UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Tese

Microcápsulas e nanoemulsões contendo óleo essencial de cravo e tomilho branco: avaliação antifúngica frente a *Penicillium digitatum* e aplicação na conservação de laranjas

Estefania Júlia Dierings de Souza
Bacharela em Química de Alimentos

Pelotas, 2023

Estefania Júlia Dierings de Souza

Microcápsulas e nanoemulsões contendo óleo essencial de cravo e tomilho branco: avaliação antifúngica frente a *Penicillium digitatum* e aplicação na conservação de laranjas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de orientação: Dra. Elessandra da Rosa Zavareze (orientadora)
Dr. Alvaro Renato Dias Guerra
Dra. Dianini Hüttner Kringel
Dr. Rufino Fernando Flores Cantillano

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

S719m Souza, Estefania Júlia Dierings de

Microcápsulas e nanoemulsões contendo óleo essencial de cravo e tomilho branco [recurso eletrônico] : avaliação antifúngica frente a *Penicillium digitatum* e aplicação na conservação de laranjas / Estefania Júlia Dierings de Souza ; Elessandra da Rosa Zavareze, orientadora ; Alvaro Renato Dias Guerra, Dianini Hüttner Kringel, Rufino Fernando Flores Cantillano, coorientadores. — Pelotas, 2023.
145 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2023.
1. Electrospraying. 2. Frutos cítricos. 3. Deterioração de alimentos. 4. Embalagem ativa. I. Zavareze, Elessandra da Rosa, orient. II. Guerra, Alvaro Renato Dias, coorient. III. Kringel, Dianini Hüttner, coorient. IV. Cantillano, Rufino Fernando Flores, coorient. V. Título.

CDD 634.394

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Estefania Júlia Dierings de Souza

Microcápsulas e nanoemulsões contendo óleo essencial de cravo e tomilho branco: avaliação antifúngica frente a *Penicillium digitatum* e aplicação na conservação de laranjas

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas

Data de defesa: 18 de dezembro de 2023.

Banca examinadora:

Profª. Dra. Elessandra da Rosa Zavareze (Orientadora) – DCTA - UFPel
Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande

Prof. Dr. André Ricardo Fajardo – CCQFA - UFPel
Doutor em Química pela Universidade Estadual de Maringá

Profª Dra Cristiana Lima Dora – ICB - FURG
Doutora em Farmácia pela Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra – DCTA - UFPel
Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Drª. Laura Martins Fonseca
Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

À Deus, pelo dom da vida, por iluminar meu caminho com oportunidades e pessoas que permitiram que eu chegasse até aqui, e também pelos obstáculos, que me fizeram crescer.

À minha primeira família, em especial à minha mãe Verani e ao meu pai Irineu, as pessoas mais importantes da minha vida, meus maiores incentivadores, pelo amor, carinho e apoio e por renunciar de tantas coisas para me deixar a maior herança, o estudo. Aos meus irmãos Estéfano e Estanislau, que foram muito importantes no desenvolvimento durante nossa convivência na infância (apesar de todos os arranca rabos), e que me possibilitaram ter a experiencia de ser tia dos anjinhos Otto, Maria Eduarda e Allana. Às minhas cunhadas, que juntos aos meus irmãos possibilitaram a formação de uma grande família.

À minha segunda família, que eu escolhi formar: meu marido Alex e meu filho Miguel, por todo o amor, carinho e apoio em todos os momentos. Vocês são meu combustível diário, os que me impulsionam a sempre seguir em frente, tentando ser uma pessoa melhor a cada dia.

À família que me acolheu aqui em Pelotas, minha sogra, cunhados e sobrinhos. Entre deboches, brincadeiras, churrascos e gritaria tornam essa caminhada da vida mais leve e divertida.

A minha orientadora Elessandra Zavareze, por quem tenho grande admiração. Agradeço por todos os ensinamentos profissionais e pessoais, pela enorme compreensão em toda essa trajetória, mas acima de tudo pela confiança depositada em mim. Ao meu co-orientador Álvaro Guerra Dias, pela confiança e pelos conhecimentos trocados ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Além dos momentos de descontração proporcionados, o que tornou essa caminhada muito mais agradável.

A minha co-orietadora, grande amiga e comadre Dianini. Que alegria a minha em a vida ter se encarregado de nos aproximar neste momento da vida. Agradeço todo apoio durante esta caminhada, aos inúmeros áudios trocados para discutirmos as questões de trabalho e para podermos dividir as angústias e as alegrias de nossa vida. Apesar de toda distância física, podemos ser presença a apoio uma para a outra. Tu és uma inspiração para mim.

Ao meu co-orientador Rufino, pela possibilidade desta parceria de trabalho, pela confiança e pelos conhecimentos trocados ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Aos pesquisadores Bernardo Ueno e Roberto Pedroso da EMBRAPA Clima temperado que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Cristina Dora Lima, da FURG, que abriu as portas para estabelecermos uma parceria para viabilizar parte deste trabalho. Obrigada por depositar um voto de confiança.

Aos meus colegas e amigos do LabBioNano e dos demais laboratórios do DCTA e do CCQFA que fizeram parte de minha caminhada de tantos anos. Ter vocês no dia-a-dia para compartilhar as ideias, as angústias, os surtos, as comilanças e todas as parcerias para executar os trabalhos foi muito importante. Com certeza a caminhada foi mais leve e feliz.

Aos professores Eliezer Gandra, Michele Greque, André Fajardo, César Rombaldi, que foram acessíveis ao conceder uma parceria, um voto de confiança para a realização de partes indispensáveis deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, e seus professores, pela colaboração e oportunidade concedida.

A CAPES pelo apoio financeiro indispensável para a execução do projeto.

Resumo

Souza, Estefania Júlia Dierings. **Microcápsulas e nanoemulsões contendo óleo essencial de cravo e tomilho branco: avaliação antifúngica frente a *Penicillium digitatum* e aplicação na conservação de laranjas**. 2023. 145 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

A encapsulação de óleos essenciais na forma de cápsulas ou emulsões possibilita sua proteção contra agentes externos, representando tecnologias promissoras para extensão da vida útil de frutas. Inicialmente objetivou-se realizar um screening de óleos essenciais (OEs) de diferentes fontes botânicas (cravo, tomilho branco, *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus staigeriana*, bergamota, laranja doce, mandarina verde e limão siciliano) para avaliar a ação antifúngica frente a *Penicillium digitatum*, por dois métodos de ação: ação de contato direto e ação dos voláteis. Os OEs foram avaliados quanto a composição química e ao perfil de compostos voláteis. Óleo essencial de tomilho branco (OETB), óleo essencial de cravo (OEC) e de *Eucalyptus citriodora* apresentaram 100% de inibição do crescimento micelial fúngico com concentrações ≤ 2μL.mL^{-1}. Os OEs de fontes cítricas (mandarina verde, laranja doce, limão siciliano e bergamota) não foram capazes de inibir o crescimento micelial fúngico, nem nas maiores concentrações testadas por contato direto. Além disso, os OEs de fontes cítrica estimularam o crescimento fúngico, quando avaliada a ação por voláteis. Em posse destes resultados, foram escolhidos os OEs de cravo e tomilho branco para ser encapsulados nos estudos seguintes. As microcápsulas, produzidas a partir de amido anidrido octenil succínico (OSA), pela técnica de *electrospraying*, foram adicionadas de diferentes concentrações de OEC e OETB. Elas apresentaram formato esférico, uniforme, sem fissuras e diâmetro médio micrométrico. A atividade antifúngica, com redução do crescimento micelial de *P. digitatum,* foi aumentada com o aumento do percentual de OEC e OETB adicionado às microcápsulas. Finalmente objetivou-se desenvolver nanoemulsões adicionadas de diferentes concentrações de OEC e OETB, além da combinação destes OEs (OECTB) e avaliar sua estabilidade e atividade antifúngica durante 150 dias de armazenamento. Nanomulsões estáveis foram formadas com a adição de 1,5 e 2% de OETB ou OECTB, com alta atividade antifúngica durante todo o tempo de armazenamento. Porém, somente a nanoemulsão com 2% de OETB foi capaz de inibir em 100% o crescimento micelial de *P. digitatum* até o 150º dia do armazenamento. Esta nanoemulsão, estável durante todo o tempo de armazenamento e com atividade antifúngica comprovada *in vitro* foi aplicada *in situ* em frutos de laranja. Os resultados obtidos na aplicação, confirmaram o potencial antifúngico avaliado *in vitro*, uma vez que a aplicação da nanoemulsão na superfície de laranjas reduziu a incidência de frutos que apresentaram degradação fúngica. Dessa forma, o encapsulamento de OEC e OETB em microcápsulas e nanoemulsões é uma alternativa promissora e viável para aplicação como embalagens ativas no controle de podridão causada por *P. digitatum* na pós-colheita de frutas cítricas.

Palavras chave: *Electrospraying*. Frutos cítricos. Deterioração de alimentos. Embalagem ativa.

Abstract

Souza, Estefania Júlia Dierings. **Microcapsules and nanoemulsions containing clove and white thyme essential oil: antifungal evaluation against *Penicillium digitatum* and application in orange preservation.** 2023. 145 f. Thesis (PhD degree in Food Science and Technology) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

The encapsulation of essential oils in the form of capsules or emulsions enables their protection against external agents, representing promising technologies for extending the shelf life of fruits. Initially, the objective was to carry out a screening of essential oils (EOs) from different botanical sources (clove, white thyme, *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus staigeriana*, bergamot, sweet orange, green mandarin, and sicilian lemon) to evaluate the antifungal action against *Penicillium digitatum*, by two methods of action: direct contact action and volatile action. The EOs were evaluated for their chemical composition and volatile compound profile. White thyme essential oil (WTEO), clove essential oil (CEO), and *Eucalyptus citriodora* showed 100% inhibition of fungal mycelial growth with concentrations ≤ 2μL.mL^{-1}. EOs from citrus sources (green mandarin, sweet orange, sicilian lemon, and bergamot) were not able to inhibit fungal mycelial growth, even at the highest concentrations tested by direct contact. Furthermore, EOs from citrus sources stimulated fungal growth when evaluating the action of volatiles. Based on these results, the EOs of clove and white thyme were chosen to be encapsulated in the following studies. The microcapsules, produced from octenyl succinic anhydride starch (OSA), by *electrospraying*, were added with different concentrations of CEO and WTEO. They had a spherical, uniform shape without cracks and an average micrometric diameter. The antifungal activity, with a reduction in the mycelial growth of *P. digitatum*, was increased with the increase in the percentage of CEO and WTEO added to the microcapsules. Finally, the objective was to develop nanoemulsions added with different concentrations of CEO and WTEO, in addition to the combination of these OEs (CWTEO), and evaluate their stability and antifungal activity during 150 days of storage. Stable nanomulsions were formed with the addition of 1.5 and 2% WTEO or CWTEO, with high antifungal activity throughout the storage time. However, only the nanoemulsion with 2% WTEO was able to inhibit *P. digitatum* mycelial growth by 100% up to the 150th day of storage. This nanoemulsion, stable throughout the storage period and with proven antifungal activity *in vitro*, was applied *in situ* in orange fruits. The results obtained from the application confirmed the antifungal potential evaluated *in vitro* since the application of the nanoemulsion on the surface of oranges reduced the incidence of fruits that showed fungal degradation. Therefore, the encapsulation of CEO and WTEO in microcapsules and nanoemulsions is a promising and viable alternative for application as active packaging to control rot caused by *P. digitatum* in post-harvest citrus fruits.

Keywords: Electrospraying. Citrus fruits. Food spoilage. Active packaging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo de uma estação de *electrospraying* para produção de cápsulas..28
Figura 2 - Estrutura do amido modificado com Octenil Sucínico Anidrido. 33
Figura 3 - Cromatogramas de óleos essenciais de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus staigeriana*, cravo, *Eucalyptus citriodora*, limão siciliano, bergamota, laranja doce e mandarina verde por análise CG-MS. 44
Figura 4 - Dendrogamma de compostos voláteis dos óleos essenciais OEs de tomilho branco, cravo, *Eucalyptus citriodora* e melaleuca. 55
Figura 5 - Morfologia do amido-OSA e das microcápsulas de amido obtidas por *electrospraying*. a – OEC 2%; b – OEC 3%; c – OEC 4%; d – OETB 2%; e – OETB 3%; f – OETB 4%; g – controle; h – amido-OSA 75
Figura 6 - Distribuição de frequência do diâmetro do amido-OSA e das microcápsulas de amido obtidas por *electrospraying*. a – OEC 2%; b – OEC 3%; c – OEC 4%; d – OETB 2%; e – OETB 3%; f – OETB 4%; g – controle; h – amido-OSA. 76
Figura 7 - Espectros de FTIR de óleo de cravo, de tomilho branco e amido-OSA (a) e das cápsulas de amido-OSA, com e sem OE, obtidas por *electrospraying.* 79
Figura 8 - Curvas TG (a) e curvas DTG (b) obtidas para amido-OSA e microcápsulas de amido adicionadas de óleos essenciais de cravo e tomilho branco. 82
Figura 9 - Imagem da estabilidade das nanoemulsões produzida com amido-OSA e óleo essencial de cravo e tomilho branco 98
Figura 10 - Potencial zeta, tamanho de partícula e índice de polidispersão das nanoemulsões de amido-OSA e óleo essencial de cravo e tomilho branco durante 150 dias de armazenamento. 99
Figura 11 - Morfologia da nanoemulsão com 2% de óleo essencial de tomilho branco observada por microscopia eletrônica de transmissão (a) e por microscopia confocal de varredura a laser (b) 101
Figura 12 - Atividade antifúngica frente a *Penicillium digitatum* de nanoemulsões desenvolvidas com amido-OSA e óleo essencial de cravo e tomilho branco avaliadas em até 150 dias de armazenamento. 102
Figura 13 - Imagem da estabilidade das nanoemulsões produzidas com amido-OSA e óleo essencial de cravo. 140

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classes e exemplos de compostos presentes em óleos essenciais (OEs), suas principais características e atividades biológicas que desempenham 18
Tabela 2 - Óleos essenciais testados para controle de fungos do gênero *Penicillium*. 22
Tabela 3 - Composição química dos óleos essenciais de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus staigeriana,* cravo, *Eucalyptus citriodora*, limão, bergamota, laranja doce e mandarina verde por análise CG-MS 45
Tabela 4 - Ação antifúngica pelo contato direto de diferentes óleos essenciais contra o crescimento micelial de fungo *Penicillium digitatum*.....57
Tabela 5 - Ação antifúngica por ação volátil de diferentes óleos essenciais frente ao crescimento micelial do fungo *Penicillium digitatum*.....58
Tabela 6 - Condutividade elétrica das soluções de amido-OSA e óleos essenciais de cravo e tomilho branco. 73
Tabela 7 - Capacidade de carregamento de cápsulas de amido-OSA adicionadas de óleo essencial de cravo e óleo essencial de tomilho branco 77
Tabela 8 - Atividade antifúngica das microcápsulas de amido-OSA com e sem óleo essencial. 83
Tabela 9 - Diâmetro da lesão e incidência de frutos infectados (%) em laranjas tratadas com nanoemulsão de amido-OSA e de óleo essencial de tomilho branco infectadas com *P. digitatum* em diferentes dias pós-inoculação 105
Tabela 10 - Parâmetros internos e externos de qualidade de frutos de laranja. 107
Tabela 11 - Identificação e quantificação de compostos voláteis de óleo essencial de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus citriodora* e cravo por cromatografia gasosa estática de headspace. 122
Tabela 12 - Propriedades termogravimétricas do amido-OSA, cápsulas adicionadas de diferentes concentrações de óleos essenciais de cravo e tomilho branco e sem óleo essencial. 137
Tabela 13 - Delineamento experimental para produção de nanoemulsões 139
Tabela 14 - Potencial zeta, tamanho de partícula e índice de polidispersão das nanoemulsões de amido-OSA e óleo essencial de cravo. 143

Lista de abreviaturas

Amido-OSA	Amido modificado com anidrido octenil succínico
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
CC	Capacidade de Carga
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CG	Cromatografia Gasosa
ICM	Inibição do Crescimento Micelial
MS	Espectrômetro de Massa
NE	Nanoemulsão
NEs	Nanoemulsões
OE	Óleo essencial
OEs	Óleos essenciais
OEB	Óleo essencial de bergamota
OEC	Óleo essencial de cravo
OEEC	Óleo essencial de *Eucalyptus citriodora*
OEEE	Óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana*
OELD	Óleo essencial de laranja doce
OELS	Óleo essencial de limão siciliano
OEM	Óleo essencial de melaleuca
OEMV	Óleo essencial de mandarina verde
OEs	Óleos essenciais
OETB	Óleo essencial de tomilho branco
P. digitatum	*Penicillium digitatum*
P. italicum	*Penicillium italicum*
COVs	Perfil de compostos orgânicos voláteis

SUMÁRIO

1 Introdução **13**
2 Revisão bibliográfica **16**
2.1 Óleos essenciais **16**
2.2 Atividade antifúngica de óleos essenciais frente ao fungo *Penicillium sp.* **20**
2.3 Uso de óleos essenciais na conservação de citros **25**
2.4 Encapsulação de OEs **26**
2.4.1 Técnica de *electrospraying* **27**
2.4.2 Emulsões **29**
2.5 Materiais de parede para encapsulação **31**
2.5.1 Amido-OSA **32**
3. Capítulo 1 - Potencial antifúngico de óleos essenciais de diferentes fontes botânicas frente a *Penicillium digitatum*: Composição química e mecanismos de ação antifúngica por contato direto e voláteis **34**
3.1 Introdução **36**
3.2 Materiais e métodos **38**
3.2.1 Materiais **38**
3.2.2 Composição química dos óleos essenciais **38**
3.2.3 Perfil de compostos orgânicos voláteis (COVs) por *headspace* **38**
3.2.4 Atividade antifúngica *in vitro* **39**
3.2.5 Análise multivariada **41**
3.3 Resultados e discussão **42**
3.3.1 Composição química dos OEs **42**
3.3.2 Compostos voláteis dos OEs **53**
3.3.3 Atividade antifúngica *in vitro* dos OEs **56**
3.4. Conclusão **62**
4. Capítulo 2 - Potencial antifúngico frente a *Penicillium digitatum* de óleos essenciais de cravo e tomilho branco encapsulados com amido-OSA por *electrospraying* **63**
4.1 Introdução 65
4.2 Materiais e métodos 68
4.2.1 Materiais **68**
4.2.2 Preparo das emulsões e formação de microcápsulas por *electrospraying* **68**
4.2.3 Condutividade elétrica da solução polimérica **68**

4.2.4 Morfologia das cápsulas....69
4.2.5 Capacidade de carregamento....69
4.2.6 Identificação dos grupos funcionais por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)....69
4.2.7 Análise Termogravimétrica (TGA)....70
4.2.8 Atividade antifúngica das microcápsulas....70
4.2.8.1 Ensaio de difusão de micro-atmosfera....70
4.2.8.2 Ensaio de difusão em ágar....71
4.2.9 Análise estatística....71
4.3 Resultados e discussão....72
4.3.1 Condutividade elétrica das soluções....72
4.3.2 Morfologia das cápsulas....73
4.3.3 Capacidade de carregamento....77
4.3.4 Identificação dos grupos funcionais por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)....78
4.3.5 Análise Termogravimétrica (TGA)....81
4.3.6 Atividade antifúngica....83
4.4. Conclusão....85
5. Capítulo 3 - Nanoemulsões de amido-OSA contendo óleos essenciais de cravo e de tomilho branco: atividade antifúngica *in vitro* e aplicação em laranjas (*Citrus sinensis* cv. Salustiana)....86
5.1 Introdução....88
5.2 Materiais e métodos....91
5.2.1 Materiais....91
5.2.2 Preparo das nanoemulsões (NEs)....91
5.2.3 Estabilidade das nanoemulsões....91
5.2.3.1 Separação de fase....92
5.2.3.2 Distribuição do tamanho de partículas, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ)....92
5.2.4 Morfologia das nanoemulsões....92
5.2.5 Atividade antifúngica *in vitro* das nanoemulsões....93
5.2.6 Ensaio antifúngico *in situ*....93
5.2.7 Avaliação de qualidade das laranjas....94
5.2.8 Análise estatística....94

5.3 Resultados e discussão.....95
5.3.1 Estabilidade das nanoemulsões.....95
5.3.2 Morfologia das nanoemulsões.....100
5.3.3 Atividade antifúngica *in vitro* das nanoemulsões.....102
5.3.4 Ensaio antifúngico *in situ*.....105
5.3.5 Avaliação de qualidade das laranjas.....106
5.4 Conclusão.....108
5. Considerações finais.....109
Referências bibliográficas.....110
Apêndice A.....122
Apêndice B.....137
Apêndice C.....138

1 Introdução

As frutas cítricas estão entre as frutas mais importantes do mundo e representam o terceiro produto agrícola mais comercializado, sendo as laranjas as responsáveis pela maior parte da produção mundial de citros, seguido das mandarinas (HU et al., 2019). O Brasil é o maior produtor de laranjas, com estimativa de produção de 16,75 milhões de toneladas para a safra 2023/24 (USDA, 2023).

As perdas pós-colheita são fatores essenciais que afetam o tempo de armazenamento de frutas e hortaliças, sendo responsáveis por significativos prejuízos financeiros em toda a cadeia produtiva (JUGREET et al., 2020). Dentre as principais causas das perdas pós-colheita de frutas cítricas destacam-se as doenças fúngicas. Ferimentos causados pelo manuseio no campo ou nas etapas subsequentes após a colheita são os principais responsáveis pela contaminação dos frutos, uma vez que permitem a entrada de patógenos (SIMAS et al., 2017). As frutas cítricas são comumente suscetíveis a ataques fúngicos, incluindo os causadores de mofos verdes e azuis, o *Penicillium digitatum* (*P. digitatum*) e *Penicillium italicum* (*P. italicum*), respectivamente (ELBARBARY et al., 2023). O *P. digitatum* é reconhecido como o patógeno pós-colheita mais problemático pelo fato de ser um fungo mesófilo, com proliferação em temperatura ótima de 20 a 30°C (SIMAS et al., 2017), normalmente utilizada na comercialização de citros.

Os métodos tradicionais utilizados para prevenir o crescimento fúngico em citros frequentemente envolvem o uso de agentes químicos sintéticos, conhecidos como fungicidas (como por exemplo, imazalil, procloraz e tiabendazol) (ALVAREZ et al., 2023; CHEN et al., 2019). No entanto, as crescentes exigências dos consumidores por produtos mais naturais têm impulsionado cada vez mais o uso de óleos essenciais (OEs) como agentes antifúngicos (JI et al., 2019). Contudo, ainda existem limitações em relação à aplicação de OEs em alimentos, em virtude de seus sabores e aromas acentuados, que podem afetar negativamente o aspecto sensorial do produto (JI et al., 2019). Uma alternativa para minimizar este problema é o uso de técnicas de encapsulação, utilizando estes compostos na forma de nanoemulsões (DÁVILA-RODRÍGUEZ et al., 2019) e nanocápsulas (BIDUSKI et al., 2019) com o intuito de mascarar os efeitos sensoriais indesejáveis, garantir proteção frente a condições ambientais adversas, além de garantir a liberação controlada de seus componentes voláteis (JI et al., 2019).

Para obter emulsões em escala nanométrica podem ser empregadas técnicas de alta energia (homogeneização a alta pressão, microfluidização e sonicação) ou abordagens de baixa energia (inversão de fase e emulsificação espontânea) (FRANKLYNE et al., 2019). Nanoemulsões contendo OEs vem sendo aplicadas em diferentes alimentos, tais como no controle microbiológico de morango (NASERZADEH; MAHMOUDI; PAKINA, 2019), de folhas de mostarda vermelha (KANG; SONG, 2018), de suco de goiaba, maçã e manga (FRANKLYNE et al., 2019), de aipo fresco (DÁVILA-RODRÍGUEZ et al., 2019), de laranja minimamente processada (RADI et al., 2018) porém, sua aplicação como método de conservação em alimentos ainda enfrenta limitações, principalmente quando aplicada para o controle fúngico em frutas cítricas.

Outra técnica que permite a obtenção de estruturas nanométricas, na forma de cápsulas, é a eletropulverização (do inglês, *electrospraying*) (LIM; MENDES; CHRONAKIS, 2019). O uso desta técnica permite a encapsulação de compostos utilizando polímeros de baixo custo como materiais de parede, como os amidos modificados, evitando também o uso de solventes tóxicos, sendo, portanto, adequados para uso alimentício (SOUZA et al., 2021). Além disso, a eletropulverização como técnica de encapsulação apresenta inúmeras vantagens, tais como o uso de temperatura ambiente, o que evita assim a decomposição de compostos ativos termo sensíveis, a produção de compostos encapsulados em tamanho nanométrico, o que permite sua incorporação em sistemas alimentares sem afetar a qualidade sensorial do produto (LIM; MENDES; CHRONAKIS, 2019).

No processo de eletropulverização diversos materiais podem ser utilizados como materiais de parede, tais como o amido. Porém em seu estado nativo, o amido apresenta característica hidrofílica, dificultando a encapsulação de substâncias de caráter hidrofóbico, como os óleos essenciais (LIM; MENDES; CHRONAKIS, 2019). A modificação do amido com anidrido octenil succínico (amido-OSA) permite produzir um polissacarídeo anfifílico que apresenta a capacidade de estabilizar emulsões óleo-em-água, devido à combinação da hidrofobicidade do grupo octenil com os grupos hidrofílicos carboxila (ALTUNA; HERRERA; FORESTI, 2018).

As nanoemulsões e as nanocápsulas representam alternativas promissoras na extensão da vida útil de frutas e hortaliças; contudo, estes sistemas ainda precisam ser melhor explorados para aplicação em frutas cítricas. O objetivo do presente trabalho é a encapsulação de óleos essenciais na forma de cápsulas e nanoemulsões,

para aplicação em laranjas, visando inibir a ação de fungos do gênero *Penicillium digitatum*, aumentar a vida útil dos frutos e agregar valor à cadeia produtiva de citros.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Óleos essenciais

Em decorrência do aumento de questionamentos com relação à segurança do uso de conservantes sintéticos em alimentos, percebe-se uma crescente tendência na busca por substâncias alternativas obtidas de fontes naturais, que sejam capazes de prolongar a vida útil dos alimentos, como por exemplo, os óleos essenciais (BORA et al., 2020). Os OEs são compostos secundários produzidos em diferentes partes de plantas medicinais e aromáticas (folhas, cascas, ramos, flores, raízes, frutos, sementes e cascas) (ELGAT et al., 2020). A extração de OEs pode ser realizada através de vários métodos, sendo a hidrodestilação e a destilação a vapor os métodos mais comuns; porém, infusão aquosa, extração por solvente, prensagem a frio ou quente, extração por fluido supercrítico e extração assistida por micro-ondas também são alternativas viáveis para extração destes compostos (ASBAHANI et al., 2015; JUGREET et al., 2020).

Os OEs consistem em compostos lipofílicos, aromáticos e voláteis formados por misturas complexas de terpenos, terpenoides, carotenoides, cumarinas, corpos cetônicos, curcuminas, aldeídos, fenóis (ATAEI et al., 2020). Na Tabela 1 estão apresentados as classes e principais exemplos de compostos presentes em OE, suas principais características e as atividades biológicas que desempenham.

Diversas aplicações nas indústrias farmacêutica, cosmética, agrícola e alimentícia são possíveis devido às inúmeras propriedades bioativas dos OEs, como ação antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, antidiabéticas, inseticidas, antifúngicas, antitumoral, antibacterianas, dentre outras (ATAEI et al., 2020; BORA et al., 2020; CHEN et al., 2019; ELGAT et al., 2020). Porém, cada propriedade bioativa pode ser potencializada por algum dos inúmeros compostos presente em cada OE. Para aplicação em alimentos ou embalagens, é importante que sejam considerados inúmeros fatores, como o agente a ser combatido, a composição química do OE, a concentração de OE a ser aplicada, visando a promoção de benefícios sem que sejam perceptíveis interferências negativas em aroma ou sabor do produto (ATAEI et al., 2020; XU et al., 2021). No entanto, a aplicação dos OEs de maneira direta é limitada e pode ser ineficiente em longo prazo, devido à sua instabilidade durante o processamento e estocagem. Além disso, os OEs normalmente apresentam inúmeros compostos que são voláteis e evaporam rapidamente (XU et al., 2021).

Dessa forma, buscam-se alternativas que permitam proteger os OEs com intuito de minimizar sua evaporação e degradação pela ação de altas temperaturas e exposição a luz, além de permitir sua liberação lenta e controlada e potencial o efeito de ação biológica, sem interferências sensoriais negativas quando aplicado em alimentos. A encapsulação em dispositivos poliméricos (sintéticos ou naturais) (BIDUSKI et al., 2019; YILMAZ et al., 2019), desenvolvimento de filmes (REHMAN et al., 2020), formação de revestimentos comestíveis (GONZÁLEZ-REZA et al., 2018), emulsões ou nanoemulsões (CHEN et al., 2019; FRANKLYNE et al., 2019) são alguns dos exemplos capazes de garantir a proteção e aplicação dos OEs em alimentos.

Tabela 1 - Classes e exemplos de compostos presentes em óleos essenciais (OEs), suas principais características e atividades biológicas que desempenham

Classe de compostos	**Características/exemplos**	**Bioatividade**
Hidrocarbonetos	Contém apenas moléculas de hidrogênio e carbono. Classificados em terpenos: mono-, sesqui- e di-terpenos (C10, C15 e C20, respectivamente) Pode ser acíclico, aliciclico (mono-, bi- ou tri-cíclico) ou aromático Ex.: limoneno, pineno, mirceno, sabineno, felandreno, cimeno, cadineno, fencano, farneseno	Antibacteriano, antiviral, antitumoral, descongestionante, estimulante, hepatoprotetor
Óxidos	Responsáveis por odores mais fortes 1,8 - cineol é o óxido mais comum, devido à sua ampla ocorrência em muitos OEs Ex.: óxido de linalol, ascaridol, óxido de bisabolona e óxido de esclareol	Expectorante, anti-inflamatório, estimulante
Lactonas	Apresentam alto peso molecular Geralmente presente em óleos prensados Ex.: alantrolactona, bergapteno, psoraleno, costuslactona, esculatina, citropteno, nepetalactona, diidronepetalactona	Antiviral, antimicrobiano, analgésico, antipirético, sedativo, hipotensivo
Ésteres	Geralmente encontrado em muitos OEs Cheiro doce; dando um cheiro agradável para o OE Ex.: acetato de eugenol, acetato de geranila, acetato de bornila, acetato de linalila	Anti-inflamatório, antiespasmódico, sedativo, antifúngico, anestésico
Álcoois	Além de seu aroma agradável, esses constituintes apresentam os maiores benefícios terapêuticos sem qualquer contraindicação relatada Ex.: linalol, citronelol, nerol, geraniol, borneol, mentol, santalol	Anestésico, anti-inflamatório, antimicrobiano, antisséptico, espasmolítico, tonificante

Tabela 1 - Classes e exemplos de compostos presentes em óleos essenciais (OEs), suas principais características e atividades biológicas que desempenham

(conclusão)

Classe de compostos	Características/exemplos	Bioatividade
Fenóis	Esses componentes aromáticos estão entre os mais reativos São potencialmente tóxicos e podem causar irritação, principalmente na pele e nas membranas mucosas Embora mais pronunciadas, suas propriedades são idênticas aos álcoois Geralmente são cristais em temperatura ambiente Ex.: timol, carvacrol, eugenol, chavicol	Antimicrobiano, espasmolítico, anestésico, irritante, estimulante imunológico
Cetonas	Não muito comum em OEs, sem importância em sabores ou fragrâncias São relativamente estáveis e não são metabolizados facilmente pelo fígado devido à sua estabilidade Podem ser neurotóxico e abortivo, em alguns casos, como a tujona e cânfora Ex.: pulegone, mentona, carvona, cânfora, verbenona, fenchone, tujona	Mucolítico, regeneração celular, sedativo, antiviral, neorotóxico, analgésico, digestivo, espasmolítico
Aldeídos	Componentes comuns em OE São instáveis e oxidam facilmente Muitos deles podem causar irritação nas membranas mucosas, bem como sensibilidade da pele São caracterizados por um cheiro frutado agradável e suave e podem ser encontrados em especiarias como canela e cominho Ex.: benzaldeído, citronela, cinamaldeído, mirtenal, citral (geranial e neral)	Antimicrobiano, antiviral, antipirético, calmante, hipotensor, sedativo, espasmolítico, tônico, vasodilatador

FONTE: DJILANI; DICKO, 2012; JUGREET et al., 2020.

2.2 Atividade antifúngica de óleos essenciais frente ao fungo *Penicillium sp.*

Dentre as inúmeras atividades biológicas encontradas em OEs serão destacadas nesta seção as ações antifúngicas, com enfoque em fungos do gênero *Penicillium sp.*, principais causadores de perdas pós-colheita na cadeia produtiva de citros. Dentre entres, o *Penicillium italicum* é o responsável pela podridão azul, e o *Penicillium digitatum* causa a podridão verde (SUMALAN et al., 2020; TAO; JIA; ZHOU, 2014).

Os OEs apresentam excelentes resultados contra fitopatógenos pois são produtos naturais seguros para a saúde humana e para o ecossistema (quando administrados de maneira correta e em dosagem segura), além de produzirem baixos níveis de resíduos rastreáveis e apresentarem menor chance de induzir resistência aos patógenos por conter diversos compostos voláteis, além do mecanismo de ação diferente atribuído a cada substância (KANASHIRO et al., 2020).

A ação antimicrobiana e antifúngica dos OEs pode ser devido a quatro possíveis mecanismos de ação: interferência na estrutura celular; interferência na biossíntese celular; inibição do mecanismo de energia e interrupção de uma gama de vias bioquímicas. Devido à sua natureza hidrofóbica, os OEs podem causar, modificações estruturais nos fungos e variações morfológicas das hifas, inibindo consequentemente a germinação dos conídios (AGUILAR-VELOZ et al., 2020). De forma geral, os OEs podem provocar mudanças físicas, químicas ou bioquímicas nos microrganismos, e diferentes constituintes são capazes de atuar por mecanismos distintos, em virtude das inúmeras interações possíveis (ATAEI et al., 2020; CHEN et al., 2019). Porém, fatores como temperatura, pH, composição do meio, forma e tempo de contato também interferem para potencializar ou inibir a ação antifúngica dos OEs (JUGREET et al., 2020).

O sucesso da aplicação de OE como fontes alternativas aos fungicidas sintéticos depende de inúmeros fatores, a citar: a fonte botânica, a concentração aplicada, a subespécie do fungo, a forma de aplicação (se aplicado direto/puro, diluído ou na fase vapor) (CHEN et al., 2019; HE et al., 2016; ROCHA NETO et al., 2019; SUMALAN et al., 2020; TAO; JIA; ZHOU, 2014). Na Tabela 2 são apresentados estudos realizados com diferentes OEs, aplicados *in vitro* ou *in vivo*, para controle ou inibição do desenvolvimento de fungos do gênero *Penicilllium sp.*

Recentemente, inúmeras pesquisas estão sendo direcionadas também na caracterização e aplicação de componentes específicos isolados dos OEs para avaliar

as suas propriedades antifúngicas. De forma geral, a maioria dos constituintes dos OEs responsáveis pelas ações biológicas são fenóis, seguidos por terpenoides oxigenados. Compostos como timol, eugenol e carvacrol, encontrados em OEs de tomilho, cravo, canela e orégano, apresentam alto potencial antimicrobiano e antifúngico, desempenhando uma ação mais eficaz do que a encontrada em terpenos e outros compostos (AGUILAR-VELOZ et al., 2020). Porém, alguns compostos isolados apresentam menor efeito antifúngico quando comparados aos OEs, fato este atribuído a ação sinérgica entre os diferentes compostos presentes nos OEs (JUGREET et al., 2020).

Compreender o papel biológico de cada molécula na interação patógeno-hospedeiro é essencial para o desenvolvimento de métodos de controle em larga escala mais eficazes, atóxicos e economicamente viáveis (KANASHIRO et al., 2020). Porém, é imprescindível incrementar as práticas *in situ* em condições semi-controladas ou reais de produção (AGUILAR-VELOZ et al., 2020). Além disso, considerar o valor das estratégias de preservação combinando à nanotecnologia em sistemas de embalagens ativas ou inteligentes, estudos de modelagem, aspectos legais, questões de segurança e otimização de técnicas precisam ser levados em consideração em pesquisas futuras.

Tabela 2 - Óleos essenciais testados para controle de fungos do gênero *Penicillium*.

(continua)

Fonte de OE	Objetivo do estudo	Resultados obtidos	Referência
Hortelã (*Mentha piperita*), manjericão (*Ocimum basilicum*) e lavanda (*Lavandula angustifólia*)	Aplicar, *in vivo*, na forma de vapor OE de hortelã, manjericão e lavanda para conservação de limão frente a *P. digitatum*	Todos OEs aplicados em fase de vapor foram eficientes para reduzir o crescimento fúngico em 7 dias de armazenamento. Os OEs de manjericão e de lavanda necessitam de menores concentrações (46 e 86 µL L^{-1}) para produzir resultados positivos.	Sumalan *et al*. (2020)
Cravo da índia (*Syzygium aromaticum*)	Desenvolver microemulsões com OE de cravo e aplicar em laranja de umbigo para controle do mofo verde (*P. digitatum*) por contato direto e fase vapor	As microemulsões exibiram uma atividade inibitória de crescimento do fungo tanto em contato direto como em fase vapor quando comparadas ao óleo puro.	He *et al*. (2016)
Botões de flores de cravo (*Eugenia caryophllata*)	Investigar *in vitro* a ação de OE de cravo e desenvolver um revestimento de CMC para aplicar em tangerinas	*In vitro: P. italicum* e *P. digitatum* foram completamente inibidos quando a concentração de óleo de cravo atingiu 1.000 e 2000 µL L^{-1} (v/v) *In vivo*: A adição de óleo de cravo ao revestimento de CMC apresentou efeito inibitório no crescimento de fungos, quando comparado ao revestimento de CMC sozinho	Chen *et al.* (2016)
Eucalipto (*Eucalyptus globulus*)	Estudar o efeito in vitro do OE *globulus* sobre o fungo *Penicillium sp*	O OE de eucalipto demonstrou atividade antifúngica sobre o patógeno *Penicillium sp*. tanto na fase vegetativa, através do controle no crescimento micelial, quanto na fase reprodutiva, na produção e germinação de esporos.	Piati; Schneider; Holanda Nozaki (2011)

Tabela 2 - Óleos essenciais testados para controle de fungos do gênero *Penicillium*.

(continuação)

Fonte de OE	**Objetivo do estudo**	**Resultados obtidos**	**Referência**
Cardamomo (*Elettaria cardamomum*), cravo (*Eugenia caryophyllus*), copaíba (*Copaifera officinalis*), cipreste (*Cupressus sempervirens*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), gengibre (Zingiber officinale), hortelã (*Mentha piperita*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), palmarosa (*Cymbopogon martinii*), patchouli (*Pogostemon cablin*), laranja-azeda (*Citrus aurantium*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), sálvia (*Salvia sclarea*), anis estrelado (*Illicium verum*) e vetiver (*Vetiveria zizanoides*)	Avaliar *in vitro* a ação da fase vapor de diferentes OEs frente ao fungo *P. expansum*	As menores concentrações capazes de inibir completamente a germinação de *P. expansum* pela fase de vapor foram observadas pelo OE de anis estrelado (0,125 g L^{-1}), melaleuca e palmarosa (0,25 g L^{-1}).	Rocha Neto *et al.* (2019)
Salvia (*Salvia Officinalis*)	Avaliar a atividade *in vitro* e *in vivo* do OE de sálvia frente a *Penicillium*	*In vitro*: No primeiro dia de inoculação o OE (10 µL) foi capaz de reduzir o crescimento micelial do fungo, porém não apresentou efeito inibidor com o passar dos dias. *In vivo*: OE de salvia não apresentou efeito inibidor sobre o fungo *Penicillium* e destruiu o tecido das laranjas	Denisa; Ioannis; Liviu (2014)
Citrus reticulata Blanco	Investigar *in vitro* o efeito do OE sobre o crescimento micelial de *P. italicum* e *P. digitatum*	O OE inibiu o crescimento micelial dos fungos de maneira dose-dependente. Para inibição total de crescimento de *P. italicum* e *P. digitatum* foram necessárias 2,5 e 40 µL mL^{-1}, respectivamente.	Tao; Jia; Zhou (2014)

Tabela 2 - Óleos essenciais testados para controle de fungos do gênero *Penicillium*.

(conclusão)

Fonte de OE	**Objetivo do estudo**	**Resultados obtidos**	**Referência**
Cravo da índia (*Syzygium aromaticum*)	Investigar *in vivo* a eficácia do OE contra *P. italicum*	OE de cravo inibiu o desenvolvimento de *P. italicum* quando aplicado de 0,05% a 0,8% (v/v), e a concentração efetiva foi obtida em 0,4% (v/v)	Chen *et al*. (2019)

OE: óleo essencial; CMC: Carboximetilcelulose.

Fonte: Autor (2023).

2.3 Uso de óleos essenciais na conservação de citros

Durante o armazenamento, as frutas e hortaliças estão frequentemente sujeitos a vários níveis de decomposição microbiana, principalmente devido a fungos patogênicos e deteriorantes que geralmente infectam o hospedeiro por meio de feridas sofridas durante a colheita, manuseio e / ou processamento (BOUBAKER et al., 2016; KANASHIRO et al., 2020).

Atualmente, as frutas cítricas destinadas ao armazenamento de longo prazo geralmente contam com o uso de fungicidas químicos como imazalil, procloraz, tiabendazol, fludioxonil, pirimetanil ou diferentes misturas desses compostos (KANASHIRO et al., 2020). No entanto, seu uso é cada vez mais restrito devido a preocupações com o impacto potencialmente prejudicial à saúde humana, poluição ambiental e desenvolvimento de patógenos resistentes a fungicidas. Dessa forma, tratamentos alternativos considerados mais seguros e ecologicamente corretos ganham espaço no controle de patógenos durante a pós colheita de frutas cítricas (AGUILAR-VELOZ et al., 2020; CHEN et al., 2016).

Inovações na preservação de produtos hortícolas podem ser alcançadas por três direções: (1) introdução de agentes de biocontrole, como leveduras e bactérias, (2) uso de OEs de plantas, (3) métodos físicos como fumigação com dióxido de enxofre, uso de ozônio ou técnicas mistas (SUMALAN et al., 2020). Apesar do aumento do interesse de aplicação de OEs para prolongar a vida útil de frutas cítricas, até o momento, poucas pesquisas sobre a efetiva aplicação de OES nestas frutas foram relatadas. Ao avaliar a fase de vapor de OEs, Sumalan et al. (2020) perceberam que OE de manjericão tem maior eficiência do que os OEs de lavanda e de menta, necessitando de uma menor concentração pelo mesmo período de tempo de aplicação. Chen et al. (2019) aplicaram uma emulsão com OE de cravo-da-índia para controlar o mofo azul pós-colheita causado por *P. italicum* em frutas cítricas e perceberam que o aumento da concentração de OE na emulsão permitiu um maior controle do crescimento fúngico e diminuiu a taxa de gravidade da doença nos frutos.

Demais pesquisas relatadas na literatura reportam a avaliação da atividade antifúngica *in vitro* frente a *P. italicum e P. digitatum* provenientes de frutas cítricas. Tao; Jia; Zhou (2014) reportaram a inibição total do crescimento micelial de *P. italicum e P. digitatum* aplicando OE de *Citrus reticulata Blanco*, nas concentrações de 2,50 e 40,0 μL mL^{-1}, respectivamente. Boubaker et al. (2016) também obtiveram resultados

promissores para inibir o crescimento micelial de *P. digitatum* e *P. italicum* quando aplicado OEs de diferentes espécies de tomilho.

Um aspecto muito positivo do uso de OEs como antifúngicos é a menor probabilidade de desenvolvimento de cepas resistentes, problema frequentemente reportado ao uso de fungicidas sintéticos; este fato pode ser justificado pela presença e interação sinérgica de vários componentes ativos nos OEs (KANASHIRO et al., 2020). Por outro lado, apesar da consolidada atividade antifúngica de OEs, um problema relatado pelos estudos têm sido a diminuição da concentração de seus compostos bioativos devido à sua rápida evaporação (SUMALAN et al., 2020), o que consequentemente afeta sua eficácia. Neste sentido, técnicas de encapsulação de óleos essenciais surgem como alternativas para manutenção de suas propriedades antifúngicas (DAS et al., 2022).

2.4 Encapsulação de OEs

O uso de técnicas de encapsulação tem sido amplamente empregado para manter as atividades biológicas de OEs durante o processamento e desenvolvimento de produtos alimentícios e de embalagens (TAVARES et al., 2022). A encapsulação é definida como o processo em que ocorre o aprisionamento/retenção de uma substancia (agente ativo) dentro de outra substancia (material transportador ou de parede) (RADÜNZ et al., 2019). É uma técnica utilizada com diversos objetivos, tais como (1) diminuir ou retardar a evaporação ou taxa de transferência do componente ativo aprisionado em seu ambiente externo; (2) manter as características físico-químicas do material do núcleo e da parede; (3) controlar a entrega e liberação do material do núcleo; (4) mascarar o aroma e sabor desagradáveis do material do núcleo; (5) separar os componentes de uma mistura e evitar a reação com outra, e tornar os compostos bioativos mais fáceis de manusear durante o transporte e armazenamento de produtos na forma de pó; (6) aumentar sua estabilidade térmica e oxidativa; (7) possibilitar o aumento da solubilidade dos compostos hidrofóbicos para facilitar sua incorporação em sistemas com característica hidrofílica (SAIFULLAH et al., 2019; TAVARES et al., 2022).

Dentre as técnicas de encapsulação podem ser citadas: *spray-drying*, emulsificação, eletrofiação, coacervação, polimerização *in situ*, gelificação iônica, inclusão molecular e inclusão em lipossomas (RADÜNZ et al., 2019; SHISHIR et al., 2018; TAVARES et al., 2022). Além da escolha da técnica apropriada, é de extrema

importância considerar o material de parede ou encapsulante a ser utilizado. No setor alimentício, a maioria dos materiais utilizados como material de parede são polímeros de carboidratos (amido, quitosana, pectina, alginato, xantana, maltodextrina), proteínas (proteína de soro de leite, proteína de soja, zeína), lipídios (gordura de palma, cera de carnaúba) e outros materiais orgânicos e inorgânicos (SAIFULLAH et al., 2019; SHISHIR et al., 2018; ZHU, 2017). Para aplicação em matrizes alimentares, os materiais utilizados no processo e o produto resultante devem ser reconhecidos como “materiais seguros” (GRAS) (TAVARES et al., 2022).

Segundo o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, nanotecnologia é um campo científico-tecnológico transversal, disruptivo e pervasivo, dedicada à compreensão, controle e utilização das propriedades da matéria na nanoescala (1,0x10-9m, que equivale a 1 bilionésimo do metro). Materiais que possuem pelo menos uma de suas dimensões em tamanho nanométrico podem apresentar novas propriedades e características diferenciadas, passivas de serem exploradas para diversas aplicações tecnológicas.

De forma geral, é considerada nanoencapsulação quando o material apresenta diâmetro de 1 nm a várias centenas de nanômetros, e, microencapsulação quando é observada a variação do material de 1 μm a várias centenas de micrômetros. Porém, alguns autores afirmam que o tamanho das nanopartículas variam entre 1 e 1000 nm, e outros consideram o tamanho variando de 1 a 100 nm (SAIFULLAH et al., 2019; TAVARES et al., 2022; TERRA et al., 2021). De forma geral, as abordagens de nanoencapsulação fornecem uma maior capacidade de carregamento e eficiência de encapsulamento, estabilidade aprimorada e melhor controle no perfil de liberação em comparação com a microencapsulação (SAIFULLAH et al., 2019).

Dessa forma, a escolha da técnica apropriada, do polímero adequado, do solvente compatível (com produto, processo e aplicação) é de extrema importância e permite uma forma mais assertiva de sucesso na encapsulação e aplicação do material produzido. Serão destacadas nas sessões seguintes sistemas promissores para encapsular óleos essenciais na forma de nanocápsulas e nanoemulsões.

2.4.1 Técnica de *electrospraying*

O *electrospraying* é um processo eletro hidrodinâmico barato e flexível, que permite a produção de cápsulas em escala micro e/ou nanométrico (BIDUSKI et al., 2019). Apesar de ainda pouco difundida para aplicação em alimentos e embalagens,

o uso da técnica de *electrospraying* apresenta um futuro promissor devido a possibilidade de encapsulamento de compostos com propriedades bioativas (ATAEI et al., 2020). Além disso, permite que os compostos encapsulados sejam liberados de forma gradual e controlada, sem o uso de altas temperaturas (KRINGEL et al., 2020; LIM; MENDES; CHRONAKIS, 2019).

Em comparação com outros métodos tradicionais de encapsulação, a encapsulação de OEs pela técnica de *electrospraying* apresenta benefícios significativos, pois permite a produção de cápsulas em condições de pressão atmosférica, de temperatura ambiente, além do uso de pequenas quantidades de solventes (SOUZA et al., 2021).

O sistema de *electrospraying* (Figura 1) é composto basicamente por: uma fonte de alta tensão (b), uma seringa com um tubo capilar ou agulha de pequeno diâmetro (c), uma bomba de fluxo (d) e uma tela de metal coletora do material (e). A solução polimérica (a) é preparada previamente e carregada na seringa. No sistema, uma alta tensão elétrica é aplicada a solução polimérica, gerando um jato carregado eletricamente (+) e o material produzido (f) é coletado pelo alvo ligado ao outro eletrodo (-).

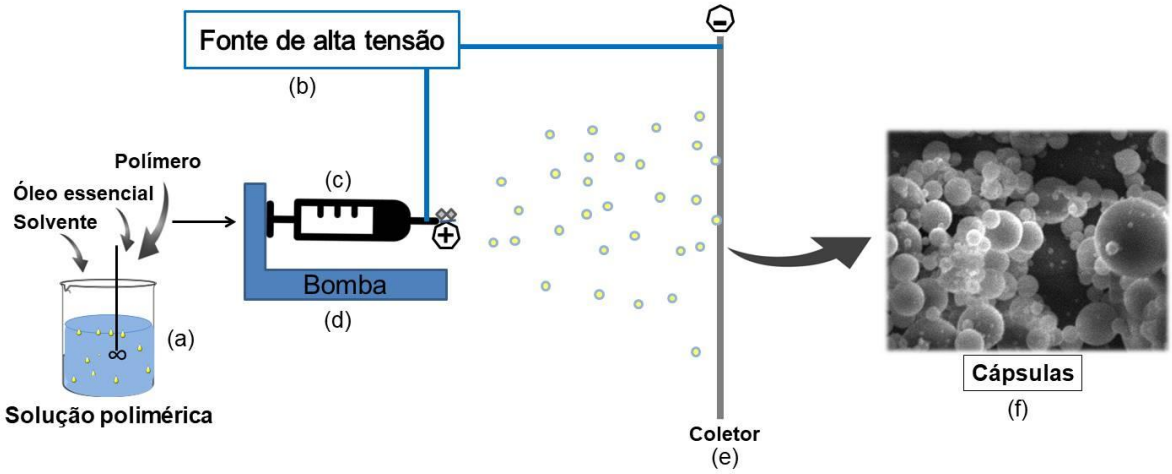


Figura 1 - Modelo de uma estação de *electrospraying* para produção de cápsulas
Fonte: Autor (2022).

Com a aplicação de uma alta tensão as cargas positivas são acumuladas na ponta da agulha, onde ocorre a formação de uma gota. Com o acúmulo destas cargas, a gota tende a se alongar em direção ao alvo metálico (carregado negativamente ou aterrado), e assim é formado o cone de Taylor. Quando a força de repulsão das cargas

aplicadas supera a tensão superficial da solução, ocorre a ejeção de um jato de solução para fora do cone de Taylor. Próximo a agulha o jato tende a ser mais estável, mas a medida em que este segue em direção ao alvo metálico um movimento de chicoteamento da solução polimérica faz com que o solvente evapore e o material seco seja depositado no coletor. Em função das características da solução polimérica, como polímero utilizado, viscosidade e condutividade elétrica, o jato pode perder sua continuidade e ser depositado no coletor na forma de cápsulas ou partículas. Estas gotículas altamente carregadas são auto dispersante, impedindo assim, a aglomeração das gotículas e da coagulação (BIDUSKI et al., 2019; LIM; MENDES; CHRONAKIS, 2019).

A utilização de *electrospraying* para encapsular ou aprisionar compostos bioativos, como óleos essenciais, vêm ganhando cada vez mais destaque nas pesquisas, que se concentram na busca pelos polímeros e pelos solventes mais adequados a serem utilizados, no estudo da influência das variáveis do processo, entre outros (ATAEI et al., 2020; SOUZA et al., 2021). O uso de polímeros como amido-OSA (BIDUSKI et al., 2019), quitosana (YILMAZ et al., 2019), goma de semente de Balangu (REZAEINIA et al., 2019) para produzir cápsulas adicionadas de óleos essenciais utilizando a técnica de *electrospraying* já foram relatados. Porém, ainda são encontradas lacunas a respeito das características das soluções formadas quando aplicadas diferentes condições de processo.

2.4.2 Emulsões

Emulsões são sistemas coloidais classificados de acordo com sua fase dispersa, ou seja, quando o óleo é disperso em água é conhecida como emulsão óleo em água (O/A); por outro lado, quando a água é dispersa em óleo é conhecida como emulsão água em óleo (A/O) (SAIFULLAH et al., 2019). Emulsões produzidas com OEs são em sua maioria do tipo óleo em água, uma vez que estes possuem característica lipofílica (LIU et al., 2021).

Com base no tamanho da gota de óleo as emulsões podem ser classificadas como macroemulsões, microemulsões e nanoemulsões. Entretanto, a classificação nanométrica ainda não é consenso entre os pesquisadores. Embora, a escala “nano” se refira a 1–1000 nm, podem ser encontrados relatos de nanoemulsões como sistemas coloidais com tamanho de gotícula na faixa de 10 a 100 nm (FRANKLYNE et al., 2019) ou de 20 e 1000 nm (DÁVILA-RODRÍGUEZ et al., 2019). Porém, é de

comum acordo entre os pesquisadores que estas devem ser cineticamente estáveis e apresentar propriedades funcionáis e bioativas compatíveis com o esperado (LIU et al., 2021). Além disso, micro e nano emulsões apresentam melhor funcionalidade quando comparadas às macroemulsões em termos de estabilidade, clareza óptica e controle de liberação (SAIFULLAH et al., 2019).

Emulsões ultrafinas (de escala nano e micrométrica) podem ser preparadas usando uma abordagem de alta energia (por exemplo, homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores e métodos de sonicação) ou abordagem de baixa energia (por exemplo, inversão de fase e emulsificação espontânea) (FRANKLYNE et al., 2019). As abordagens de alta energia requerem equipamentos mecânicos especialmente projetados e, normalmente apresentam custo mais elevado. A homogeneização de alta pressão apresenta como vantagem a formação de emulsões em nanoescala que não dependem do equilíbrio hidrofílico-lipofílico dos componentes; assim, pequenas partículas com distribuição uniforme de tamanho e boa estabilidade podem ser preparadas por esta técnica (LIU et al., 2021). Por outro lado, as abordagens de baixo consumo de energia não requerem nenhum equipamento sofisticado, são simples, baratas e energeticamente mais eficientes; no entanto, requerem altas quantidades de estabilizante, permitem tipos limitados de óleo e surfactante e produzem gotículas instáveis em temperaturas elevadas (DÁVILA-RODRÍGUEZ et al., 2019; SAIFULLAH et al., 2019). Outra importante diferença entre a alta e baixa energia é o solvente a ser utilizado. Nos métodos de baixa energia é necessário o uso de solventes orgânicos, enquanto que os métodos de alta energia não necessitam (FRANKLYNE et al., 2019; LIU et al., 2021).

De maneira geral, uma emulsão é formada por água, óleo e um emulsificante, sendo as características desses componentes fundamentais para garantir sua estabilidade (TAVARES et al., 2022). Surfactantes com qualidade alimentar vem demostrando cada vez mais interesse dos pesquisadores, tais como polissorbatos, ésteres de açúcar, lecitinas ou biopolímeros (gomas naturais, proteínas vegetais ou animais, amidos modificados). Além da capacidade emulsionante, são importantes características como comportamento interfacial específico (forças eletrostáticas, repulsão estérica e reologia), capacidade de carregamento, bem como resposta a estresses ambientais (LIU et al., 2021; SHISHIR et al., 2018; TAVARES et al., 2022).

A produção de emulsões com gotículas em escala nanométrica adicionadas de OEs vem se demostrando um campo promissor para aplicação em alimentos. Este

fato está relacionado a algumas características como: distribuição de tamanho monomodal; estabilidade do tamanho das partículas dos OEs nas emulsões durante o armazenamento em diferentes condições de temperaturas; bem como atividade antimicrobiana, antifúngica, antioxidante com adição de pequenas quantidades de OEs (DÁVILA-RODRÍGUEZ et al., 2019; FRANKLYNE et al., 2019; LIU et al., 2021; WAN et al., 2019).

2.5 Materiais de parede para encapsulação

Durante muitos anos, polímeros sintéticos foram a opção mais recorrente no desenvolvimento de embalagens e na encapsulação de compostos bioativos; porém, o crescente impulsionamento por técnicas e polímeros *eco-friendly* exige que os pesquisadores busquem por opções naturais e ambientalmente seguras (ATAEI et al., 2020).

Polissacarídeos de origem natural apresentam um grande potencial como material de parede para incorporação de OEs e posterior aplicação em alimento. Neste sentido, uma vasta gama de polissacarídeos pode ser utilizada para tal fim, como quitosana, amido, pectina, gelatina, alginato, xantana, goma arábica, celulose, e pululana (ATAEI et al., 2020; BIDUSKI et al., 2019; KUMARI; YADAV; YADAV, 2020). Porém, é necessário entender as particularidades de interação que acontecem entre o polissacarídeo e o OE para avaliar sua possível aplicação como material bioativo em alimentos e embalagens (SOUZA et al., 2021).

Materiais de parede utilizados para a encapsulação de compostos bioativos devem ser “geralmente reconhecidos como seguros” (GRAS). Além disso, a funcionalidade, a aplicação, as concentrações de material, o mecanismo de liberação e o requisito de estabilidade devem ser considerados para uma escolha assertiva do polissacarídeo (SHISHIR et al., 2018).

Alguns polímeros naturais, como o amido nativo, apresentam limitações de aplicação no setor industrial e de alimentos, devido a proporcionar poucas interações com compostos hidrofóbicos ou se apresentar com pouca estabilidade para determinadas aplicações. Assim sendo, com o objetivo de aprimorar as propriedades do amido e ampliar ainda mais sua aplicação foram desenvolvidas modificações químicas como esterificação, eterificação ou oxidação dos grupos hidroxila disponíveis nos monômeros de glicose (ALTUNA; HERRERA; FORESTI, 2018; ZHU, 2017).

2.5.1 Amido-OSA

Devido a suas propriedades naturalmente hidrofílicas, o amido nativo não apresenta afinidade por substâncias hidrofóbicas (WANG et al., 2020). Porém, quando realizadas modificações físicas ou químicas, as propriedades deste polímero podem ser alteradas a fim de adequá-lo a aplicações específicas no setor alimentício ou de embalagens (ALTUNA; HERRERA; FORESTI, 2018). Modificações químicas são responsáveis por introduzir um novo grupo funcional nos amidos nativos com o objetivo de aprimorar suas propriedades físico-químicas, dentre as quais podemos citar a esterificação, reticulação e eterificação (ZAINAL ABIDDIN; YUSOFF; AHMAD, 2018).

Dentre as modificações químicas, enfatiza-se a modificação via esterificação com anidrido octenil succínico (OSA), que é capaz de introduzir grupamentos hidrofóbicos nas moléculas de amido, conferindo a ele características anfifílicas (ALTUNA; HERRERA; FORESTI, 2018; ZAINAL ABIDDIN; YUSOFF; AHMAD, 2018). Esse tipo de modificação possibilita a solubilidade do amido em solventes polares e apolares, amplia a aplicação como potencial estabilizador em sistemas de água e óleo e aumenta a capacidade de ligações com substâncias hidrofóbicas (BIDUSKI et al., 2019; FANG et al., 2019; KUMARI; YADAV; YADAV, 2020; SHARIF et al., 2017a). A modificação com OSA é regulamentada e aprovada pela Food and Drug Administration (FDA, 2019) com o limite máximo de substituição de 3%, para uso alimentar.

A esterificação do amido com OSA envolve a substituição parcial dos grupos hidroxila por substituintes hidrofóbicos (Figura 2), permitindo ao amido caráter anfifílico e propriedades interfaciais (ALTUNA; HERRERA; FORESTI, 2018). Os grupos hidroxilas passíveis de substituição são os ligados aos carbonos 2, 3 e 6 (KUMARI; YADAV; YADAV, 2020). Fatores de condição de reação, como pH, temperatura, concentração de amido e tempo de reação, ou a interação desses fatores, interferem diretamente na reação de esterificação por OSA (ZHU et al., 2013).

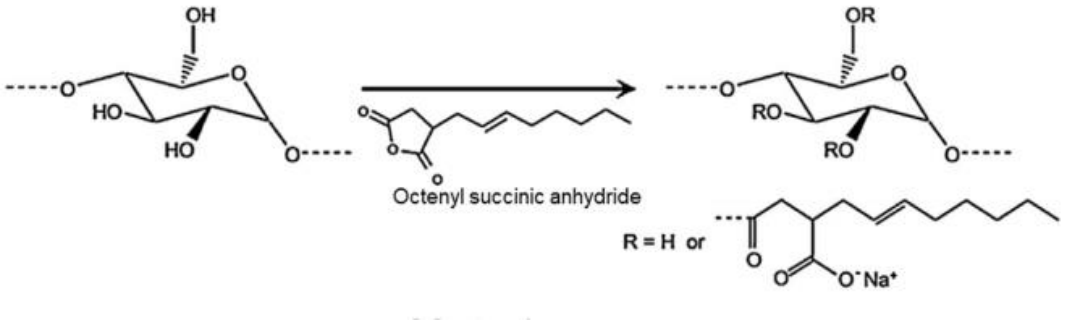


Figura 2 - Estrutura do amido modificado com Octenil Sucínico Anidrido.
Fonte: Altuna et al. (2018).

Este polissacarídeo anfifílico apresenta diversas aplicações, como em filmes e revestimentos, para formação de gel, para encapsulação de compostos bioativos e como emulsificante (AGAMA-ACEVEDO; BELLO-PEREZ, 2017; BIDUSKI et al., 2019; FANG et al., 2019; SHARIF et al., 2017a). A capacidade emulsionante do amido-OSA depende não apenas dos grupos hidrofóbicos introduzidos, mas também da estrutura original do amido; dessa forma, amidos com diferentes estruturas moleculares exibem distintas propriedades (ZHAO et al., 2018). Além disso, estudos recentes propõem que os amidos com menores tamanhos de grânulo modificados com OSA são melhores candidatos para estabilizar emulsões (AGAMA-ACEVEDO; BELLO-PEREZ, 2017). O amido-OSA produzido a partir de milho (ceroso e normal) é amplamente comercializado para aplicações industriais; porém, outras fontes como mandioca e arroz, também estão em crescente expansão.

Este polissacarídeo foi utilizado com sucesso para produzir cápsulas com OE de alecrim pela técnica de *electrospraying* (BIDUSKI et al., 2019), cápsulas com OE de rosa por liofilização (XIAO et al., 2019) e o desenvolvimento de emulsões adicionadas de OE de cominho (SHARIF et al., 2017b), canela (XU et al., 2020) e cedro (HUANG et al., 2021). Diversas lacunas ainda necessitam ser exploradas no quesito de encapsulação de OE utilizando amido-OSA como material de parede. A análise do tamanho de partícula, as atividades biológicas, a capacidade de carregamento são exemplos de avaliações que necessitam ser melhor elucidadas quando desenvolvidas cápsulas. Já no sentido de emulsões avaliar a estabilidade dos materiais a longo prazo, explorar as atividades biológicas como potencial antifúngico e a aplicação em matrizes alimentares merecem destaque.

3. Capítulo 1

Potencial antifúngico de óleos essenciais de diferentes fontes botânicas frente a *Penicillium digitatum*: Composição química e mecanismos de ação antifúngica por contato direto e voláteis

Resumo

A deterioração de frutas cítricas causada por fungos é um desafio frequente, o que tem levado ao aumento da busca por conservantes naturais. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica de diversos óleos essenciais (OEs) por meio do contato direto e da ação de voláteis. Os OEs de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus staigeriana*, cravo, *Eucalyptus citriodora*, limão siciliano, bergamota, laranja doce e mandarina verde foram avaliados por contato direto e ação de voláteis frente ao crescimento micelial de *Penicillium digitatum* isolado de frutas cítricas contaminadas. A determinação da composição química e a identificação dos compostos voláteis dos OEs foram realizadas por cromatografia gasosa. O composto majoritário dos OEs cítricos, como limão siciliano, laranja doce e mandarina verde, foi o monoterpeno D-limoneno, variando de 25,05 a 66,97%. Eugenol, timol, isoborneol, bergamiol e 4-terpineol foram os principais compostos encontrados nos OEs de cravo, tomilho branco, *Eucalyptus citriodora*, bergamota e melaleuca, respectivamente. Os principais compostos voláteis encontrados nos óleos essenciais de cravo, tomilho, *Eucalyptus citriodora* e melaleuca foram eugenol, timol, β-citronelal e α-pineno, respectivamente. Os OEs de cravo, tomilho branco e *Eucalyptus citriodora* inibiram 100% do crescimento micelial de *P. digitatum* por contato direto e ação volátil, em concentrações ≤ 2 μL mL^{-1}. Por outro lado, os OEs de fontes cítricas não foram capazes de inibir 100% do crescimento micelial independente do mecanismo de ação. Assim, os OEs de cravo, tomilho e *Eucalyptus citriodora* são promissores para o desenvolvimento de novos produtos ecologicamente corretos para o controle de fitopatógeno em frutas cítricas.

Palavras-chave: Crescimento micelial; Composição química; Óleo essencial; *headspace*

3.1 Introdução

A contaminação fúngica é a principal causa de deterioração microbiológica de frutas cítricas durante a pós-colheita, levando a perdas econômicas significativas na cadeia produtiva de citros. Um dos principais deterioradores da cadeia citrícola é o fungo *Penicillium digitatum*, sendo responsável pela podridão verde dos frutos; representando 90% das perdas pós-colheita de frutas cítricas, principalmente laranjas e tangerinas (AMINIFARD e BAYAT, 2018; HE et al., 2016); o segundo principal responsável pela degradação de frutas cítricas é o fungo *Penicillium italicum*, causador da podridão azul. Dentre as técnicas de conservação destes frutos, sabe-se que o armazenamento refrigerado é capaz de inibir o crescimento de *Penicillium digitatum* (CHEN et al., 2019); além disso, a conservação pode se dar através da aplicação de fungicidas, como imazalil, procloraz e tiabendazol. No entanto, devido à crescente resistência dos fungos, combinada com a preocupação pública em relação aos efeitos dos conservantes químicos na saúde humana e na contaminação ambiental (CHEN et al., 2019; ERASMUS et al., 2015), são necessários estudos mais aprofundados sobre fontes alternativas de conservação, como o uso de OEs como bioconservantes (AMINIFARD; BAYAT, 2018; SUMALAN et al., 2020).

Os OEs são extraídos de plantas e contêm uma mistura de vários compostos bioativos e a sua eficiência antimicrobiana depende de sua estrutura e composição química (CHEN et al., 2019). Os constituintes dos OEs incluem um amplo grupo de moléculas que, com base na sua estrutura química, podem ser classificadas como terpenos (mono-, sesqui- e diterpenos), álcoois, ácidos, ésteres, epóxidos, aldeídos, cetonas, aminas e sulfetos (ATAEI et al., 2020). As diferentes estruturas químicas desses compostos desempenham mecanismos de ação distintos, dependendo da atividade biológica a que é atribuída (ATAEI et al., 2020; XU et al., 2021).

Os compostos voláteis dos OEs vêm sendo amplamente estudados, devido ao seu efeito antimicrobiano, para aplicações como conservantes de alimentos e uso medicinal (ROCHA NETO et al., 2019; RAI et al., 2017). O sinergismo entre os componentes dos OEs é um desafio para atribuir a ação antifúngica de determinados compostos, uma vez que a composição varia dependendo de diversos fatores como condições climáticas de cultivo, época de colheita, parte da planta e método de extração (AGUILAR-VELOZ et al., 2020).

Diversas pesquisas têm sido desenvolvidas utilizando OEs como alternativa antifúngica aos métodos convencionais aplicados na conservação de alimentos.

Resultados promissores na inibição da proliferação de *Penicillium sp*. foram identificados usando diferentes OEs, como de *Citrus reticulata Blanco* (TAO; JIA; ZHOU, 2014), sálvia (DENISA; IOANNIS; LIVIU, 2014), cravo (CHEN et al., 2019; HE et al., 2016), hortelã, manjericão, lavanda (SUMALAN et al., 2020), palmarosa, melaleuca, anis estrelado (ROCHA NETO et al., 2019), folha de *betel* (BASAK; GUHA, 2017), cominho preto e anis (AMINIFARD; BAYAT, 2018).

Embora vários estudos tenham relatado a ação de OEs no controle de *Penicillium sp*, ainda existem lacunas a serem exploradas, como (1) avaliar o mecanismo de ação antifúngica dos OEs por contato direto e pela ação de voláteis; (2) explorar as diferentes fontes de OEs com ação antifúngica especificamente sobre *P. digitatum*; e (3) otimizar as menores concentrações de OEs capazes de inibir a proliferação deste fungo. Em virtude disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antifúngico dos OEs de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus staigeriana*, cravo, *Eucalyptus citriodora*, limão siciliano, bergamota, laranja doce e mandarina verde, por contato direto e ação dos voláteis, contra o crescimento micelial de *P. digitatum* isolado de frutas cítricas contaminadas. A composição química dos OEs também foi avaliada, bem como a composição dos compostos voláteis por *headspace*.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Materiais

Foram utilizados nove OEs comerciais de diferentes fontes botânicas: melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus staigeriana*, cravo, *Eucalyptus citriodora*, limão siciliano, bergamota, laranja doce e mandarina verde. Os OEs de tomilho branco e melaleuca foram adquiridos da empresa Ferquima, e os demais da Dierberger Essential Oils, todos extraídos por hidrodestilação conforme informações técnicas dos produtos. O fungo do gênero *P. digitatum* foi obtido pelo isolamento de frutos de laranja com presença de mofo verde. Os demais reagentes utilizados para análise foram de grau analítico e cromatográfico.

3.2.2 Composição química dos óleos essenciais

A composição química dos OEs foi determinada utilizando um cromatógrafo a gás Ultra QP2010 acoplado a um espectrômetro de massas (CG-MS) (Shimadzu, Tóquio, Japão) equipado com uma coluna capilar apolar OV – 5MS (30 m x 0,25 mm, 0 0,25 µm, Agilent J & W DB-Wax, EUA). Primeiramente iniciou-se a temperatura do forno com um programa isotérmico de 60°C por 1 min, depois uma rampa de aquecimento de 5 °C min^{-1} até 180 °C onde permaneceu por 1 min, em seguida uma nova rampa de aquecimento de 40 °C min^{-1} até 280 °C onde permaneceu por 1,5 min, totalizando 30 min de análise. A temperatura do injetor foi ajustada para 200 °C com uma vazão de gás hélio de 1 mL min^{-1} no modo split 1:50. Uma taxa de varredura de 0,2 s foi aplicada para detecção, cobrindo uma faixa de massas de 40,00 a 450,00 m/z, temperatura de interface e fonte de íons de 270 ºC e 260 ºC.

Os compostos foram identificados comparando os índices de similaridade e espectro de massa com o banco de dados do sistema CG/MS (NIST11s.lib), índice de retenção (NIST11s.lib) e índice de retenção calculado a partir de uma série de hidrocarbonetos C8-C40 de acordo com (VAND DEN DOOL; KRATZ, 1963).

3.2.3 Perfil de compostos orgânicos voláteis (COVs) por *headspace*

Somente os OEs que apresentaram 100% de inibição do crescimento micelial em qualquer uma das concentrações testadas foram avaliados quanto ao perfil de compostos orgânicos voláteis. Assim, os OEs de melaleuca, tomilho branco, cravo e *Eucalyptus citriodora* foram utilizados para identificar e quantificar os compostos voláteis por *headspace* usando CG/MS.

A amostra contendo COVs foi preparada pelo método de microextração em fase sólida (HS-SPME) utilizando fibra de divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) (Supelco, 50/30 µm × 20 mm) pré-condicionada seguindo o protocolo do fabricante. Para a extração dos COVs, foram colocados aproximadamente 0,1 g de OE em um frasco de 20 mL, em seguida foram adicionados 1 g de NaCl e 10 µL de solução padrão de benzofenona (5 µg mL^{-1}). O frasco foi vedado com tampa de silicone revestida com politetrafluoretileno. Os frascos selados contendo a amostra foram submersos em banho-maria a 40 °C por 15 min, após a fibra foi exposta ao headspace por 15 min sob agitação constante. Os COVs foram quantificados e identificados usando um sistema de CG (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com um espectrômetro de massa detector de massa (Shimadzu QP2010 UltraPlus, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e coluna capilar Rxi -1MS (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm, Restek EUA).

A temperatura da rampa foi mantida a 40 °C por 5 min, aumentada para 50°C a 3 °C min^{-1}, para 120 °C a 5 °C min^{-1}, para 175 °C a 7 °Cmin^{-1} e finalmente a 175 °C a 7 °C min^{-1}, 230 °C a 10 °C min^{-1}, e mantido sob condições isotérmicas por 8 min. O espectrômetro de massa (MS) foi totalmente avaliado (faixa de massa m/z 30 a 450). Os dados de CG-MS foram analisados usando LabSolution (solução CG-MS versão 4.11 SU2). Os COVs foram identificados comparando índices de similaridade e espectro de massa com o banco de dados do sistema do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST11), índice de retenção e índice de retenção calculado a partir de uma série homóloga de hidrocarbonetos C8-C40 de acordo com (VAND DEN DOOL; KRATZ, 1963). A análise quantitativa foi determinada de acordo com o padrão interno.

3.2.4 Atividade antifúngica *in vitro*

A atividade antifúngica dos OEs foi avaliada pelos protocolos de Tao; Jia; Zhou (2014) e Chen et al. (2016), com algumas adaptações. O fungo *P. digitatum* foi isolado dos tecidos lesionados do fruto laranja infectado (isolamento direto). Os isolados foram cultivados em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) com temperatura e fotoperíodo constantes e posteriormente mantidos em meio BDA para utilização nos ensaios. O meio BDA foi preparado com 200 g de batatas fervidas em 1000 mL de água destilada. Após a drenagem, o líquido foi adicionado a 20 g de ágar e 20 g de sacarose e esterilizado em autoclave a 121 ºC, sob pressão de 1-1,2 atm, por 15 min.

Os OEs foram adicionados diretamente ao meio e despejados em placas de Petri esterilizadas (55 x 15 mm) para ação de contato direto. Para ação dos voláteis, os OEs foram aplicados em papel filtro esterilizado (40 x 40 mm) e fixados na parte superior das placas (tampa). No primeiro bloco foram utilizados nove óleos essenciais nas concentrações de 40, 20, 10 e 5 μL mL^{-1}. Os OEs que não apresentaram crescimento micelial, para ambos os mecanismos de ação, na concentração mais baixa (5 μL mL^{-1}), foram submetidos a concentrações mais baixas de 2, 1, 0,5 μL mL^{-1}. Uma solução de água destilada estéril e Tween 80 (1%, v/v) foi preparada e adicionada ao meio e papel filtro para garantir volume igual e distribuição uniforme do óleo adicionado em todos os tratamentos. O fungicida imazalil e o tween 80 (1%) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente.

Todas as placas de Petri foram inoculadas com micélio jovem do fungo *P. digitatum* proveniente da borda de uma colônia fúngica, cortada com broca de cortiça (0,5 cm). As placas foram seladas com parafilme e incubadas de cabeça para baixo a 25°C. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. Após 72 h de incubação, o diâmetro da colônia foi avaliado medindo-se o crescimento diametralmente oposto da colônia do fungo nas placas com auxílio de uma régua graduada (cm). A porcentagem de inibição do crescimento micelial (MGI) foi calculada de acordo com a Equação 1 (CHEN et al., 2016)

$$MGI\ (\%) = \frac{dc-dt}{dc-0,5}\ x\ 100 \quad \text{(Eq. 1)}$$

Em que: dc (cm) é o diâmetro médio da colônia do controle e dt (cm) é o diâmetro médio da colônia para o tratamento. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. A concentração inibitória mínima (CIM) foi estabelecida como a menor concentração que resultou na ausência de crescimento visível dos fungos testados incubados a 25 °C por 72 h.

A concentração máxima de OEs utilizada para avaliar o efeito antifúngico foi definida com base em estudo realizado por Tao; Jia; Zhou (2014). Os autores relataram que o uso do OE de *Citrus reticulata Blanco* contra *P. digitatum* exigiu 40 μL mL^{-1} para obter a CIM. Porém, devido aos OEs possuírem diferentes composições químicas e concentrações de compostos bioativos, foram testadas concentrações

mais baixas para avaliar sua atividade antifúngica, tanto por contato direto quanto por ação de voláteis.

3.2.5 Análise multivariada

O conjunto de dados referente aos compostos voláteis dos OEs (Apêndice A) foi avaliado por Hierarchical Cluster Analysis (HCA) no software *RStudio* (versão 2022.12.0). Foi utilizado o pacote Análise Multivariada e adotada a distância euclidiana padronizada para revelar as nuances entre as amostras. O método de Ward foi selecionado para ligação dos grupos devido ao seu alto coeficiente de correlação cofenética (r = 0,97); o ponto de corte foi calculado segundo o critério de Mojena, utilizando k = 1,25. O dendograma resultante foi combinado com o Heatmap, onde os compostos voláteis individuais foram ordenados de acordo com sua ocorrência em cada amostra de OE totalizando 116 compostos, e o mapa foi apresentado em intervalos de 3 COVs.

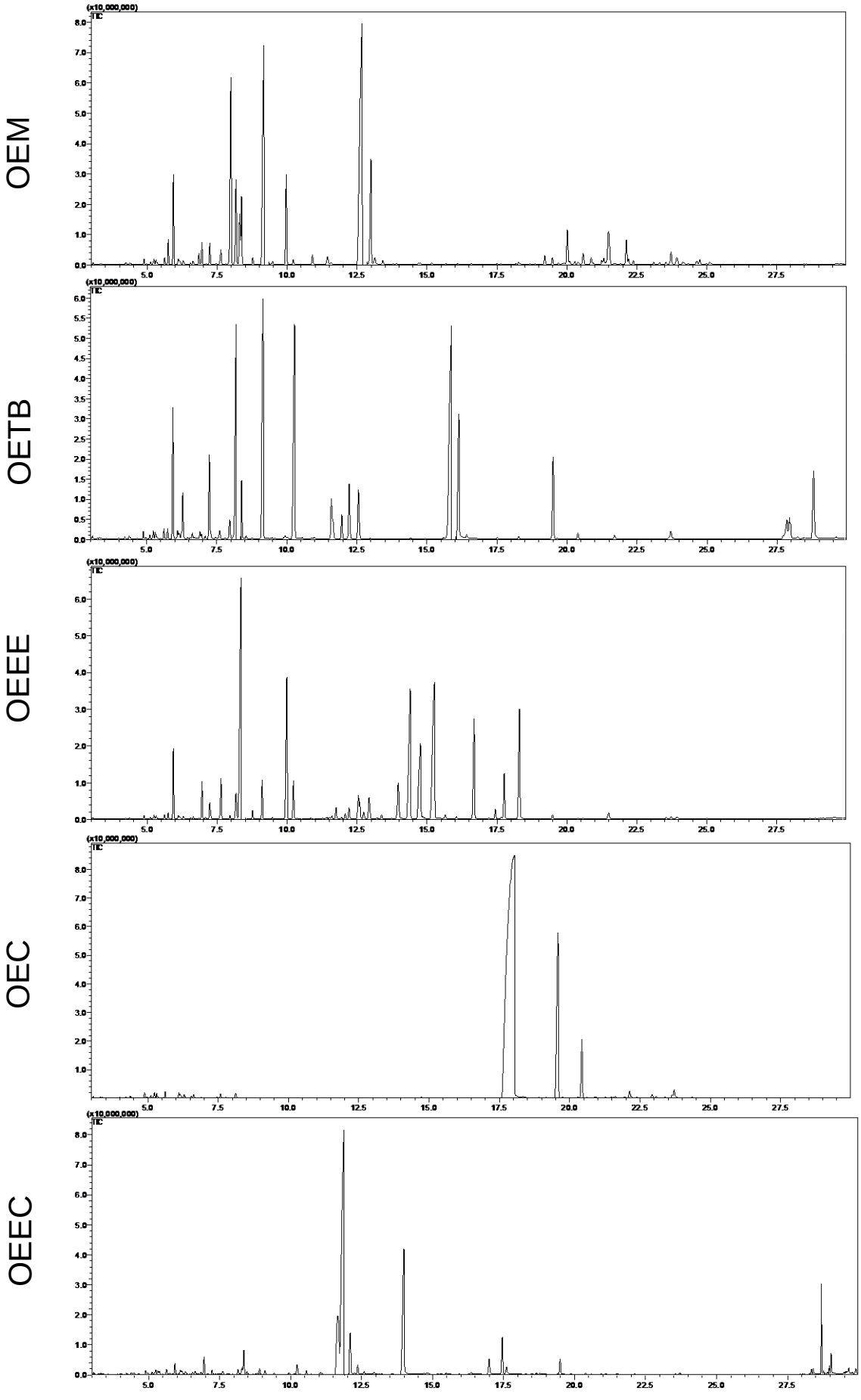
3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Composição química dos OEs

A composição química dos OEs de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus staigeriana*, cravo, *Eucalyptus citriodora*, limão siciliano, bergamota, laranja doce e mandarina verde estão apresentadas nos cromatogramas (Figura 3 e Tabela 3)

No OE de melaleuca foram identificados 20 compostos diferentes, a citar os principais: 4-terpineol (49,13%), α-terpineol (11,46%), terpinoleno (8,33%), isopropil (7,96%), α-pineno (6,36%) (Tabela 3). Chidi; Bouhoudan; Khaddor (2020) também relataram que o 4-terpineol foi o principal componente encontrado em OE de melaleuca, porém com concentração menor (23,1%) quando comparado ao nosso estudo. KRZYŚKO-ŁUPICKA; SOKÓŁ; PIEKARSKA-STACHOWIAK (2020) identificaram a presença do monoterpenóide 4-terpineol em maiores concentrações (38,2%) e de outros compostos em menores concentrações do que as encontradas no presente estudo. As diferenças quantitativas na composição química dos OEs são diretamente influenciadas pelo tecido vegetal utilizado para extrair o OE, pelo método de extração, pela origem geográfica da planta e pelas condições ambientais de cultivo, entre outros (CHIDI; BOUHOUDAN; KHADDOR, 2020; WAN et al., 2019).

No OE de tomilho branco foram identificados 18 compostos químicos: timol (22,7%), γ-terpinoleno (16,36%), linalol (15,94%) e cimol (11,69%). DORNA et al. (2021) identificaram como principais componentes do OE de tomilho: timol (34,2%), p-cimeno (26,2%), 1,8-cineol (11,9%), limoneno (4,0%), α-pineno (3,7%) e δ-3-cuidado (3,2%). WESOŁOWSKA e JADCZAK (2019) avaliaram o OE de duas cultivares de tomilho e identificaram o timol como constituinte principal, com concentração variando de 36,8 a 44,9%. Geralmente, a composição química do OE de tomilho é a mesma, embora sejam observadas variações na concentração dos compostos presentes.


OEM
OETB
OEEE
OEC
OEEC

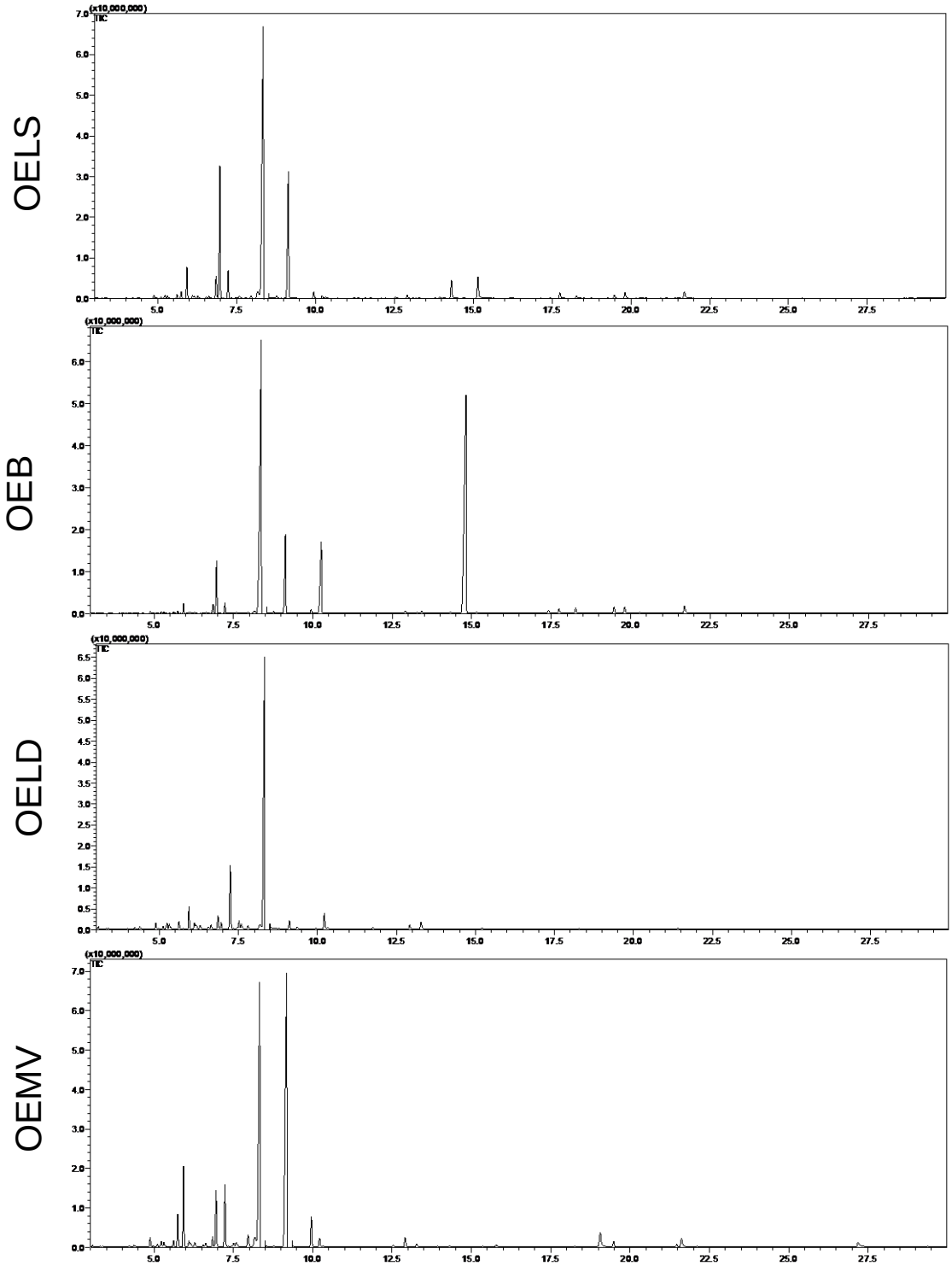


Figura 3 - Cromatogramas de óleos essenciais de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus staigeriana*, cravo, *Eucalyptus citriodora*, limão siciliano, bergamota, laranja doce e mandarina verde por análise CG-MS.

OEM: OE de melaleuca; OETB: OE de tomilho branco; OEEE: OE de *Eucalyptus staigeriana*; OEC: OE de cravo; OEEC: OE de *Eucalyptus citriodora*; OELS: OE de limão siciliano; OEB: OE de bergamota; OELD: OE de laranja doce; OEMV: OE de mandarina verde; OE: óleo essencial.

Tabela 3 - Composição química dos óleos essenciais de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus staigeriana,* cravo, *Eucalyptus citriodora*, limão, bergamota, laranja doce e mandarina verde por análise CG-MS

(continua)

Nome Usual	IS	IRL (NIST11)	IRLe	A (%)	Íons de referência (experimental)	Íons de referencia (Nist11)
					Óleo essencial de melaleuca	
Styrol	97	883	888	0,08	104,05(100) 78,00(55,87) 103,05(46,21)	104,00(100) 103,00(48,50) 78,00(46,40)
3-Tujene	97	902	924	1,66	93,05(100) 91,05(58,62) 77,00(44,19)	93,00(100) 77,00(46,15) 91,00(42,87)
α-pineno	97	948	931	6,36	93,05(100) 91,00(42,69) 92,05(41,02)	93,00(100) 92,00(34,92) 91,00(32,34)
Sabinene	94	897	970	0,86	93,05(100) 91,05(43,85) 77,00(40,19)	93,00(100) 91,00(35,53) 77,00(35,49)
β-pineno	97	943	974	1,69	93,05(100) 41,00(47,63) 69,05(34,78)	93,00(100) 41,00(50,81) 69,00(39,67)
β-Mirceno	96	958	986	1,60	41,00(100) 93,05(85,52) 69,05(68,88)	41,00(100) 93,00(85,59) 69,00(79,68)
Isopropil	94	1042	1022	7,96	119,10(100) 134,10(41,68) 91,05(40,46)	119,00(100) 91,00(35,72) 134,00(23,72)
β-Ocimeno	98	976	1043	0,61	93,05(100) 91,05(48,73) 79,00(46,47)	93,00(100) 91,00(49,10) 79,00(44,10)
Terpinoleno	95	1052	1086	8,33	93,05(100) 121,05(76,48) 91,00(51,60	93,00(100) 121,00(78,36) 91,00(61,74)
Linalol	92	1082	1095	0,45	43,00(100) 71,05(88,52) 41,00(55,06)	71,00(100) 41,00(64,28) 43,00(64,07)
β-terpineol	92	1158	1163	0,07	71,00(100) 43,00(99,78) 93,05(68,04)	71,00(100) 43,00(90,20) 93,00(45,33)
4-terpineol	89	1137	1179	49,13	71,05(100) 93,05(89,51) 43,00(88,57)	71,00(100) 43,00(54,50) 93,00(50,58)
α-Terpineol	97	1143	1190	11,46	59,05(100) 93,05(58,15) 121,05(41,30)	59,00(100) 93,00(60,24) 121,00(48,78)
Lemonol	91	1228	1249	0,15	69,05(100) 41,00(78,77) 68,00(18,58)	69,00(100) 41,00(65,39) 68,00(19,85)
Cariofileno	95	1494	1421	0,73	41,00(100) 93,05(91,56) 69,05(85,65)	41,00(100) 69,00(97,61) 93,00(93,71)
D-Guaieno	90	1490	1497	5,77	93,05(100) 107,05(91,13) 105,05(75,60)	93,00(100) 107,00(96,18) 105,00(86,89)
D-Amorfeno	90	1469	1523	2,58	119,05(100) 105,05(90,76) 161,05(89,22)	161,00(100) 119,00(89,99) 105,00(76,28)
Espatulenol	95	1536	1580	0,23	43,00(100) 41,00(58,88) 91,00(56,34)	43,00(100) 41,00(68,87) 91,00(42,27)
β-Eudesmol	82	1598	1604	0,28	59,00(100) 149,10(85,84) 81,00(42,42)	59,00(100) 149,00(99,01) 81,00(43,90)

Tabela 3 - Composição química dos óleos essenciais de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus staigeriana,* cravo, *Eucalyptus citriodora*, limão, bergamota, laranja doce e mandarina verde por análise CG-MS

(continuação)

Nome Usual	IS	IRL (NIST11)	IRLe	A (%)	Íons de referência (experimental)	Íons de referencia (Nist11)
					Óleo essencial de tomilho branco	
Styrol	97	883	888	0,07	104,00(100) 78,00(53,53) 103,00(44,37	104,00(100) 103(48,50) 78,00(46,40)
3-Tujene	97	902	924	0,44	93,05(100) 91,05(59,89) 77,00(42,77)	93,00(100) 77,00(46,15) 91,00(42,87)
α-pineno	97	948	931	5,78	93,05(100) 91,00(45,16) 92,00(43,37)	93,00(100) 92,00(34,92) 91,00(32,34)
β-pineno	95	943	974	0,28	93,05(100) 41,00(44,17) 91,05(27,92)	93,00(100) 41,00(40,02) 91,00(31,44)
β-Mirceno	96	958	986	4,04	41,00(100) 93,05(86,12) 69,05(70,69)	41,00(100) 93,00(85,59) 69,00(79,68)
p-Menta-1,3,8-triene	88	1029	1022	11,69	119,15(100) 134,05(89,92) 91,00(82,71)	119,00(100) 91,00(74,21) 134,00(65,71)
β-Ocimeno	94	976	1043	0,07	93,05(100) 79,00(55,59) 91,05(52,71)	93,00(100) 91,00(49,10) 79,00(44,10)
Terpinoleno	90	1052	1083	16,36	93,05(100) 91,00(87,94) 121,05(47,50)	93,00(100) 121,00(78,36) 91,00(61,74)
Linalol	98	1082	1097	15,94	71,00(100) 43,00(74,98) 93,00(72,41)	71,00(100) 93,00(76,08) 43,00(59,86)
Cânfora	92	1138	1107	3,63	95,05(100) 81,05(71,41) 41,00(57,27)	95,00(100) 81,00(71,87) 41,00(51,35)
Isoborneol	83	1088	1119	1,33	95,05(100) 41,00(23,81) 43,00(18,19)	95,00(100) 41,00(27,00) 43,00(21,00)
4-terpineol	96	1137	1175	3,30	71,00(100) 93,05(49,48) 43,00(48,56)	71,00(100) 43,00(54,50) 93,00(50,58)
Timol	94	1231	1240	22,72	135,15(100) 150,05(85,12) 91,00(56,17)	135,00(100) 150,00(94,19) 91,00(51,76)
Carvacrol	94	1262	1299	8,37	135,05(100) 150,05(44,54) 91,00(30,53)	135,00(100) 150,00(58,11) 91,00(25,80)
Cariofileno	96	1494	1422	5,11	41,00(100) 93,05(92,57) 69,05(85,94)	41,00(100) 69,00(97,61) 93,00(93,71)
β-bisaboleno	97	1500	1506	0,25	69,05(100) 41,00(85,91) 93,05(76,94)	69,00(100) 41,00(92,00) 93,00(76,17)
D-Amorfeno	87	1469	1523	0,02	105,05(100) 119,05(98,23) 161,05(89,29)	161,00(100) 119,00(89,99) 105,00(76,28)
Óxido de cariofileno	96	1507	1586	0,60	43,00(100) 41,00(93,97) 79,00(87,18)	43,00(100) 41,00(92,77) 79,00(88,53)

Tabela 3 - Composição química dos óleos essenciais de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus staigeriana,* cravo, *Eucalyptus citriodora*, limão, bergamota, laranja doce e mandarina verde por análise CG-MS

(continuação)

Nome Usual	IS	IRL (NIST11)	IRLe	A (%)	Íons de referência (experimental)	Íons de referência (Nist11)
					Óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana*	
Styrol	96	883	888	0,05	104,05(100) 78,10(58,76) 103,05(42,92)	104,00(100) 103,00(48,50) 78,00(46,40)
α-pineno	97	948	931	4,83	93,05(100) 91,05(43,91) 92,05(41,55)	93,00(100) 92,00(34,92) 91,00(32,34)
Sabinene	93	987	970	0,09	93,05(100) 91,05(45,77) 41,05(26,56)	93,00(100) 41,00(37,67) 91,00(35,53)
β-pineno	97	943	974	2,75	93,10(100) 41,05(51,43) 69,05(34,85)	93,00(100) 41(60,93) 69,00(35,06)
β-Mirceno	95	958	986	1,49	41,05(100) 93,05(80,79) 69,10(66,30)	41,00(100) 93,00(85,59) 69,00(79,68)
α-Fellandreno	97	969	1002	3,37	93,05(100) 91,05(62,04) 77,05(42,13)	93,00(100) 91,00(59,94) 77,00(44,48)
D-Limoneno	95	1018	1028	25,05	68,05(100) 67,05(95,55) 93,05(92,91)	68,00(100) 93,00(78,39) 67,00(74,68)
β-Ocimeno	98	976	1043	0,64	93,05(100) 91,05(49,34) 79,05(46,72)	93,00(100) 91,00(49,10) 79,00(44,10)
γ-Terpineno	97	998	1055	3,05	93,05(100) 91,05(53,75) 77,05(36,94)	93,00(100) 91,00(56,55) 77,00(41,55)
Terpinoleno	96	1052	1086	14,75	93,05(100) 121,10(77,65) 136,15(73,84)	93,00(100) 121,00(78,36) 136,00(61,41)
Linalol	97	1082	1095	3,25	71,05(100) 43,05(82,73) 93,05(71,67)	71,00(100) 93,00(76,08) 43,00(59,86)
4-terpineol	94	1137	1175	2,58	71,05(100) 43,05(43,39) 111,10(39,64)	71,00(100) 111,00(48,03) 43,00(45,04)
α-Terpineol	95	1143	1188	2,66	59,05(100) 93,05(52,17) 121,10(34,09)	59,00(100) 93,00(60,24) 121,00(48,78)
Citral	96	1174	1239	18,87	41,05(100) 69,05(68,87) 94,05(20,43)	41,00(100) 69,00(83,00) 94,00(25,30)
Lemonol	96	1228	1251	11,92	69,05(100) 41,05(87,07) 68,05(18,65)	41,00(100) 69,00(90,23) 68,00(19,17)
Acetato de nerol	97	1352	1358	4,26	69,05(100) 41,05(72,13) 43,00(53,77)	69,00(100) 41,00(72,16) 43,00(56,25)
Cariofileno	96	1494	1421	0,39	41,05(100) 93,05(90,77) 69,05(82,74)	41,00(100) 69,00(97,61) 93,00(93,71)
					Óleo essencial de cravo	
Eugenol	91	1392	1368	85,88	164,05(100) 77,00(62,23) 103,00(61,14)	164,00(100) 77,00(46,40) 103,00(41,60)
Cariofileno	96	1494	1423	12,99	41,00(100) 93,05(93,36) 69,05(86,61)	41,00(100) 69,00(97,61) 93,00(93,71)
Aromandendreno	90	1386	1428	0,05	41,05(88,24) 91,05(69,86) 79,05(62,75)	41,00(100) 91,00(67,87) 79,00(50,76)
α-Fellandreno	95	1458	1503	0,11	93,05(100) 41,05(89,73) 69,05(61,12)	41,00(100) 93,00(88,53) 69,00(46,72)
D-Amorfeno	85	1469	1526	0,40	119,05(100) 105,05(94,69) 161,05(87,44)	161,00(100) 119,00(89,99) 105,00(76,28)
Óxido de cariofileno	96	1507	1587	0,57	43,00(100) 41,00(91,92) 79,05(83,47)	43,00(100) 41,00(92,77) 79,00(88,53)

Tabela 3 - Composição química dos óleos essenciais de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus staigeriana,* cravo, *Eucalyptus citriodora*, limão, bergamota, laranja doce e mandarina verde por análise CG-MS

(continuação)

Nome Usual	IS	IRL (NIST11)	IRLe	A (%)	Íons de referência (experimental)	Íons de referência (Nist11)
					Óleo essencial de *Eucalyptus citriodora*	
α-pineno	97	948	931	1,08	93,05(100) 91,05(41,41) 92,05(40,15)	93,00(100) 92,00(34,92) 91,00(32,34)
β-pineno	97	943	974	1,87	93,05(100) 41,00(48,17) 69,05(35,59)	93,00(100) 41,00(50,81) 69,00(39,67)
β-Mirceno	96	958	985	0,46	41,00(100) 93,05(83,93) 69,05(69,96)	41,00(100) 93,00(85,59) 69,00(79,68)
Bergamol	93	1025	1047	0,65	82,05(100); 67,00(69,47) 41,00(69,01)	82,00(100) 41,00(59,26) 67,00(58,56)
Rodinal	93	1125	1151	61,38	41,05(100) 69,05(99,15) 95,05(82,72)	41,00(100) 69,00(98,97) 95,00(52,76)
Mentol	96	1196	1159	6,51	41,00(100) 69,05(75,46) 55,05(68,70)	41,00(100) 69,00(84,70) 55,00(80,85)
α-Terpineol	96	1143	1188	0,28	59,05(100) 93,05(57,34) 121,10(39,09)	59,00(100) 93,00(60,24) 121,00(48,78)
Cefrol	97	1179	1224	22,94	41,00(100) 69,05(84,76) 55,05(52,60)	41,00(100) 69,00(82,99) 55,00(48,55)
Lemonol	95	1228	1248	0,13	69,05(100) 41,00(88,29) 68,00(21,23)	69,00(100) 41,00(60,06) 68,00(21,42)
Citriodiol	95	1320	1330	2,28	81,05(100) 59,05(70,94) 96,10(36,00)	81,00(100) 59,00(88,18) 96,00(58,62)
Cariofileno	95	1494	1421	2,04	41,00(100) 93,05(92,09) 69,05(84,50)	41,00(100) 69,00(97,61) 93,00(93,71)
Germacrena D	92	1515	1482	0,10	105,00(100) 161,10(96,64) 91,05(87,26)	161,00(100) 105,00(77,51) 91,00(68,51)
D-Amorfeno	91	1469	1522	0,06	161,10(100) 119,05(99,99) 105,05(92,11)	161,00(100) 119,00(89,99) 105,00(76,28)
Espatulenol	91	1536	1580	0,03	43,00(100) 119,10(49,18) 41,00(44,52)	43,00(100) 41,00(68,87) 119,00(42,17)
Óxido de cariofileno	95	1507	1586	0,19	43,00(100) 41,00(95,60) 79,00(80,30)	43,00(100) 41,00(92,77) 79,00(88,53)

Tabela 3 - Composição química dos óleos essenciais de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus staigeriana,* cravo, *Eucalyptus citriodora*, limão, bergamota, laranja doce e mandarina verde por análise CG-MS

(continuação)

Nome Usual	IS	IRL (NIST11)	IRLe	A (%)	Íons de referência (experimental)	Íons de referência (Nist11)
					Óleo essencial de limão siciliano	
Styrol	95	883	888	0,06	104,05(100) 78,05(66,69) 103,05(45,06)	104,00(100) 103,00(48,50) 78,00(46,40)
3-Tujene	97	902	924	0,73	93,05(100) 91,05(62,81) 77,05(45,62)	93,00(100) 77,00(46,15) 91,00(42,87)
α-pineno	97	948	931	3,34	93,05(100) 91,05(45,78) 92,05(42,02)	93,00(100) 92,00(34,92) 91,00(32,34)
Sabineno	95	897	970	2,96	93,10(100) 91,05(47,54) 41,05(32,22)	93,00(100) 41,00(37,67) 91,00(35,53)
β-pineno	98	943	975	15,94	93,05(100) 41,05(54,92) 69,05(36,99)	93,00(100) 41,00(60,93) 69,00(35,06)
β-Mirceno	95	958	986	3,17	41,05(100) 93,10(73,06) 69,05(62,86)	41,00(100) 93,00(85,59) 69,00(79,68)
Cimol	81	1042	1022	1,75	119,10(100) 91,05(33,61) 134,10(27,91)	119,00(100) 134,00(22,82) 91,00(16,78)
D-Limoneno	95	1018	1028	45,41	68,05(100) 67,05(95,41) 93,05(91,68)	68,00(100) 93,00(78,39) 67,00(74,68)
β-Ocimeno	98	976	1043	0,29	93,10(100) 79,05(50,27) 91,05(50,22)	93,00(100) 91,00(50,06) 79,00(45,24)
γ-Terpineno	97	998	1056	17,99	93,05(100) 91,05(53,79) 77,05(37,40)	93,00(100) 91,00(56,55) 77,00(41,55)
Terpinoleno	96	1023	1085	0,83	93,05(100) 121,10(69,86) 91,05(52,61)	93,00(100) 121,00(78,48) 91,00(44,63)
Linalol	96	1082	1094	0,34	71,05(100) 43,05(94,30) 93,05(68,84)	71,00(100) 93,00(76,08) 43,00(59,86)
Cânfora	84	1121	1141	0,04	95,05(100) 81,10(56,60) 41,05(56,30)	95,00(100) 81,00(71,87) 41,00(51,35)
4-terpineol	95	1137	1174	0,19	71,05(100) 43,05(49,31) 111,10(38,08)	71,00(100) 111,00(48,03) 43,00(45,04)
α-Terpineol	95	1143	1187	0,47	59,05(100) 93,10(55,73) 121,10(37,24)	59,00(100) 93,00(60,24) 121,00(48,78)
Citral	95	1174	1236	2,76	41,05(100) 69,05(67,55) 94,10(18,87)	41,00(100) 69,00(83,00) 94,00(25,30)
Lemonol	96	1352	1357	0,03	69,05(100) 41,05(81,48) 68,10(18,41)	41,00(100) 69,00(90,23) 68,00(19,17)
Acetato de citronelol	91	1302	1347	0,04	43,00(100) 69,05(95,61) 81,05(77,28)	43,00(100) 69,00(90,59) 81,00(85,59)
Acetato de nerol	96	1352	1357	0,88	69,05(100) 41,05(77,34) 43,00(57,01)	69,00(100) 41,00(72,16) 43,00(56,25)
Cariofileno	95	1494	1421	0,51	41,05(100) 93,10(88,06) 69,10(81,77)	41,00(100) 69,00(81,72) 93,00(77,84)
α-bergamoteno	96	1430	1434	0,90	93,05(100) 119,10(85,30) 41,05(65,21)	93,00(100) 41,00(88,49) 119,00(85,69)
α-bisaboleno	90	1518	1498	0,17	93,05(100) 41,05(38,26) 91,05(37,32)	93,00(100) 41,00(74,78) 91,00(34,83)
β-bisaboleno	97	1500	1506	1,2	69,10(100) 41,05(92,05) 93,10(76,27)	69,00(100) 41,00(92,00) 93,00(76,17)

Tabela 3 - Composição química dos óleos essenciais de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus staigeriana,* cravo, *Eucalyptus citriodora*, limão, bergamota, laranja doce e mandarina verde por análise CG-MS

(continuação)

Nome Usual	IS	IRL (NIST11)	IRLe	A (%)	Íons de referência (experimental)	Íons de referência (Nist11)
					Óleo essencial de bergamota	
α-pineno	98	948	931	0,76	93,10(100) 91,05(49,23) 92,05(43,27)	93,00(100) 91,00(46,84); 92,00(41,47)
Sabinene	95	897	970	0,81	93,10(100) 91,05(50,31) 41,05(41,96)	93,00(100) 41,00(37,67) 91,00(35,53)
β-pineno	98	943	975	4,43	93,05(100); 41,05(67,62) 69,05(37,06)	93,00(100) 41,00(60,93) 69,00(35,06)
β-Mirceno	94	958	986	0,80	41,05(100) 93,10(58,14) 69,10(54,16)	41,00(100) 93,00(85,59) 69,00(79,68)
D-Limoneno	95	1018	1029	35,51	68,05(100) 67,05(95,01) 93,0590,65)	68,00(100) 93,00(78,39) 67,00(74,68)
β-Ocimeno	96	976	1043	0,16	93,10(100) 91,05(56,81) 79,05(54,34)	93,00(100) 91,00(50,06) 79,00(45,24)
µ-Terpineno	98	998	1056	7,57	93,05(100) 91,05(56,28) 77,05(40,40)	93,00(100) 91,00(56,55) 77,00(41,55)
Linalol	96	1082	1096	8,66	71,05(100) 43,05(94,96) 93,05(70,03)	71,00(100) 93,00(76,08) 43,00(59,86)
α-Terpineol	94	1143	1187	0,27	59,10(100) 93,10(52,71) 121,10(33,83)	59,00(100) 93,00(60,24) 121,00(48,78)
Citral	93	1174	1236	0,17	41,05(100) 69,10(61,42) 94,10(17,45)	41,00(100) 69,00(83,00) 94,00(25,30)
Bergamiol	94	1272	1253	37,8	93,05(100) 43,05(93,73) 41,05(54,86)	93,00(100) 43,00(93,81) 41,00(50,31)
Acetato de terpineol	93	1333	1345	0,36	43,05(100) 93,05(74,51) 121,10(74,04)	43,00(100) 121,00(81,30) 93,00(71,82)
Acetato de nerol	96	1352	1357	0,47	69,05(100) 41,05(77,23) 43,00(57,77)	69,00(100) 41,00(72,16) 43,00(56,25)
Cariofileno	95	1494	1419	0,66	41,05(100) 93,10(78,21) 69,10(72,43)	41,00(100) 69,00(81,72) 93,00(77,84)
α-bergamoteno	96	1430	1431	0,64	93,05(100) 119,10(81,85) 41,05(72,40)	93,00(100) 41,00(88,49) 119,00(85,69)
β-bisoleno	96	1500	1506	0,93	69,10(100) 41,05(95,92) 93,10(73,81)	69,00(100) 41,00(92,00) 93,00(76,17)

Tabela 3 - Composição química dos óleos essenciais de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus staigeriana,* cravo, *Eucalyptus citriodora*, limão, bergamota, laranja doce e mandarina verde por análise CG-MS

(continuação)

Nome Usual	IS	IRL (NIST11)	IRLe	A (%)	Íons de referência (experimental)	Íons de referência (Nist11)
					Óleo essencial de laranja doce	
Styrol	97	883	888	0,27	104,00(100) 78,05(54,35) 103,00(44,82)	104,00(100) 103,00(48,50) 78,00(46,40)
3-Tujene	95	902	923	0,13	93,05(100) 91,05(58,66) 77,05(40,07)	93,00(100) 77,00(46,15) 91,00(42,87)
α-pineno	97	948	931	4,42	93,05(100) 91,05(42,51) 92,05(40,21)	93,00(100) 92,00(34,92) 91,00(32,34)
β-Fellandreno	94	987	970	3,08	93,05(100) 91,05(43,24) 77,05(39,00)	93,00(100) 91,00(35,53) 77,00(35,49)
β-pineno	96	943	974	1,47	93,05(100) 41,05(45,19) 91,05(27,49)	93,00(100) 41,00(40,02) 91,00(31,44)
β-Mirceno	96	958	986	14,71	41,05(100) 93,05(87,77) 69,05(70,67)	41,00(100) 93,00(85,59) 69,00(79,68)
D-Limoneno	95	1018	1027	66,97	68,05(100) 67,00(95,05) 93,05(91,81)	68,00(100) 93,00(78,39) 67,00(74,68)
β-Ocimeno	96	976	1043	0,42	93,05(100) 79,05(52,89) 91,05(48,06)	93,00(100) 91,00(50,06) 79,00(45,24)
γ -Terpineno	97	998	1055	1,91	93,05(100) 91,05(53,03) 77,05(36,77)	93,00(100) 91,00(56,55) 77,00(41,55)
Terpinoleno	95	1052	1085	0,22	93,05(100) 121,10(71,77) 136,10(64,36)	93,00(100) 121,00(87,98) 136,00(62,26)
Linalol	97	1082	1095	3,91	71,05(100) 43,00(77,57) 93,05(70,09)	71,00(100) 93,00(76,08) 43,00(59,86)
4-terpineol	94	1137	1175	0,11	71,00(100) 43,05(46,57) 111,05(40,01)	71,00(100) 111,00(48,03) 43,00(45,04)
α-Terpineol	96	1143	1187	1,23	59,05(100) 93,05(58,14) 121,10(40,68)	59,00(100) 93,00(60,24) 121,00(48,78)
Citronelol	95	1179	1223	0,15	41,05(100) 69,05(81,76) 55,05(37,42)	41,00(100) 69,00(68,67) 55,00(40,84)
Acetato de nerol	92	1352	1358	0,08	69,05(100) 41,05(75,12) 43,00(59,31)	69,00(100) 41,00(72,16) 43,00(56,25)
Cariofileno	94	1494	1421	0,17	41,05(100) 69,05(93,59) 93,05(90,24)	41,00(100) 69,00(97,61) 93,00(93,71)
α-bergamoteno	90	1430	1434	0,09	119,05(100) 93,00(99,18) 41,05(59,56)	93,00(100) 119,00(86,29) 41,00(50,56)
Germacrena D	92	1515	1483	0,12	105,05(100) 161,10(95,56) 91,00(76,47)	161,00(100) 105,00(77,51) 91,00(68,51)
D-Guaieno	93	1490	1494	0,23	161,10(100) 93,05(95,85) 105,05(93,00)	93(100) 105,00(86,89) 161,00(83,89)
β-Bisaboleno	90	1500	1507	0,15	41,05(100) 93,05(97,91) 69,05(96,44)	69,00(100) 41,00(92,00) 93,00(76,17)
D-Amorfeno	90	1469	1523	0,16	119,10(100) 105,05(99,78) 161,05(94,18)	161,00(100) 119,00(89,99) 105,00(76,28)

Tabela 3 - Composição química dos óleos essenciais de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus staigeriana,* cravo, *Eucalyptus citriodora*, limão, bergamota, laranja doce e mandarina verde por análise CG-MS

(conclusão)

Nome Usual	IS	IRL (NIST11)	IRLe	A (%)	Íons de referência (experimental)	Íons de referência (Nist11)
					Óleo essencial de mandarina verde	
Styrol	97	883	888	0,15	104,05(100) 78,05(52,05) 103,05(45,13)	104,00(100) 103,00(48,50) 78,00(46,40)
3-Tujene	97	902	924	4,45	93,05(100) 91,05(58,66) 77,05(42,36)	93,00(100) 77,00(46,15) 91,00(42,87)
α-pineno	97	948	931	11,20	93,05(100) 91,05(42,86) 92,05(41,78)	93,00(100) 92,00(34,92) 91,00(32,34)
Sabinene	94	897	970	1,55	93,05(100) 91,05(44,69) 77,05(39,82)	93,00(100) 91,00(35,53) 77,00(35,49)
β-pineno	97	943	974	8,63	93,05(100) 41,05(46,91) 69,05(33,97)	93,00(100) 41,00(50,81) 69,00(39,67)
β-Mirceno	96	958	986	9,93	41,05(100) 93,05(87,83) 69,05(70,37)	41,00(100) 93,00(85,59) 69,00(79,68)
D-Limoneno	95	1018	1027	50,64	68,05(100) 67,05(95,04) 93,05(92,86)	68,00(100) 93,00(78,39) 67,00(74,68)
β-Ocimeno	95	976	1043	0,14	93,05(100) 79,05(54,34) 91,05(50,85)	93,00(100) 91,00(50,06) 79,00(45,24)
Terpinoleno	91	1052	1085	5,16	93,05(100) 121,10(75,30) 91,05(51,21)	93,00(100) 121,00(78,94) 91,00(37,77)
Linalol	94	1082	1095	1,58	71,05(100) 93,05(64,82) 55,05(56,98)	71,00(100) 93,00(76,08) 55,00(63,77)
Cânfora	89	1121	1142	0,06	95,05(100) 81,10(69,34) 41,05(55,92)	95,00(100) 81,00(71,87) 41,00(51,35)
4-terpineol	95	1137	1174	0,35	71,05(100) 93,05(47,60) 43,05(46,40)	71,00(100) 43,00(54,50) 93,00(50,58)
α-Terpineol	96	1143	1187	1,87	59,05(100) 93,05(56,82) 121,10(39,37)	59,00(100) 93,00(60,24) 121,00(48,78)
Citronelol	96	1179	1222	0,20	41,05(100) 69,05(81,55) 55,05(47,58)	41,00(100) 69,00(82,99) 55,00(48,55)
Cariofileno	96	1494	1421	1,03	41,05(100) 93,05(95,20) 69,05(85,17)	41,00(100) 69,00(97,61) 93,00(93,71)
Germacrena D	94	1515	1482	0,09	105,05(100) 161,10(85,78) 91,05(73,18)	161,00(100) 105,00(77,51) 91,00(68,51)
α-Guaieno	91	1490	1497	0,56	93,05(100) 107,10(81,41) 105,05(71,83)	105,00(100) 107(89,59) 93,00(78,68)
α-Farneseno	96	1458	1502	2,29	93,05(100) 41,05(84,46) 69,05(60,10)	41,00(100) 93,00(88,59) 69,00(46,74)
D-Amorfeno	90	1469	1522	0,12	119,10(100) 161,10(90,50) 105,05(88,88)	161,00(100) 119,00(89,99) 105,00(76,28)

IS: Índice de Similaridade; IRL: Índices de retenção de literatura (NIST11); IRLe: Índice de Retenção Experimental relativo a n-alcanos (C8-C21); A (%): porcentagem de área do composto

No OE de *Eucalyptus citriodora* foram identificados 15 compostos; o composto majoritário encontrado foi o rodinal (61,38%), seguido do cefrol (22,94%) e do mentol (6,51%). No OE de *Eucalyptus staigeriana* foram identificados D-limoneno (25,05%), citral (18,87%), terpinoleno (14,75%), lemonol (11,92%) e outros constituintes em menores concentrações. ELGAT et al. (2020) relataram como principais componentes do OE de *Eucalyptus camaldulensis*: espatulenol, eucaliptol, sabineno, α-felandreno, cripto, terpineno-4-ol, felandral e D-limoneno. TOLBA et al. (2018) identificaram 22 compostos, principalmente monoterpenóides, representando 95,3% do OE de *Eucalyptus citriodora*.

O OE de cravo foi composto principalmente por eugenol (85,88%), seguido por cariofileno (12,99%). Vários autores relataram que o eugenol é o composto primário do OE de cravo e representa pelo menos 50% da composição total do OE; sendo o restante (10-40%) composto por acetato de eugenol, β-cariofileno e α-humuleno. Menos de 10% correspondem a componentes minoritários ou vestigiais, como ftalato de dietila, óxido de cariofileno, cadineno, α-copaeno, 4-(2-propenil)-fenol, chavicol e α-cubebeno (GOLMAKANI; ZARE; RAZZAGHI, 2017; HARO-GONZÁLEZ et al., 2021).

O composto majoritário encontrado nos OEs de fontes cítricas, como laranja doce, limão e mandarina verde foi o monoterpeno D-limoneno (variando de 25,05 a 66,97%). Apesar de também ser de origem cítrica, o OE de bergamota apresentou maior concentração de bergamiol (37,8%) do que D-limoneno (35,51%). Embora todos sejam extraídos de fontes cítricas, a diferença dos compostos e suas concentrações em cada OE influencia diretamente no seu mecanismo de ação e consequentemente em suas propriedades antifúngicas.

As diferenças qualitativas e quantitativas na composição química relatadas em todos os OEs são diretamente influenciadas por fatores como a origem botânica da planta; tecido vegetal utilizado para extração de OE; método de extração; cultivo; condições ambientais (abastecimento de água, incidência solar, temperatura); origem geográfica da planta, entre outros (CHIDI; BOUHOUDAN; KHADDOR, 2020; TOLBA et al., 2018; WAN et al., 2019).

3.3.2 Compostos voláteis dos OEs

O dendograma (Figura 4) do perfil de COVs das amostras de OEs revelou a formação de dois grupos homogêneos distintos, conforme Linha Fenon traçada na

distância de ligação entre os grupos em 17,71. O primeiro grupo é caracterizado pela presença de OE de *Eucalyptus citriodora*, cravo e tomilho branco, onde os dois últimos apresentam maior grau de similaridade, evidenciado pelos ramos curtos, formando um subgrupo com maior homogeneidade. O Mapa de Calor mostra que as maiores concentrações de compostos voláteis (cor azul escuro) pertencem ao OE de melaleuca, seguido pelo *Eucalyptus citriodora*, tomilho branco e cravo.

O OE de melaleuca foi atribuído a outro grupo por ser diferente dos demais. A distância de ligação mais significativa entre os OEs de melaleuca e tomilho pode ser observada e justificada pelos componentes complexos e voláteis presentes no OE de melaleuca, classificados principalmente em terpenos, sesquiterpenos, ésteres, éteres e compostos fenólicos. Os compostos primários únicos (Tabela 3) do OE da melaleuca foram α-pineno (62,35 µg g^{-1}), β-felandreno (42,08 µg g^{-1}), 7-etil-4-nonanona (37,57 µg g^{-1}), β-pineno (28,47 µg g^{-1}) e aloaromadendreno (28,12 µg g^{-1}). SEVIK et al., (2021) também relataram a presença de compostos em concentrações semelhantes às encontradas neste estudo.

No OE de *Eucalyptus citriodora* foram identificados os seguintes compostos voláteis: β-citronelal (264,31 µg g^{-1}), eucaliptol (34,07 µg g^{-1}), β-citronelol (26,79 µg g^{-1}) , β-pineno (25,85 µg g^{-1}) e α-limoneno (15,52 µg g^{-1}). A composição dos compostos voláteis deste OE foi elucidada por ELGAT et al., (2020) e UMEREWENEZA et al. (2019), que a classificaram principalmente como terpenos e sesquiterpenos. A ação antifúngica deste OEs é atribuída ao sinergismo entre os COVs que o compõem, uma vez que sua composição é complexa e variável, dependendo da espécie (UMEREWENEZA et al., 2019).

Entre os compostos voláteis identificados no OE de cravo e tomilho, eugenol (127,70 µg g^{-1}) e timol (85,33 µg g^{-1}), são considerados seus principais constituintes, respectivamente. Os mesmos compostos foram relatados por AHMED et al. (2021) e EL-ESSAWY et al. (2021) como principais COVs presentes nestes OEs. Vale destacar que a atividade antifúngica dos COVs encontrados frente a diferentes espécies de fungos, são atribuídas principalmente aos grupos -OH presentes nos núcleos aromáticos do OE de tomilho e cravo. Esses compostos oxidam e podem afetar as ligações de hidrogênio das enzimas fúngicas necessárias para sua sobrevivência durante seu ciclo de vida (DEBONNE et al., 2022; GHASEMI et al., 2019).

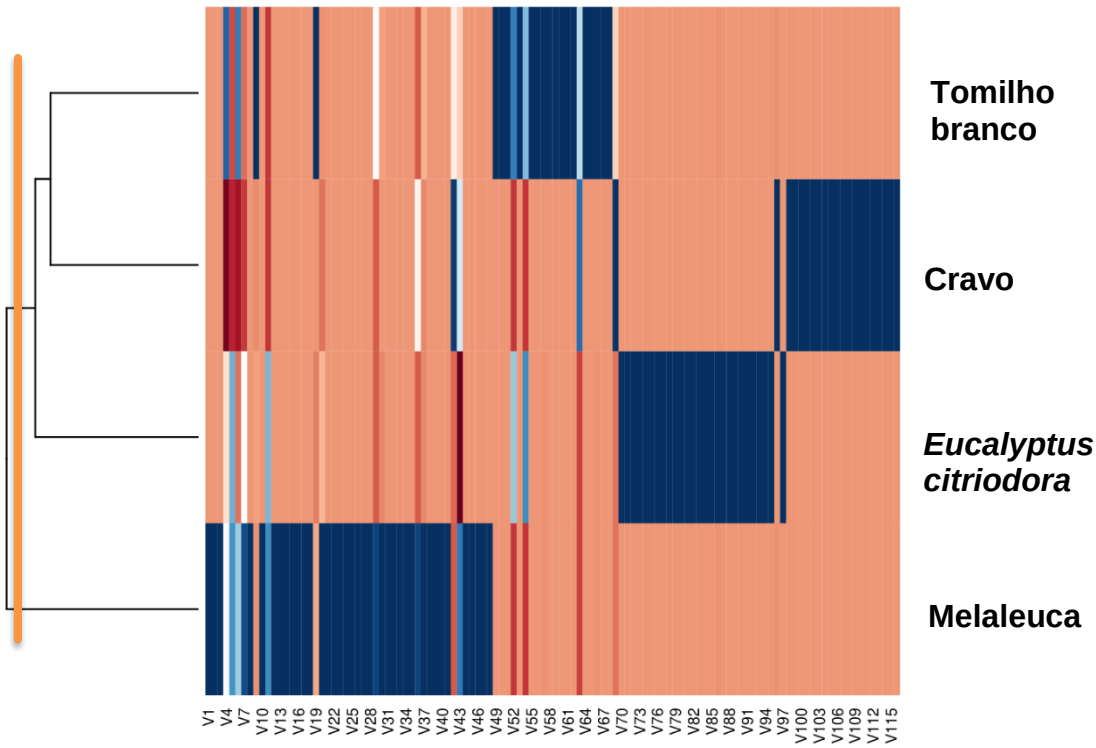


Figura 4 - Dendrogamma de compostos voláteis dos óleos essenciais OEs de tomilho branco, cravo, *Eucalyptus citriodora* e melaleuca.

V1: 3-hepteno, 2,6-dimetil-; V4: α-tujeno; V7: β-mirceno; V10: isocineol; V13: tujona; V16: estireno, 2,6-dimetil-; V19: 4-terpineol; V22: transpiperitol; V25: anetol; V28: cuminol; V31: β-elemeno; V34: ɣ-muuroleno; V37: β-cadineno; V40: 1,4-dimetil-3-(2-metil-1-propenil)-4-vinil-1-ciclohepteno; V43: óxido de cariofileno; V46: espatulenol; V49: α-tujeno; V52: 3-metil-apopineno; V55: m-mentano; V58: 3,8-p-pentadieno; V61: plinol A; V64: 4-terpineol; V67: α-terpineol; V70: α-copaeno; V73: timol; V76: β-cadineno; V79: β-bisaboleno; V82: butanal, 2-etil-; V85: 1-Isopropil-3-metilciclopentano; V88: estireno; V91: n-butirato de isobutil; V94: 3-careno; V97: α-felandreno; V100: α-limoneno; V103: terpinoleno; V106: β-citronelal; V109: dodecano; V112: α-selineno; V115: 3-heptadeceno.

3.3.3 Atividade antifúngica *in vitro* dos OEs

Os efeitos inibitórios dos nove diferentes OEs frente ao crescimento micelial do fungo *Penicillium digitatum* após 72 h de incubação por contato direto e por ação dos voláteis são apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. A fonte botânica do OE, sua concentração e a forma de ação (contato direto ou ação volátil) influenciaram o percentual de inibição do crescimento micelial do fungo.

Utilizando o contato direto como mecanismo de ação, o OE de cravo apresentou 100% de inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum* na concentração de 1 µL mL^{-1}, seguido pelos OEs de tomilho branco e *Eucalyptus citriodora*, ambos utilizados na concentração de 2 µL mL^{-1}. As concentrações de OEs utilizadas neste estudo são consideravelmente inferiores às reportadas por XING et al. (2012) que relataram uma concentração de 25 µL mL^{-1} de OE de cravo para inibir o crescimento fúngico de *Penicillium citrinum* pelo método de diluição em ágar. Isso demonstra o potencial efeito antifúngico dos OEs avaliados no nosso estudo, mesmo quando utilizados em baixas concentrações.

Os OEs de cravo, tomilho branco e *Eucalyptus citriodora* demonstraram capacidade de inibir o crescimento fúngico a partir de concentrações de 2 µL mL^{-1} pela ação dos COVs. A diferença de concentração entre o contato direto e a ação volátil pode estar relacionada às diferentes concentrações dos compostos químicos presentes em cada modo de ação. Os COVs atuam de diferentes formas, rompendo as células das hifas ou a membrana dos esporos dos fungos, inibindo a esporulação e afetando o crescimento de fungos deteriorantes (SUMALAN et al., 2020). HE et al. (2016) avaliaram o potencial antifúngico do OE de cravo em laranjas de umbigo, aplicando o óleo essencial (0,25 µL mL^{-1}) diretamente em lesões causadas nos frutos para avaliar o contato direto ou adicionando OE na caixa de armazenamento dos frutos (0,025 µL mL^{-1}) para avaliar a ação dos COVs. Os autores relataram que a incidência da doença em laranjas de umbigo tratadas com óleo essencial aplicado diretamente na ferida dos frutos foi menor (~50%) quando comparado às laranjas tratadas com a fase volátil do OE (72,84%). Esses resultados demonstram que, mesmo em baixas concentrações, estes óleos apresentam uma ação antifúngica promissora através da ação dos COVs, o que sugere que sua aplicação em alimentos com possibilidade de menor interferência negativa em atributos sensoriais.

Tabela 4 - Ação antifúngica pelo contato direto de diferentes óleos essenciais contra o crescimento micelial de fungo *Penicillium digitatum*.

Concentração (µL mL^{-1})	Inibição do crescimento (%) por contato direto								
	Melaleuca	Tomilho branco	*Eucalyptus staigeriana*	Cravo	*Eucalyptus citriodora*	Limão siciliano	Bergamota	Laranja doce	Mandarina Verde
40	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	43,5 ± 5,8	84,1 ± 3,8	80,7 ± 5,5	92,3 ± 0,9
20	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	35,2 ± 4,7	77,8 ± 1,7	76,3 ± 0,8	87,9 ± 2,2
10	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	31,9 ± 3,8	75,4 ± 1,4	32,8 ± 3,0	80,2 ± 4,7
5	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	71,5 ± 6,8	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	24,6 ± 5,2	44,9 ± 2,5	17,9 ± 2,2	57,0 ± 3,7
2	69,2 ± 2,8	100,0 ± 0,0	-	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	-	-	-	-
1	65,4 ± 1,6	63,5 ± 5,6	-	100,0 ± 0,0	84,1 ± 1,6	-	-	-	-
0,5	56,1 ± 1,6	24,3 ± 5,6	-	38,3 ± 4,9	29,0 ± 4,3	-	-	-	-

Tabela 5 - Ação antifúngica por ação volátil de diferentes óleos essenciais frente ao crescimento micelial do fungo *Penicillium digitatum*.

Concentração (µL.mL-¹)	Inibição do crescimento (%) por ação dos voláteis								
	Melaleuca	Tomilho branco	*Eucalyptus staigeriana*	Cravo	*Eucalyptus citriodora*	Limão siciliano	Bergamota	Laranja doce	Mandarina Verde
40	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	45,5 ± 6,6	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	44,8 ± 1,5	34,5 ± 3,9	-56,9 ± 5,9	12,1 ± 6,8
20	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	34,7 ± 2,9	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	-43,1 ± 3,0	-46,5 ± 1,5	-30,2 ± 1,5	-23,9 ± 5,4
10	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	33,1 ± 2,5	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	-27,6 ± 7,9	-48,3 ± 3,9	-23,3 ± 1,5	-44,8 ± 6,8
5	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	20,7 ± 4,9	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	-28,4 ± 5,4	-65,5 ± 5,2	-15,5 ± 1,5	-51,7 ± 3,9
2	84,8 ± 1,7	100,0 ± 0,0	-	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	-	-	-	-
1	63,8 ± 5,9	79,0 ± 5,9	-	82,9 ± 2,9	70,5 ± 4,4	-	-	-	-
0,5	17,1 ± 5,7	54,3 ± 7,6	-	77,1 ± 5,7	61,9 ± 5,9	-	-	-	-

O OE de melaleuca apresentou 100% de inibição do crescimento micelial na concentração de 5 µL mL^{-1} por contato direto e por ação dos COVs. Nas menores concentrações do OE (2, 1 e 0,5 µL mL^{-1}), houve inibição do crescimento micelial de 69,16, 65,42 e 56,07% por contato direto, e 84,76, 63,81 e 17,14% pela ação dos COVs. A ação antifúngica do OE de melaleuca está associada principalmente aos terpenos presentes no OE (YASIN et al., 2021). Compostos como 4-terpineol, α-terpineol, terpinoleno e α-pineno presentes no OE tendem a atuar por contato direto. Por outro lado, a ação dos COVs parece estar relacionada aos terpenos presentes em maiores concentrações, tais como α-pineno, β-felandreno, β-pineno, β-mirceno e α-terpineol (concentrações > 20 µg g^{-1}) (YASIN et al., 2021). Apesar de ser necessário maiores concentrações deste OE para inibir 100% de crescimento micelial, este OE também demonstra ser um potencial agente antifúngico no controle de *P. digitatum.*

O OE de *Eucalyptus staigeriana* apresentou resultados de 100% de inibição do crescimento micelial em concentrações ≥ 10 µL mL^{-1} quando em contato direto. Essa ação está diretamente relacionada aos compostos presentes no OE, como D-limoneno, citral, terpinoleno e Lemonol, classificados como terpenos. Quanto à ação dos COVs, à medida que houve aumento na concentração de OE observou-se também um aumento no percentual de inibição do crescimento micelial; porém, nem mesmo a maior concentração testada neste estudo (40 µL mL^{-1}) foi capaz de inibir 100% do crescimento micelial. Apesar do OE de *Eucalyptus staigeriana* apresentar controle de crescimento micelial de *P. digitatum* quando em contato com o fungo, a alta concentração necessária para obter tal resultado, pode interferir negativamente em atributos sensoriais, se aplicado em uma matriz alimentar.

Os OEs de fontes cítricas (limão siciliano, mandarina verde, bergamota e laranja doce) apresentaram os menores percentuais de inibição do crescimento micelial para ambos os mecanismos de ação avaliados. A diminuição da concentração de OE foi acompanhada pela diminuição da inibição do crescimento micelial do fungo quando avaliado por contato direto. Porém, apesar de reduzir o crescimento, as maiores concentrações aplicadas não foram eficientes o suficiente para inibir completamente o crescimento micelial do fungo. Estes resultados contradizem os relatados por TAO; JIA; ZHOU (2014) que encontraram inibição de 100% do crescimento micelial dos fungos *P. italicum* e *P. digitatum* quando aplicados OE de *Citrus reticulata Blanco* em concentrações de 2,50 e 40 µL mL^{-1}, respectivamente. A não inibição completa do crescimento micelial de *P. digitatum* por contato direto,

observada neste estudo, pode estar relacionada à fonte desses OEs. O fungo, isolado de frutas cítricas contaminadas, possivelmente já estava exposto aos compostos destes OEs, o que pode levar a sua adaptação e consequentemente criar uma espécie de resistência fúngica. Dessa forma, os OE de fontes cítricas avaliados neste estudo não podem ser considerados potentes agentes antifúngicos para o controle de *P. digitatum*.

Além disso, os OEs de origem cítrica apresentaram comportamentos distintos, possivelmente devido à ação dos COVs (Tabela 5). OE de limão siciliano, bergamota e mandarina verde apresentaram redução no crescimento micelial do fungo na maior concentração aplicada (40 µL mL^{-1}). Entretanto, nas concentrações mais baixas (20, 10 e 5 µL mL^{-1}), estes OEs foram responsáveis por estimular o crescimento micelial (valores negativos). Este fato pode ser devido à origem do fungo e à origem dos OEs serem as mesmas. CHEN et al. (2019) relataram que compostos presentes nesses óleos essenciais, como limoneno, mirceno, α-pineno e β-pineno, podem estimular o crescimento de *P. digitatum* e *P. italicum*.

A atividade antifúngica dos OEs ainda não foi totalmente elucidada e é impossível afirmar exatamente quais compostos voláteis desempenham esta atividade. Porém, sugere-se que sua composição complexa ataca a parede celular do fungo, prejudicando o sistema reprodutivo e vegetativo, causando extravasamento celular e interferindo em suas unidades de propagação (ROCHA NETO et al., 2019).

A composição dos OEs é naturalmente afetada pelas características da planta, como estágio de desenvolvimento, variedade, origem geográfica, parte da planta utilizada, idade, estação e condição da planta quando colhida. Além disso, também são afetadas pelo método de extração, pelas condições de análise e pelo solvente utilizado (AGUILAR-VELOZ et al., 2020). Portanto, esses fatores também influenciam a capacidade de inibir o crescimento fúngico.

De maneira geral, os resultados deste estudo indicam que 100% de inibição do crescimento micelial do fungo *P. digitatum* foi observado quando 1 µL mL^{-1} de OE de cravo, 2 µL mL^{-1} de OE de tomilho branco e OE de *Eucalyptus citriodora*, 5 µL mL^{-1} de OE de melaleuca e 10 µL mL^{-1} de OE de *Eucalyptus staigeriana* foram aplicados por contato direto. Entretanto, nenhum OE de origem cítrica (limão siciliano, bergamota, laranja doce e mandarina verde) foi capaz de inibir 100% do crescimento fúngico quando o mecanismo de ação por contato direto foi usado, mesmo na maior concentração aplicada (40 µL mL^{-1}).

Em relação à ação por COVs, observou-se uma inibição total do crescimento fúngico quando aplicados 2 µL mL^{-1} de OEs de cravo, tomilho branco e *Eucalyptus citriodora* e 5 µL mL^{-1} de OE de melaleuca. Por outro lado, no mesmo modo de ação, o OE de *Eucalyptus staigeriana* e os OEs de fontes cítricas não conseguiram inibir 100% do crescimento de *P. digitatum*.

3.4. Conclusão

Os principais compostos dos óleos essenciais (OEs) foram eugenol no de cravo, timol no de tomilho branco, isoborneol no de *Eucalyptus citriodora*, bergamiol no de bergamota, 4-terpineol no de melaleuca e D-limoneno nos de laranja doce, limão siciliano, mandarina verde e de *Eucalyptus staigeriana*. Para os compostos voláteis avaliados por *headspace*, os compostos majoritários encontrados nos OEs de cravo, tomilho, *Eucalyptus citriodora* e melaleuca foram eugenol, timol, β-citronelal e α-pineno, respectivamente.

Os OEs de fontes não cítricas como cravo, *Eucalyptus citriodora* e tomilho branco foram os que apresentaram maiores percentuais de inibição do crescimento micelial do *P. digitatum*, mesmo em menores concentrações, tanto por contato direto quanto pela ação de compostos voláteis. Porém, quando os OEs de fontes cítricas como bergamota, limão siciliano, mandarina verde e laranja doce foram avaliados por contato direto, não houve inibição do crescimento micelial do fungo em nenhuma das concentrações avaliadas. Exceto para o OE de laranja doce, que promoveu o crescimento micelial de *P. digitatum* em todas as concentrações aplicadas. Comportamento semelhante foi observado quando aplicadas menores concentrações de OEs de limão siciliano, mandarina verde e bergamota.

É de suma importância a aplicação de OEs em alimentos em quantidades adequadas para desempenhar os efeitos antifúngicos desejados sem comprometer a qualidade sensorial do produto. Nesse sentido, avaliações *in vitro*, como a realizada neste estudo, permitem determinar as concentrações mínimas necessárias para obter atividade antifúngica sem causar interferências significativas indesejáveis nas características sensoriais dos alimentos. Além disso, estes OEs podem ser aplicados na forma de encapsulados, através de técnicas como a formação de nanoemulsões, nanoestruturas ou filmes nanocompósitos, podendo ser utilizados para aplicação como embalagem ativa de frutas cítricas. Essas abordagens podem evitar interferência no sabor e odor dos alimentos e controlar a proliferação do fungo *P. digitatum*, responsável pelas perdas pós-colheita de frutas cítricas.

4. Capítulo 2

Potencial antifúngico frente a *Penicillium digitatum* de óleos essenciais de cravo e tomilho branco encapsulados com amido-OSA por *electrospraying*

Resumo

O amido modificado por octenil succínico anidrido (OSA) é um importante polissacarídeo que pode ser utilizado como material de parede para encapsulação de óleos essenciais (OEs). O objetivo do presente trabalho foi desenvolver microcápsulas a base de amido-OSA contendo óleo essencial de cravo (OEC) e óleo essencial de tomilho branco (OETB) por *electrospraying.* O potencial antifúngico dos OEs encapsulados em diferentes concentrações foi avaliado frente ao fungo *Penicillium digitatum.* As microcápsulas foram avaliadas quanto a morfologia, distribuição de tamanho de partícula, capacidade de carregamento, propriedades térmicas e grupos funcionais. A atividade antifúngica frente a P. *digitatum* foi avaliada por microatmosfera e por difusão em poço. As microcápsulas apresentaram formato esférico e uniforme. A capacidade de carregamento das microcápsulas variou de 69 a 83%, sendo a cápsula com 4% de OEC a que apresentou maior potencial de carregamento. A análise de identificação dos grupos funcionais sugeriu a interação dos OEs com o material da parede. As propriedades termogravimétricas demonstraram que o amido-OSA é capaz de reter os compostos voláteis dos OEs e retardar sua degradação térmica. O amido-OSA foi eficiente como material de parede para encapsular OEs utilizando a técnica de *electrospraying*. As microcápsulas de amido-OSA adicionadas de 4% de OEC e 4% de OETB destacaram-se por apresentar os maiores halos de inibição do crescimento micelial de *P. digitatum*, tanto pela técnica de difusão em poço quanto por microatmosfera. Além disso, os resultados demonstram o potencial de aplicação das microcápsulas produzidas com ambos os OEs avaliados com potencial antifúngico frente ao fungo *P. digitatum.*

Palavras-chave: Encapsulação; Amido modificado; Octenil succínico anidrido; microcápsulas.

4.1 Introdução

O avanço da ciência e tecnologia de alimentos têm estimulado cada vez mais o interesse dos consumidores pela busca de alimentos saudáveis e funcionais, isentos de conservantes químicos. A contaminação fúngica representa um risco à garantia de segurança alimentar, contribuindo para a depreciação dos alimentos em várias fases da cadeia de abastecimento, desde a colheita e transporte até ao armazenamento. Além das preocupações relacionadas com a saúde, o crescimento fúngico afeta também a qualidade e a comercialização dos produtos alimentícios (ABDI-MOGHADAM et al., 2023). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), os fungos são os agentes responsáveis por aproximadamente 25% das perdas de alimentos agrícolas em todo o mundo (FAO, 2023).

Para inibir o crescimento fúngico, a aplicação de fungicidas sintéticos tem sido utilizada como método predominante. No entanto, é de conhecimento científico que os compostos antifúngicos sintéticos podem apresentar efeitos adversos à saúde do consumidor. Para solucionar este problema, diversos estudos têm sido reportados sugerindo o uso de compostos naturais capazes de inibir o crescimento de fungos e representando uma alternativa aos conservantes sintéticos, seguindo a crescente tendência de “produtos mais verdes”, focados na sustentabilidade (SUNDAR; PARIKH, 2023; TAHERI; SOWEIZY; TARIGHI, 2023). Nesse contexto, os óleos essenciais (OEs) representam uma excelente opção como agentes antifúngicos naturais devido às suas características biocompatíveis, biodegradáveis e de baixo custo (FINCHEIRA et al., 2023).

De forma geral, o mecanismo de ação antifúngica dos OEs está relacionado à capacidade destes compostos de penetrar e romper a estrutura celular fúngica, alterando a permeabilidade em toda a membrana plasmática e interferindo na síntese de ATP, desnaturando proteínas e causando danos irreparáveis à membrana celular (HOU et al., 2022; YAO et al., 2023). Os OEs são metabólitos secundários extraídos de plantas aromáticas, encontrados em várias partes das plantas, incluindo frutas, cascas, rizomas, raízes, flores, sementes e folhas. Diversos OEs têm sido apontados como potenciais agentes antifúngicos para aplicação em alimentos, como reportado na revisão sistemática de Abdi-Moghadam et al. (2023).

Dentre as ervas aromáticas mais utilizadas em todo o mundo, merecem destaque os OEs de cravo e de tomilho. Diversos pesquisadores concentram seus

esforços para avaliar o potencial antifúngico destes OEs frente a patógenos de alimentos. O OE de cravo foi reportado como um potente antifúngico frente a *Eurotium spp*, deteriorante de damasco (DEBONNE et al., 2022), *Botryosphaeria dothidea* e *Colletotrichum gloeosporioides*, deteriorantes de maçã (WANG et al., 2023), *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus niger* encontrados em tomates (MUÑOZ CASTELLANOS et al., 2020), *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum* causadores de mofos em frutas cítricas (CHEN et al., 2019; WANG et al., 2018). O OE de tomilho é relatado como um potente antifúngico para inibir a proliferação de *Botrytis cinerea* (FINCHEIRA et al., 2023; LOPES et al., 2023), *Penicillium expansum* (FINCHEIRA et al., 2023), *Fusarium oxysporum* (AMOOZEGARAN et al., 2022), dentre outros fungos de relevância na área de alimentos.

Apesar das propriedades benéficas atribuídas aos OEs, sua aplicação em alimentos é limitada devido à sua natureza altamente volátil, fácil decomposição em condições ambientais e baixa solubilidade em fases aquosas (AMIGHI et al., 2023; YANG et al., 2022). Uma estratégia para superar estas desvantagens é a encapsulação, que envolve o aprisionamento do OE dentro de um material biocompatível a fim de garantir a sua proteção, promover a sua liberação controlada e aumentar a sua biodisponibilidade (YAMMINE et al., 2023).

Diferentes técnicas de encapsulação têm sido reportadas na literatura, e nos últimos anos o *electrospraying*, uma técnica simples, versátil e de baixo custo vem ganhando destaque na encapsulação de OE; uma vez que não emprega altas temperaturas, protegendo desta forma os compostos bioativos voláteis (CRUZ et al., 2023; PIRES et al., 2023). O *electrospraying* é um processo eletro hidrodinâmico que permite a produção de cápsulas em escala micro e/ou nanométrico, com alta relação superfície-volume e estrutura altamente porosa (BIDUSKI et al., 2019; LIM; MENDES; CHRONAKIS, 2019). Neste sistema, uma solução líquida é pulverizada através de uma agulha em direção a um alvo coletor. A diferença de potencial gerada pela formação de um campo elétrico faz com que o solvente presente na solução evapore e no coletor seja depositado o material seco, na forma de cápsulas ou esferas (PIRES et al., 2022). O uso de pressão atmosférica, de temperatura ambiente, de pequenas quantidades de solvente, de solventes verdes e de polímeros de fontes naturais, renováveis e biodegradáveis apresentam benefícios significativos para encapsulação de OEs, em comparação com outros métodos tradicionais de encapsulação (SOUZA et al., 2021).

Conforme relatado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, o amido pode ser utilizado como material de parede para a encapsulação de OEs por técnicas eletro hidrodinâmicas, através da formação de nanocápsulas ou nanofibras. Fibras de amido de mandioca, de caroço de abacate e de batata foram utilizadas para encapsular OEs de capim-limão, gengibre e tomilho por *electrospinning* (CRUZ et al., 2023; FONSECA et al., 2020; PIRES et al., 2024). No entanto, o amido apresenta natureza predominantemente hidrofílica, em sua forma nativa, o que acarreta em pouca afinidade por moléculas hidrofóbicas. Em virtude disso, sua utilização como material de parede para encapsulação de OEs apresenta limitações (SOUZA et al., 2021). Como alternativa, o amido pode ser modificado por métodos químicos, físicos ou enzimáticos visando alterar a sua estrutura hidrofílica. Neste sentido, destaca-se o amido modificado por octenil succínico anidrido (amido-OSA), originando uma molécula anfifílica, composto por grupos hidrofóbicos da molécula OSA e grupos hidrofílicos (hidroxila) do amido nativo (BIDUSKI et al., 2019). Alguns estudos relataram o uso de amido-OSA como material de parede para encapsulação de OEs (BIDUSKI et al., 2019; XIAO et al., 2019), porém, até onde sabemos, não foi relatado seu uso para encapsulação de OE de cravo e tomilho branco

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver microcápsulas a base de amido-OSA adicionadas de OEs de cravo e de tomilho branco por *electrospraying* e avaliar seu potencial antifúngico frente ao fungo *P. digitatum.*

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Materiais

O óleo essencial de tomilho branco (OETB) foi adquirido da empresa Ferquima e o óleo essencial de cravo (OEC) da empresa Dierberger Óleos Essenciais. O amido-OSA foi gentilmente fornecido pela empresa Ingredion. O fungo *P. digitatum* foi obtido por isolamento de frutas críticas infectadas. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e cromatográfico. Os OEs foram analisados quanto a composição química em estudo prévio. Os compostos majoritários do OEC são eugenol (85,88%) e cariofileno (12,99) e do OETB são timol (22,72%), terpinoleno (16,36), linalol (15,94%), p-menta-1,3,8-triene (11,69%) e carvacrol (8,37%).

4.2.2 Preparo das emulsões e formação de microcápsulas por *electrospraying*

Para elaboração das soluções poliméricas utilizadas no processo de eletrofiação, uma emulsão (O/W) foi formada com a dissolução de amido-OSA (40%, p/v) em solução etanólica de 20% (v/v). Essa solução foi homogeneizada em agitador magnético durante 30 minutos. Após, foi adicionado o OEC ou OETB (2, 3 e 4%, p/p, amido) e esta solução permaneceu em agitação durante 30 min, sob proteção de luz. A solução polimérica foi carregada em uma seringa de plástico de 3 mL conectada com uma agulha de fieira de aço inoxidável (Ø 0,8) apontando horizontalmente em direção a uma placa coletora de aço inoxidável aterrada. Foi utilizado um equipamento montado dentro de uma câmara de teste ambiental com as seguintes condições experimentais: temperatura de 20 ± 2° C e umidade relativa de 40 ± 5% , equipado com uma fonte de alimentação (Modelo ES30R-5 W / DM; Gama High Voltage Research, EUA) e uma bomba de infusão de seringa (Modelo 780,100; Kd Scientific Inc., Holliston, MA, EUA). Os níveis de variação de processo utilizados foram voltagem de 23 kV, 15 cm de distância entre agulha e coletor e 0,6 mL h^{-1} de taxa de alimentação. As microcápsulas com suas respectivas concentrações de OE foram nomeadas como: OEC 2%, OEC 3% OEC 4%, quando adicionadas de OE de cravo e OETB 2%, OETB 3%, OETB 4%, quando adicionadas de OE de tomilho branco, e controle, quando não ocorreu adição de OE.

4.2.3 Condutividade elétrica da solução polimérica

A condutividade elétrica das soluções poliméricas foi determinada utilizando um medidor de condutividade de bancada (Simpla, modelo EC 150, Brasil) e expressa em

mS cm^{-1}. As medidas foram realizadas em triplicata e a temperatura ambiente (22±2 °C).

4.2.4 Morfologia das cápsulas

A morfologia das microcápsulas foi avaliada utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) com uma voltagem de aceleração de 15 kV. Uma pequena porção de amostra foi fixada na superfície do *stub* com uma fita de carbono dupla face e recoberta com uma camada de ouro utilizando um metalizador a vácuo. As imagens foram analisadas para verificar a conformação das microcápsulas e seu diâmetro foi medido de forma aleatória em 50 microcápsulas, utilizando o software ImageJ na aproximação de 5000x.

4.2.5 Capacidade de carregamento

A capacidade das microcápsulas de amido de reter OEs foi avaliada por meio da determinação da capacidade de carregamento utilizando CG/MS. A preparação da amostra seguiu com protocolos descritos por Fonseca et al. (2021) e Pires et al. (2022), com algumas adaptações. Em resumo, as microcápsulas (40 mg) foram dissolvidas em 1 mL de etanol (20%, v/v) e agitadas em vórtex por 1 min. Em seguida, 600 µL de hexano (Sigma Aldrich) foram adicionados, a mistura foi agitada novamente por 30 segundos e centrifugada a 3226×g por 5 min a 10 ºC. O sobrenadante foi recolhido, filtrado com filtros de seringa de 0,22 µm e injetados no cromatógrafo. A capacidade de carga (CC) foi calculada comparando a quantidade real de compostos de OE presentes nas microcápsulas com a quantidade teórica de compostos de OE que podem ser retidos, utilizando a Equação 2.

$$CC\ (\%) = \frac{Quantidade\ real\ de\ compostos\ de\ OE\ em\ microcápsulas}{Quantidade\ teórica\ de\ compostos\ de\ OE\ em\ microcápsulas}\ x\ 100 \quad \text{(Eq. 2)}$$

4.2.6 Identificação dos grupos funcionais por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As microcápsulas de amido-OSA com e sem OE e o OEC e OETB, foram caracterizadas em um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (Shimadzu, IR Afnity-1, Japão). As amostras foram misturadas com KBr e

prensadas em *pellets* antes da análise. Os espectros foram obtidos na faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1}, com resolução de 2 cm^{-1} e 100 varreduras.

4.2.7 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica das cápsulas com e sem OEs foram realizadas em um analisador termogravimétrico (SDT Q600, marca TA Instruments, modelo TA60, EUA). As amostras (cerca de 5 mg) foram aquecidas em cápsulas de platina entre 30 e 600 °C, sob fluxo de N_2(g) de 50 mL min^{-1}, a uma taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1}. Uma cápsula de platina vazia foi usada como referência. Os dados brutos de TGA foram plotados e analisados usando Software Origin-Pro® 8.5.

4.2.8 Atividade antifúngica das microcápsulas

4.2.8.1 Ensaio de difusão de micro-atmosfera

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada seguindo metodologia descrita por Tao; Jia; Zhou (2014) e Chen et al. (2016), com algumas adaptações. O fungo *P. digitatum* foi isolado a partir de tecidos lesionados de fruto de citros infectados (isolamento direto). Os isolados foram cultivados em meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) à temperatura e fotoperíodo constante e posteriormente mantidos em meio BDA para uso nos ensaios.

Placas de Petri (60x15 mm) foram inoculadas com micélio jovem do fungo *P. digitatum* obtido a partir da margem de uma colônia de fungos que foi cortada com uma broca de cortiça (0,5 cm). Na tampa das placas foram dispostas 50 mg de cápsulas referentes a cada tratamento. As placas foram seladas com parafilme e encubadas invertidas a 25 ºC. Após 72 h de incubação o diâmetro da colônia foi avaliado através da medição diametricamente oposta do crescimento da colônia do fungo em placa, com auxílio de uma régua graduada (cm). A percentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) foi calculada de acordo com a Equação 3 (CHEN et al., 2016):

$$ICM(\%) = \frac{dc-dt}{dc-0,5} \times 100 \text{ (Eq. 3)}$$

Em que: dc (cm) é o diâmetro médio da colônia para os controles e dt (cm) é o diâmetro médio da colônia para o tratamento. Os resultados são expressos pela média ± desvio padrão.

4.2.8.2 Ensaio de difusão em ágar

Para ensaio de difusão em ágar das microcápsulas de amido-OSA, OEC e OETB foi seguida as metodologias propostas por Hashemi et al. (2016) e Kringel et al. (2020), com adaptações. Resumidamente, os fungos foram cultivados em Ágar Batata Dextrose (BDA) por 7 dias a 25ºC para induzir a formação de conídios e esporos. As colônias foram cobertas com solução salina estéril 0,85% (3 mL). O conteúdo fúngico foi transferido para tubos para decantar as partículas pesadas. Após aproximadamente 3 min, as suspensões superiores foram transferidas para tubos contendo solução salina e o inóculo foi ajustado com a escala McFarland para uma concentração de 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC (unidades formadoras de colônia) mL^{-1}). Placas de BDA (Ø 5,5 cm) foram inoculadas com 0,1 mL de solução fúngica em toda superfície. Em seguida, com auxílio de uma broca de cortiça (Ø 5mm) foi realizado um furo no centro da placa e adicionados 40 mg de microcápsulas de amido-OSA com OEC e OETB. As placas foram incubadas a 25 °C por 72 h e os halos de inibição foram medidas com auxílio de um paquímetro digital marca Mtx ®. Microcápsulas de amido-OSA sem OE também foram adicionadas a fim de verificar se o polímero não teria interferência no crescimento fúngico. Solução salina foi usada como controle positivo.

4.2.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para comparação de médias foi aplicado o teste de Tukey com nível de significância estatística de $p < 0,05$.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Condutividade elétrica das soluções

A condutividade elétrica das soluções poliméricas de amido-OSA adicionadas de OEC e OETB utilizadas para *electrospraying* estão apresentadas na Tabela 6. A condutividade elétrica é um parâmetro importante que pode afetar e interferir no processo de *electrospraying* de uma solução polimérica e consequentemente nas características dos materiais formados (PIRES et al., 2022; VAFANIA; FATHI; SOLEIMANIAN-ZAD, 2019). A adição OEC e OETB alterou a condutividade elétrica das soluções poliméricas. Para ambos os OEs o comportamento foi semelhante, conforme aumentou a concentração de OE adicionado observou-se uma diminuição da condutividade elétrica ($p < 0,05$) das soluções. Comportamento semelhante foi observado por Vafania; Fathi; Soleimanian-Zad (2019), ao adicionar diferentes concentrações de OETB em soluções poliméricas de quitosana e gelatina. Este comportamento é esperado, pois quanto maior é a quantidade de OE adicionada menor é a tendência da solução em conduzir correntes elétricas.

As soluções poliméricas contendo OEC apresentaram valores superiores de condutividade elétrica ($p < 0,05$) quando comparadas às soluções contendo OETB. A condutividade elétrica representa a concentração de íons móveis e a acessibilidade de condução em uma solução (PIRES et al., 2024). A condutividade das soluções de eletrofiação é de grande importância para a compreensão do comportamento na produção de materiais; soluções com baixa condutividade elétrica não terão cargas suficientes para promover o processo de eletrofiação, em contrapartida, soluções com maiores valores de condutividade elétrica não só aumentam a carga da superfície como tendem a produzir materiais com menores diâmetros (HAIDER, HAIDER e KANG, 2018). Em nosso estudo, apesar de observarmos diferença de condutividade elétrica nas soluções, este parâmetro não interferiu na morfologia e no diâmetro médio das cápsulas formadas.

Tabela 6 - Condutividade elétrica das soluções de amido-OSA e óleos essenciais de cravo e tomilho branco.

Tratamento	OE*	Concentração OE* (% p/p)	Condutividade (mS cm^{-1})
1	Cravo	2	$4,06^{Aa*} \pm 0,01$
2	Cravo	3	$4,03^{Aa*} \pm 0,00$
3	Cravo	4	$3,98^{Ba*} \pm 0,00$
4	Tomilho branco	2	$3,83^{Ab*} \pm 0,01$
5	Tomilho branco	3	$3,81^{ABb*} \pm 0,01$
6	Tomilho branco	4	$3,78^{Bb*} \pm 0,01$
7	Controle	0	$4,93^{\#} \pm 0,01$

Letras maiúsculas diferentes representam diferença entre as concentrações do mesmo OE. Letras minúsculas diferentes mostram diferença na mesma concentração dos diferentes OEs. Símbolos diferentes representam diferença entre as soluções com e sem OE.

*OE: óleo essencial; ** % de OE/% amido

4.3.2 Morfologia das cápsulas

As morfologias das microcápsulas obtidas por *electrospraying* e do amido OSA são apresentadas na Figura 5. Em todos os tratamentos avaliados foi possível produzir microcápsulas em formato esférico, liso e sem fissuras visíveis na parte externa. Esses recursos são importantes para evitar a perda dos compostos voláteis por evaporação (BIDUSKI et al., 2019). Cápsulas de formato esférico, liso, sem fissuras visíveis na parede também foram observadas por Biduski et al. (2019). Os autores utilizaram uma menor concentração de amido-OSA (20%) e adicionaram maiores concentrações de OE de alecrim (20, 30, 40 e 50% p/p) para formação das cápsulas. A diferença da concentração de amido-OSA e OE utilizada nos estudos não causou alterações drásticas na morfologia das cápsulas.

A partir das imagens de MEV, o diâmetro médio das cápsulas e a distribuição de tamanho das partículas foram determinados e estão apresentados na Figura 6. Em todas as condições experimentais foi observada a formação de cápsulas de tamanho nanométrico (< 1000 nm); porém, a distribuição de tamanho médio não apresentou uniformidade para que possamos denominá-las como nanocápsulas. A presença de um número elevado de capsulas de tamanho micrométrico (acima de 1000 nm) eleva a média em todos os tratamentos realizados. Apesar do tamanho não ser totalmente uniforme, isto não comprometeu a capacidade antifúngica na maioria dos tratamentos.

Ao desenvolver cápsulas de amido-OSA e OE de rosa pelo processo de liofilização, Xiao et al. (2019) obtiveram materiais de tamanho de 2,22 μm. Este fato pode estar relacionado à diferença de processo de secagem das cápsulas, além da diferença entre a composição química dos OEs, o que consequentemente, altera as interações com o amido-OSA.

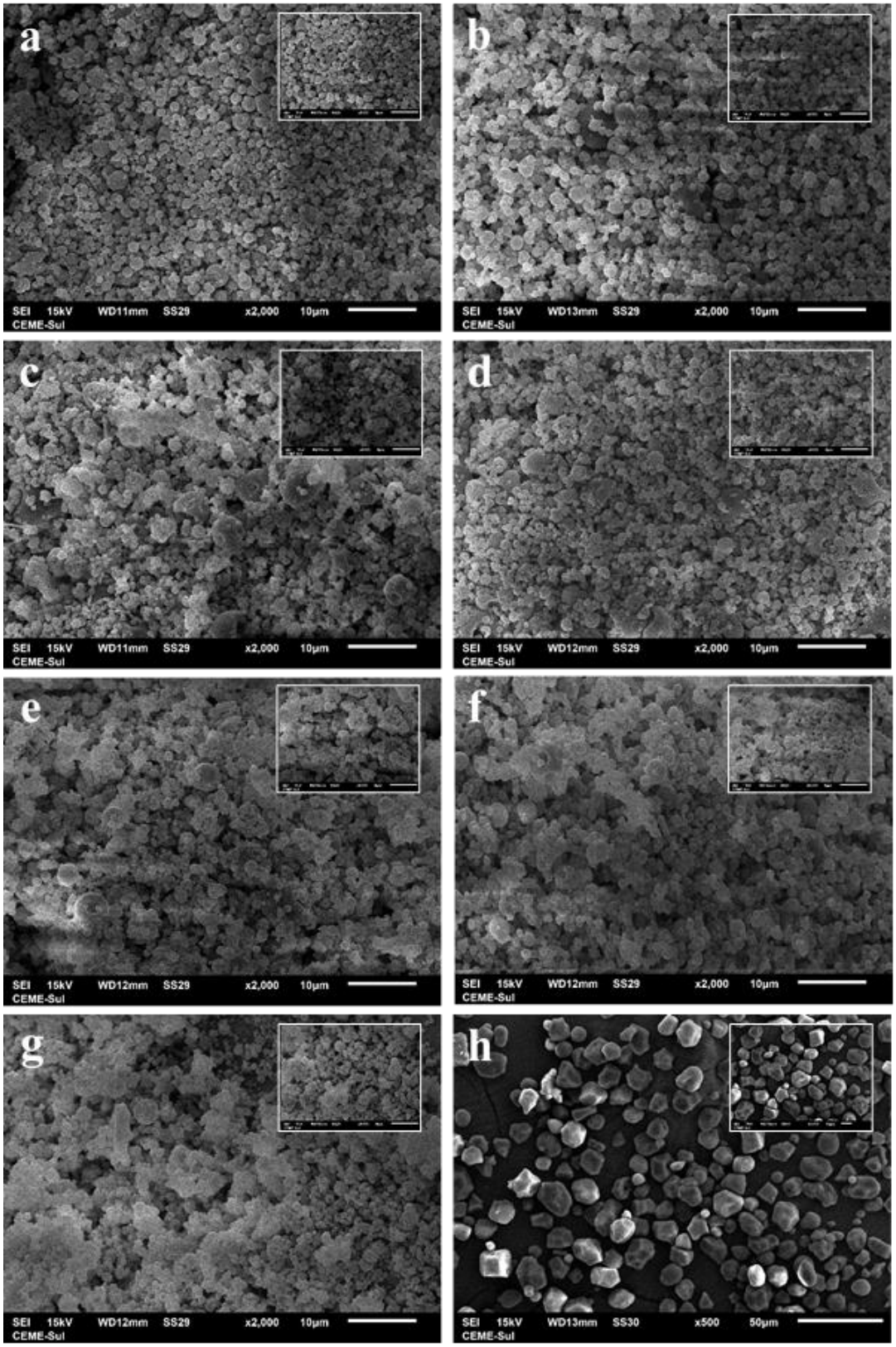


Figura 5 - Morfologia do amido-OSA e das microcápsulas de amido obtidas por *electrospraying*.
a – OEC 2%; b – OEC 3%; c – OEC 4%; d – OETB 2%; e – OETB 3%; f – OETB 4%; g – controle; h – amido-OSA

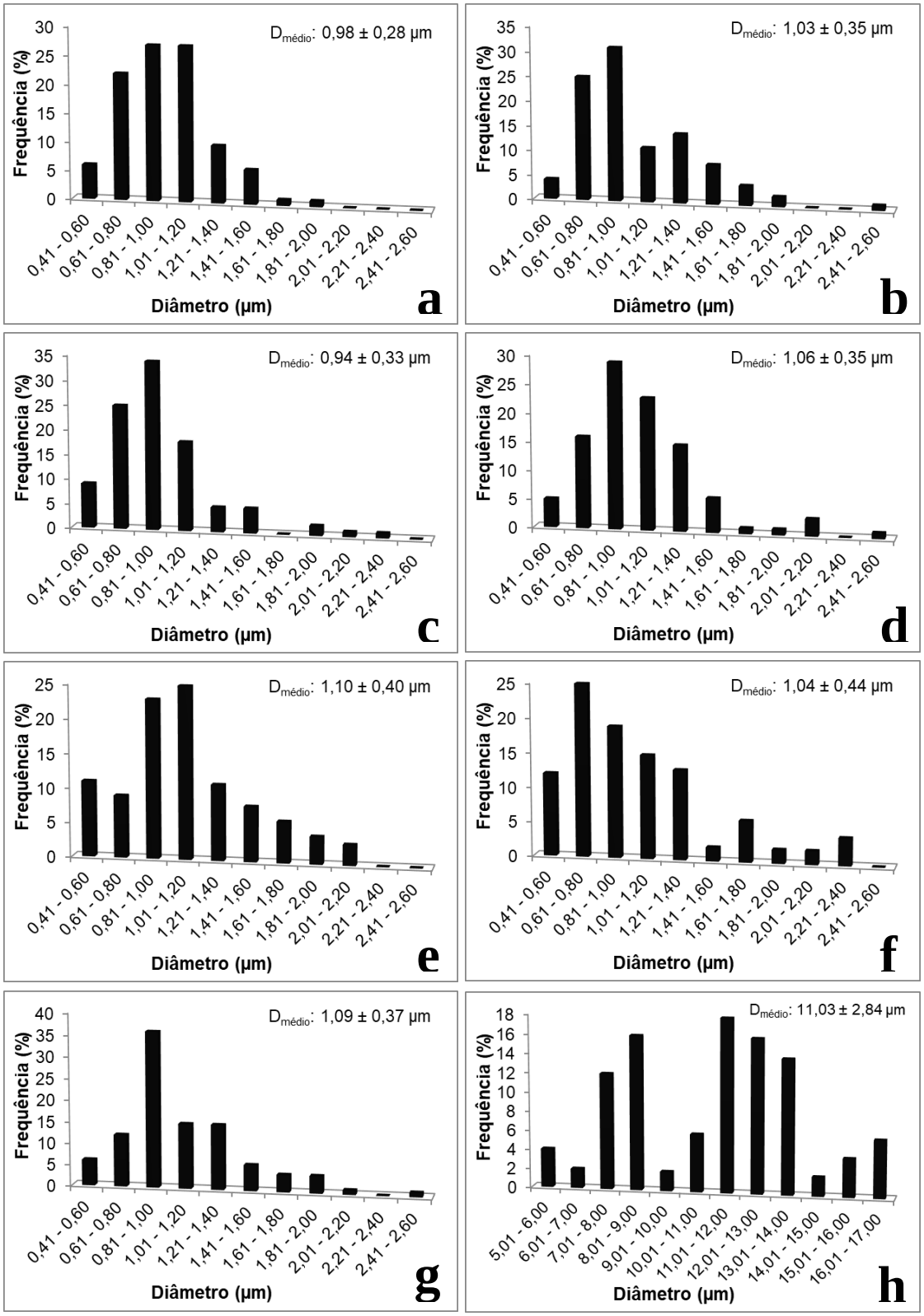


Figura 6 - Distribuição de frequência do diâmetro do amido-OSA e das microcápsulas de amido obtidas por *electrospraying*.

a – OEC 2%; b – OEC 3%; c – OEC 4%; d – OETB 2%; e – OETB 3%; f – OETB 4%; g – controle; h – amido-OSA.

4.3.3 Capacidade de carregamento

A capacidade de carregamento das microcápsulas de amido-OSA adicionadas de OEC e OETB está apresentada na Tabela 7. O aumento da capacidade de carregamento foi observado com o aumento da concentração de OE adicionado, para ambos os OEs testados. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as cápsulas com a maior concentração de OE (OEC 4% e OETB 4%) em relação às cápsulas com menor concentração de OE (OEC 2 e 3% e OETB 2 e 3%). Biduski et al. (2019), ao desenvolver cápsulas de amido-OSA adicionadas de OE de alecrim (0, 20, 30, 40 e 50%, p/p, óleo/amido OSA), encontraram maiores valores de eficiência de encapsulação, de 82 a 98%. As diferenças entre estes valores possivelmente se devem à composição química distintas dos OEs, o que consequentemente, proporciona diferentes interações com o material de parede, o amido-OSA.

Em contrapartida, na literatura há relatos de cápsulas de amido-OSA/maltodextrina adicionadas de OE de rosa, obtidos por liofilização que apresentaram capacidade de carregamento máxima de ~ 45% (XIAO et al., 2019). Os maiores percentuais de capacidade de carregamento encontradas em nosso estudo podem ser atribuídos ao uso de temperatura ambiente no processo de *electrospraying*, importante para reduzir as perdas por volatilização, o que é uma vantagem sobre outros métodos de encapsulação, como a liofilização (XIAO et al., 2019).

Tabela 7 - Capacidade de carregamento de cápsulas de amido-OSA adicionadas de óleo essencial de cravo e óleo essencial de tomilho branco

Cápsula*	Capacidade de carregamento (%)
OEC 2%	$70,6^{Ba} \pm 1,2$
OEC 3%	$69,9^{Bb} \pm 1,9$
OEC 4%	$83,0^{Ac} \pm 1,9$
OETB 2%	$69,0^{Ba} \pm 1,5$
OETB 3%	$68,3^{Bb} \pm 1,4$
OETB 4%	$79,4^{Ac} \pm 0,2$

*OEC: óleo essencial de cravo; OETB: óleo essencial de tomilho

Letras maiúsculas diferentes representam diferença entre as concentrações do mesmo OE. Letras minúsculas diferentes mostram diferença na mesma concentração dos diferentes OE.

4.3.4 Identificação dos grupos funcionais por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 7 é possível observar os espectros de FTIR obtidos para os materiais precursores (Figura 7a) bem como para as microcápsulas sem OE, com OEC e OETB (Figura 7b). O espectro do OEC apresentou bandas característica do eugenol, o qual está presente em mais de 85% de sua composição. Uma banda referente ao estiramento da ligação -O-H foi observada em 3529 cm^{-1}. Ainda, entre 2921 e 2842 cm^{-1} é possível observar bandas características do estiramento da ligação -C=C e -C-H_3 (TARHAN et al., 2022). Bandas características do estiramento -C=C do anel aromático foram observadas em 1611, 1516 e 1432 cm^{-1}. O estiramento da ligação -C-H de grupos metila foi observado em 1371 cm^{-1} (YIN et al., 2023). Em 1273 cm^{-1} nota-se uma banda referente ao estiramento -C-OH característica de fenol e em 1230 cm^{-1} o estiramento da ligação -C-O. O espectro apresentou também bandas características da ligação -C-O-C de éster aromático 1032 cm^{-1} (GAO; YANG; WANG, 2017; ROJAS et al., 2021).

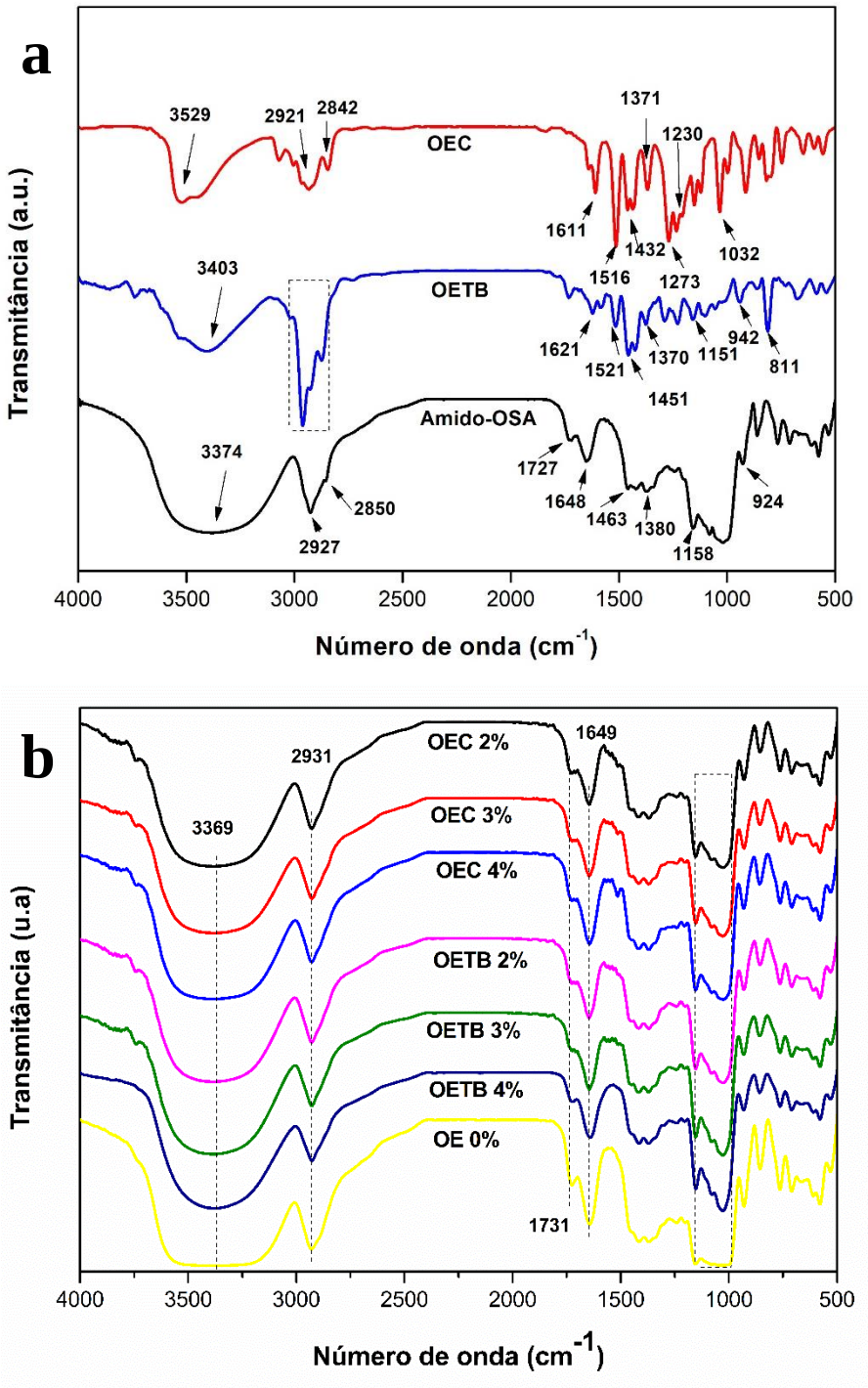


Figura 7 - Espectros de FTIR de óleo de cravo, de tomilho branco e amido-OSA (a) e das cápsulas de amido-OSA, com e sem óleo essencial, obtidas por *electrospraying.*

OEC: óleo essencial de cravo; OETB: óleo essencial de tomilho branco

Bandas características de timol, componente majoritário do OETB foram observados no espectro. Em 3403 cm^{-1} uma banda característica do estiramento da ligação -O-H do timol foi observada. Na região de 2800-3000 cm^{-1} observou-se bandas característica do estiramento da ligação C-H simétrico e assimétrico (VOLIĆ et al., 2022). Também é possível observar bandas característica do estiramento da ligação -C=C de alcenos em 1621 cm^{-1}, 1521 cm^{-1} e 1451 cm^{-1}. Ainda em 1370 cm^{-1} nota-se o estiramento da ligação -C-C da porção isopropílica (VOLIĆ et al., 2022). O espectro também apresentou uma banda 1151 cm^{-1} característica do estiramento da ligação -O-H na posição meta do anel aromático. Além disso, em 942 cm^{-1} nota-se uma banda característica do estiramento da ligação -C-C presente no timol e no terpinoleno bem como uma banda intensa em 811 cm^{-1} característica do estiramento fora do plano da ligação -C-H, que ocorre no timol (SHARMA et al., 2022).

No espectro referente a natureza química do amido-OSA é possível observar em torno de 3374 cm^{-1} o estiramento da ligação -O-H e em 2927 e 2850 bandas referente ao estiramento da ligação C-H. Na região de 1727 cm^{-1} há uma banda característica da ligação -C=O, a qual está presente na porção OSA do amido (DU et al., 2023). Também se observa uma banda em 1648 cm^{-1} referente ao estiramento dos grupos carboxilato ($-COO^-$). As bandas na região de1463 cm^{-1} e 1380 cm^{-1} são característica da flexão da ligação $-CH_2$ (BIDUSKI et al., 2019; LI et al., 2023). No espectro ainda se observa na região de 1158-924 cm^{-1} bandas atribuídas ao estiramento das ligações -C-O-C, -C-C e -C-OH presentes no anel piranosídico (WANG et al., 2022).

Os espectros das microcápsulas apresentaram as bandas características da estrutura química do amido-OSA com leves deslocamentos de número de onda, o que é característico de cápsulas obtidas por *electrospraying* (BIDUSKI et al., 2019). Quando incorporadas com OEC ou OETB, não apresentaram mudanças significativas em seus espectros, o que indica que as concentrações de OE adicionado não interferem na estrutura química das cápsulas. No entanto, ao comparar as microcápsulas com e sem OE é possível observar um estreitamento da banda referente ao estiramento da ligação -O-H, possivelmente devido a adição do OEC e OETB interromper as interações de H inter e intramoleculares das cápsulas formuladas (DU et al., 2023; SHARMA et al., 2022; VOLIĆ et al., 2022). Ainda, observa-se uma alteração da intensidade e um leve deslocamento nas bandas

características do estiramento das ligações C-O-C em torno de 1146 cm^{-1} e 1024 cm^{-1} o que também indica a presença de OE nas cápsulas (YIN et al., 2023).

4.3.5 Análise Termogravimétrica (TGA)

Os terrmogramas e as primeiras derivadas (termogravimetria derivada, DTG) das microcápsulas e do amido-OSA são demonstrados nas Figuras 8a e 8b, respectivamente, e as propriedades termogravimétricas estão apresentadas no Apêndice B. O amido-OSA apresentou um padrão térmico com dois estágios de perda de massa, onde o primeiro ocorre entre 36-93 ºC com perda de cerca de 7% de massa (Δm_1), o qual está atribuído a perda de água. Já o segundo estágio ocorreu entre 248-354 ºC com Δm_2 de ~66%, decorrente da decomposição do polímero (PIRES et al., 2022).

As microcápsulas de amido-OSA contole (sem OE) também apresentaram comportamento semelhante ao amido puro, com perda de massa em dois estágios. A primeira etapa apresentou Δm_1 de ~9,6% com temperatura de pico (Tp_1) de ~54 °C, e, o segundo estágio apresentou Δm_2 de ~63,7% com Tp_2 de ~305,4 °C, característico da decomposição térmica do polímero (LI et al., 2023).

Devido a adição de diferentes concentrações de OEC e OETB, as microcápsulas apresentaram, no primeiro estágio, menores perdas de massa do que as cápsulas sem OE (Δm_1 com variação de 3,4 a 6,3%), além de temperatura de pico (Tp_1 de ~43 a 52 °C) e temperatura final (Tpf_1 de máx 105 °C) inferiores. Este fato por estar relacionado a interrupção de interações de H inter e intramoleculares das cápsulas formuladas, observadas nos espectros de FTIR, o que exige uma menor energia para quebra de ligações (XIAO et al., 2019).

A menor perda de massa das microcápsulas adicionadas de diferentes concentrações de OEC e OETB em comparação às cápsulas sem OE, ocorrida no primeiro evento, sugerem que o amido-OSA é um polímero capaz de reter compostos voláteis. Este fato ocorre possivelmente devido ao efeito de resistência térmica dos materiais da parede, que diminuiu a taxa de transferência de calor e aumenta a temperatura da pirólise (XIAO et al., 2019).

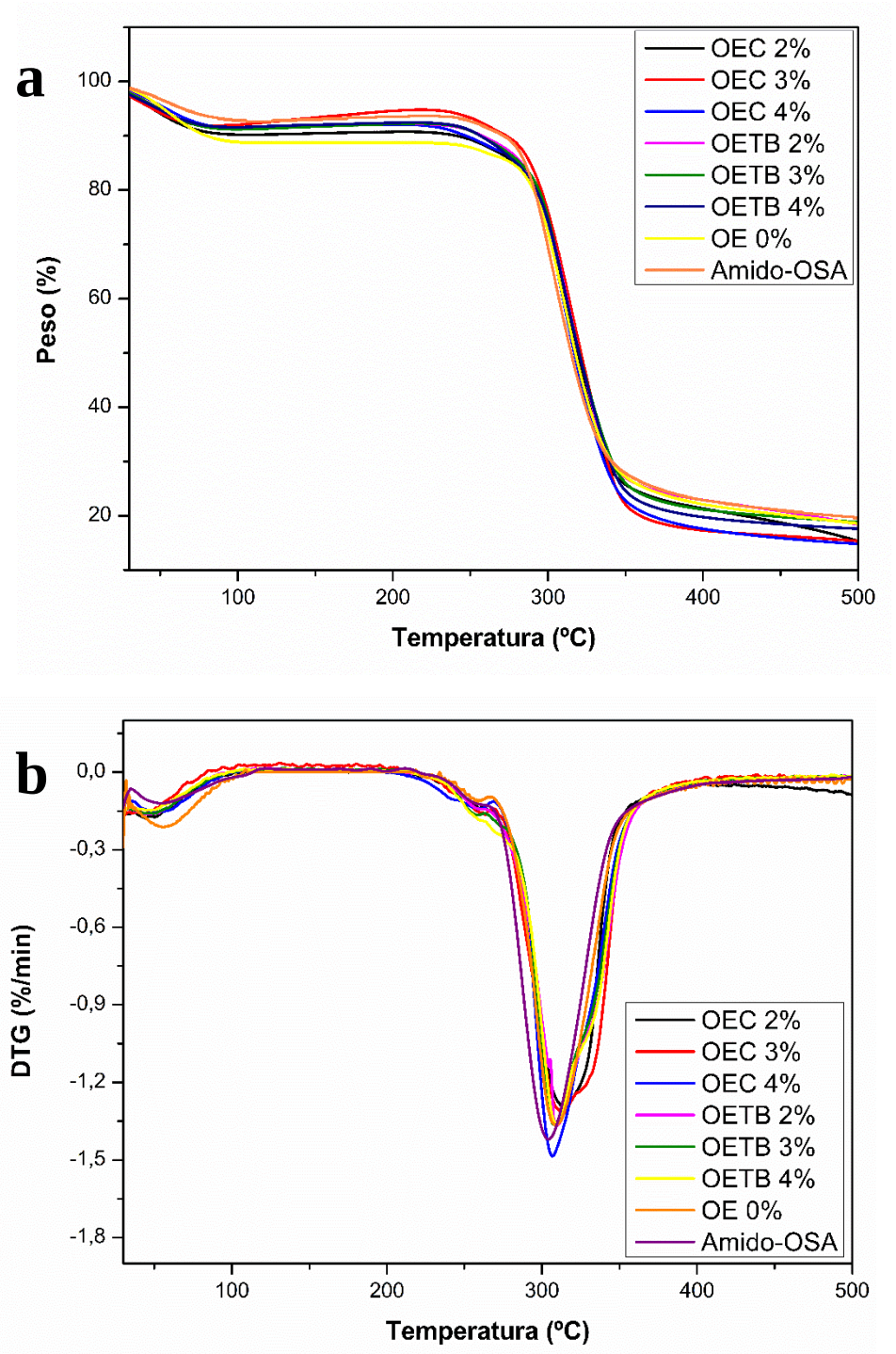


Figura 8 - Curvas TG (a) e curvas DTG (b) obtidas para amido-OSA e microcápsulas de amido adicionadas de óleos essenciais de cravo e tomilho branco.

OEC: óleo essencial de cravo; OETB: óleo essencial de tomilho branco; amido-OSA: amido modificado com anidrido octenil succínico

4.3.6 Atividade antifúngica

A atividade antifúngica das microcápsulas de amido-OSA adicionadas de OEC e OETB por ação dos voláteis e por difusão em ágar é apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 - Atividade antifúngica das microcápsulas de amido-OSA com e sem óleo essencial.

Cápsula*	Inibição do crescimento micelial por voláteis (%)	Halo de inibição (mm)
OEC 2%	$30,8^{Ca\#} \pm 2,4$	$0,0^{Ca*} \pm 0,0$
OEC 3%	$46,2^{Bb\#} \pm 3,6$	$13,8^{Bb\#} \pm 1,2$
OEC 4%	$57,7^{Ac\#} \pm 1,4$	$21,0^{Ac\#} \pm 1,4$
OETB 2%	$31,7^{Ba\#} \pm 2,7$	$0,0^{Ca*} \pm 0,0$
OETB 3%	$38,5^{Bb\#} \pm 2,7$	$12,3^{Bb\#} \pm 1,3$
OETB 4%	$51,0^{Ac\#} \pm 4,1$	$20,3^{Ac\#} \pm 1,2$
Controle	$0,0^{*} \pm 0,0$	$0,0^{*} \pm 0,0$

*OEC: óleo essencial de cravo; OETB: óleo essencial de tomilhoLetras maiúsculas diferentes representam diferença entre as concentrações do mesmo OE. Letras minúsculas diferentes mostram diferença na mesma concentração dos diferentes OE. Símbolos diferentes representam diferença entre as soluções com e sem OE.

A atividade antifúngica por ação dos voláteis aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração dos OEs, com valores de 30,8, 46,2 e 57,57% de inibição do crescimento micelial para as microcápsulas contendo 2%, 3% e 4% de OEC, respectivamente. Comportamento semelhante foi observado para as microcápsulas adicionadas de OETB, com redução de 31,7 (OETB 2%), 38,5 (OETB 3%) e 51,0 % (OETB 4%) do crescimento micelial. Entre as diferentes fontes de OEs, não foram observadas diferenças em relação à capacidade de inibição fúngica ($p>0,05$) quando avaliada a mesma concentração de OE adicionado as microcápsulas. A ação dos compostos voláteis pode se dar de diferentes formas, através do rompimento das células das hifas ou da membrana dos esporos dos fungos, o que inibe a esporulação e afeta o crescimento fúngico (SUMALAN et al., 2020).

Ao avaliar a formação de halos de inibição sobre o crescimento fúngico observou-se que somente as microcápsulas com adição de 3 e 4% apresentaram ação antifúngica. Halos de inibição de 13,8 mm foram observados para OEC 3% e de 21,0 mm para OEC 4%, com diferença significativa entre os tratamentos ($p<0,05$). O mesmo comportamento foi demonstrado ao avaliar as microcápsulas adicionadas de 3 e 4% de OETB, com formação de halos de inibição de 12,3 e 20,3 mm,

respectivamente. Microápsulas elaboradas com diferentes OEs, nas mesmas concentrações de OE não apresentaram diferença entre si ($p>0,05$). Possivelmente o maior halo de inibição observado se deve a quantidade de OE adicionado à solução polimérica e a capacidade de carregamento apresentada pelas microcápsulas.

A ação antifúngica das microcápsulas adicionadas de OEC está associada aos principais compostos bioativos presentes, como eugenol (85,88%) e cariofileno (12,99%). Oliveira et al. (2020) avaliaram o modo de ação OEC e alecrim no nível celular através da detecção de apoptose precoce (condensação nuclear) e tardia (dano à membrana plasmática) em hifas expostas aos OEs em um ensaio de taxa de crescimento. Embora ambos os OE possuam propriedades antifúngicas contra *A. flavus,* o OE de cravo inibiu o crescimento micelial mais fortemente do que o OE de alecrim, além de induzir a morte celular semelhante a apoptose e a regulação negativa dos genes laeA, lipA e met P (OLIVEIRA et al., 2020).

Alguns mecanismos antifúngicos foram relatados por diversos pesquisadores. De forma geral, os OEs modificam a permeabilidade da membrana dos fungos através de um mecanismo alternativo o que leva à interrupção do sistema de transporte de elétrons. Com esta interrupção, ocorre o aumento da concentração intracelular de ATP, ocasionando a interrupção da força próton-motriz e da síntese de outros componentes celulares, inibindo as bombas de efluxo e, consequentemente levando à morte celular (ABDI-MOGHADAM et al., 2023; AMOOZEGARAN et al., 2022). Além disso, os OEs podem penetrar facilmente na membrana plasmática, levando à partição dentro dos lipídios da membrana celular fúngica, aumento da permeabilidade e eventual vazamento de conteúdo celular (FINCHEIRA et al., 2023). Os OEs estudados são capazes de inibir a síntese de ergosterol, um constituinte natural das membranas miceliais dos fungos, que é vital para manter a integridade celular, a viabilidade e o crescimento dos fungos (AMOOZEGARAN et al., 2022).

Além disso, monoterpenos como o timol e o carvacrol presentes no OETB evitam a super expressão de genes associados a bombas de efluxo. Devido a sua característica hidrofóbica, eles apresentam a capacidade de se projetar para dentro da membrana plasmática do fungo, formando um complexo com os grupos acil graxo e perturbando o funcionamento da membrana, o que culmina na sua desestabilização (AMOOZEGARAN et al., 2022; FINCHEIRA et al., 2023; HOU et al., 2022).

Apesar de inúmeros pesquisadores concentrar seus esforços para elucidar de forma mais assertiva a ação de compostos isolados, em nosso estudo não podemos

afirmar que apenas um composto é responsável pela ação antifúngica frente a *P. digitatum;* possivelmente o sinergismo entre os compostos tenha contribuído para inibir o crescimento deste fungo. Para aplicação em matrizes alimentares, as cápsulas com maior concentração de OE adicionado (4%) são as mais indicadas, devido à formação dos maiores halos de inibição, quando avaliadas por difusão em poço, e dos maiores percentuais de inibição do crescimento micelial avaliados por microatmosfera.

Estudos futuros podem ser realizados para alcançar uma inibição total do crescimento micelial por microatmosfera *in vitro*. Para tal, duas estratégias podem ser utilizadas: (1) aumento da quantidade de microcápsulas adicionadas na tampa da placa, (2) aumento do percentual de OE adicionado à solução para formação das cápsulas. Para avaliação de difusão em poço, o aumento da quantidade de microcápsulas adicionadas seria um limitante, dessa forma, a melhor alternativa seria o aumento do percentual de OE adicionado.

4.4. Conclusão

As microcápsulas de amido-OSA adicionadas de óleo essencial de cravo (OEC) e tomilho branco (OETB) foram obtidas com sucesso por *electrospraying*. Os resultados obtidos demonstraram que as microcápsulas formadas apresentaram formato esférico, liso e sem ranhuras e, que o amido-OSA é um material de parede adequado para proteger compostos voláteis como os óleos essenciais, comprovado pelos altos índices de capacidade de carregamento e pelas propriedades térmicas das cápsulas. Além disso, maiores concentrações de OEC e OETB nas microcápsulas resultaram em maiores percentuais de inibição do crescimento micelial de *P. digitatum* em ambos os ensaios avaliados, por microatmosfera e por difusão em disco. Portanto, cápsulas de amido-OSA adicionadas de OEC e OETB são alternativas promissoras para ser adicionadas no interior de embalagens de alimentos para evitar ou minimizar a degradação fúngica por *P. digitatum*. A exemplo das frutas cítricas, acometidas pela degradação por fungos do gênero *Penicillium.*

5. Capítulo 3

Nanoemulsões de amido-OSA contendo óleos essenciais de cravo e de tomilho branco: atividade antifúngica *in vitro* e aplicação em laranjas (*Citrus sinensis* cv. Salustiana)

Resumo

O amido modificado por octenil succínico anidrido (OSA) é um importante polissacarídeo que pode ser utilizado como estabilizante no desenvolvimento de emulsões adicionadas de óleos essenciais (OEs). O objetivo do presente trabalho foi desenvolver nanoemulsões (NEs) a base de amido-OSA contendo óleo essencial de cravo (OEC) e óleo essencial de tomilho branco (OETB) e uma mistura proporcional dos dois OEs (OECTB), utilizando a técnica de homogeneização a alta pressão. As emulsões foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta, índice de polidispersão, estabilidade (150 dias) e atividade antifúngica frente ao fungo *Penicillium digitatum*. A adição de concentrações de 1,5 e 2 % de OETB e OECTB permitiu a formação de nanoemulsões estáveis físico-quimicamente e com potencial em reduzir o crescimento micelial de *P. digitatum* (100% para NE com 2% de OETB e 80,5% para 2% de OECTB) até os 150 dias de armazenamento. As nanoemulsões contendo 2% de OETB também foram aplicadas em frutos de laranja cv. *Salustiana* para avaliar seu potencial antifúngico *in situ.* Estas nanoemulsões foram capazes de reduzir a incidência de podridão causada por *P. digitatum* em laranjas, demonstrando seu potencial de aplicação como alternativa aos fungicidas sintéticos para reduzir as perdas na pós colheita de frutas cítricas.

Palavras chave: *Penicillium digitatum;* mofo verde; controle pós-colheita; homogeneizador a alta pressão

5.1 Introdução

As frutas cítricas são uma das culturas frutíferas mais comercializadas em todo o mundo devido ao alto consumo atribuído ao seu reconhecido valor nutricional. Contudo, durante o período de armazenamento, desde a colheita até o consumo *in natura*, estas frutas são altamente vulneráveis à contaminação por fungos, como o fungo *Penicillium digitatum,* agente causador do “mofo verde”*,* responsável por 90% do total de perdas pós-colheita na produção em regiões tropicais e subtropicais (GUO et al., 2023; VU et al., 2023). Atualmente, o controle desta doença fúngica adota principalmente agentes químicos; no entanto, o uso extensivo e a longo prazo destes agentes evidentemente aumentou a resistência de fungos patogênicos aos medicamentos, além de causar prejuízos ao meio ambiente e à saúde humana (YAO et al., 2023). Neste contexto, a busca por alternativas naturais de alta eficiência e baixa toxicidade, representa um dos maiores desafios para os pesquisadores no cenário atual, visando atender a um dos objetivos da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) para a Agenda 2030 que contempla “reduzir as perdas de alimentos ao longo das cadeias de produção e abastecimento, incluindo as perdas pós-colheita” e “adotar práticas sustentáveis de produção e consumo” (FAO, 2023).

Desta forma, nas últimas décadas muitas pesquisas têm explorado o uso potencial de óleos essenciais (OEs) como uma alternativa às medidas de controle químico, devido à sua segurança e eficiência, além de suas propriedades bioativas (LI et al., 2024). Os OEs são compostos aromáticos de origem natural, com atividades biológicas de amplo espectro como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antialérgica, antibacteriana, antiviral, antifúngica, dentre outras (CHEN et al., 2019; DÁVILA-RODRÍGUEZ et al., 2019). Dentre os OEs reconhecidos por suas propriedades antifúngicas destacam-se os óleos essenciais de cravo (OEC) e de tomilho branco (OETB) (CHEN et al., 2019; HE et al., 2016). A ação antifúngica destes OEs se deve à presença de seus principais constituintes: o eugenol no OEC e o timol no OETB, responsáveis por inibir a síntese de ergosterol, componente específico da parede celular que é considerado vital para manter a saúde celular, a integridade, viabilidade e crescimento dos fungos (ABDI-MOGHADAM et al., 2023; GENGATHARAN; RAHIM, 2023; SINGH; PULIKKAL, 2022).

Apesar dos consolidados benefícios, a aplicação direta de OEs é limitada devido à certas desvantagens, como a formação de injúrias celulares quando

aplicados em altas concentrações, além de alterações sensoriais indesejáveis nos produtos onde são utilizados (FRANKLYNE et al., 2019). Além disso, devido à sua alta volatilidade, a concentração dos compostos bioativos apresenta drástica redução e consequente perda de suas propriedades bioativas (LIU et al., 2021). Um dos métodos promissores para o uso eficiente de OEs é o seu emprego em um sistema de emulsão. A encapsulação de OEs nestes sistemas surge como uma alternativa para aumentar sua estabilidade e solubilidade. Além disso, a encapsulação em sistemas de nanoemulsões pode efetivamente prolongar a ação dos OEs, fazendo com que os componentes ativos sejam preservados na matriz da nanoemulsão e promovendo uma liberação lenta e controlada, o que amplia o seu tempo de atividade e consequentemente sua ação antifúngica (TIAN et al., 2023).

Emulsões são sistemas coloidais cineticamente estáveis onde gotículas finas de um componente (fase dispersa) estão dispersas no meio do outro componente (meio de dispersão/fase contínua) (FRANKLYNE et al., 2019); nanoemulsões são uma classe de emulsões com tamanho de gotícula de fase dispersa na faixa de 10-100 nm (SINGH; PULIKKAL, 2022). A homogeneização de alta pressão é um processo de alta energia utilizado para preparar nanoemulsões (LIU et al., 2021) que apresenta como vantagem a formação de emulsões em nanoescala que não dependem do equilíbrio hidrofílico-lipofílico dos componentes; dessa forma, podem ser preparadas pequenas partículas com distribuição de tamanho de partícula uniforme e com boa estabilidade (FRANKLYNE et al., 2019; WAN et al., 2019).

Na literatura existem diversos relatos da ação antifúngica *in vitro* dos OEC e OETB frente a fungos pós-colheita, como o *Penicillium digitatum.* No entanto, a sua eficácia *in situ* em frutos cítricos tem sido pouco reportada, alguns exemplos são os estudos de He et al. (2016) que avaliaram a capacidade das microemulsões de OEC no controle do mofo verde em laranjas de umbigo por contato direto e fase vapor; Pinto et al. (2021) que avaliaram o efeito do OE de tomilho vermelho na vida útil e na contaminação fúngica de laranjas durante o armazenamento refrigerado; Zhang et al. (2023) que avaliaram os efeitos antifúngicos de timol (compostos majoritário encontrado em OE de tomilho) tanto *in vitro* quanto aplicado em frutas cítricas.

Considerando os benefícios já descritos para o OEC e OETB, combinados com as vantagens da encapsulação para manutenção das propriedades bioativas dos OEs, o objetivo deste estudo foi avaliar a estabilidade de nanoemulsões contendo OEC e

OETB e sua eficácia no controle do mofo verde causado por *Penicillium digitatum in vitro* e em laranjas (*Citrus sinensis* cv. Salustiana).

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Materiais

Óleos essenciais de tomilho branco (OETB) (timol, 22,7%; terpinoleno,16,4; linalol, 15,9%; p-Menta-1,3,8-triene. 11,7% e carvacrol, 8,4%) e de cravo (OEC) (eugenol, 85,9% e cariofileno, 13,0) foram obtidos das empresas Ferquima S/A e Dierberger Óleos Essenciais. Amido-OSA foi gentilmente doado pela Ingredion. Tween 20 (CAS 9005-64-5), triglicerídeo do ácido cáprico/caprílico (TGC) (CAS 7338), Potato Dextrose Agar (CAT K25-1022, Kasvi). O fungo *Penicillium digitatum* foi obtido por isolamento de frutas cítricas infectadas. Os demais reagentes utilizados para as análises foram de grau analítico.

5.2.2 Preparo das nanoemulsões (NEs)

O delineamento e as concentrações utilizadas neste estudo foram baseados em resultados preliminares (Apêndice C). Inicialmente o amido-OSA (10%, p/v) foi dissolvido em água destilada e filtrada à temperatura ambiente com agitação magnética por 30 min. Após a solução foi filtrada com auxílio de uma bomba a vácuo (marca Buchi, modelo V-700), utilizando um filtro de nitrato de celulose (tamanho dos poros de 8 µm). Para preparo da fase aquosa (FA), tween 20 (1%, p/v) foi adicionado ao filtrado e este permaneceu com agitação magnética por 5 minutos. A fase oleosa (FO) foi composta de diferentes concentrações (1; 1,5 e 2%, p/v) de OEC, OETB e uma mistura dos dois OECTB na proporção 1:1 (p/p).

A FA (30 mL), previamente preparada, foi vertida à FO sob agitação magnética a 1000 rpm por 30 min. Após esse tempo de agitação, as formulações foram submetidas a um homogeneizador de alta velocidade (Ultra-turrax®T10 basic, IKA) a 14.500 rpm por 3 min, seguido de 10 ciclos de 40 s (totalizando 6 min) em HAP (EmulsiFlex-C3, Avestin) a 10.000 psi. Todos os sistemas de NEs formulados foram armazenados a 20 ± 2 ºC para acompanhamento da estabilidade e direcionados para análises subsequentes.

5.2.3 Estabilidade das nanoemulsões

A estabilidade das NEs foi avaliada através das análises de distribuição do tamanho da partícula, potencial zeta e separação de fases. Todas as análises foram realizadas no dia subsequente à formação da NE, e após 30, 60, 90, 120 e 150 dias de armazenamento (20 ± 2ºC). As formulações que apresentaram separação visual

de fases durante o período de armazenamento, não foram avaliadas nos itens 5.2.3.2 e 5.2.4.

5.2.3.1 Separação de fase

A separação de fases foi realizada de acordo com Biduski et al. (2019), com adaptações. As NEs foram avaliadas pela formação de espuma ou sedimentado observada em temperatura de armazenamento. Tubos de vidro foram preenchidos com a NE e a espuma formada na camada superior dos tubos ou material sedimentado foi visualmente observada e registrada em fotografia macroscópica.

5.2.3.2 Distribuição do tamanho de partículas, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ)

Para análise de tamanho de partícula, PDI e PZ as NEs foram diluídas (1:30) em água (destilada e filtrada), submetidas a banho de ultrassom durante 2 min em temperatura ambiente (25 ± 3 °C). A distribuição do tamanho das gotículas e PDI das NEs foi medida por dispersão de luz. O potencial zeta foi medido pelo método de dispersão de luz dinâmica (DLS) (Nano ZS-90, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido).

5.2.4 Morfologia das nanoemulsões

Para análises morfológicas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) foi utilizada somente a NE adicionada de OETB (2%, p/v). Esta NE apresentou as melhores condições de estabilidade e atividade antifúngica e foi escolhida para aplicação *in situ.*

Para avaliar a morfologia da NE por MET (JEOL JEM-1400 equipado com uma abertura de 20 µm a 100 kV) foi seguida metodologia proposta por LU et al. (2018), com adaptações. As amostras (50 µL) foram adicionadas a porta-amostras MET de cobre revestido com formvar de 200 malhas (EM Sciences, Hatfield, PA, EUA), depois coradas negativamente com 50 µL de uranila a 1,5% (peso/volume) por 10 min à temperatura ambiente (25 ± 3 °C). O excesso de líquido foi enxugado com papel de filtro Whatman.

Imagens de CLSM foram tiradas para ilustrar a morfologia da NE de acordo com Rehman et al. (2020) e Sharif et al. (2017a), com adaptações. Foram homogeneizadas 2 µL da solução de corante vermelho do Nilo (1 mg ml^{-1} de etanol) à

200 µL de NE e misturados completamente para manchar as gotas de OE. Em seguida, 5 µL da amostra corada foi colocada em uma lâmina de vidro microscópica, coberta por lamínula e observada sob o CLSM. O comprimento de onda de excitação foi de 543 nm para o corante vermelho do Nilo. Um microscópio confocal Leica TCS SP8 (Leica, Heidelberg, Alemanha) com uma lente objetiva de imersão em óleo 63 × foi usado para capturar as imagens confocais. As imagens foram obtidas e processadas usando o programa de *software* do instrumento.

5.2.5 Atividade antifúngica *in vitro* das nanoemulsões

A atividade antifúngica foi determinada conforme descrito por Tao; Jia; Zhou (2014) e Chen et al. (2016), com algumas adaptações. As NEs (10 µl mL^{-1}) foram adicionadas diretamente ao meio BDA que foi vertido em placas de Petri estéreis (55 x 15 mm). O BDA sem adição de NE foi utilizado como controle positivo de crescimento. Todas as placas foram inoculadas com micélio do fungo *P. digitatum,* cultivado por 5 dias em meio BDA, a partir da margem de uma colônia de fungos que foi cortada com uma broca de cortiça (0,5 cm). As placas foram seladas com parafilme e incubadas a 25 ºC. Todos os tratame3ntos foram realizados em triplicata. Após 72 h de incubação, o diâmetro da colônia foi avaliado através da medição diametricamente oposta do crescimento da colônia do fungo em placa, com auxílio de uma régua graduada (cm). A percentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) foi calculada de acordo com a Equação 4 (CHEN et al., 2016):

$$ICM\ (\%) = \frac{dc-dt}{dc-0,5} \times 100 \text{ (Eq. 4)}$$

Em que: dc (cm) é o diâmetro médio da colônia para os controles e dt (cm) é o diâmetro médio da colônia para o tratamento. Os resultados são expressos pela média ± desvio padrão.

5.2.6 Ensaio antifúngico *in situ*

As frutas cítricas (*Citrus sinensis* cv. Salustiana) foram colhidas na maturação comercial de um pomar experimental da EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas (31°42'S, 52°24'O), e aquelas que eram saudáveis, tinham tamanho consistente (50-70 mm), cor uniforme e livres de hematomas ou doenças foram escolhidos como

material experimental. O protocolo utilizado para o teste *in situ* foi adaptado de Guo et al. (2023) e Chen et al. (2019). Todas as frutas selecionadas foram mergulhadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) por 2 min e depois lavadas com água corrente para remover o desinfetante residual e secas ao natural antes de ferir.

Uma ferida uniforme (4 mm de diâmetro, 2 mm de profundidade) foi feita com perfurador estéril na face equatorial de cada fruto, e 20 µL de suspensão de esporos de *P. digitatum* ($1,5 \times 10^5$ UFC mL^{-1}) foram injetados em cada ferida. Após 30 min, 20 µL de NE 2% OETB foi injetado em cada ferida. Frutos sem aplicação de NE foram utilizados como controle. Tanto os frutos tratados com NE quanto os de controle foram colocados em recipientes (embalagens plásticas de 60 cm de diâmetro) a 25 °C. O diâmetro da lesão foi medido com um paquímetro digital (Mtx ®) aos 3, 5 e 7 dias após a inoculação. Cada tratamento foi composto por três repetições, cada uma contendo 10 frutos. O experimento foi repetido duas vezes.

5.2.7 Avaliação de qualidade das laranjas

Para avaliação da qualidade dos frutos foram utilizados somente frutos que não receberam intervenções de avaliação da atividade antifúngica. A avaliação dos parâmetros de qualidade foi realizada em 15 frutos no momento da colheita e após o período de armazenamento. Os frutos, sadios, foram armazenados nas mesmas condições dos frutos utilizados no experimento *in situ* (25º C durante 7 dias).

A avaliação de cor foi determinada na parte externa dos frutos (flavedo) com auxílio de colorímetro Minolta CR-400, possibilitando a leitura de cores num sistema tridimensional (L*, a*, b*, Hue).

A firmeza da casca foi determinada com auxílio de um texturômetro eletrônico TA-XT plus 40855. As leituras foram realizadas em 6 a 8 pontos do fruto e o resultado expresso em Newton (N).

Sólidos solúveis totais (ºbrix), potencial Hidrogeniônico (pH) e acidez total titulável (% ác. cítrico) foram determinados do suco da fruta conforme descrito por (ALVAREZ et al., 2023).

5.2.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para comparação de médias foi aplicado o teste de Tukey com nível de significância estatística de $p < 0,05$.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Estabilidade das nanoemulsões

Na Figura 9 são apresentas as fotos das NEs após 1, 30, 60, 90, 120 e 150 dias de armazenamento. Análises de caracterização como potencial zeta, índice de polidispersão (PDI) e tamanho de partícula foram utilizadas para para avaliar a estabilidade das NEs e estão apresentadas nas Figuras 10a, 10b e 10c, respectivamente. Fatores como a proporção da fase oleosa, o tipo e a concentração de surfactante, o tamanho das partículas, o índice de polidispersão das partículas e o potencial zeta podem interferir na estabilidade de uma NE (LIU et al., 2021; SHARIF et al., 2017a, 2017b).

Após 24 h é possível notar que a formulação controle (CNT) e a formulação com 1% de OEC iniciam o processo de separação de fases. Apesar da formulação 1% OEC apresentar tamanho de partícula de 129 nm, o PDI foi de 0,85. O valor de PDI é definido como a medida da heterogeneidade na distribuição do tamanho da gota. Valores de PDI próximos a 0 indicam distribuições de tamanho homogêneas, enquanto valores de PDI próximos a 1 indicam distribuições de tamanho heterogêneas (FRANK et al., 2018; KEYKHOSRAVY et al., 2020). Desta forma, além da visível separação de fases observada nas fotos, a NE de 1% OEC pode ser considerada heterogênea.

Após 30 dias de armazenamento as formulações com 1,5% de OEC e 1% de OECTB também apresentaram separação de fases (Figura 9). Neste tempo de armazenamento todas as formulações visivelmente estáveis apresentavam tamanho de partícula <200 nm (Figura 10b), com destaque às formulações com 1,5% e 2% de OETB que apresentaram tamanhos de partícula inferiores a 100nm. A formulação com 2% de OETB apesar de apresentar um discreto aumento no tamanho de partícula, se apresentou estável até os 150 dias de armazenamento, com o menor tamanho de partícula registrado entre as formulações (126 nm). O tamanho de gotícula reduzido à nanoescala, aliado à presença de um surfactante estabilizador inibe a coalescência das gotículas e permite que NEs sejam estáveis por muitos meses ou anos (SINGH; PULIKKAL, 2022).

Dos 90 aos 150 dias de armazenamento somente as formulações com 1,5% de OETB, 2,0% de OETB, 1,5% de OECTB e 2,0% de OECTB se mostraram estáveis. Os valores de PDI, potencial zeta e tamanho de partícula apresentaram pequenas oscilações durante o tempo de armazenamento de 90 a 150 dias, porém não

suficientes para interferir na estabilidade das emulsões. Cabe salientar que um valor de PDI próximo a 1 e um valor superior de tamanho de partícula (~850 nm) foi observado no tempo de armazenamento de 120 dias nas formulações com 1,5% de OETB e 2% de OETB. Este fato está relacionado a uma falha/desprogramação no equipamento, em função de uma queda de energia ocorrida durante o momento da análise, o que consequentemente interferiu nos valores reportados, que não relatam o real tamanho de partícula e a dispersão destas emulsões e, portanto, devem ser desconsiderados.

O potencial zeta (PZ) também pode servir para avaliar a estabilidade das NEs, pois fornece uma relação com a repulsão eletrostática entre as gotículas dispersas com cargas semelhantes com objetivo de evitar a coalescência ou agregação. Os valores de PZ no dia 1 de armazenamento das Nes variou de -11 a -20 mV. Ao final do tempo de armazenamento foi observada uma redução do PZ em todas as NEs, que se demonstraram estáveis, com valor mínimo de -7,8 mV observado para formulação com 1,5% de OETB. Os valores negativos encontrados em nosso estudo para todas as nanoemulsões são decorrentes dos grupos carboxílicos presentes no amido-OSA (SHARIF et al., 2017a).

Em nanoescala, valores mais elevados de PZ conferem estabilidade física por repulsão eletrostática. Valores de PZ > |20| mV são desejados quando são necessárias estabilizações estéricas e eletrostáticas combinadas, e, valores de PZ > |30| mV são cruciais para manter a estabilidade de NEs quando a estabilização esférica não se faz presente. Além disso, quando o PZ apresenta valores acima de |30| mV as forças de repulsão são suficientes para superar as forças atrativas de van der Waals, impedindo que ocorra floculação (ENGELMANN et al., 2023; SHARIF et al., 2017a). Em nosso estudo, o PZ atingiu um valor máximo de -20 mV para T2 (1,5% OETB, 1 dia de armazenamento) e de -10,8 para M3 (2% OECTB, 150 dias de armazenamento). Uma vez que o ponto de corte do potencial zeta é apenas um índice parcial da estabilidade físico-química, foi de extrema importância acompanhar a estabilidade a longo prazo. Se fosse avaliado de forma isolado os valores encontrados em nosso estudo (PZ < |20| mV) indicariam que nenhuma emulsão se manteria estável, porém as emulsões T2, T3, M2 e M3 apresentaram estabilidade até 150 dias de armazenamento (Figura 9).

O desenvolvimento de NEs de amido-OSA adicionadas de OEC não se demonstrou satisfatório no quesito de estabilidade a longo prazo se comparado as

demais formulações. Em contrapartida, uso de OETB em concentrações de 1,5 e 2% apresentou resultados satisfatórios no quesito estabilidade até 150 dias de armazenamento, e, com a maior concentração de OETB adicionado foram obtidas emulsões com tamanho de partícula nanométrica. A combinação de OEC e OETB para produção de NE também foi aceitável, principalmente nas concentrações de 1,5 e 2% de OE. Possivelmente a estabilidade das NEs 1,5% OETB, 2% OETB, 1,5% OECTB e 2% OECTB está vinculada ao seu reduzido tamanho de partícula e baixo valor de PDI (<0,3). Além disso, a composição química do OE pode ter apresentado interferência no quesito estabilidade.

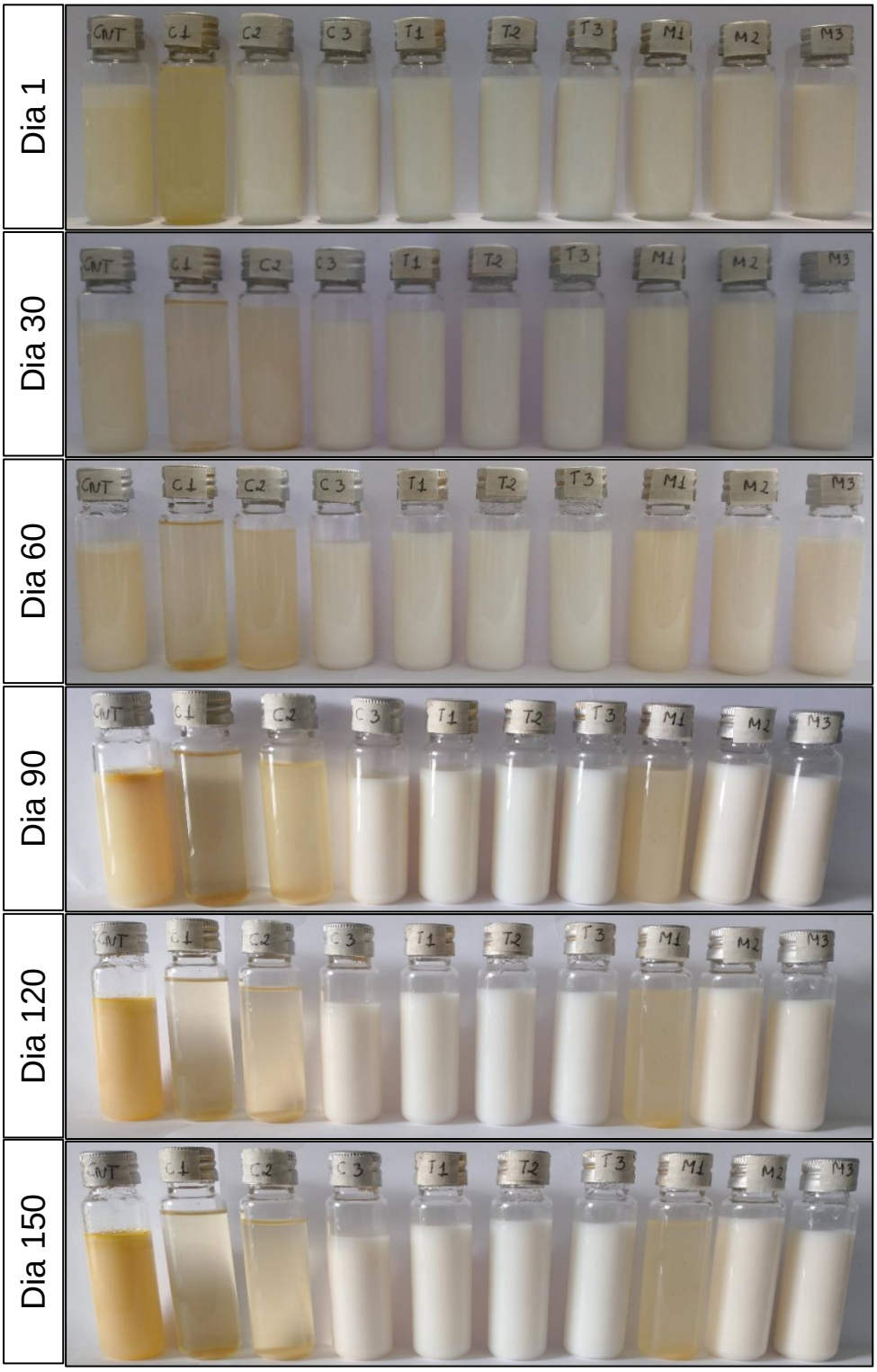


Figura 9 - Imagem da estabilidade das nanoemulsões produzida com amido-OSA e óleo essencial de cravo e tomilho branco

CNT: 1,5% TCG; C1: 1% OEC; C2: 1,5% OEC; C3: 2% OEC; T1: 1% OETB; T2: 1,5% OETB; T3: 2% OETB; M1: 1% OECTB; M2: 1,5% OECTB; M3: 2% OECTB; TCG: Triglicerídeo do ácido cáprico; OEC: óleo essencial de cravo; OETB: óleo essencial de tomilho branco; OECTB: óleo essencial de cravo e tomilho branco

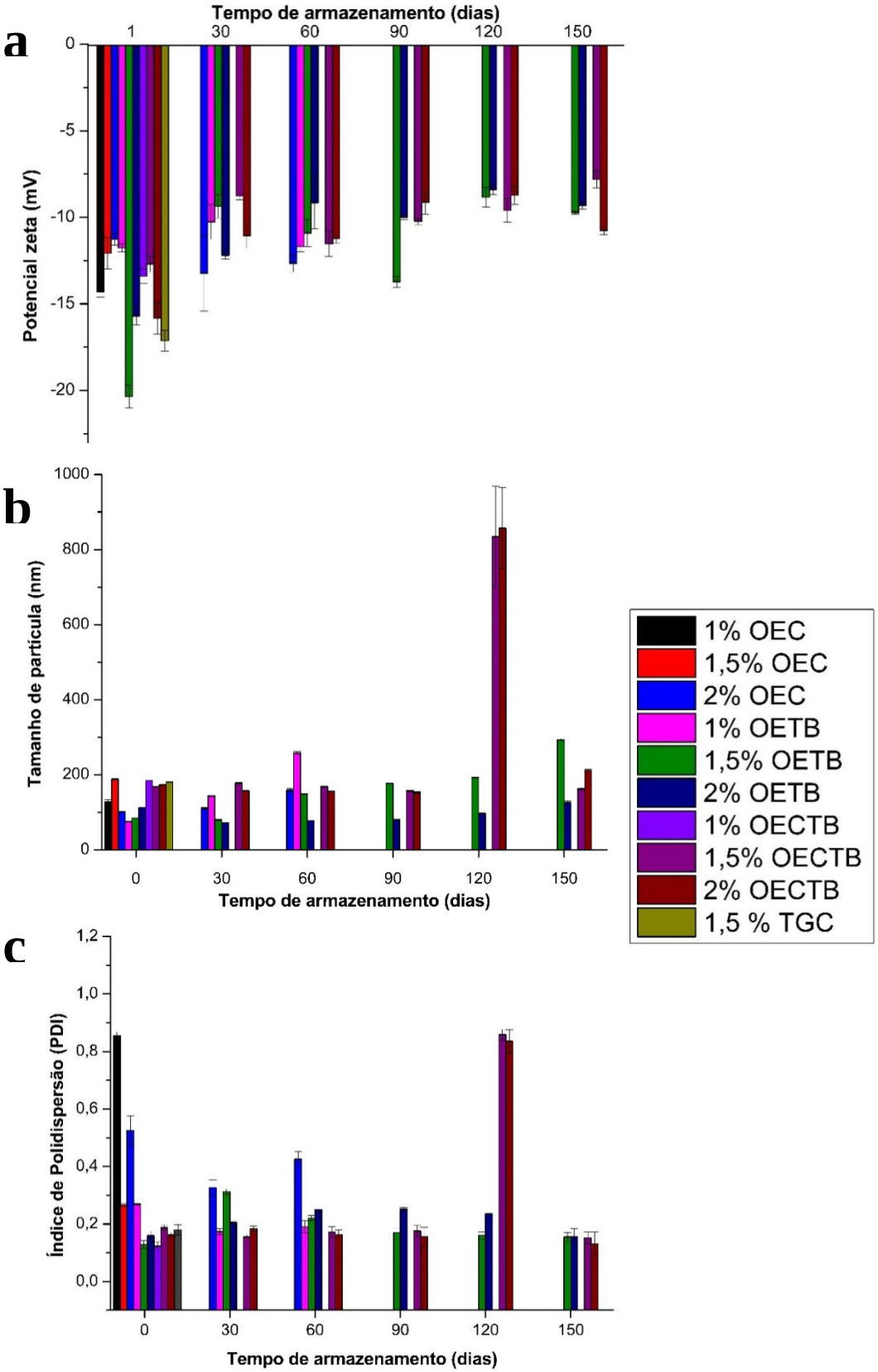


Figura 10 - Potencial zeta, tamanho de partícula e índice de polidispersão das nanoemulsões de amido-OSA e óleo essencial de cravo e tomilho branco durante 150 dias de armazenamento.

5.3.2 Morfologia das nanoemulsões

A morfologia da NE com 2% OETB, caracterizada por microscopia eletrônica de transmissão e por microscopia confocal de varredura a laser pode ser observada na Figura 12. No MET (Figura 12a), o contraste realizado com uranila permitiu observar que as gotículas eram muito pequenas, esféricas e se encontravam dispersas, o que é característico de uma NE. Características de gotícula semelhantes foram observadas por Huang et al. (2021) ao desenvolver NEs de amido-OSA e óleo essencial de cedro. A natureza esférica das partículas de NEs é atribuída à redução da área interfacial devido à grande pressão de Laplace ($\Delta P = 2\gamma/r$) como resultado da tensão interfacial relativamente alta (γ) e pequeno raio de partícula (r) (SINGH; PULIKKAL, 2022).

A imagem CLSM (Figura 12b) foi capturada para avaliar as flutuações estruturais em gotículas de OE na NE. O corante vermelho do Nilo ao entrar em contato com a fase oleosa da nanoemulsão emite fluorescência (pontos vermelhos, Figura 12b). Foram observadas gotículas de OE muito pequenas e uniformemente dispersas. Em estudos anteriores Rehman et al. (2020) e Sharif et al. (2017a) também confirmaram a distribuição uniforme de gotículas de OE de hortelã-pimenta e de cominho preto em nanoemulsões estabilizadas por amido-OSA. As gotículas observadas por MET e CLSM confirmam os resultados obtidos por DLS. Como resultado da alta pressão, do impacto de alta velocidade, da cavitação e taxa de cisalhamento intensa, a homogeneização a alta pressão se consolida como um sistema promissor para produção de NEs de amido-OSA e OE estáveis, com tamanho de gotícula em nanoescala e atividade antifúngica frente a *P. digitatum*.

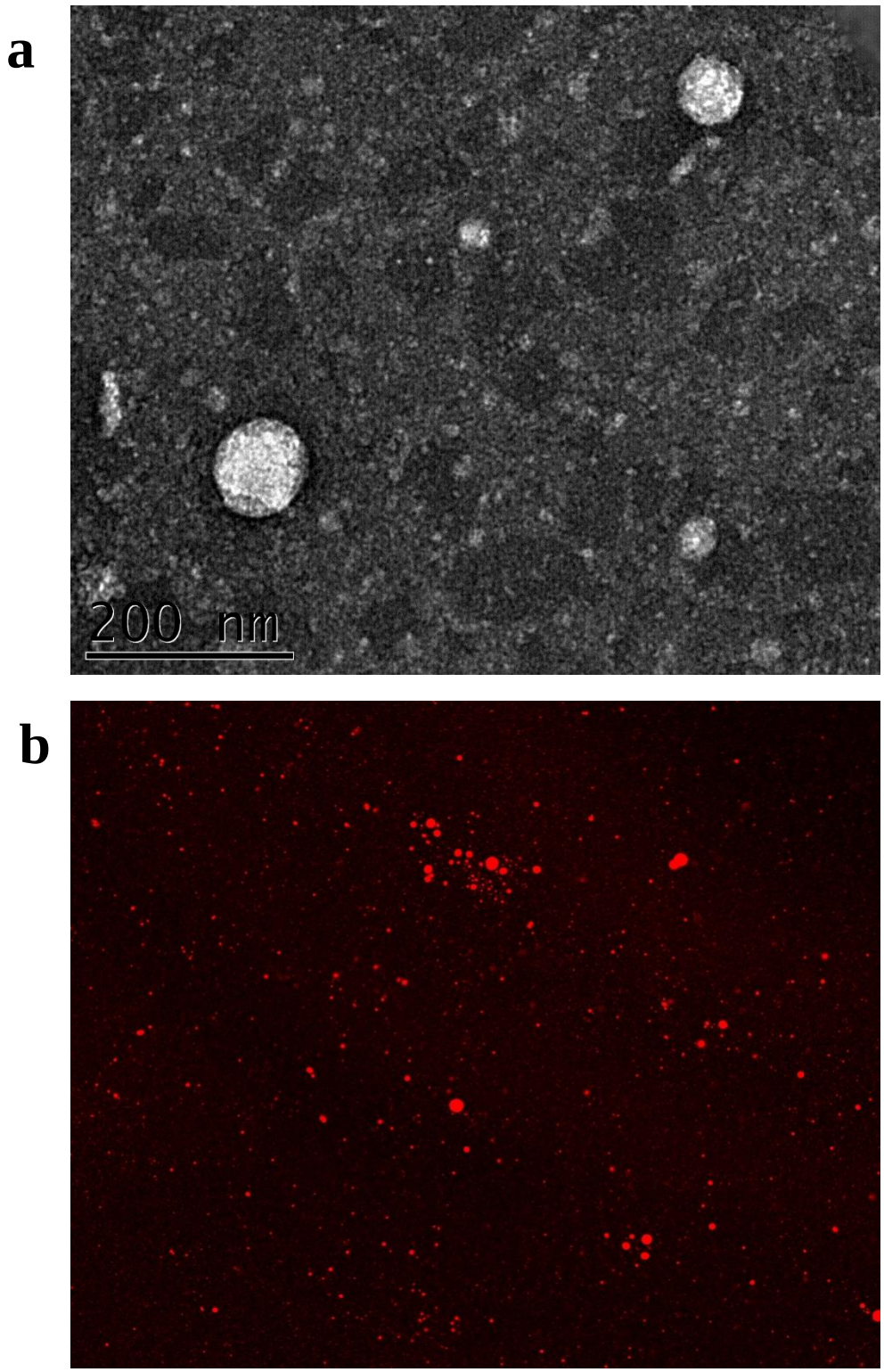


Figura 11 - Morfologia da nanoemulsão com 2% de óleo essencial de tomilho branco observada por microscopia eletrônica de transmissão (a) e por microscopia confocal de varredura a laser (b)

5.3.3 Atividade antifúngica *in vitro* das nanoemulsões

Avaliar a capacidade antifúngica das NEs ao longo de seu armazenamento é importante para verificar se além desta se manter estável fisicamente, os compostos presentes nos OEs também se mantêm ativos, apresentando ação frente à *P. digitatum*. Em um cenário ideal, se deseja a inibição total do crescimento e proliferação fúngica desde o estágio inicial de preparo da NE até o estágio final de armazenamento. Os percentuais de inibição do crescimento micelial de *P. digitatum* das NEs avaliadas a cada 30 dias durante 150 dias de armazenamento estão apresentados na Figura 11.

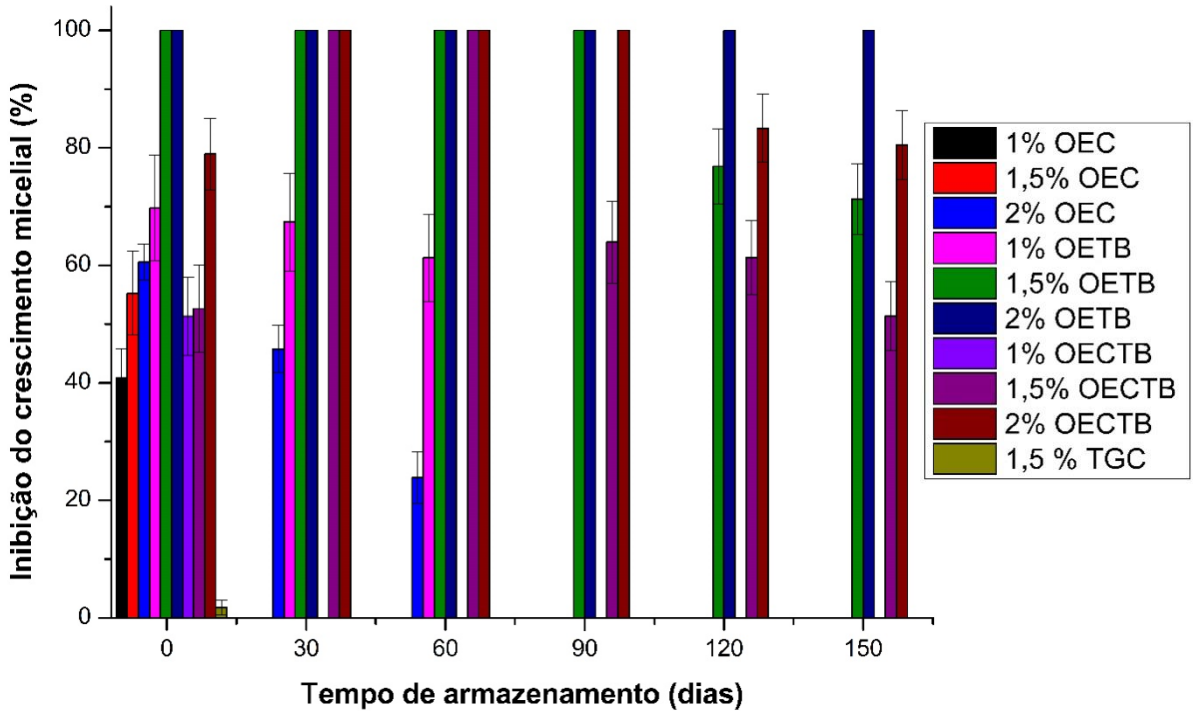


Figura 12 - Atividade antifúngica frente a *Penicillium digitatum* de nanoemulsões desenvolvidas com amido-OSA e óleo essencial de cravo e tomilho branco avaliadas em até 150 dias de armazenamento.

No tempo 0 (1 dia após preparo das formulações) é notável a diferença do percentual de inibição entre as formulações. Apesar de já ser observada separação de fases das NEs 1% OEC e 1,5% TGC (Figura 9) estas também foram avaliadas quanto a atividade antifúngica para fins de caracterização. Como já esperado, a NE com 1,5% TGC não apresentou ação antifúngica significativa, visto que não havia nenhum composto bioativo presente. Já a NE com 1% OEC, apesar de não ser fisicamente estável, apresentou redução de 40,8% do crescimento micelial de *P.*

digitatum. As formulações elaboradas com o mesmo OE (1,5% OEC e 2% OEC) apresentaram maiores percentuais de inibição, 55,3 e 60,5% respectivamente, possivelmente em função da adição de uma maior concentração de OE e, consequentemente, a maior disponibilidade de compostos bioativos. Até 60 dias de armazenamento, a NE 2% OEC se mostrou estável; porém, foi observado uma diminuição no seu potencial de inibição do crescimento micelial de *P. digitatum*, com valores de 45,8% e 23,9% no 30º e 60º dia de armazenamento, respectivamente. Após este período, em função da desestabilização da emulsão, a atividade antifúngica também não foi avaliada. A ação antifúngica do OEC está ligada ao potencial de seu composto majoritário eugenol se ligar ao ergosterol, constituinte natural das membranas miceliais dos fungos. Com isto, ocorre a inibição da produção de biomassa fúngica e o crescimento micelial é afetado, mesmo em baixas concentrações de OE adicionado (ABDI-MOGHADAM et al., 2023).

A NE com 1% OETB avaliada nos tempos 0, 30 e 60 dias de armazenamento, apresentou valores de inibição de crescimento micelial de *P. digitatum* de 69,7; 67,4 e 61,3%, respectivamente. Os menores valores comparados às NEs 1,5% e 2% OETB, possivelmente é em decorrência da menor concentração de OE adicionado. A NE com 1,5% OETB, apesar de se demonstrar estável até os 150 dias de armazenamento, apresentou inibição total do crescimento micelial do fungo somente até os 90 dias de armazenamento. Após este período observou-se uma perda de ~25% do seu potencial de inibir o crescimento micelial fúngico.

A maior concentração adicionada de OETB (2%) além de apresentar a formação de uma emulsão estável até o 150º de armazenamento, propiciou a inibição total do crescimento micelial de *P. digitatum* durante todo o período de armazenamento. Assim como o OEC, o OETB também atua na inibição do ergosterol em fungos (ABDI-MOGHADAM et al., 2023). Além disso, componentes presentes no OETB como o timol e carvacrol têm como alvo as bombas de efluxo, que evitam a superexpressão de genes associados a essas bombas (ABDI-MOGHADAM et al., 2023; SINGH; PULIKKAL, 2022; ZHANG et al., 2023). Ademais, o OETB também pode exibir um efeito inibitório sobre os esporos fúngicos (ZHANG et al., 2023). Para esta emulsão (2% OETB) é observado que os princípios ativos foram liberados continuamente no processo, em que alguns deles expressaram seu potencial de inibição fúngica no início do tempo de armazenamento, em função da maior concentração adicionada à formulação, e outros foram liberados lentamente,

conforme foi ocorrendo a destruição da estrutura da emulsão. Este resultado demonstra a promissora aplicação desta nanoemulsão em períodos mais longos de armazenamento.

Ao combinar OEC e OETB nas NEs observou-se a inibição de 51,3; 52,6 e 78,9% do crescimento micelial fúngico no tempo 0 de armazenamento nas respectivas concentrações 1, 1,5 e 2% de OECTB. Aos 30 e 60 dias de armazenamento 1,5 % OECTB e 2% OECTB apresentaram 100% de inibição do crescimento micelial do fungo. Possivelmente o menor percentual de inibição observado no início do armazenamento possa estar relacionado ao maior aprisionamento dos OEs na matriz; e que, com o passar do tempo de armazenamento, possivelmente tenha ocorrido a liberação gradual dos compostos para a fase aquosa da emulsão, aumentando assim a potencial ação antifúngica. A rápida liberação no estágio inicial de armazenamento é importante para inibir completamente a proliferação fúngica; porém, para resultados promissores a longo prazo é mais interessante que ocorra uma liberação gradual durante o armazenamento (ZHANG et al., 2023). Neste sentido, a formulação elaborada com a combinação de OEC e OETB, na concentração de 2% seria indicada para controlar o crescimento de *P. digitatum* até 90 dias de armazenamento, após este período, sua eficiência seria reduzida e, portanto, não indicada.

5.3.4 Ensaio antifúngico *in situ*

A influência da aplicação de nanoemulsão de amido-OSA adicionada de 2% de OETB na incidência da doença fúngica e no diâmetro da lesão em laranjas inoculadas com *P. digitatum* é apresentada na Tabela 9.

Tabela 9 - Diâmetro da lesão e incidência de frutos infectados (%) em laranjas tratadas com nanoemulsão de amido-OSA e de óleo essencial de tomilho branco infectadas com *P. digitatum* em diferentes dias pós-inoculação

Avaliação	Armazenamento (dias)	Tratamento	
		Controle	Nanoemulsão
Diâmetro da lesão (mm)	3	$4,69^{Ca} \pm 0,01$	$4,23^{Ca} \pm 0,01$
	5	$4,82^{Bb} \pm 0,02$	$4,33^{Bb} \pm 0,01$
	7	$4,90^{Ac} \pm 0,02$	$4,39^{Ac} \pm 0,01$
Frutos infectados (%)	3	22	4
	5	67	26
	7	100	33

Letras maiúsculas diferentes representam diferença entre os dias de armazenamento para o mesmo tratamento. Letras minúsculas diferentes mostram diferença no mesmo dia para os diferentes tratamentos

O diâmetro da lesão aumentou com o tempo de armazenamento para ambos os tratamentos avaliados ($p<0,05$), porém de forma mais acentuada para as frutas submetidas ao tratamento controle, que não foram tratadas com a NE. A incidência da doença no grupo controle após 3 dias de inoculação foi de 22%, enquanto no grupo tratado com NE foi de apenas 4%; aos 7 dias a incidência da doença atingiu 100% dos frutos no grupo controle e 33% no grupo de frutos tratados. Através destes resultados foi possível confirmar *in situ* a ação antifúngica *in vitro* da NE com 2% de OETB, apresentada e discutida anteriormente no item 5.3.2. A atividade antifúngica da nanoemulsão 2% OETB pode ser atribuída à compostos como o timol (22,7%) e carvacrol (8,4%) que podem danificar a estrutura da parede celular do fungo, tornar sua membrana mais permeável e reduzir as chances de sobrevivência celular, interrompendo reações enzimáticas e interceptando transportes de elétrons (ABBASI et al., 2023; ZHANG et al., 2023).

Resultados promissores em experimento *in situ* para o controle de *P. digitatum* foram relatados por Abbasi et al. (2023), que atingiram a inibição máxima em limões

cobertos com revestimentos de carboximetilcelulose (CMC, 1,5%) adicionado de OETB (0,2%). Os autores verificaram alterações na morfologia das células fúngicas e sugeriram que o OETB pode atacar a parede celular para inibir a infecção e dificultar o progresso de doenças fúngicas (ABBASI et al., 2023)

Em nosso experimento *in situ*, comprovamos que a aplicação de 20 µL de nanoemulsão 2% OETB ocasionou uma redução na incidência de laranjas infectadas com *P. digitatum*. Vale destacar que uma série de trabalhos demonstram o potencial antifúngico de inúmeros OEs; porém trabalhos sobre a avaliação desta atividade em estudos *in situ* são escassos. Além disso, quando estes OEs são aplicados em uma matriz, nem sempre conseguem desempenhar a mesma ação antifúngica da reportada nos estudos *in vitro*. Dessa forma, nossos resultados confirmam a ação antifúngica das emulsões contendo OETB tanto *in vitro* quanto *in situ* e com isso, fornece uma abordagem promissora capaz de auxiliar no controle do desenvolvimento de mofo verde e de reduzir as perdas pós-colheita de frutas cítricas.

5.3.5 Avaliação de qualidade das laranjas

Os atributos de qualidade das laranjas sem contaminação fúngica, avaliadas antes e após armazenamento, em condições semelhantes às utilizadas no experimento *in situ*, estão apresentadas na Tabela 10. Os parâmetros internos de qualidade, como sólidos solúveis totais, acidez titulável e pH apresentaram sutil diferença do início ao final do tempo de armazenamento, o que é comum para este tipo de fruta. Alvarez et al. (2023), ao avaliar a qualidade de laranjas *Citrus sinensis* cv. '*Valencia*' com e sem aplicação de revestimentos bioativos para controle de podridão azeda causada por *Geotrichum citri-aurantii*, também verificaram que o tempo de armazenamento não apresentou interferência em parâmetros internos de qualidade.

Foram avaliados também parâmetros externos, como a cor e a firmeza da casca. Para os parâmetros de cor (L*a*b e Hue) não foram observadas diferenças em função do tempo de armazenamento. O fato de não serem observadas alterações significativas em parâmetros de qualidade dos frutos durante o armazenamento pode ser justificado pelo fato da laranja ser classificado como um fruto não climatérico, e por esta razão, não apresentar pico de produção de etileno, grande responsável por alterações em características dos frutos, como cor, dureza e textura (SUN et al., 2022).

Em relação à firmeza, foi observada uma redução deste parâmetro após o armazenamento de 7 dias. Perdas por evaporação e transpiração que resultam em perda de peso e diminuição da firmeza ocorrem como um processo natural durante o armazenamento de frutos. Para minimizar estas perdas, a adição de revestimentos bioativos é uma alternativa promissora (ABBASI et al., 2023; ALVAREZ et al., 2023).

Em nosso estudo, foi possível perceber que os parâmentos de qualidade das laranjas não apresentaram alterações significativas durante o tempo de armazenamento. Assim, esses parâmetros não apresentam interferência sobre a proliferação do fungo, e o resultado da aplicação *in situ* da NE pode ser atribuído somente a sua ação.

Tabela 10 - Parâmetros internos e externos de qualidade de frutos de laranja.

Avaliação	Tempo de armazenamento (dias)	
	0	7
STT (º brix)	12,23ª ± 1,29	11,63ª ± 1,09
pH	3,51ª ± 0,16	3,71ª ± 0,15
ATT (% ac. cítrico)	1,19ª ± 0,17	1,13ª ± 0,29
L*	69,87ª ± 1,63	67,99ª ± 1,43
a*	18,55ª ± 3,15	21,05ª ± 2,12
b*	72,37ª ± 1,83	71,98ª ± 2,34
Hue	75,62ª ± 2,49	73,70ª ± 1,50
Firmeza (N)	28,96ª ± 4,53	19,23ª ± 4,22

*STT = sólidos solúveis totais; ATT= acidez total titulável

Letras diferentes (a, b, c) na linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos tratamentos, pelo teste T

5.4 Conclusão

A fonte de óleo essencial e a sua concentração influenciam na estabilidade das nanoemulsões (NEs) ao longo do armazenamento. As NEs produzidas com óleo essencial de tomilho branco (OETB) se mostraram mais estáveis durante os 150 dias de armazenamento quando comparadas àquelas produzidas com óleo essencial de cravo (OEC). A formulação com 2% de OETB se destacou por apresentar tamanho de partícula inferior a 100 nm no primeiro dia de armazenamento e o menor tamanho de partícula registrado entre as formulações (126 nm) mesmo após 150 dias de armazenamento, o que demonstra sua excelente estabilidade, confirmada também pelos resultados de potencial zeta e índice de polidispersão. Esta mesma formulação apresentou 100% de inibição do crescimento micelial de *P. digitatum* durante todo o período de armazenamento, demonstrando o seu potencial antifúngico, mesmo em períodos mais longos. Ainda que na mesma concentração, a NE contendo 2% de OEC apresentou menor percentual de inibição (60,5%) do que a produzida com OETB. Além disso, a NE com 2% OEC foi estável e apresentou ação antifúngica somente até o 60º dia de armazenamento.

Os resultados obtidos no estudo *in situ* confirmam a ação antifúngica *in vitro* do OETB, reduzindo a incidência de laranjas infectadas após aplicação de 20 µL de nanoemulsão 2% OETB. Estes resultados são promissores pois comprovam que nanoemulsões contendo OETB podem ser usadas para controlar a incidência fúngica por *P. digitatum* em frutas cítricas sem qualquer comprometimento dos parâmetros de qualidade dos frutos. Com isso, nossos resultados representam uma alternativa natural e viável para reduzir as perdas pós-colheita da cadeia de citros.

5. Considerações finais

A avaliação antifúngica *in vitro* de óleos essenciais de diversas fontes botânicas frente a *P. digitatum* apontou que os óleos essenciais de tomilho branco, cravo e *Eucalyptus citriodora* foram eficazes para inibir 100% do crescimento micelial deste fungo em concentrações ≤ 2 μL mL^{-1} tanto por ação de contato direto e quanto por voláteis. Em contrapartida, óleos essenciais de fontes cítricas como bergamota, limão siciliano, mandarina verde e laranja doce não foram capazes de inibir o crescimento micelial do fungo em nenhuma das concentrações avaliadas, por contato direto. Ao avaliar a ação dos voláteis de óleos essenciais de fontes cítricas, todos foram capazes de promover o crescimento micelial de *P. digitatum* em concentrações ≤ 20 μL mL^{-1}.

Óleos essenciais de tomilho branco e cravo foram encapsulados utilizando amido-OSA como polímero, pela técnica de *electrospraying*. As cápsulas apresentaram formato esférico liso e sem fissuras e a incorporação dos óleos essenciais foi comprovada pela inserção de grupos funcionais analisadas por FTIR e pela alta capacidade de carregamento. Além disso, o amido-OSA se demonstra como um polímero capaz de reter compostos voláteis, proporcionando proteção térmica aos óleos essenciais. As cápsulas apresentaram ação antifúngica, com maior capacidade de inibir a proliferação de *P. digitatum* quando avaliadas por ação dos voláteis. Além disso, a ação antifúngica foi dose dependente, isto é, conforme foi aumentado o percentual de óleo essencial adicionado às cápsulas, maior a inibição do crescimento micelial do fungo, sem ser observada diferença significativa entre óleos essenciais de cravo e de tomilho branco.

O uso de amido-OSA para o desenvolvimento de nanoemulsões adicionadas de óleo essencial de tomilho branco permitiram a formação de sistemas estáveis durante 150 dias de armazenamento e com tamanho de partícula < 200 nm. Além disso, nanoemulsão adicionada com 2% de óleo essencial de tomilho branco, avaliada *in situ,* apresentou ação antifúngica frente a *P. digitatum*, com inibição de 100% do crescimento micelial, durante todo o período de armazenamento. Esta nanoemulsão, quando aplicada *in situ* em laranjas confirmou o potencial para controle deste fungo.

Portanto, a encapsulação de óleos essenciais de cravo e tomilho branco em microcápsulas ou nanoemulsões demonstra uma forma eficiente para conservar as propriedades bioativas dos compostos. Essas microcápsulas e nanoemulsões podem ser aplicadas em sistemas de embalagens de alimentos como laranjas, com o objetivo de reduzir as perdas pós colheita decorrentes da proliferação de *P. digitatum.*

Referências bibliográficas

ABBASI, M. et al. Postharvest control of green and blue molds on Mexican lime fruit caused by Penicillium species using Thymus vulgaris essential oil and carboxy methyl cellulose. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 130, n. 5, p. 1017–1026, 1 out. 2023.

ABDI-MOGHADAM, Z. et al. The significance of essential oils and their antifungal properties in the food industry: A systematic review. **Heliyon**, v. 9, n. 11, 1 nov. 2023.

AGAMA-ACEVEDO; BELLO-PEREZ, L. A. Starch as an emulsions stability: the case of octenyl succinic anhydride (OSA) starch. **Current Opinion in Food Science**, v. 13, p. 78–83, 1 fev. 2017.

AGUILAR-VELOZ, L. M. et al. Application of essential oils and polyphenols as natural antimicrobial agents in postharvest treatments: Advances and challenges. **Food Science and Nutrition**, v. 8, n. 6, p. 2555–2568, 1 jun. 2020.

AHMED, L. I. et al. Potential application of ginger, clove and thyme essential oils to improve soft cheese microbial safety and sensory characteristics. **Food Bioscience**, v. 42, p. 101177, 1 ago. 2021.

ALTUNA, L.; HERRERA, M. L.; FORESTI, M. L. Synthesis and characterization of octenyl succinic anhydride modified starches for food applications. A review of recent literature. **Food Hydrocolloids**, v. 80, p. 97–110, 1 jul. 2018.

ALVAREZ, M. V. et al. Postharvest Application of Novel Bio-Based Antifungal Composite Edible Coatings to Reduce Sour Rot and Quality Losses of ‘Valencia’ Oranges. **Coatings**, v. 13, n. 8, p. 1412, 1 ago. 2023.

AMIGHI, M. et al. Encapsulation of Nepeta hormozganica and Nepeta dschuprensis essential oils in shrimp chitosan NPs: Enhanced antifungal activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 238, 31 maio 2023.

AMINIFARD, M. H.; BAYAT, H. Antifungal Activity of Black Caraway and Anise Essential Oils Against Penicillium digitatum on Blood Orange Fruits. **International Journal of Fruit Science**, v. 18, n. 3, p. 307–319, 3 jul. 2018.

AMOOZEGARAN, A. et al. Efficacy of an edible coating, containing thyme essential oil, to control Fusarium oxysporum and the quality of tomato fruits. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 16, n. 5, p. 3760–3767, 1 out. 2022.

ASBAHANI, A. EL et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, 15 abr. 2015.

ATAEI, S. et al. Essential Oils-Loaded Electrospun Biopolymers: A Future Perspective for Active Food Packaging. **Advances in Polymer Technology**, v. 2020, p. 1–21, 21 fev. 2020.

BASAK, S.; GUHA, P. Use of predictive model to describe sporicidal and cell viability efficacy of betel leaf (Piper betle L.) essential oil on Aspergillus flavus and Penicillium expansum and its antifungal activity in raw apple juice. **LWT**, v. 80, p. 510–516, 1 jul. 2017.

BIDUSKI, B. et al. Electrosprayed octenyl succinic anhydride starch capsules for rosemary essential oil encapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 300–307, 1 jul. 2019.

BORA, H. et al. Citrus essential oils (CEOs) and their applications in food: An overview. **Plants**, v. 9, n. 3, p. 357, 1 mar. 2020.

BOUBAKER, H. et al. Chemical characterization and antifungal activities of four Thymus species essential oils against postharvest fungal pathogens of citrus. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 95–101, 1 ago. 2016.

CHEN, C. et al. Clove essential oil as an alternative approach to control postharvest blue mold caused by penicillium italicum in citrus fruit. **Biomolecules**, v. 9, n. 5, p. 197, 1 maio 2019.

CHEN, C. Y. et al. Effect of carboxymethyl cellulose coating enriched with clove oil on postharvest quality of “Xinyu” Mandarin oranges. **Fruits**, v. 71, n. 5, p. 319–327, 2016.

CHIDI, F.; BOUHOUDAN, A.; KHADDOR, M. Antifungal effect of the tea tree essential oil (Melaleuca alternifolia) against Penicillium griseofulvum and Penicillium verrucosum. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 3, p. 2041–2045, 1 abr. 2020.

CRUZ, E. P. DA et al. Encapsulation of lemongrass essential oil into cassava starch fibers for application as antifungal agents in bread. **Food Hydrocolloids**, v. 145, 1 dez. 2023.

DAS, S. et al. Efficacy of Cinnamomum camphora essential oil loaded chitosan nanoemulsion coating against fungal association, aflatoxin B1 contamination and storage quality deterioration of Citrus aurantifolia fruits. **Journal of Food Science & Technology**, v. 57, n. 12, p. 7486–7495, 2022.

DÁVILA-RODRÍGUEZ, M. et al. Antimicrobial activity of nanoemulsions of cinnamon, rosemary, and oregano essential oils on fresh celery. **LWT**, v. 112, p. 108247, 1 set. 2019.

DEBONNE, E. et al. Comparison of antifungal activity of essential oils of clove, lemongrass and thyme for natural preservation of dried apricots. **Food Science and Technology International**, v. 28, n. 7, p. 641–649, 1 out. 2022.

DENISA, D.; IOANNIS, V.; LIVIU, G. Antifungal effects of sage essential oil against Penicillium infection on oranges storaged in modified packaging. **Carpathian Journal of Food Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 78–82, 2014.

DJILANI, A.; DICKO, A. The Therapeutic Benefits of Essential Oils. Em: **Nutrition, well-being and health**. 2012. v. 7p. 155–179.

DORNA, H. et al. Chemical composition of fir, pine and thyme essential oils and their effect on onion (Allium cepa l.) seed quality. **Agronomy**, v. 11, n. 12, p. 2245, 1 dez. 2021.

DU, Z. et al. Organic solvent-free starch-based green electrospun nanofiber mats for curcumin encapsulation and delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 232, 31 mar. 2023.

ELBARBARY, A. M. et al. Radiation Synthesis of Edible Coating Films of Nanocurcumin Based on Carboxymethyl Chitosan/Polyvinyl Alcohol to Extend the Shelf Life of Sweet Orange “Valencia”. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 31, n. 9, p. 3783–3802, 1 set. 2023.

EL-ESSAWY, A. M. et al. Effects of anise, clove and thyme essential oils supplementation on rumen fermentation, blood metabolites, milk yield and milk composition in lactating goats. **Animal Feed Science and Technology**, v. 271, p. 114760, 1 jan. 2021.

ELGAT, W. A. A. A. et al. Eucalyptus camaldulensis, citrus aurantium, and citrus sinensis essential oils as antifungal activity against aspergillus flavus, aspergillus niger, aspergillus terreus, and fusarium culmorum. **Processes**, v. 8, n. 8, p. 1003, 2020.

ENGELMANN, J. I. et al. Chitosan-based nanocapsules by emulsification containing PUFA concentrates from tuna oil. **Food Science and Technology International**, 2023.

ERASMUS, A. et al. Imazalil resistance in Penicillium digitatum and P. italicum causing citrus postharvest green and blue mould: Impact and options. **Postharvest Biology and Technology**, v. 107, p. 66–76, 1 set. 2015.

FANG, S. et al. Fabricating multilayer emulsions by using OSA starch and chitosan suitable for spray drying: Application in the encapsulation of β-carotene. **Food Hydrocolloids**, v. 93, p. 102–110, 1 ago. 2019.

FAO - Food and Agriculture Organizations of the United Nations: **Database**. 2023. Disponível em: <https://www.fao.org/home/en/>. Acesso em 27/11/23

FINCHEIRA, P. et al. The efficient activity of plant essential oils for inhibiting Botrytis cinerea and Penicillium expansum: Mechanistic insights into antifungal activity. **Microbiological Research**, v. 277, p. 127486, dez. 2023.

FONSECA, L. M. et al. Electrospun potato starch nanofibers for thyme essential oil encapsulation: antioxidant activity and thermal resistance. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 11, p. 4263–4271, 30 ago. 2020.

FONSECA, L. M. et al. Effect of carvacrol encapsulation in starch-based nanofibers: Thermal resistance and antioxidant and antimicrobial properties. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 5, 1 maio 2021.

FRANK, K. et al. Alginate biocomposite films incorporated with cinnamon essential oil nanoemulsions: Physical, mechanical, and antibacterial properties. **International Journal of Polymer Science**, v. 2018, 2018.

FRANKLYNE, J. S. et al. Essential oil nanoemulsions: antibacterial activity in contaminated fruit juices. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 9, p. 2802–2810, 2019.

GAO, H.; YANG, H.; WANG, C. Controllable preparation and mechanism of nano-silver mediated by the microemulsion system of the clove oil. **Results in Physics**, v. 7, p. 3130–3136, 2017.

GENGATHARAN, A.; RAHIM, M. H. A. The application of clove extracts as a potential functional component in active food packaging materials and model food systems: A mini-review. **Applied Food Research**, v. 3, n. 1, 1 jun. 2023.

GHASEMI, G. et al. Antioxidant and antifungal activities of a new chemovar of cumin (Cuminum cyminum L.). **Food Science and Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 669–677, 1 jun. 2019.

GOLMAKANI, M. T.; ZARE, M.; RAZZAGHI, S. Eugenol enrichment of clove bud essential oil using different microwave-assisted distillation methods. **Food Science and Technology Research**, v. 23, n. 3, p. 385–394, 2017.

GONZÁLEZ-REZA, R. M. et al. The functionalization of nanostructures and their potential applications in edible coatings. **Coatings**, v. 8, n. 5, p. 160, 1 maio 2018.

GUO, L. et al. Polymethoxylated flavonoids (PMFs)-loaded citral nanoemulsion controls green mold in citrus by damaging the cell membrane of Penicillium digitatum. **Fungal Biology**, v. 127, n. 1–2, p. 854–864, 1 jan. 2023.

HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, I. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology, **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, p. 1165- 1188, 2018.

HARO-GONZÁLEZ, J. N. et al. Clove essential oil (Syzygium aromaticum l. myrtaceae): Extraction, chemical composition, food applications, and essential bioactivity for human health. **Molecules**, v. 26, n. 21, p. 6387, 1 nov. 2021.

HASHEMI, M. et al. Chemical Composition and Antifungal Effect of Echinophora platyloba Essential Oil against Aspergillus flavus, Penicillium expansum and Fusarium graminearum. **Journal of Chemical Health Risks**, v. 6, n. 2, p. 91–97, 2016.

HE, S. et al. Microemulsification of clove essential oil improves its in vitro and in vivo control of Penicillium digitatum. **Food Control**, v. 65, p. 106–111, 1 jul. 2016.

HOU, T. et al. Essential oils and its antibacterial, antifungal and anti-oxidant activity applications: A review. **Food Bioscience**, v. 47, 1 jun. 2022.

HUANG, K. et al. Characteristics of two cedarwood essential oil emulsions and their antioxidant and antibacterial activities. **Food Chemistry**, v. 346, 1 jun. 2021.

HU, Y. et al. Protection and delivery of mandarin (Citrus reticulata Blanco) peel extracts by encapsulation of whey protein concentrate nanoparticles. **LWT**, v. 99, p. 24–33, 1 jan. 2019.

JI, H. et al. Synergistic antimicrobial activities of essential oil vapours against Penicillium corylophilum on a laboratory medium and beef jerky. **International Journal of Food Microbiology**, v. 291, p. 104–110, 16 fev. 2019.

JUGREET, B. S. et al. Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils. **Trends in Food Science and Technology**, v. 101, p. 89–105, 1 jul. 2020.

KANASHIRO, A. M. et al. Penicillium italicum: An Underexplored Postharvest Pathogen. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 606852, 4 dez. 2020.

KANG, J. H.; SONG, K. BIN. Inhibitory effect of plant essential oil nanoemulsions against Listeria monocytogenes, Escherichia coli O157:H7, and Salmonella Typhimurium on red mustard leaves. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 45, p. 447–454, 1 fev. 2018.

KEYKHOSRAVY, K. et al. Chitosan-loaded nanoemulsion containing Zataria Multiflora Boiss and Bunium persicum Boiss essential oils as edible coatings: Its impact on microbial quality of turkey meat and fate of inoculated pathogens. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 904–913, 1 maio 2020.

KRINGEL, D. H. et al. Free and encapsulated orange essential oil into a β-cyclodextrin inclusion complex and zein to delay fungal spoilage in cakes. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 5, 1 maio 2020.

KRZYŚKO-ŁUPICKA, T.; SOKÓŁ, S.; PIEKARSKA-STACHOWIAK, A. Evaluation of fungistatic activity of eight selected essential oils on four heterogeneous Fusarium isolates obtained from cereal grains in southern Poland. **Molecules**, v. 25, n. 2, p. 292, 2020.

KUMARI, S.; YADAV, B. S.; YADAV, R. B. Synthesis and modification approaches for starch nanoparticles for their emerging food industrial applications: A review. **Food Research International**, v. 128, 1 fev. 2020.

LIM, L. T.; MENDES, A. C.; CHRONAKIS, I. S. Electrospinning and electrospraying technologies for food applications. Em: **Advances in Food and Nutrition Research**. Academic Press Inc., 2019. v. 88p. 167–234.

LI, S. et al. Natural antimicrobials from plants: Recent advances and future prospects. **Food Chemistry**, v. 432, p. 137231, 30 jan. 2024.

LIU, X. et al. Cinnamon essential oil nanoemulsions by high-pressure homogenization: Formulation, stability, and antimicrobial activity. **LWT**, v. 147, p. 111660, 1 jul. 2021.

LI, X. et al. OSA-starch stabilized EPA nanoliposomes: Preparation, characterization, stability and digestion in vitro and in vivo. **Food Chemistry**, v. 419, 1 set. 2023.

LOPES, V. C. et al. Antifungal activity of lemongrass and thyme essential oils and effect on gray mold control and postharvest quality of 'Italia' grape. **Bragantia**, v. 82, 2023.

LU, W. C. et al. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 1, p. 82–89, 1 jan. 2018.

MUÑOZ CASTELLANOS, L. et al. In Vitro and in Vivo Antifungal Activity of Clove (Eugenia caryophyllata) and Pepper (Piper nigrum L.) Essential Oils and Functional Extracts against Fusarium oxysporum and Aspergillus niger in Tomato (Solanum lycopersicum L.). **International Journal of Microbiology**, v. 2020, 2020.

NASERZADEH, Y.; MAHMOUDI, N.; PAKINA, E. Antipathogenic effects of emulsion and nanoemulsion of cinnamon essential oil against Rhizopus rot and grey mold on strawberry fruits. **Foods and Raw Materials**, v. 7, n. 1, p. 210–216, 2019.

OLIVEIRA, R. C. et al. Essential oils trigger an antifungal and anti-aflatoxigenic effect on Aspergillus flavus via the induction of apoptosis-like cell death and gene regulation. **Food Control**, v. 110, 1 abr. 2020.

PIATI, A.; SCHNEIDER, C. F.; DE HOLANDA NOZAKI, M. Efeito in vitro do óleo essencial de Eucalyptus globulus sobre o crescimento e desenvolvimento de Penicillium sp. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 32, n. 3, p. 1033–1040, jul. 2011.

PINTO, L. et al. Effect of red thyme oil (Thymus vulgaris L.) vapours on fungal decay, quality parameters and shelf-life of oranges during cold storage. **Food Chemistry**, v. 336, 30 jan. 2021.

PIRES, J. B. et al. Curcumin encapsulation in capsules and fibers of potato starch by electrospraying and electrospinning: Thermal resistance and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 162, 1 dez. 2022.

PIRES, J. B. et al. Essential oil encapsulation by electrospinning and electrospraying using food proteins: A review. **Food Research International**, v. 170, 1 ago. 2023.

PIRES, J. B. et al. Starch extraction from avocado by-product and its use for encapsulation of ginger essential oil by electrospinning. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 254, 1 jan. 2024.

RADI, M. et al. The use of orange peel essential oil microemulsion and nanoemulsion in pectin-based coating to extend the shelf life of fresh-cut orange. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 2, 1 fev. 2018.

RADÜNZ, M. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (Syzygium aromaticum, L.) essential oil. **Food Chemistry**, v. 276, p. 180–186, 15 mar. 2019.

RAI, M. et al. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 519, n. 1–2, p. 67–78, 15 mar. 2017.

REHMAN, A. et al. Development of active food packaging via incorporation of biopolymeric nanocarriers containing essential oils. **Trends in Food Science and Technology**, v. 101, p. 106–121, 1 jul. 2020.

REZAEINIA, H. et al. Electrohydrodynamic atomization of Balangu (Lallemantia royleana) seed gum for the fast-release of Mentha longifolia L. essential oil: Characterization of nano-capsules and modeling the kinetics of release. **Food Hydrocolloids**, v. 93, p. 374–385, 1 ago. 2019.

ROCHA NETO, A. C. et al. Antifungal activity of palmarosa (Cymbopogon martinii), tea tree (Melaleuca alternifolia) and star anise (Illicium verum) essential oils against Penicillium expansum and their mechanisms of action. **LWT**, v. 105, p. 385–392, 1 maio 2019.

ROJAS, J. et al. Lipidic matrixes containing clove essential oil: Biological activity, microstructural and textural studies. **Molecules**, v. 26, n. 9, 22 abr. 2021.

SAIFULLAH, M. et al. Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 86, p. 230–251, 1 abr. 2019.

SEVIK, R. et al. Chemical Composition of Tea Tree (Melaleuca alternifolia) (Maiden & Betche) Cheel Essential Oil and Its Antifungal Effect on Foodborne Molds Isolated from Meat Products. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 24, p. 561-570, 2021.

SHARIF, H. R. et al. Influence of OSA-starch on the physico chemical characteristics of flax seed oil-eugenol nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 66, p. 365–377, 1 maio 2017a.

SHARIF, H. R. et al. Formulation, characterization and antimicrobial properties of black cumin essential oil nanoemulsions stabilized by OSA starch. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 10, p. 3358–3365, 1 set. 2017b.

SHARMA, P. et al. Physicochemical and thermal characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) films incorporating thyme essential oil for active packaging of white bread. **Food Control**, v. 133, 1 mar. 2022.

SHISHIR, M. R. I. et al. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. **Trends in Food Science and Technology**, v. 78, p. 34–60, 1 ago. 2018.

SIMAS, D. L. R. et al. Citrus species essential oils and their components can inhibit or stimulate fungal growth in fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 98, p. 108–115, 1 abr. 2017.

SINGH, I. R.; PULIKKAL, A. K. Preparation, stability and biological activity of essential oil-based nano emulsions: A comprehensive review. **OpenNano**, v. 8, p. 100066, 1 nov. 2022.

SOUZA, E. J. D. DE et al. Polysaccharides as wall material for the encapsulation of essential oils by electrospun technique. **Carbohydrate Polymers**, v. 265, 1 ago. 2021.

SUMALAN, R. M. et al. Assessment of mint, basil, and lavender essential oil vapor-phase in antifungal protection and lemon fruit quality. **Molecules**, v. 25, n. 8, 1 abr. 2020.

SUNDAR, S. K.; PARIKH, J. K. Advances and trends in encapsulation of essential oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 635, 25 mar. 2023.

SUN, L. et al. Genome-wide identification and transcript analysis during fruit ripening of ACS gene family in sweet orange (Citrus sinensis). **Scientia Horticulturae**, v. 294, 27 fev. 2022.

TAHERI, P.; SOWEIZY, M.; TARIGHI, S. Application of essential oils to control some important fungi and bacteria pathogenic on cereals. **Journal of Natural Pesticide Research**, v. 6, p. 100052, dez. 2023.

TAO, N.; JIA, L.; ZHOU, H. Anti-fungal activity of Citrus reticulata Blanco essential oil against Penicillium italicum and Penicillium digitatum. **Food Chemistry**, v. 153, p. 265–271, 15 jun. 2014.

TARHAN, İ. et al. Rapid determination of adulteration of clove essential oil with benzyl alcohol and ethyl acetate: Towards quality control analysis by FTIR with chemometrics. **Vibrational Spectroscopy**, v. 118, 1 jan. 2022.

TAVARES, L. et al. Rheological and structural trends on encapsulation of bioactive compounds of essential oils: A global systematic review of recent research. **Food Hydrocolloids**, v. 129, p. 107628, 1 ago. 2022.

TERRA, A. L. M. et al. Development of time-pH indicator nanofibers from natural pigments: An emerging processing technology to monitor the quality of foods. **LWT**, v. 142, p. 111020, 1 maio 2021.

TIAN, X. et al. Preparation and characterization of emulsions of soy protein isolate-chitosan quaternary ammonium salt complexes and peppermint essential oil with extended release effect. **Food Hydrocolloids**, v. 142, 1 set. 2023.

TOLBA, H. et al. Essential oil of Algerian Eucalyptus citriodora: Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. **Revue Nature et Technologie**, v. 10, n. 1, p. 105–111, 2018.

UMEREWENEZA et al. Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oils Extracted from Leaves of Eucalyptus Melliodora and Eucalyptus Anceps Grown in Rwanda. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 22, p. 151-158, 2019.

USDA – United States Department of Agriculture. **Citrus Semi-Annual**. 2023. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Citrus%20Semi-annual_Brasilia_Brazil_BR2023-0015>. Acesso em 03/11/2023.

VAFANIA, B.; FATHI, M.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. 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, 1 jul. 2019.

VAND DEN DOOL, H.; KRATZ, D. J. A. Generalization of the retention index system, including liner temperature programmed gas–liquid partition chromatography. **JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY**, v. 11, p. 463–467, 1963.

VOLIĆ, M. et al. Design and characterization of whey protein nanocarriers for thyme essential oil encapsulation obtained by freeze-drying. **Food Chemistry**, v. 386, 30 ago. 2022.

VU, T. X. et al. Efficient control of the fungal pathogens Colletotrichum gloeosporioides and Penicillium digitatum infecting citrus fruits by native soilborne Bacillus velezensis strains. **Heliyon**, v. 9, n. 2, 1 fev. 2023.

WANG, D. et al. Inhibitory effect and underlying mechanism of cinnamon and clove essential oils on Botryosphaeria dothidea and Colletotrichum gloeosporioides causing rots in postharvest bagging-free apple fruits. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1109028, 2023.

WANG, W. et al. Properties of OSA-modified starch and emulsion prepared with different materials: Glutinous rice starch, japonica rice starch, and indica rice starch. **Food Research International**, v. 161, 1 nov. 2022.

WANG, X. et al. Research advances in chemical modifications of starch for hydrophobicity and its applications: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 240, p. 116292, 15 jul. 2020.

WANG, Y. et al. Microencapsulation of clove essential oil improves its antifungal activity against Penicillium digitatum in vitro and green mould on Navel oranges. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 159–166, 4 mar. 2018.

WAN, J. et al. Physical properties, antifungal and mycotoxin inhibitory activities of five essential oil nanoemulsions: Impact of oil compositions and processing parameters. **Food Chemistry**, v. 291, p. 199–206, 1 set. 2019.

WESOŁOWSKA, A.; JADCZAK, D. Comparison of the chemical composition of essential oils isolated from two thyme (Thymus vulgaris L.) cultivars. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 47, n. 3, p. 829–835, 2019.

XIAO, Z. et al. Microcapsules based on octenyl succinic anhydride (OSA)-modified starch and maltodextrins changing the composition and release property of rose essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 137, p. 132–138, 15 set. 2019.

XING, Y. et al. ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF CLOVE OIL AGAINST RHIZOPUS NIGRICANS, ASPERGILLUS FLAVUS AND PENICILLIUM CITRINUM IN VITRO AND IN WOUNDED FRUIT TEST. **Journal of Food Safety**, v. 32, n. 1, p. 84–93, fev. 2012.

XU, T. et al. Characterization of chitosan based polyelectrolyte films incorporated with OSA-modified gum arabic-stabilized cinnamon essential oil emulsions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 362–370, 1 maio 2020.

XU, Y. et al. Tea tree oil controls brown rot in peaches by damaging the cell membrane of Monilinia fructicola. **Postharvest Biology and Technology**, v. 175, p. 111474, 1 maio 2021.

YAMMINE, J. et al. Advances in essential oils encapsulation: development, characterization and release mechanisms. **Polymer Bulletin**, 29 jul. 2023.

YANG, R. et al. Untargeted lipidomics reveals the antifungal mechanism of essential oils nanoemulsion against Penicillium digitatum. **LWT**, v. 168, 1 out. 2022.

YAO, Y. et al. Citrus lemon (Citrus limon (L.) Burm. f. cv. Eureka) essential oil controls blue mold in citrus by damaging the cell membrane of Penicillium italicum. **LWT**, v. 188, 1 out. 2023.

YASIN, M. et al. Extraction of essential oil from river tea tree (Melaleuca Bracteata F. muell.): Antioxidant and antimicrobial properties. **Sustainability (Switzerland)**, v. 13, n. 9, p. 4827, 1 maio 2021.

YILMAZ, M. T. et al. Electrospraying method for fabrication of essential oil loaded-chitosan nanoparticle delivery systems characterized by molecular, thermal, morphological and antifungal properties. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 52, p. 166–178, 1 mar. 2019.

YIN, X. et al. Inclusion complexes of clove essential oil with sodium caseinate and gum arabic prepared by high-pressure homogenization: Characterization and non-contact antimicrobial activity. **Food Control**, v. 150, 1 ago. 2023.

ZAINAL ABIDDIN, N. F.; YUSOFF, A.; AHMAD, N. Effect of octenylsuccinylation on physicochemical, thermal, morphological and stability of octenyl succinic anhydride (OSA) modified sago starch. **Food Hydrocolloids**, v. 75, p. 138–146, 1 fev. 2018.

ZHANG, Y. et al. γ-Cyclodextrin encapsulated thymol for citrus preservation and its possible mechanism against Penicillium digitatum. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 194, 1 ago. 2023.

ZHAO, S. et al. Emulsifying stability properties of octenyl succinic anhydride (OSA) modified waxy starches with different molecular structures. **Food Hydrocolloids**, v. 85, p. 248–256, 1 dez. 2018.

ZHU, F. Encapsulation and delivery of food ingredients using starch based systems. **Food Chemistry**, v. 229, p. 542–552, 15 ago. 2017.

ZHU, J. et al. Nano-structure of octenyl succinic anhydride modified starch micelle. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 1, p. 1–8, 2013.

Apêndices

Apêndice A

Tabela 11 - Identificação e quantificação de compostos voláteis de óleo essencial de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus citriodora* e cravo por cromatografia gasosa estática de headspace.

(continua)

Compostos orgânicos voláteis		IS	IRL*	IRL	Íon*	Íon	Quantificação (µg g^{-1})
Óleo essencial de melaleuca							
ÁLCOOL	3-Hexen-1-ol. (Z)-	95	868	843	67.00(100) 41.00(73.00) 82.00(46.49)	67.05(100) 41.05(83.39) 82.10(48.48)	3.02
	(E)-p-2-Menthen-1-ol	83	1109	1103	111.00(100) 71.00(83.69) 69.00(44.14)	71.05(100) 111.10(54.96) 69.10(42.56)	5.24
	cis-p-mentha-1(7).8-dien-2-ol	85	1201	1116	67.00(71.18) 109.00(96.53) 93.00(47.39)	67.05(100) 93.05(96.25) 109.10(79.84)	3.85
ALDEHYDE	α-Thujenal	80	1090	1131	79.00(100) 107.00(51.10) 108.00(28.99)	79.05(100) 107.10(34.94) 108.10(32.66)	19.23
	Cumaldehyde	95	1230	1223	133.00(100) 105.00(68.00) 77.00(28.89)	133.10(100) 105.10(72.86) 77.05(28.49)	1.98
KETONE	2-Ethylcyclohexanone	84	1051	1152	98.00(100) 55.00(75.65) 83.00(49.55)	98.10(100) 55.05(75.65) 83.05(53.70)	5.04
	7-ethyl-4-nonanone	81	1187	1246	43.00(100) 71.00(67.11) 109.00(44.99)	43.05(100) 109.10(77.85) 71.05(52.82)	37.57
	D-Carvone	94	1190	1226	79.00(100) 107.00(51.10) 108.00(28.99)	79.05(100) 107.10(34.94) 108.10(32.66)	1.06
ETHER	Anethole	93	1190	1266	133.00(100) 105.00(68.00) 77.00(28.89)	133.10(100) 105.10(72.86) 77.05(28.49)	0.87

Tabela 11 - Identificação e quantificação de compostos voláteis de óleo essencial de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus citriodora* e cravo por cromatografia gasosa estática de headspace.

(continuação)

Compostos orgânicos voláteis		**IS**	**IRL***	**IRL**	**Íon***	**Íon**	**Quantificação (µg g^{-1})**
Óleo essencial de melaleuca							
HIDROCARBON	3-Heptene. 2.6-dimethyl-	92	796	816	69.00(100) 55.00(89.01) 56.00(82.01)	69.10(100) 55.05(84.31) 56.10(64.97)	0.40
	Octane	91	816	806	43.00(100) 85.00(26.49) 41.00(43.79)	43.05(100) 85.10(54.49) 41.05(37.76)	0.01
	Styrene. 2.6-dimethyl-	86	1110	1075	132.00(100) 117.00(90.43) 91.00(24.45)	132.15(100) 117.10(92.55) 91.05(33.86)	4.12
	Styrene. 3.5-dimethyl-	93	1110	1079	132.00(100) 117.00(73.48) 115.00(25.12)	132.15(100) 117.10(81.19) 115.10(38.36)	10.05
MONOTERPENE	α-Thujene	95	902	908	93.00(100) 91.00(34.93) 77.00(34.23)	93.10(100) 91.10(49.05) 77.05(38.87)	7.69
	β-Pinene	93	943	956	93.00(100) 69.00(30.60) 77.00(26.15)	93.10(100) 69.10(27.18) 77.05(27.11)	28.47
	1R-α-Pinene	95	948	938	93.00(100) 92.0(32.19) 91.00(26.69)	93.10(100) 92.10(48.62) 91.10(36.01)	62.35
	β-Myrcene	86	958	979	41.00(100) 93.00(85.59) 69.00(79.68)	69.10(100) 41.05(96.00) 93.10(58.16)	28.23
	β-Phellandrene	93	964	971	93.00(100) 77.00(27.42) 91.00(24.72)	93.10(100) 91.10(29.09) 77.05(25.22)	42.08
	ɣ-Terpinene	94	998	1060	93.00(100) 91.00(37.29) 136.00(35.89)	93.10(100) 136.20(45.82) 91.10(43.93)	3.26
	D-Limonene	93	1018	1049	68.00(100) 93.00(59.10) 67.00(44.69)	68.05(100) 67.05(69.56) 93.10(65.46)	17.77

Tabela 11 - Identificação e quantificação de compostos voláteis de óleo essencial de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus citriodora* e cravo por cromatografia gasosa estática de headspace.

(continuação)

Compostos orgânicos voláteis		**IS**	**IRL***	**IRL**	**Íon***	**Íon**	**Quantificação (µg g^{-1})**
Óleo essencial de melaleuca							
MONOTERPENOID	Isocineole	86	1012	1058	111.00(100) 43.00(88.79) 71.00(83.69)	71.05(100) 43.05(73.19) 111.10(47.87)	1.04
	Thujone	88	1062	1096	69.00(100) 41.00(74.01) 81.00(55.01)	69.10(100) 41.05(65.53) 81.05(69.09)	1.32
	Perillene	84	1125	1093	69.00(100) 41.00(74.01) 81.00(55.01)	69.10(100) 41.05(65.53) 81.05(64.09)	1.99
	4-Terpineol	84	1137	1062	71.00(100) 111.00(48.03) 43.00(45.04)	71.05(100) 43.05(61.69) 111.10(39.74)	2.73
	α-Terpineol	89	1143	1207	111.00(100) 71.00(83.69) 69.00(44.14)	71.05(100) 111.10(54.96) 69.10(42.56)	23.41
	Citral	87	1174	1252	69.00(100) 41.00(94.00) 84.00(25.69)	69.10(100) 41.05(68.18) 84.05(23.85)	2.09
	trans-Piperitol	88	1175	1212	84.00(100) 83.00(26.30) 139.00(24.30)	84.10(100) 139.15(36.28) 83.10(30.65)	4.10
	Cuminol	92	1284	1269	69.00(100) 41.00(74.01) 81.00(55.01)	69.10(100) 41.05(65.53) 81.05(64.09)	1.78
SESQUITERPENE	α-Cubebene	90	1344	1347	161.00(100) 119.00(97.61) 91.00(29.20)	119.15 (100) 161.15(87.51) 91.10(23.52)	2.97
	Alloaromadendrene	94	1386	1437	93.00(80.08) 91.00(83.59) 105.00(75.28)	93.10(100) 91.10(90.07) 105.10(86.26)	28.12

Tabela 11 - Identificação e quantificação de compostos voláteis de óleo essencial de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus citriodora* e cravo por cromatografia gasosa estática de headspace.

(continuação)

Compostos orgânicos voláteis		IS	IRL*	IRL	Íon*	Íon	Quantificação (µg g^{-1})
Óleo essencial de melaleuca							
SESQUITERPENE	β-Elemene.	93	1398	1385	81.00(100) 93.00(94.84) 107.00(57.45)	93.10(100) 81.10(86.11) 107.10(70.42)	2.45
	(-)-Aristolene	84	1403	1374	105.00(100) 107.00(20.08) 91.00(40.72)	105.10(100) 91.10(42.53) 107.10(49.17)	4.19
	α-Gurjunene	93	1419	1403	204.00(100) 161.00(72.66) 105.00(56.96)	204.15(100) 161.15(92.97) 105.10(82.09)	8.88
	ɣ-Muurolene	91	1435	1466	161.00(100) 105.00(51.55) 119.00(44.09)	161.15(100) 105.10(63.37) 119.10(59.40)	3.38
	ɣ-Cadinene	93	1435	1499	161.00(100) 105.00(26.40) 119.00(20.99)	161.15(100) 105.10(42.46) 119.15(34.33)	1.44
	α-Muurolene	95	1440	1489	105.00(100) 161.00(49.18) 94.00(32.97)	105.10(100) 161.15(47.53) 94.10(29.50)	2.95
	β-Cadinene	92	1440	1510	161.00(100) 119.00(44.54) 134.00(45.64)	161.15(100) 119.15(65.61) 134.15(56.90)	4.30
	ɣ-Gurjunene	90	1461	1462	161.00(100) 107.00(80.46) 105.00(74.61)	105.10(100) 107.10(90.71) 161.15(78.93)	2.93
	β-Selinene	96	1469	1474	105.00(89.42) 107.00(76.49) 93.00(74.48)	105.10(100) 107.10(93.37) 93.10(88.00)	6.57
	1.4-Dimethyl-3-(2-methyl-1-propenyl)-4-vinyl-1-cycloheptene	80	1480	1487	107.00(100) 93.00(84.96) 135.00(47.30)	107.10(100) 135.15(57.27) 93.10(52.55)	13.20

Tabela 11 - Identificação e quantificação de compostos voláteis de óleo essencial de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus citriodora* e cravo por cromatografia gasosa estática de headspace.

(continuação)

Compostos orgânicos voláteis		**IS**	**IRL***	**IRL**	**Íon***	**Íon**	**Quantificação (µg g^{-1})**
Óleo essencial de melaleuca							
	α-Guaiene	90	1490	1478	105.00(100) 107.00(77.26) 93.00(74.95)	105.10(100) 107.10(73.00) 93.10(54.91)	4.77
	Caryophyllene	96	1494	1410	93.00(100) 69.00(90.89) 133.00(80.21)	133.15(100) 69.10(95.68) 93.10(95.17)	6.49
	(-)-Calamenene	94	1537	1504	159.00(65.82) 202.00(60.03) 91.00(40.13)	159.15(100) 202.15(49.29) 91.05(39.09)	6.10
SESQUITERPENOID	Caryophyllene oxide	92	1507	1558	43.00(100) 79.00(66.08) 93.00(63.26)	79.05(100) 93.10(92.86) 43.05(91.34)	1.78
	Epiglobulol	86	1530	1540	109.00(50.65) 82.00(59.82) 161.00(37.69)	109.10(100) 82.10(88.40) 161.15(78.97)	1.56
	(-)-Globulol	89	1530	1564	43.00(100) 109.00(53.70) 107.00(37.68)	43.05(100) 109.10(85.57) 107.10(71.99)	3.40
	Spathulenol	88	1536	1554	109.00(93.96) 107.00(71.86) 93.00(63.67)	107.10(100) 93.10(80.40) 109.10(77.44)	5.48
	ɣ-Eudesmol	85	1626	1545	189.00(96.80) 43.00(74.87) 59.00(85.69)	189.15(100) 43.05(84.72) 59.05(69.13)	0.83
Óleo essencial de tomilho branco							
ETHER	Anisole, 2-isopropyl-4-methyl-	96	1231	1227	149.00(100) 164.00(43.74) 91.00(17.02)	149.10(100) 164.10(38.51) 91.05(16.60)	2.07
HIDROCARBON	m-Menthane	93	976	901	55.00(100) 97.00(95.84) 96.00(56.38)	97.10(100) 55.05(86.35) 96.10(62.21)	2.86

Tabela 11 - Identificação e quantificação de compostos voláteis de óleo essencial de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus citriodora* e cravo por cromatografia gasosa estática de headspace.

(continuação)

Compostos orgânicos voláteis		**IS**	**IRL***	**IRL**	**Íon***	**Íon**	**Quantificação (µg g^{-1})**
Óleo essencial de tomilho branco							
MONOTERPENE	α-Thujene	94	902	824	93.00(100)	93.10(100)	14.63
					91.00(35.93)	92.05(36.01)	
					92.00(30.83)	91.10(35.36)	
	Camphene	93	943	834	93.009(100)	121.10(100)	2.26
					121.00(63.40)	93.10(99.85)	
					79.00(36.39)	79.05(52.48)	
	β-Pinene	95	943	888	93.00(100)	93.10(100)	37.67
					41.00(41.79)	69.10(32.35)	
					69.00(38.99)	41.05(28.26)	
	3-Methyl-apopinene	95	948	817	93.00(100)	93.10(100)	20.51
					92.00(28.83)	92.10(30.55)	
					91.00(21.52)	91.05(23.20)	
	α-Pinene	96	948	938	93.00(100)	93.10(100)	80.12
					92.00(32.19)	92.10(46.11)	
					91.00(26.69)	91.10(39.23)	
	β-Myrcene	90	958	910	41.00(100)	69.10(100)	2.61
					93.00(85.59)	41.05(81.10)	
					69.00(79.68)	93.10(58.16)	
	ɣ-Terpinene	91	998	1038	93.00(100)	93.10(100)	3.63
					91.00(37.29)	136.15(49.81)	
					136.00(35.89)	91.05(22.09)	
	α-Terpinene	92	998	1056	121.00(100)	121.15(100)	423.31
					93.00(90.70)	93.10(69.02)	
					136.00(53.00)	136.15(51.98)	
	3,8-p-Menthadiene	90	1018	1077	79.00(100)	79.05(100)	5.50
					93.00(48.81)	107.10(54.71)	
					107.00(44.50)	93.05(23.76)	
	Terpinolene	93	1052	1087	121.00(100)	121.15(100)	5.95
					93.00(98.14)	136.15(96.66)	
					136.00(72.75)	93.10(91.17)	
MONOTERPENOID	β-Linalool	95	1082	1105	71.00(100)	71.05(100)	57.98
					93.00(76.08)	55.05(78.18)	
					55.00(63.77)	93.05(53.64)	

Tabela 11 - Identificação e quantificação de compostos voláteis de óleo essencial de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus citriodora* e cravo por cromatografia gasosa estática de headspace.

(continuação)

Compostos orgânicos voláteis		**IS**	**IRL***	**IRL**	**Íon***	**Íon**	**Quantificação (µg g^{-1})**
Óleo essencial de tomilho branco							
MONOTERPENOID	Plinol A	92	1099	1117	43.00(100)	43.05(100)	1.96
					71.00(74.01)	71.05(78.25)	
					55.00(50.01)	55.05(51.51)	
	Camphor	92	1121	1123	95.00(100)	95.10(100)	11.92
					81.00(52.16)	81.10(47.87)	
					108.00(44.54)	108.10(29.35)	
	Isopinocampheol	90	1125	1120	70.00(100)	70.10(100)	2.25
					43.00(90.59)	43.05(83.42)	
					41.00(50.86)	41.05(48.25)	
	4-Terpineol	95	1137	1166	71.00(100)	71.05(100)	32.91
					111.00(57.65)	111.10(54.54)	
					93.00(39.59)	93.05(39.60)	
	Isoborneol	93	1138	1144	95.00(100)	95.10(100)	14.08
					41.00(20.19)	110.10(24.91)	
					93.00(18.99)	93.05(21.76)	
	Linderol	94	1138	1154	95.00(100)	95.10(100)	22.24
					110.00(19.19)	110.10(27.98)	
					41.00(15.99)	41.05(8.37)	
	α-Terpineol	94	1143	1203	59.00(100)	59.05(100)	1.49
					93.00(74.78)	93.10(76.33)	
					136.00(71.87)	136.15(62.99)	
	Thymol	92	1262	1296	135.00(100)	135.10(100)	13.22
					150.00(37.53)	150.10(49.90)	
					91.00(14.81)	91.05(14.69)	
	Carvacrol	92	1262	1301	135.00(100)	135.10(100)	85.33
					150.00(31.49)	150.10(55.20)	
					91.00(13.19)	91.05(22.23)	
	β-Terpinol	90	1158	1049	71.00(100)	93.10(100)	8.43
					93.00(52.65)	136.15(33.40)	
					136.00(50.35)	71.05(27.68)	
SESQUITERPENE	Copaene	94	1221	1367	161.00(100)	119.10(100)	0.93
					119.00(93.89)	105.10(90.47)	
					105.00(90.09)	161.15(87.68)	

Tabela 11 - Identificação e quantificação de compostos voláteis de óleo essencial de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus citriodora* e cravo por cromatografia gasosa estática de headspace.

(continuação)

Compostos orgânicos voláteis		**IS**	**IRL***	**IRL**	**Íon***	**Íon**	**Quantificação (µg g^{-1})**
Óleo essencial de tomilho branco							
SESQUITERPENE	α-Copaene	94	1221	1370	162.00(100) 119.00(93.59) 105.00(85.69)	119.10(100) 161.10(91.46) 105.10(88.30)	3.61
	α-Cubebene	94	1344	1346	105.00(100) 161.00(90.30) 119.00(89.83)	105.10(100) 119.10(91.07) 161.10(86.73)	1.12
	Alloaromadendrene	92	1386	1429	161.00(100) 41.00(94.09) 91.00(83.59)	161.10(100) 91.05(83.47) 41.05(60.62)	1.35
	β-Cadinene	93	1440	1508	161.00(100) 204.00(51.86) 134.00(45.64)	161.10(100) 134.15(56.42) 204.15(55.43)	0.37
	10,10-Dimethyl-2,6-dimethylenebicyclo[7.2.0]undecane	93	1489	1417	120.00(100) 41.00(72.76) 69.00(62.65)	120.10(100) 69.10(49.75) 41.05(39.41)	1.82
	Caryophyllene	96	1494	1414	93.00(100) 69.00(90.89) 133.00(80.21)	93.05(100) 133.15(89.91) 69.05(73.15)	26.41
	β-Bisabolene	93	1500	1498	69.00(100) 93.00(69.07) 41.00(68.67)	69.10(100) 93.05(81.88) 41.05(54.69)	2.22
	Humulene	96	1579	1442	93.00(100) 80.00(35.13) 121.00(26.52)	93.10(100) 80.05(37.53) 121.15(31.31)	5.06
SESQUITERPENOID	Caryophyllene oxide	91	1507	1557	43.00(100) 41.00(68.73) 79.00(66.08)	79.05(100) 43.05(90.68) 41.05(68.29)	0.79

Tabela 11 - Identificação e quantificação de compostos voláteis de óleo essencial de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus citriodora* e cravo por cromatografia gasosa estática de headspace.

(continuação)

Compostos orgânicos voláteis		**IS**	**IRL***	**IRL**	**Íon***	**Íon**	**Quantificação (µg g^{-1})**
Óleo essencial de *Eucalyptus citriodora*							
CARBOXYLIC ACID	Citronellic acid	94	1293	1312	69.00(100)	69.10(100)	0.76
					41.00(68.67)	41.05(60.80)	
					110.00(57.66)	110.15(53.35)	
ALCOHOL	3-Methyl-1-pentanol	95	796	831	56.00(100)	56.05(100)	0.41
					69.00(79.30)	69.05(78.66)	
					55.00(74.90)	55.05(59.70)	
	3-Methylcyclopentanol	90	849	824	57.00(100)	57.05(100)	1.19
					71.00(67.86)	41.05(74.75)	
					41.00(48.50)	71.05(70.36)	
	Menthoglycol	93	1320	1304	81.00(100)	81.10(100)	1.71
					59.00(95.20)	59.05(58.64)	
					96.00(85.80)	96.10(49.20)	
ALDEHYDE	Butanal, 2-ethyl-	90	742	773	43.00(100)	43.05(100)	0.38
					72.00(48.09)	71.05(35.62)	
					71.00(34.19)	72.05(28.05)	
	Bergamal	90	1025	1037	82.00(100)	82.10(100)	9.84
					41.00(59.26)	67.10(51.85)	
					67.00(58.56)	41.05(37.36)	
KETONE	Jasmone	93	1338	1364	164.00(100)	79.05(100)	1.03
					79.00(83.90)	164.15(98.42)	
					110.00(75.80)	110.10(93.81)	
ESTER	Isobutyl n-butyrate	96	920	906	71.00(100)	71.05(100)	3.79
					43.00(47.99)	43.05(55.92)	
					56.00(35.79)	56.10(34.54)	
	Iso-Amyl iso-butyrate	92	955	1003	43.00(100)	70.10(100)	1.18
					71.00(64.10)	43.05(90.80)	
					70.00(59.10)	71.05(70.86)	
	Methyl citronellate	95	1203	1253	41.00(100)	69.10(100)	1.46
					69.00(67.00)	95.10(85.23)	
					95.00(48.00)	41.05(56.37)	
	Citronellol acetate	95	1302	1342	43.00(100)	81.10(100)	11.72
					81.00(79.18)	95.10(73.41)	
					95.00(74.28)	43.05(58.96)	

Tabela 11 - Identificação e quantificação de compostos voláteis de óleo essencial de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus citriodora* e cravo por cromatografia gasosa estática de headspace.

(continuação)

Compostos orgânicos voláteis		**IS**	**IRL***	**IRL**	**Íon***	**Íon**	**Quantificação (µg g^{-1})**
Óleo essencial de *Eucalyptus citriodora*							
ESTER	p-Menth-8-en-3-ol, acetate	95	1335	1263	43.00(100)	43.05(100)	0.81
					136.00(64.20)	136.20(67.64)	
					121.00(46.19)	121.15(50.26)	
	β-Phenylethyl isobutyrate	95	1394	1368	104.00(100)	104.10(100)	0.56
					43.00(3.21)	43.05(18.66)	
					105.00(8.45)	105.10(12.09)	
PHENOL	Eugenol	96	1392	1327	164.00(100)	164.10(100)	0.47
					149.00(28.79)	149.10(34.71)	
					77.00(20.69)	77.05(22.10)	
HIDROCARBON	1-Isopropyl-3-methylcyclopentane	92	856	858	55.00(100)	55.05(100)	1.18
					83.00(65.97)	83.10(93.87)	
					41.00(52.66)	41.05(45.97)	
	Methyl ethyl cyclopentene	93	860	912	81.00(100)	81.10(100)	1.24
					95.00(51.63)	95.05(51.32)	
					67.00(42.92)	67.05(45.03)	
	2,6-Dimethyl-1,5-heptadiene	90	868	881	69.00(100)	69.10(100)	1.45
					41.00(70.14)	81.10(92.66)	
					81.00(38.84)	41.05(64.32)	
	Styrene	97	883	868	104.00(100)	104.10(100)	1.15
					103.00(40.69)	103.10(42.53)	
					78.00(34.99)	78.05(40.22)	
	cis-1,2,3-Trimethylcyclohexane	90	903	862	69.00(100)	69.10(100)	1.27
					55.00(97.77)	55.05(91.63)	
					41.00(89.31)	41.05(86.57)	
MONOTERPENE	α-Thujene	94	902	923	93.00(100)	93.10(100)	6.60
					91.00(34.93)	92.05(36.01)	
					92.00(30.83)	91.10(35.36)	
	β-Pinene	95	943	968	93.00(100)	93.10(100)	25.85
					41.00(41.79)	69.10(41.61)	
					69.00(38.99)	41.05(34.47)	
	α-Pinene	96	948	929	93.00(100)	93.10(100)	15.63
					92.00(32.19)	92.10(39.74)	
					91.00(26.69)	91.10(36.40)	

Tabela 11 - Identificação e quantificação de compostos voláteis de óleo essencial de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus citriodora* e cravo por cromatografia gasosa estática de headspace.

(continuação)

Compostos orgânicos voláteis		**IS**	**IRL***	**IRL**	**Íon***	**Íon**	**Quantificação (µg g^{-1})**
Óleo essencial de *Eucalyptus citriodora*							
	3-Carene	92	948	1033	93.00(100)	93.10(100)	7.40
					91.00(50.01)	91.10(40.37)	
					79.00(32.06)	79.10(33.11)	
	β-Myrcene	93	958	987	93.00(100)	93.10(100)	12.53
					41.00(90.62)	69.10(76.78)	
					69.00(73.22)	41.05(71.94)	
	α-Phellandrene	94	969	993	93.00(100)	93.10(100)	2.18
					91.00(59.94)	91.10(59.85)	
					77.00(44.48)	92.10(38.23)	
	α-Terpinene	90	998	1007	121.00(100)	121.15(100)	2.85
					93.00(90.70)	93.10(85.03)	
					136.00(53.00)	136.15(57.52)	
	ɣ-Terpinene	95	998	1050	93.00(100)	93.10(100)	15.47
					91.00(37.29)	136.20(50.07)	
					136.00(35.89)	91.10(44.04)	
	D-Limonene	91	1018	1021	68.00(100)	68.10(100)	15.52
					93.00(78.39)	67.10(65.37)	
					67.00(74.68)	93.10(62.75)	
	p-Mentha-3,8-diene	92	1018	1059	79.00(100)	79.10(100)	8.59
					93.00(48.81)	107.10(61.45)	
					107.00(44.50)	93.10(37.79)	
	Terpinolene	93	1052	1077	121.00(100)	121.15(100)	6.90
					93.00(98.14)	93.10(97.98)	
					136.00(72.75)	136.15(97.47)	
MONOTERPENOID	Rosoxide	90	1114	1097	139.00(100)	139.15(100)	12.33
					69.00(45.00)	69.05(67.37)	
					41.00(31.00)	41.05(14.19)	
	β-Citronellal	90	1125	1185	41.00(100)	69.05(100)	264.31
					69.00(98.30)	41.05(64.83)	
					95.00(48.24)	95.10(49.33)	
	α-Terpineol	95	1143	1194	59.00(100)	59.05(100)	3.31
					93.00(74.78)	93.10(79.64)	
					136.00(71.87)	136.15(68.57)	

Tabela 11 - Identificação e quantificação de compostos voláteis de óleo essencial de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus citriodora* e cravo por cromatografia gasosa estática de headspace.

(continuação)

Compostos orgânicos voláteis		**IS**	**IRL***	**IRL**	**Íon***	**Íon**	**Quantificação (µg g^{-1})**
Óleo essencial de *Eucalyptus citriodora*							
	α-Citral	93	1174	1251	69.00(100) 41.00(86.50) 84.00(25.40)	69.10(100) 41.05(67.38) 84.05(26.94)	0.55
	β-Citronellol	94	1179	1230	69.00(100) 41.00(94.29) 67.00(58.76)	69.10(100) 41.05(86.26) 67.05(62.12)	26.79
	Isopulegol	94	1196	1126	81.00(100) 69.00(94.37) 41.00(91.65)	81.10(100) 41.05(61.81) 69.10(54.41)	13.78
	Eucalyptol	90	1059	1018	43.00(100) 81.00(65.41) 108.00(52.14)	43.05(100) 81.10(88.36) 108.10(75.15)	34.07
SESQUITERPENE	Caryophyllene	96	1494	1410	93.00(100) 69.00(90.89) 133.00(80.21)	133.15(100) 93.10(99.69) 69.10(80.56)	7.89
Óleo essencial de cravo							
CARBOXYLIC ACID	Palmitic acid	90	1968	1947	60.00(100) 73.00(98.10) 57.00(84.09)	73.05(100) 60.00(71.82) 57.05(71.21)	0.04
ALDEHYDE	Hexanal	97	806	790	44.00(100) 56.00(81.64) 41.00(65.56)	44.00(100) 56.05(82.03) 41.00(64.94)	0.02
KETONE	Sulcatone	95	938	968	43.00(100) 41.00(53.70) 69.00(35.09)	43.00(100) 41.05(49.19) 69.05(42.98)	0.16
PHENOL	Benzenol	97	901	975	94.00(100) 66.00(22.59) 65.00(16.79)	94.05(100) 66.05(29.27) 65.05(19.04)	0.08
	p-Chavicol	90	1203	1232	134.00(100) 133.00(92.61) 77.00(25.90)	134.10(100) 133.10(77.38) 77.05(22.48)	0.40

Tabela 11 - Identificação e quantificação de compostos voláteis de óleo essencial de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus citriodora* e cravo por cromatografia gasosa estática de headspace.

(continuação)

Compostos orgânicos voláteis		**IS**	**IRL***	**IRL**	**Íon***	**Íon**	**Quantificação (µg g^{-1})**
Óleo essencial de cravo							
	Eugenol	96	1392	1366	164.00(100) 149.00(28.79) 77.00(20.69)	164.05(100) 149.05(28.93) 77.05(17.84)	127.70
	Isoeugenol	96	1410	1392	164.00(100) 149.00(35.50) 103.00(27.60)	164.05(100) 149.05(33.91) 103.05(21.71)	3.03
HIDROCARBON	4-Propylheptane	94	951	951	57.00(100) 41.00(35.43) 98.00(29.63)	57.10(100) 98.10(32.88) 41.00(27.03)	0.01
	Decylene	95	1005	992	55.00(100) 41.00(89.36) 56.00(84.57)	56.05(100) 55.05(92.95) 41.05(77.72)	0.21
	4-Decene	94	1023	995	55.00(100) 69.00(55.45) 56.00(54.68)	55.05(100) 69.10(55.90) 56.05(40.32)	0.05
	o-Cymene	97	1042	1008	119.00(100) 134.00(29.39) 91.00(17.89)	119.10(100) 134.15(30.45) 91.05(20.05)	6.08
	Dodecane	95	1214	1202	57.00(100) 43.00(77.90) 71.00(51.50)	57.05(100) 43.05(74.40) 71.10(73.60)	0.03
	3-Heptadecene	91	1719	1678	55.00(100) 41.00(98.01) 69.00(97.01)	69.10(100) 55.05(77.03) 41.05(43.83)	0.01
MONOTERPENE	α-Thujene	95	902	923	93.00(100) 91.00(34.93) 92.00(30.83)	93.05(100) 91.05(50.88) 92.05(38.25)	0.07
	Camphene	93	943	938	93.00(100) 121.00(63.40) 79.00(36.39)	93.05(100) 121.10(82.32) 79.05(40.54)	0.02
	β-Pinene	91	943	965	93.00(100) 41.00(41.79) 69.00(38.99)	93.05(100) 69.05(25.44) 41.05(23.01)	0.07

Tabela 11 - Identificação e quantificação de compostos voláteis de óleo essencial de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus citriodora* e cravo por cromatografia gasosa estática de headspace.

(continuação)

Compostos orgânicos voláteis		**IS**	**IRL***	**IRL**	**Íon***	**Íon**	**Quantificação (µg g^{-1})**
Óleo essencial de cravo							
	α-Pinene	96	948	927	93.00(100)	93.05(100)	0.27
					92.00(32.19)	92.05(39.39)	
					91.00(26.69)	91.05(36.96)	
	β-Myrcene	92	958	986	93.00(100)	93.05(100)	0.14
					41.00(90.62)	41.05(69.50)	
					69.00(73.22)	69.05(67.88)	
	ɣ-Terpinene	97	998	1048	93.00(100)	93.05(100)	0.76
					91.00(37.29)	91.05(46.35)	
					136.00(35.89)	136.15(43.91)	
MONOTERPENOID	β-Linalool	96	1082	1086	71.00(100)	71.05(100)	0.32
					93.00(76.08)	93.05(72.50)	
					55.00(63.77)	55.05(45.48)	
	Camphor	90	1121	1109	95.00(100)	95.10(100)	0.03
					81.00(52.16)	81.10(55.50)	
					108.00(44.54)	108.10(46.60)	
	β-Citronellal	91	1125	1132	69.00(100)	95.10(100)	0.08
					41.00(84.74)	69.05(88.09)	
					95.00(61.84)	41.05(75.93)	
	4-Terpineol	97	1137	1155	71.00(100)	71.05(100)	1.71
					111.00(48.03)	111.10(54.89)	
					93.00(39.90)	93.10(44.41)	
	Camphol	91	1138	1141	95.00(100)	95.10(100)	0.06
					110.00(21.52)	110.10(25.50)	
					41.00(16.61)	41.05(8.82)	
	α-Terpineol	94	1143	1167	59.00(100)	59.05(100)	0.09
					93.00(74.78)	93.05(76.15)	
					136.00(71.87)	136.15(67.32)	
	Thymol	97	1262	1274	135.00(100)	135.10(100)	1.21
					150.00(32.09)	150.10(32.14)	
					91.00(12.59)	91.05(14.54)	
SESQUITERPENES	α-Copaene	94	1221	1373	162.00(100)	119.10(100)	5.43
					119.00(93.59)	161.10(93.17)	
					105.00(85.69)	105.10(91.41)	

Tabela 11 - Identificação e quantificação de compostos voláteis de óleo essencial de melaleuca, tomilho branco, *Eucalyptus citriodora* e cravo por cromatografia gasosa estática de headspace.

(conclusão)

Compostos orgânicos voláteis		**IS**	**IRL***	**IRL**	**Íon***	**Íon**	**Quantificação (µg g^{-1})**
Óleo essencial de cravo							
	Alloaromadendrene	91	1386	1456	161.00(100) 91.00(97.35) 41.00(86.13)	161.10(100) 91.05(70.49) 41.05(45.95)	0.99
	epi-Bicyclosesquiphellandrene	90	1435	1466	161.00(100) 105.00(28.68) 119.00(18.45)	161.10(100) 105.10(39.09) 119.10(23.66)	2.30
	α-Muurolene	95	1440	1489	105.00(100) 161.00(49.18) 94.00(31.97)	105.10(100) 161.10(45.43) 94.10(27.36)	1.06
	α-Selinene	93	1474	1484	189.00(100) 204.00(76.11) 93.00(74.61)	189.10(100) 93.10(69.04) 204.10(53.37)	1.59
	α-Bulnesene	90	1490	1494	108.00(100) 107.00(91.15) 93.00(88.37)	107.10(100) 93.05(53.41) 108.10(51.03)	0.79
	Caryophyllene	93	1494	1429	93.00(100) 69.00(90.89) 133.00(80.21)	93.10(100) 69.05(99.26) 133.10(87.38)	67.81
	Humulene	96	1579	1453	93.00(100) 80.00(35.13) 121.00(26.52)	93.10(100) 80.05(31.50) 121.15(24.75)	23.89
SESQUITERPENOID	Caryophyllene oxide	90	1507	1559	43.00(100) 41.00(68.73) 79.00(66.08)	79.05(100) 43.05(92.17) 41.05(69.07)	1.24
	Viridiflorol	90	1530	1644	41.00(100) 43.00(68.51) 69.00(62.91)	41.05(100) 43.05(62.27) 69.05(55.18)	0.18

IS: Índice de similaridade com NIST11; IRL*: Índice de retenção da biblioteca de NIST11; IRL: Índice de retenção experimental (baseado na série de alcanos); Ion*: íons de referência (com relativa intensidade da biblioteca de NIST11; Ion: íons de referência experimental.

Apêndice B

Tabela 12 - Propriedades termogravimétricas do amido-OSA, cápsulas adicionadas de diferentes concentrações de óleos essenciais de cravo e tomilho branco e sem óleo essencial.

Amostra	Propriedades termogravimétricas*							
	Tpi_1 (ºC)	Tp_1 (ºC)	Tpf_1 (ºC)	Δm_1 (%)	Tpi_2 (ºC)	Tp_2 (ºC)	Tp_{f2} (ºC)	Δm_2 (%)
OEC 2%	37,8	44,2	100,8	5,9	236,7	315,0	365,0	65,6
OEC 3%	40,3	43,2	93,5	3,4	220,8	312,5	372,1	76,0
OEC 4%	34,1	52,2	99,0	6,3	227,9	305,9	361,4	70,7
OETB 2%	32,8	44,2	94,2	6,1	244,4	311,3	367,9	66,6
OETB 3%	33,3	47,2	105	6,1	234,9	306,9	369,1	69,1
OETB 4%	33,6	49,9	102,8	5,5	239,9	307,6	368,3	70,5
OE 0%	29,7	54	107	9,6	217,4	305,4	360,6	63,7
Amido-OSA	36,0	53,0	93,0	5,3	248,0	303,7	354,0	65,7

*Temperatura inicial (Ti_n), temperatura de pico (Tp_n), temperatura final (Tf_n), perda de massa (Δm_n)

Apêndice C

Testes preliminares para o preparo das nanoemulsões (NE)

O projeto ideal para a fabricação de nanoemulsões (NE) estáveis incluiu diversas conformações de formulações, a maioria com duas fases, a fase aquosa e a fase orgânica (Tabela 13). Para os testes preliminares foi utilizado somente o óleo essencial de cravo. Inicialmente o amido-OSA (10% e 20% p/v) foi dissolvido em água destilada e filtrada ou solução aquosa de etanol (20%) à temperatura ambiente com agitação magnética (1000 rpm) por 30 minutos. Após as soluções foram filtradas com auxílio de uma bomba a vácuo (marca Buchi, modelo V-700), utilizando um filtro de nitrato de celulose (tamanho dos poros de 8 µm). Para preparo da fase aquosa (FA), tween 20 (0,5 e 1%, p/v) foi adicionado ao filtrado e este permaneceu com agitação magnética por 5 min. Para o preparo da fase orgânica (FO), SPAN 80 (1,5 e 3,0%, p/v) foi adicionado ao OEC (2%, p/v). A FA foi adicionada a FO, sob agitação magnética (1000 rpm), para a formação de emulsões grosseiras (EG) e a agitação permaneceu por 30 min, seguido de uma homogeneização a 14 500 rpm por 3 min à temperatura ambiente usando um homogeneizador de alta velocidade (Ultraturrax TP 18/10–10N; IKA-Werke GmbH, Staufen, Alemanha). As NEs foram produzidas imediatamente passando as EG pelo homogeneizador de alta pressão (Marca Avestin, Modelo Emulsi Flex - C3) em condições de 10 000 PSI por 10 ciclos. Todos os sistemas de NEs formulados foram armazenados a 20 ± 2 ºC para acompanhamento da estabilidade. Na Tabela 13 são apresentas as variações de polímero, surfactantes e solvente utilizada para produção de NEs.

Tabela 13 - Delineamento experimental para produção de nanoemulsões

Teste	Amido (%, p/v)	Tween 20 (%, p/v))	Span 80 (%, p/v)	Solvente
1	20	1,0	-	Etanol 20%
2	20	0,5	1,5	Etanol 20%
3	20	1,0	3,0	Etanol 20%
4	20	1,0	-	Água
5	20	0,5	1,5	Água
6	20	1,0	3,0	Água
7	10	0,5	1,5	Etanol 20%
8	10	0,5	1,5	Água
9	10	1,0	-	Água

As NEs foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão após 24 h. As formulações que não apresentaram separação visual de fases (floculação ou sedimentação) durante o período de armazenamento de 30 dias foram novamente avaliadas quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão.

Para avaliar a separação de fases as NEs foram acondicionadas em tubos de vidro e a espuma formada na camada superior dos tubos ou material sedimentado foi visualmente observado e registrado em fotografia macroscópica ao término do preparo da emulsão (tempo 0), após 24 h e 30 dias.

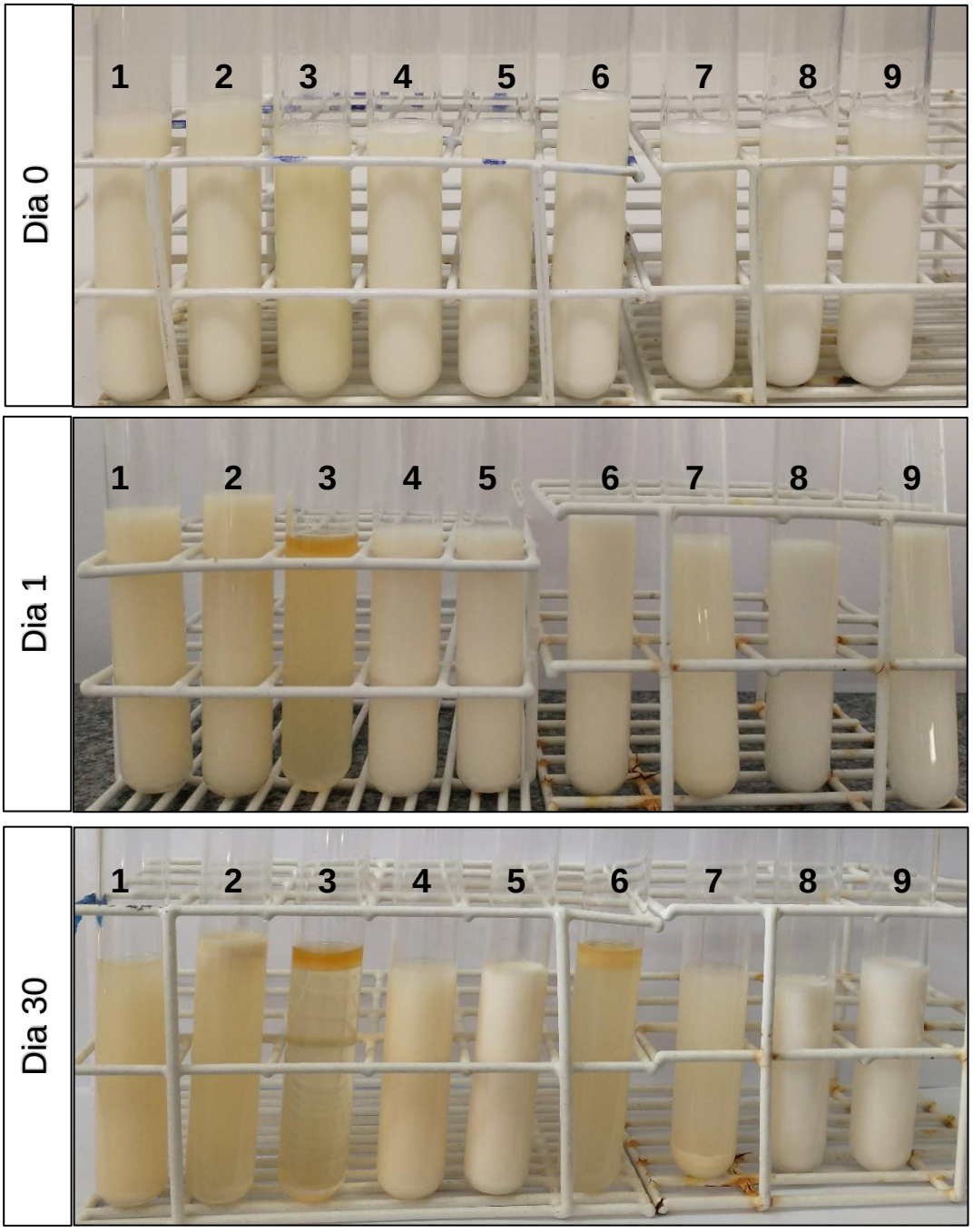
Para análise de tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão as NEs foram diluídas (1:100) em água destilada e filtrada, submetidas a banho de ultrassom durante 2 min em temperatura ambiente.

O tamanho de partícula e o índice de polidispersidade (PDI) das NEs foram medidos em triplicata por DLS (Litesizer™ 500, Anton Paar, Áustria).

O potencial zeta das NEs foi medido em triplicata por ELS (Litesizer™ 500, Anton Paar, Áustria) a uma temperatura constante de 25 °C.

Na Figura 13 estão apresentas as fotos das NEs logo após o término do preparo (dia 0), após 24 h (dia 1) e após 30 dias de armazenamento.

Figura 13 - Imagem da estabilidade das nanoemulsões produzidas com amido-OSA e óleo essencial de cravo.



Logo após o preparo é perceptível que a nanoemulsão 3 apresenta uma coloração tendendo ao amarelo, diferente das demais. Após 24 h de armazenamento esta emulsão já se apresentou como instável, com a floculação da fase orgânica (óleo

essencial). Após 30 dias de armazenamento se percebe nas NEs 1 e 7 apresentam a formação de sedimentado, decorrente da precipitação do amido. Já as NEs 2, 3 e 6 apresentam sobrenadante, em função da floculação da fase orgânica. De forma geral se observa que a utilização de etanol 20% (NEs nº 1, 2, 3 e 7) prejudicou a estabilidade das NEs durante o armazenamento. Além disso, a combinação dos surfactantes tween 20 e span 80 em concentrações máximas (1,0 e 3,0 %) também prejudicou a estabilidade da NE (NE nº 6).

Ns Tabela 14 são indicados os resultados da caracterização das NEs de amido-OSA carregadas com OEC. Após 24 h foram observados valores de PDI variando de 0,15 a 0,37. Valores de PDI maiores do que 0,3 foram observados nas NEs 3, 4 e 7. As NEs 3 e 7 não se demonstraram estáveis após 30 dias de armazenamento, e dessa forma não foram novamente avaliadas. Já a NE nº 4 apresentou uma redução no PDI de 0,31 para 0,26 e se demonstrou estável após o prazo de armazenamento. O valor PDI é definido como a medida da heterogeneidade na distribuição do tamanho da gota. Valores de PDI próximos a 0 indicam distribuições de tamanho homogêneas, enquanto valores de PDI próximos a 1 indicam distribuições de tamanho heterogêneas (KEYKHOSRAVY et al., 2020). Em contrapartida este tratamento (NE nº 4) apresentou um aumento do tamanho de partícula, o que pode ser devido a aglomeração de partículas em função da baixa carga superficial na interface das gotas, demonstrada pelo potencial zeta.

Apesar de ser observada diferença em todos os parâmetros avaliados 24 h e após 30 dias de armazenamento, como o aumento do tamanho de partícula (de 0,24 para 0,32 µm), diminuição do potencial zeta (de 26,67 para 16,50 mV) e o aumento da polidispersão (de 0,15 para 0,26) a NE elaborada com 20% de amido, 0,5% de tween 20, 1,5% de span 80 e água como solvente (emulsão nº 5) se demonstrou estável.

Apesar de os parâmetros de avaliação como potencial zeta e polidispersão apresentarem valores distintos entre os tratamentos 8 e 9, e entre seus períodos de armazenamento, ambas as NEs se demonstraram estáveis durante os 30 dias de armazenamento. Com relação ao tamanho de partícula, após 30 dias de armazenamento, a NE nº 9 apresentou o menor tamanho.

Em virtude da estabilidade observada de forma visual, estariam aptas as emulsões 4, 5, 8 e 9. Porém parâmetros de qualidade (tamanho de partícula e PDI) aliados a quantidade dos compostos da formulação (concentração de amido e

percentual total de surfactante) foram considerados para definir a NE que seria utilizada como modelo. Dessa forma, optou-se pelo uso da formulação 9, na qual foi utilizado 10% de amido-OSA e somente tween 20 (1,0%) como surfactante.

Tabela 14 - Potencial zeta, tamanho de partícula e índice de polidispersão das nanoemulsões de amido-OSA e óleo essencial de cravo.

Formulação	Tamanho de partícula (µm)		Potencial zeta (mV)		Índice de polidispersão	
	Dia 1	Dia 30	Dia 1	Dia 30	Dia 1	Dia 30
1	0,18 ± 0,02	-	5,10 ± 1,19		0,27 ± 0,02	
2	1,05 ± 0,11	-	-23,3 ± 0,22		0,29 ± 0,02	
3	1,52 ± 1,17	-	-24,23 ± 0,49		0,36 ± 0,04	
4	0,15 ± 0,02	0,24 ± 0,04	-7,40 ± 0,37	-6,20 ± 0,36	0,31 ± 0,01	0,26 ± 0,02
5	0,24 ± 0,01	0,32 ± 0,02	-26,67 ± 0,17	-16,50 ± 0,75	0,15 ± 0,05	0,26 ± 0,01
6	0,75 ± 0,03	-	-25,60 ± 0,29		0,20 ± 0,09	
7	1,58 ± 1,09	-	-26,30 ± 0,92		0,37 ± 0,04	
8	0,22 ± 0,01	0,24 ± 0,01	-29,70 ± 0,85	-24,03 ± 0,53	0,20 ± 0,01	0,13 ± 0,04
9	0,19 ± 0,01	0,17 ± 0,01	-17,43 ± 3,00	-8,87 ± 0,31	0,25 ± 0,01	0,27 ± 0,02