

## ATIVIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE A *PENICILLIUM DIGITATUM* DE ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO LIVRE E ENCAPSULADO EM AMIDO-OSA PELA TÉCNICA DE *ELECTROSPRAYING*

ESTEFANIA JULIA DIERINGS DE SOUZA<sup>1</sup>; DIANINI KRINGEL<sup>2</sup>; ELIEZER ÁVILA GANDRA<sup>3</sup>; ALVARO RENATO GUERRA DIAS<sup>4</sup>; ELESSANDRA DA ROSA ZAVAREZE<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [estefaniajulia.dierings@gmail.com](mailto:estefaniajulia.dierings@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade do Estado de Santa Catarina – [dianinikringel@hotmail.com](mailto:dianinikringel@hotmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [gandraea@hotmail.com](mailto:gandraea@hotmail.com);

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [alvaro.guerradias@gmail.com](mailto:alvaro.guerradias@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [elessandrad@yahoo.com.br](mailto:elessandrad@yahoo.com.br)

### 1. INTRODUÇÃO

Dentre as principais causas das perdas pós-colheita de frutas cítricas, destacam-se as doenças fúngicas, incluindo os causadores de mofos verdes e azuis, o *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum*, respectivamente (TAO et al., 2014). O *P. digitatum* é reconhecido como o patógeno pós-colheita mais problemático devido a ser um fungo mesófilo, com proliferação em temperatura ótima de 20 a 30°C (SIMAS et al., 2017), normalmente utilizada na comercialização pós colheita de citros.

Os métodos tradicionais utilizados para prevenir o crescimento fúngico em citros envolvem frequentemente o uso de agentes químicos sintéticos, conhecidos como fungicidas (como exemplo, imazalil, procloraz e tiabendazol) (CHEN et al., 2019). No entanto, as crescentes exigências dos consumidores por produtos mais naturais impulsionaram 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, como nanocápsulas (BIDUSKI et al., 2019), visando 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).

Aliar tecnologias que não utilizam altas temperaturas com o uso de polímeros biodegradáveis como carreadores é uma alternativa promissora para encapsulação de óleos essenciais. Neste sentido, o *electrospraying* é uma técnica viável para a fabricação de nanopartículas poliméricas estáveis, contendo óleos essenciais (ATAEI et al., 2020) como por exemplo, para encapsular OE de alecrim em amido-OSA (BIDUSKI et al., 2019), OE de orégano em quitosana (YILMAZ et al., 2019).

O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antifúngica de óleo essencial de tomilho branco (OETB) puro e encapsulado em amido-OSA por *electrospraying*, frente ao fungo *Penicillium digitatum*.

### 2. METODOLOGIA

Para elaboração da solução polimérica utilizada no processo de eletrofiação uma emulsão (O/W) foi formada com a dissolução de amido-OSA (40%, p/v) em solução aquosa contendo 20% de etanol. Essa solução foi homogeneizada em agitador magnético durante 30 minutos. Após foi adicionado o OETB (4000 ppm, em relação a solução) e esta solução permaneceu em agitação durante 30 min. A solução

polimérica foi carregada em uma seringa de plástico de 3 mL (Ø 0,8) conectada com uma agulha de feira de aço inoxidável apontando horizontalmente em direção a uma placa coletora de aço inoxidável aterrada. Foi utilizado um equipamento de eletrofiação, montado dentro de uma câmara de teste ambiental com condições experimentais de  $22 \pm 5^\circ \text{C}$  de temperatura e  $40 \pm 5\%$  de umidade relativa, 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  $0,6 \text{ mL h}^{-1}$  de taxa de alimentação.

Para avaliação da atividade antifúngica seguiram-se os protocolos de Tao et al. (2014) e Chen et al. (2016), com algumas adaptações. A ação antifúngica do OETB foi avaliada, *in vitro*, por ação dos voláteis, onde o OE foi aplicado em papel filtro (40 x 40 mm) esterilizado, fixado na parte superior das placas (tampa). As concentrações utilizadas foram de 5, 2, 1 e  $0,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ . As cápsulas de amido-OSA carregadas de OETB, coletadas sobre papel alumínio estéril, foram fixadas na parte superior das placas de petri. Para padronização, foram eletrofiados 2 mL de solução e as cápsulas coletadas em 4 discos de alumínio estéril (Ø 5,5 cm).

Todas as placas de Petri foram inoculadas com micélio jovem do fungo *Penicillium digitatum* a partir da margem de uma colônia de fungos que foi cortada com uma broca de cortiça (5 mm). As placas foram seladas com parafilme e encubadas invertidas a  $25^\circ\text{C}$ . Após 72 horas 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 (MGI) foi calculada de acordo com a Equação 1 (CHEN et al., 2016):

$$\text{MGI (\%)} = [(d_c - d_t)/(d_c-5)] \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da atividade antifúngica, frente à fungos do gênero *Penicillium digitatum*, por ação dos voláteis do OETB e das cápsulas de amido-OSA adicionadas de OETB estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Atividade antifúngica por ação dos voláteis de OETB e das cápsulas de amido-OSA adicionadas de OETB frente à fungos do gênero *Penicillium digitatum*

Tratamento	Óleo essencial de tomilho branco ( $\mu\text{L.mL}^{-1}$ )				OETB encapsulado
	5	2	1	0,5	-
Inibição do crescimento (%)	$100,0 \pm 0,0$	$100,0 \pm 0,0$	$79,0 \pm 5,9$	$54,3 \pm 7,6$	$48,0 \pm 12,1$

Quando verificado a ação dos voláteis, OETB apresentou total inibição do crescimento fúngico nas concentrações de 2 e  $5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ . As menores concentrações testadas (1 e  $0,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ ) também foram capazes. A redução da concentração de OETB testada apresentou redução também do potencial de inibição do crescimento micelial, apesar de em menor percentual. A concentração dos compostos que se volatilizaram efetivamente interferiu diretamente no percentual de inibição do crescimento micelial dos fungos. SUMALAN et al. (2020) ao avaliar vapor de óleo

essencial de lavanda, manjeriço e hortelã perceberam que a inibição do crescimento micelial de *P. digitatum* aconteceu de forma dose-dependente, isto é, ao aumentar a dose, também foi aumentado o percentual de inibição do crescimento fúngico. De forma geral, o modo de ação dos compostos voláteis de óleos essenciais consiste em romper as células hifais ou a membrana de esporos de fungos, inibir a esporulação e finalmente afetar o crescimento de fungos que deterioram os alimentos (SUMALAN et al., 2020).

As cápsulas de amido-OSA carregadas de OETB apresentaram percentual de inibição do crescimento micelial fúngico inferior a 50% na avaliação *in vitro*. Apesar de apresentar um percentual de inibição do crescimento micelial, este valor não poderia ser considerado satisfatório para considerar um efetivo controle fúngico. Este fato pode estar relacionado a quantidade de óleo essencial carregado nas cápsulas de amido-OSA e/ou a sua volatilização.

#### 4. CONCLUSÕES

O óleo essencial de tomilho branco foi capaz de inibir totalmente o crescimento micelial do fungo *Penicillium digitatum*, nas maiores concentrações testadas, por ação dos compostos voláteis. Além disso, apresentou redução parcial do crescimento micelial nas menores concentrações testadas. As cápsulas de amido-OSA carregadas com OETB também apresentaram redução no crescimento micelial, apesar de não ser em sua totalidade. A fim de atingir inibição do crescimento micelial total seria importante avaliar cápsulas com adição de maiores concentrações de OETB.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATAEI, S.; AZARI, P.; HASSAN, A.; PINGGUAN-MURPHY, B.; YAHYA, R.; MUHAMAD, F. Essential Oils-Loaded Electrospun Biopolymers: A Future Perspective for Active Food Packaging. **Advances in Polymer Technology**, p. 1–21, 2020. doi:10.1155/2020/9040535

BIDUSKI, B; KRINGEL, D. H; COLUSSI, R; HACKBART, H. C. DOS S; LIM, L.-T; DIAS, A. R. G; & ZAVAREZE, E. DA R. Electrospayed octenyl succinic anhydride starch capsules for rosemary essential oil encapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 300–307, 2019. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.03.203

CHEN, A. Y.; ZHENG, J. P.; WAN, C. P.; CHEN, M.; CHEN, J. Y. Effect of carboxymethyl cellulose coating enriched with clove oil on postharvest quality of 'Xinyu' mandarin oranges. **Fruits**, v. 71(5), p. 319-327, 2016. doi: 10.1051/fruits/2016019

CHEN, C.; CAI, N.; CHEN, C.; WAN, C. 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, 2019. doi:10.3390/biom9050197

JI, H.; KIM, H.; BEUCHAT, L. R.; RYU, J. H. 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, 2019. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.023

SIMAS, D. L.R.; AMORIM, S. H.B. M.; GOULART, F. R.V.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S.; SILVA, A. J. R. Citrus species essential oils and their components can inhibit or stimulate fungal growth in fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 98, p. 108–115, 2017. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.01.026

SUMALAN, R. M.; KUGANOV, R.; OBISTIOIU, D.; POPESCU, I.; RADULOV, I.; ALEXA, E.; NEGREA, M.; SALIMZODA, A. F.; SUMALAN, R. L.; COCAN, I. Assessment of Mint, Basil, and Lavender Essential Oil Vapor-Phase in Antifungal Protection and Lemon Fruit Quality. **Molecules**, v. 25, n 8, p. 1831, 2020. doi:10.3390/molecules25081831

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, 2014. doi:10.1016/j.foodchem.2013.12.070

YILMAZ, M. T; YILMAZ, A; AKMAN, P. K; BOZKURT, F; DERTLI, E; BASAHEL, A; AL-SASI, B; TAYLAN, O; SAGDIC, O. *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, 2019. doi: 10.1016/j.ifset.2018.12.005