

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA

LAVÍNIA CIPRIANO

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE NANOEMULSÕES DE ÓLEO ESSENCIAL
DE CRAVO-DA-ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*)**

SÃO CARLOS -SP

2022

LAVÍNIA CIPRIANO

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE NANOEMULSÕES DE ÓLEO ESSENCIAL
DE CRAVO-DA-ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*)

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Departamento de
Ciências Biológicas e Saúde da
Universidade Federal de São
Carlos, para obtenção do título de
bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Cristina
Paiva de Sousa

São Carlos-SP

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e Saúde

Folha de aprovação

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Trabalho de conclusão de curso da candidata Lavínia Cipriano, realizada em 22/03/2022:

Prof. Dra. Cristina Paiva de Sousa Marcos David Ferreira

Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. Marcos David Ferreira Universidade Federal de São Carlos

Embrapa Instrumentação

Prof. Dr. Leonardo Maurici Borges

Universidade Federal de São Carlos

Dr. Josemar Gonçalves de Oliveira Filho

Embrapa Instrumentação

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu agradeço a vida. Viver e crescer em um mundo tão lindo, com tantas formas de vida tão incríveis foi o que me fez querer estudar biologia há 5 anos atrás, e o que hoje ainda desperta minha curiosidade e me inspira diariamente a seguir no caminho da ciência.

A meus pais, Flávia e Marcelo, por desde pequena terem me ensinado o valor e a importância do estudo e da dedicação. Por terem me apoiado todos esses anos apesar de todos os obstáculos. Por terem me preparado para voar e viver meus sonhos.

A família que eu encontrei na Biologia. Minha astronave: Gi, Camila, Dudu, Gabi e Bru. Eles definitivamente fizeram desta jornada a mais divertida e incrível da minha vida até agora, e tudo foi mais leve com vocês ao meu lado, para dividir as conquistas e as dificuldades.

À minha gata, Lua, que, fazendo jus ao seu nome, foi quem iluminou meu céu em diversos momentos. Minha maior companheira.

À professora Cristina por lá em 2018 ter confiado no meu potencial e me dado uma oportunidade que me abriu portas e me permitiu aprender muita coisa. A todos os colegas do LAMIB que também colaboraram muito para meu crescimento durante a graduação, meu muito obrigada.

Ao professor Marcos David por ter me dado a oportunidade de estagiar na Embrapa, onde aprendi muito durante dois anos. Ao Josemar por ter me recebido e acolhido desde o primeiro dia. Aprendi demais e ganhei um grande amigo que admiro muito.

Agradeço a UFSCar e às universidades públicas, por possibilitarem o acesso à educação de qualidade, e, apesar de todas as barreiras, fazer ciência com excelência.

Por fim, agradeço todos que passaram pelo meu caminho e me possibilitaram chegar até aqui. Meus amigos de infância, colegas de turma e professores, todos tiveram um papel essencial nessa jornada da vida e da graduação.

EPÍGRAFE

"Durante toda a minha vida, as novas descobertas sobre a natureza me alegraram como uma criança."

Marie Curie

RESUMO

Os óleos essenciais são extratos derivados de plantas, definidos como compostos metabólitos secundários, sendo um importante mecanismo de defesa das plantas. A atividade antimicrobiana dos óleos se dá principalmente devido a sua natureza hidrofóbica, e acredita-se que essa atividade contra bactérias e fungos tem relação direta com os compostos majoritários presentes no óleo essencial. O cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) é uma planta nativa da Indonésia, com um extenso registro na literatura da atividade do óleo essencial de cravo contra bactérias e fungos. Os fungos fitopatogênicos que atacam culturas após a colheita são responsáveis pela perda de toneladas de culturas no mundo todo. Em regiões tropicais, os fungos *Penicillium* spp. e *Rhizopus stolonifer* têm alta incidência, e causam doenças conhecidas como “Podridão verde” e “Podridão preta”, respectivamente. O uso e a aplicação dos óleos essenciais em sua forma pura apresenta algumas limitações, como sua volatilidade, alta reatividade e hidrofobicidade, dificultando sua incorporação direta em alimentos. Visando manter suas propriedades biológicas e diminuir o impacto de sua aplicação nos alimentos, os óleos foram incorporados a emulsões e nanoemulsões para posteriormente serem encapsulados. **Materiais e métodos:** Foi feita a produção e caracterização de nanoemulsões com OE de Cravo, após a determinação do Balanço Hidrofílico-lipofílico (BHL), a partir da mistura entre fase aquosa e orgânica, constituída pelo OE e um mix de surfactante composto por Tween 80 e Span 80. Após a caracterização, foi feita a comparação entre a atividade antifúngica do óleo essencial puro, emulsão e nanoemulsão contra os fungos pós colheita *Penicillium* spp. e *Rhizopus stolonifer*. **Resultados:** Após a determinação do BHL, foi produzida uma nanoemulsão com tamanho de partícula de 50 d.nm. A partir dos testes de atividade antifúngica, conclui-se que a nanoemulsão não aumentou a atividade de óleo essencial contra os fungos testados, sendo o óleo em sua forma pura mais eficiente do que a emulsão e nanoemulsão.

Palavras-chave: Nanoemulsão. Atividade antifúngica. Óleos essenciais

ABSTRACT

Essential oils are extracts derived from plants, defined as secondary metabolites compounds, being an important defense mechanism of plants. The antimicrobial activity of the oils is mainly due to their hydrophobic nature, and it is believed that this activity against bacteria and fungi is directly related to the major compounds present in the essential oil. Clove (*Syzygium aromaticum*) is a plant native to Indonesia, with an extensive literature record of the activity of clove essential oil against bacteria and fungi. Phytopathogenic fungi that attack crops after harvest are responsible for the loss of tons of crops worldwide. In tropical regions, *Penicillium* spp. and *Rhizopus stolonifer* have a high incidence, and cause diseases known as "Green Rot" and "Black Rot", respectively. The use and application of essential oils in their pure form has some limitations, such as their volatility, high reactivity and hydrophobicity, making their direct incorporation into foods difficult. In order to maintain their biological properties and reduce the impact of their application on food, the oils were incorporated into emulsions and nanoemulsions to later be encapsulated. **Materials and methods:** The production and characterization of nanoemulsions with Clove EO was carried out, after the determination of the Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB), from the mixture between aqueous and organic phase, consisting of the EO and a mix of surfactant composed by Tween 80 and Span 80. After characterization, a comparison was made between the antifungal activity of the pure essential oil, emulsion and nanoemulsion against postharvest fungi *Penicillium* spp. and *Rhizopus stolonifer*. **Results:** After the determination of the BHL, a nanoemulsion with a particle size of 50 d.nm was produced. From the antifungal activity tests, it is concluded that the nanoemulsion did not increase the essential oil activity against the tested fungi, being the oil in its pure form more efficient than the emulsion and nanoemulsion.

Key-words: Nanoemulsion. Antifungal activity. Essencial oils

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ÓLEOS ESSENCIAIS (OEs)	1
1.2 ÓLEO DE CRAVO.....	2
1.3 FUNGOS PÓS COLHEITA.....	3
1.4 NANOEMULSÕES.....	4
1.5 APLICAÇÕES.....	5
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	5
2.1. OEs.....	5
2.2. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES.....	6
2.2.1. BHL.....	6
2.2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES.....	6
2.3. SUSPENSÃO FÚNGICA DE ESPOROS.....	7
2.4. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	7
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	8
3.1. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES.....	8
3.1.1 BHL E CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES.....	8
3.2 TESTES ANTIFÚNGICOS.....	10
3.2.1 OE DE CRAVO.....	10
3.2.2 EMULSÃO E NANOEMULSÃO DE OE.....	12
4. CONCLUSÃO.....	15
5. REFERÊNCIAS.....	15

1. INTRODUÇÃO

O uso desenfreado de fungicidas químicos trouxe muitos problemas ao longo do tempo. Além de favorecer o surgimento de cepas resistentes, tem impactos ambientais negativos, e grande potencial de causar doenças em humanos devido ao consumo de seus resíduos. Desta forma, é necessário buscar novos métodos de controle de infecções fúngicas, que sejam efetivos e seguros, para diminuir as perdas pós colheita e manter a qualidade das frutas e hortaliças. Neste contexto, extratos de plantas e produtos de origem natural, como os OEs, têm ganhado destaque por apresentarem metabólitos ativos contra agentes patogênicos (MATROSE et al., 2020).

Devido ao seu forte odor e sabor, além da volatilidade, a aplicação dos óleos se torna um desafio. É necessário que a distribuição pela superfície do alimento seja homogênea, que o óleo não cause reações que levam a sua degradação e que não altere sensorialmente o produto. Desta forma, algumas das opções de aplicação existentes atualmente são: (1) misturar diretamente em produtos líquidos, (2) revestir a superfície do alimento com soluções aquosas ou emulsões contendo os óleos ou (3) encapsular os óleos em matrizes porosas para que sua liberação seja controlada (DONSI; FERRARI, 2016).

1.1 ÓLEOS ESSENCIAIS (OEs)

Os óleos essenciais (OEs) são compostos derivados do metabolismo secundário de plantas, e há muito tempo são utilizados na medicina popular, por apresentar atividade antioxidante, antiinflamatória, antialérgica, anticâncer, inseticida e, principalmente, antimicrobiana, e têm sido intensamente explorados na indústria alimentícia, atuando como barreira ou inibidor da proliferação de patógenos alimentares, conservantes naturais dos alimentos, além de terem menor impacto ambiental (RANA; RANA; RAJAK, 2011). Já na indústria farmacêutica, seu uso está em alta pois em muitos casos eles atuam de forma mais eficiente do que compostos sintetizados quimicamente, agindo contra um amplo espectro de micro-organismos, e apresentam menos efeitos colaterais em comparação a compostos sintéticos (RANA; RANA; RAJAK, 2011). Isso provavelmente ocorre devido a uma ação

sinérgica entre os componentes que são capazes de interagir com várias moléculas (SEOW; YEO, 2017).

Os OEs são importantes mecanismos de defesa das plantas, e geralmente são obtidos por destilação a partir de várias partes da planta, como flores, sementes, folhas, galhos, casca, fruto e raízes, sendo caracterizados por serem misturas naturais voláteis. São produzidos pelas plantas em condições adversas, apresentando aroma forte e alta volatilidade. (SEOW; YEO, 2017; OLIVEIRA, *et al.*, 2021).

A atividade antimicrobiana dos óleos se dá principalmente devido a sua natureza hidrofóbica, que permite sua passagem através da membrana celular dos microrganismos, tornando-as mais permeáveis, o que leva à morte celular devido a perda de íons e materiais celulares. Acredita-se que essa atividade contra bactérias e fungos tem relação direta com os compostos majoritários presentes no óleo essencial, sendo os compostos fenólicos (timol, carvacrol e eugenol, por exemplo) os mais ativos, principalmente contra bactérias gram positivas (BHAVANIRAMYA; VISHNUPRIYA; AL-ABOODY, 2019; DONSI; FERRARI, 2016).

Também é notável a atividade antifúngica dos OEs, com registros de atividade contra grande variedade de patógenos de flora dos óleos de manjeriço, frutas cítricas, erva-doce, capim-limão, orégano, alecrim e tomilho (TARIQ *et al.*, 2019). Fu *et al.*, (2007) avaliou a atividade antifúngica do óleo de cravo e alecrim contra *Candida albicans* e *Aspergillus niger*, tendo como resultado inibição do crescimento micelial em baixas concentrações de óleo. Arora & Kaur, (1999) testaram extrato de cravo da Índia contra *Candida acutus*, *Candida albicans*, *Candida apicola*, *Candida catenulata*, *Candida inconspicua*, *Candida tropicalis*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Trigonopsis variabilis*, e todos foram sensíveis aos extratos. Acredita-se que a atividade antifúngica dos óleos é devido ao comprometimento da parede celular do alvo, ao estabelecer um potencial de membrana, e também pela inativação de enzimas essenciais para o metabolismo fúngico (TARIQ *et al.*, 2019).

1.2 ÓLEO DE CRAVO

O cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) é uma planta nativa da Indonésia, pertencente à família Myrtaceae, e tem esse nome devido a flor aromática que a árvore produz, amplamente utilizada na culinária. É usada também na medicina

popular no tratamento de problemas gastrointestinais, devido a suas propriedades antioxidantes. É uma das principais fontes de compostos fenólicos entre as fontes vegetais, sendo que o composto majoritário do óleo essencial de cravo é o eugenol, seguido de acetato de eugenol e cariofileno (MBAVENG; KUETE, 2017). O eugenol atua ao inibir a síntese do ergosterol na membrana celular das células fúngicas, comprometendo sua integridade e causando morte celular (SINGH et al., 2020).

Na literatura, há um extenso registro da atividade do óleo essencial de cravo contra bactérias, sendo algumas delas: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* ATCC19117 e *Candida albicans*. Já em testes antifúngicos, o óleo essencial de cravo apresentou atividade contra os seguintes fungos: espécies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Scopulariopsis*, além de outros fungos que atacam plantas e animais, como *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus* sp., *Mucor* sp., *Trichophyton rubrum* e *Microsporum gypseum*. Foi registrada também atividade anti câncer, anti diabetes, antiinflamatória, antiviral, antiparasitária e antioxidante (MBAVENG; KUETE, 2017).

Em estudo feito por Xie et al., (2015), foi testado tanto óleo essencial de cravo quanto seu principal componente, o eugenol, contra três fungos: *Trametes hirsuta*, *Schizophyllum commune* e *Pycnoporus sanguineus*. Os resultados obtidos demonstraram que tanto o óleo puro quanto o eugenol são ativos contra os fungos testados. Aguilar-González; Palou & López-Malo, (2015) testaram o óleo de cravo em fase de vapor contra o fungo pós colheita *Botrytis cinerea*, atribuindo sua alta atividade antifúngica ao principal componente do óleo, o eugenol. O óleo de cravo também apresentou atividade fungicida contra *Fusarium proliferatum* sp., de acordo com ensaios feitos por SINGH et al., (2020), tendo como concentração mínima inibitória (MIC) de 9 µL.

1.3 FUNGOS PÓS COLHEITA

Os fungos fitopatogênicos que atacam culturas após a colheita são responsáveis pela perda de toneladas de culturas no mundo todo, causando doenças durante o armazenamento de frutos, vegetais e hortaliças quando há condições favoráveis para se desenvolverem. Em regiões tropicais, os fungos *Penicillium* spp. e *Rhizopus stolonifer* têm alta incidência, e causam doenças

conhecidas como “Podridão verde” e “Podridão preta”, respectivamente (BEZERRA et al., 2016).

Penicillium spp. infecta a hortaliça ou a fruta a partir de ferimentos feitos por insetos, galhos ou manuseio durante a colheita e armazenamento, levando ao seu rápido apodrecimento. Ele sobrevive no solo e também no interior de sementes e grãos, e é dispersado a partir da reprodução assexuada que leva a liberação de grandes quantidades de esporos. Se o alimento infectado for consumido por humanos e animais, pode causar intoxicação, devido a produção de micotoxinas, como a patulina (PAPOUTSIS et al., 2019). É um dos fungos que mais causa doenças em frutas cítricas, levando a perdas significativas no pós colheita. O controle é feito com aplicação de fungicidas químicos, antes e após a colheita. Devido ao extenso uso destes produtos, cepas de fungos resistentes começaram a surgir, demandando o surgimento de novos métodos eficientes de controle, como biocontrole, extratos de plantas e OEs (PAPOUTSIS et al., 2019).

Rhizopus stolonifer é um fungo pós colheita, que causa uma doença chamada de “soft rot”, “black mold” e “Rhizopus rot”. Seus esporos se espalham pelo ar, o que facilita a contaminação das culturas. Infecta tanto hortaliças quanto frutas, sendo responsável pela perda de grandes quantidades de alimentos ao redor do mundo durante o armazenamento. Feridas e lesões são a porta de entrada para a infecção, levando cerca de 3-6 dias para o início dos sintomas nos frutos e vegetais infectados. Após o surgimento de pequenas colônias do fungo na superfície onde ocorreu a infecção, enzimas são responsáveis pela degradação do tecido da fruta ou vegetal (BAUTISTA-BAÑOS; BOSQUEZ-MOLINA; BARRERA-NECHA, 2014).

A podridão causada pelo *Rhizopus* raramente ocorre em campo, sendo a mais comum das doenças pós-colheita, sendo encontrado no solo e em matéria orgânica presente no ambiente. Altas temperaturas e umidade favorecem a ocorrência do fungo, já que facilitam sua reprodução, e a alta quantidade de esporos produzidos pode contaminar uma grande quantidade de frutos e hortaliças. A principal forma de impedir a contaminação é evitar lesões nos frutos, já que essa é a porta de entrada do fungo, levando a lesões aquosas e colapso do tecido (OLIVEIRA & FILHO, 2007). Atualmente, o controle é feito com fungicidas químicos e

desinfetantes, sendo que o controle biológico com bactérias é uma alternativa ainda em teste (BAUTISTA-BAÑOS; BOSQUEZ-MOLINA; BARRERA-NECHA, 2014).

1. NANOEMULSÕES

A emulsão consiste basicamente em uma suspensão contendo água, um emulsificante para facilitar a dispersão e o óleo essencial em gotículas. Em nanoemulsões, ao reduzir o tamanho das partículas, os grupos hidrofílicos ficam mais expostos e têm maior facilidade de interagir com a membrana celular. Essa atividade é ainda mais acentuada, interagindo com múltiplos sítios na membrana celular ao mesmo tempo (DONSÌ; FERRARI, 2016).

O uso e a aplicação dos OEs em sua forma pura apresentam algumas limitações, como sua volatilidade, alta reatividade e hidrofobicidade, dificultando sua incorporação direta em alimentos. Visando manter suas propriedades biológicas e diminuir o impacto de sua aplicação nos alimentos, os óleos foram incorporados a emulsões para posteriormente serem encapsulados. Essas cápsulas são compostas ingredientes compatíveis com os alimentos, para que não sejam alterados sensorialmente e a atividade dos óleos encapsulados seja mantida. As emulsões podem atingir a escala nano (nanoemulsões), ao reduzir o tamanho das gotículas de óleo presente, tornando-as mais bioativas e reduzindo o impacto no alimento (DONSÌ; FERRARI, 2016).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. OEs

O óleo essencial de Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) foi adquirido em sua forma comercial, da empresa LAZLO Aromaterapia (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). O óleo foi extraído a partir de hidrodestilação conforme informado no rótulo do produto. Os fungos usados (*Penicillium expansum* CMIIAA PEN 001 e *Rhizopus Stolonifer* CCT 0276) e o antifúngico Itraconazol usado como controle pertenciam ao estoque de compostos da Embrapa Instrumentação.

2.2. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES

2.2.1 BHL

Para produzir as nanoemulsões, foi determinado o balanço hidrofílico-lipofílico (BHL) do óleo essencial de cravo da Índia, que indica a interação entre as partes hidrofóbicas e hidrofílicas da molécula. A metodologia adotada foi adaptada de PRAKASH et al., (2018): foram testadas diferentes concentrações dos surfactantes Tween 80 e Span 80 conforme a tabela 1. Essa mistura de surfactantes (Smix) foi utilizada na concentração de 10% da solução, homogeneizada com o óleo essencial (1%) em vórtex por 2 min., constituindo a fase orgânica. Posteriormente, esta foi adicionada a água destilada e homogeneizada em um Homogeneizador T50 Digital Ultra Turrax a 7000 rpm por 2 min., formando assim a emulsão/nanoemulsão. A homogeneização foi feita em banho de gelo para evitar aquecimento da amostra e possível perda de propriedades do OE.

Tabela 1. Concentrações de Span 80 e Tween 80 no Smix para cada valor de BHL

BHL (8 - 15)	Span 80 (4,3) (%)	Tween 80 (15) (%)
8	65,4	34,6
9	57	43
10	46,7	53,3
11	37,4	62,2
12	28	72
13	18,7	81,3
14	9,3	90,7
15	0	100

2.2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES

Após a produção da nanoemulsão de acordo com a metodologia descrita no item 2.3.1, estas foram caracterizadas quanto ao seu tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta no Malvern Zetasizer Nano ZS. A nanoemulsão foi

diluída em uma concentração de 1:20 em água MilliQ e homogeneizada em ultrassom por 30s na amplitude 10% para ser caracterizada. A caracterização foi feita com 0 e 24h visando identificar a estabilidade da emulsão, indicada pela constância no tamanho de partícula.

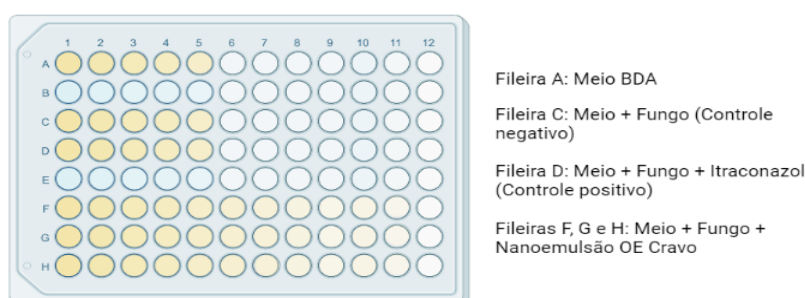
2.3. SUSPENSÃO FÚNGICA DE ESPOROS

A suspensão fúngica utilizada nos testes preliminares do potencial de inibição do óleo essencial de cravo pertence ao estoque de microrganismos da Embrapa Instrumentação, e se encontrava armazenada no freezer -80°C em solução de NaCl (0,9%) + glicerol (20%) na concentração de 1.10^6 esporos/mL.

2.4. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

O teste de concentração inibitória mínima foi feito em microplacas de 96 poços, nas quais foi feita uma diluição seriada (1:1) do óleo de cravo no meio de cultura BDA, sendo que no primeiro poço foi adicionado $190\ \mu\text{l}$ de meio e $10\ \mu\text{l}$ de óleo, totalizando $200\ \mu\text{l}$. Após homogeneização, $100\ \mu\text{l}$ do primeiro poço foi passado para o segundo, homogeneizado com o meio e novamente transferido para o terceiro poço, repetindo esse processo até um décimo segundo poço. O antifúngico Itraconazol 5mg/ml foi usado como composto controle. Após a solidificação do meio, foi inoculado $10\ \mu\text{l}$ da suspensão fúngica do estoque da Embrapa Instrumentação em cada poço e a placa foi incubada a 37°C por 7 dias e foi observado o crescimento dos fungos e a atividade antifúngica do OE de cravo da Índia. A disposição dos compostos na placa foi feita de acordo com a Figura 1.

Figura 1 - Disposição do experimento na placa de 96 poços



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES

3.1.1 BHL E CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES

Os valores de BHL variam de 0-20, sendo determinados pela diferente proporção dos dois surfactantes utilizados, sendo que o Span 80 apresenta BHL = 4.3 e Tween 80 BHL = 15. Quanto maior o BHL, maior sua hidrofobicidade, assim como valores mais próximos de 0 indicam baixa hidrofobicidade (WU et al., 2021) Os efeitos da diferente concentração dos surfactantes no tamanho de gotas são apresentados na Tabela 2. A formulação com valor de BHL 14 apresentou menor tamanho de partícula (50 nm), sendo o único abaixo de 100 nm e que apresentou maior estabilidade. A estabilidade da emulsão está inversamente ligada à tensão superficial entre a fase oleosa e a água, o que indica que a tensão superficial das gotículas de óleo da emulsão produzida é baixa, por isso sua estabilidade no tamanho de partícula (PRAKASH et al., 2018).

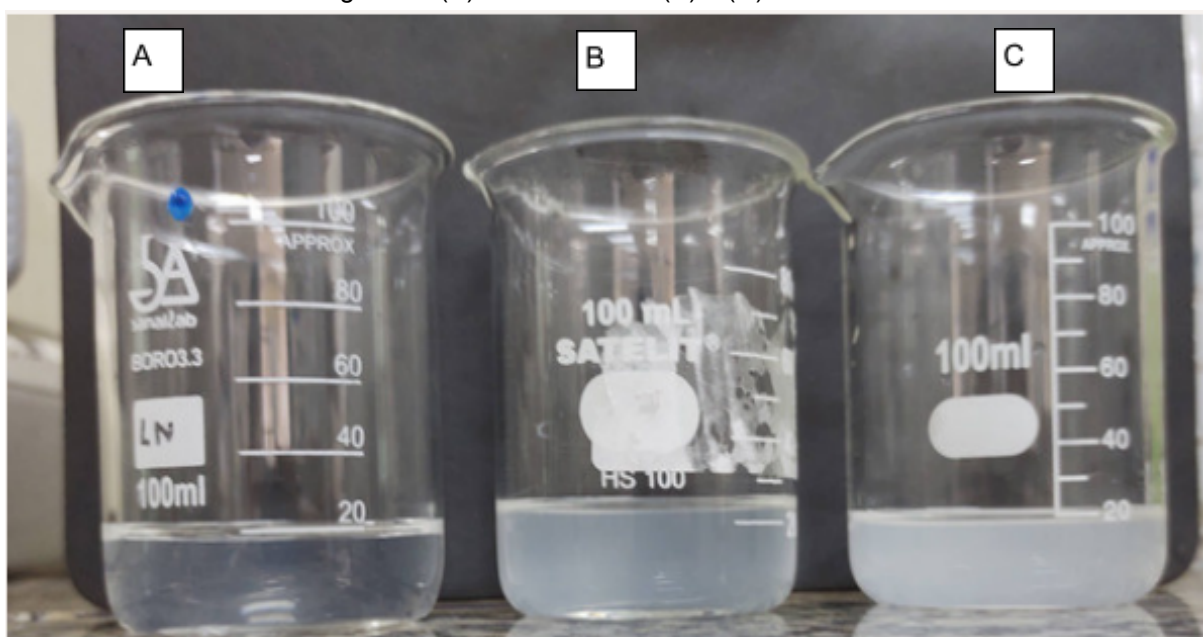
Tabela 2 - Tamanho de partícula do OE de Cravo para diferentes valores de BHL

BHL	Tamanho de partícula (d.nm)
8	183
9	146
10	108
11	111
12	222
13	145
14	50
15	157

Após 24h, o tamanho de partículas das emulsões reduziu, indicando que ocorreu a formação de micélios, com aglomerados de moléculas individuais do surfactante. Eles se mantêm em equilíbrio dinâmico, onde ocorre a constante formação e desintegração dos micélios, até atingir um equilíbrio cinético

(ALEJANDRO; GUZMÁN, 2021). A metodologia adotada para homogeneização da emulsão tem papel importante na determinação do tamanho das gotas de OE, sendo que a partir dos resultados obtidos, uma rotação em menor velocidade no Turrax por mais tempo é mais eficiente se o objetivo for a redução do tamanho de partícula. A adição do ultrassom não alterou significativamente a homogeneização da emulsão, por isso, não foi utilizado para a produção de nanoemulsões para testes antifúngicos (PRAKASH et al., 2018)

Figura 2 - (A) Nanoemulsão. (B) e (C) Emulsões.



Fonte: Acervo pessoal

A transparência da emulsão também é um bom indicador do tamanho de partícula das gotículas de OE presentes, sendo que quanto maior a concentração de surfactantes, mais transparente a emulsão e menor o tamanho das gotículas. Isso ocorre porque a alta concentração de surfactantes diminui a tensão entre a interface OE-água, fazendo com que as gotículas formadas tenham tamanho menor (NATANIA; SETIAWAN, 2020).

Não foi encontrado registro na literatura que indicasse um estudo prévio sobre o BHL do OE de cravo da Índia. A Smix encontrada para o valor de BHL 14 foi utilizada para produzir as nanoemulsões dos experimentos de atividade antifúngica.

3.2 TESTES ANTIFÚNGICOS

3.2.1 OE DE CRAVO

A concentração inibitória mínima (CIM) foi de 0,039 μ L, para *Rhizopus stolonifer* e 0,0097 μ L para *Penicillium* sp., mostrando a alta atividade antifúngica do óleo essencial de cravo, sendo até mais ativo que o antifúngico comercial usado como controle (Itraconazol). A imagem 1 mostra a placa do teste, sendo que a fileira A é o controle, mostrando que não houve contaminações durante o experimento. A fileira C mostra o controle negativo, onde há apenas meio de cultura e suspensão fúngica, enquanto a fileira D é o controle positivo com o antifúngico. As fileiras F, G e H mostram a atividade do óleo em triplicata.

Tabela 3. Concentrações inibitórias mínimas (MIC) para os fungos *Rhizopus stolonifer* e *Penicillium* sp. em testes com OE puro, emulsão e nanoemulsão.

Fungo	MIC		
	OE puro	Emulsão	Nanoemulsão
<i>Rhizopus stolonifer</i>	0,0039 μ L	0,0625 μ L	0,0625 μ L
<i>Penicillium</i> sp.	0,00097 μ L	0,0625 μ L	0,03125 μ L

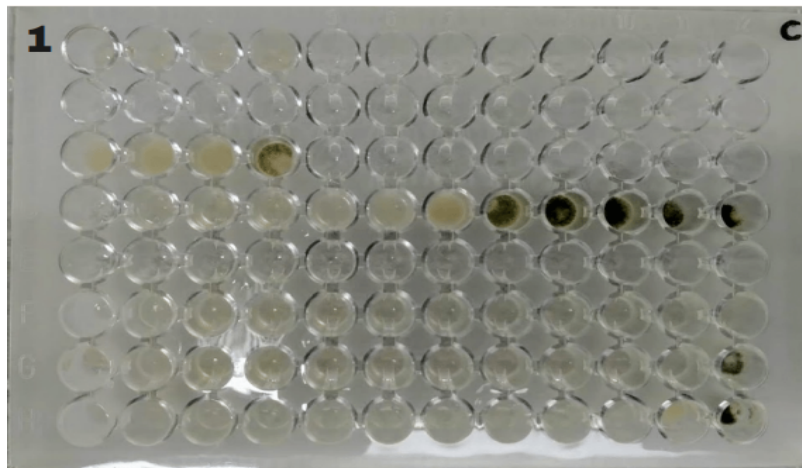
A atividade antifúngica dos óleos se dá devido a sua natureza lipofílica, que facilita sua penetração através dos limites celulares do patógenos, levando a uma cadeia de reações que geram efeitos tóxicos. Os compostos ativos presentes nos OE interferem diretamente na toxicidade, e sua interação permite uma ação sinérgica com atividade contra um amplo espectro de patógenos (MOSSA et al., 2021).

O principal composto ativo do OE de cravo é o eugenol, que atua inibindo a síntese de ergosterol na membrana celular fúngica. Além da composição do OE, outros fatores como alta volatilidade e baixa solubilidade em solução aquosa são determinantes na atividade antifúngica. Desta forma, a produção de emulsões contendo OEs se torna um desafio e uma alternativa como sistema eficiente para dispersão e acentuação dos efeitos antimicrobianos dos óleos (SINGH et al., 2020).

A atividade antifúngica do OE de cravo já era esperada, já que na literatura há diversos registros de sua eficiência em inibir o crescimento de diversos fungos. Em

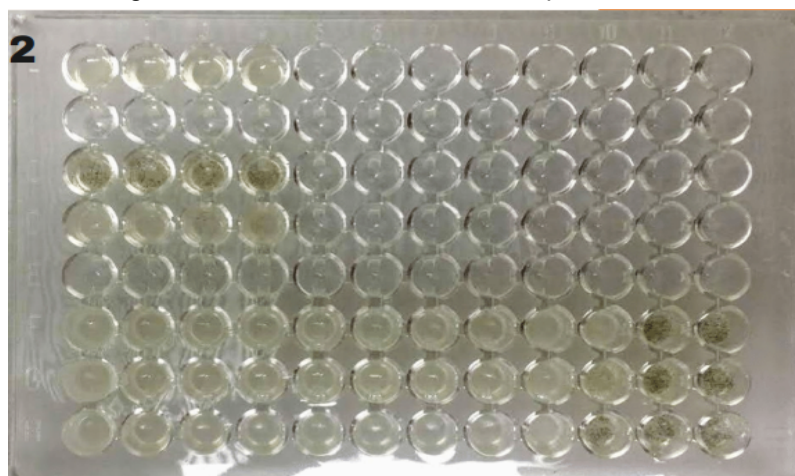
seus estudos, Xie, et al., (2021) descobriu que 1000 μL do óleo essencial de cravo tinha efeito de inibição contínua do crescimento de *Rhizopus stolonifer*, durando até 8 dias após o início do experimento. Resultados semelhantes foram obtidos por Natania & Setiawan (2020), que encontrou o valor de 0,13 para MIC do OE de cravo contra *Rhizopus stolonifer*. O óleo também apresentou excelente atividade contra outros microorganismos testados, e suas propriedades antifúngicas foram atribuídas à presença de eugenol em altas concentrações. O mecanismo de ação se dá pela interação do OE com a parede e membrana celular, penetrando no citoplasma e inibindo a síntese de material genético e proteínas essenciais para o crescimento do microrganismo (NATANIA & SETIAWAN, 2020). Contra *Penicillium* sp., Galoviř et al., (2021) obteve resultados semelhantes, testando o OE de cravo pelo método de difusão em disco, inibindo em 100% o crescimento do fungo *P. expansum* com a MIC de 64,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Figura 4 - Placa 1: OE Cravo + *Penicillium* sp.



Fonte: Acervo pessoal

Figura 5 - Placa 2: OE Cravo + *Rhizopus stolonifer*



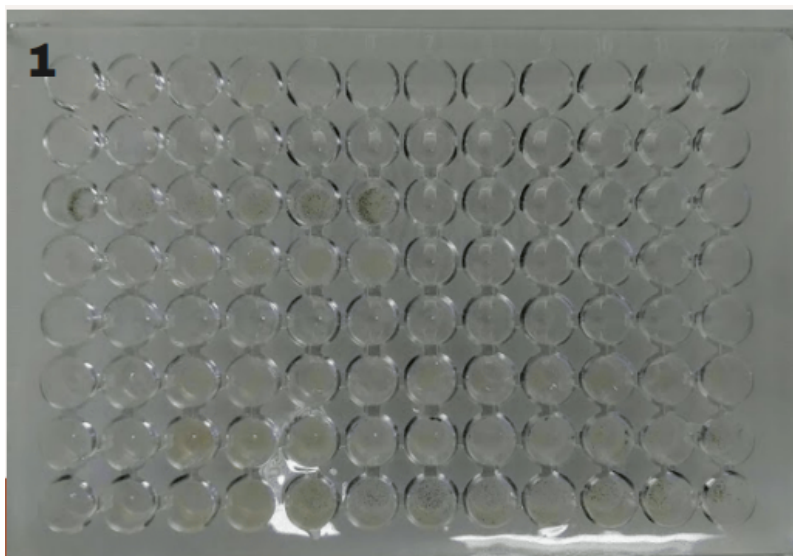
Fonte: Acervo pessoal

3.2.2 EMULSÃO E NANOEMULSÃO DE OE

O uso de emulsões se mostra promissor ao melhorar a dispersão do óleo em solução aquosa, além de facilitar sua penetração e espalhamento pela superfície de aplicação. Quando o objetivo é a aplicação tecnológica, é comum o uso de nanoemulsões ao invés de emulsões, devido ao seu maior nível de estabilidade cinética e estabilidade física contra coalescência, além do menor tamanho de partícula, que interfere diretamente na sua atividade funcional. As nanoemulsões se mostram como um excelente veículo para substâncias hidrofóbicas bioativas como os OEs. (ALEJANDRO; GUZMÁN, 2021).

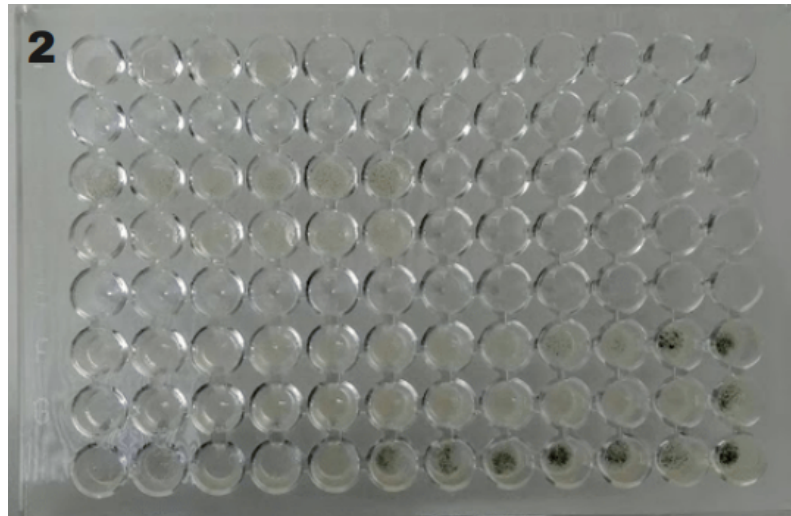
No teste antifúngico contra o fungo *Penicillium* sp. a emulsão com tamanho de partícula maior pareceu inibir o crescimento de forma mais efetiva do que a nanoemulsão (Figuras 6 e 7):

Figura 6 - Placa 1: Emulsão OE Cravo + *Penicillium* sp.



Fonte: Acervo pessoal

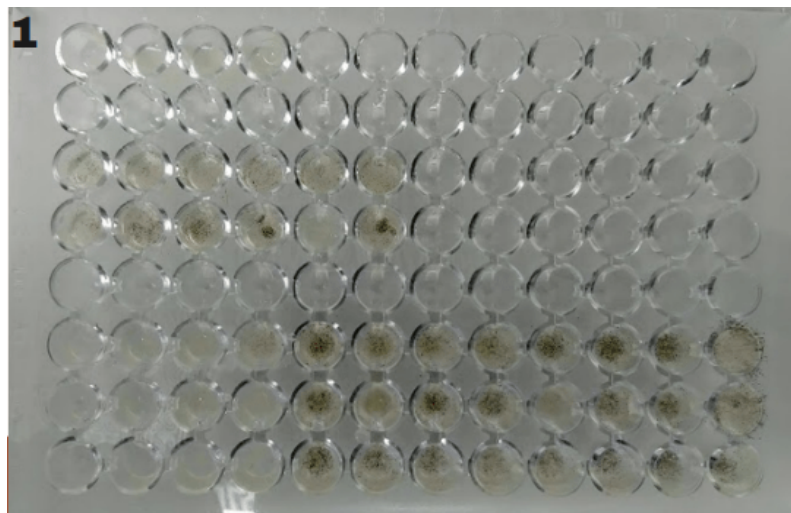
Figura 7 - Placa 2: Nanoemulsão OE Cravo + *Penicillium* sp.



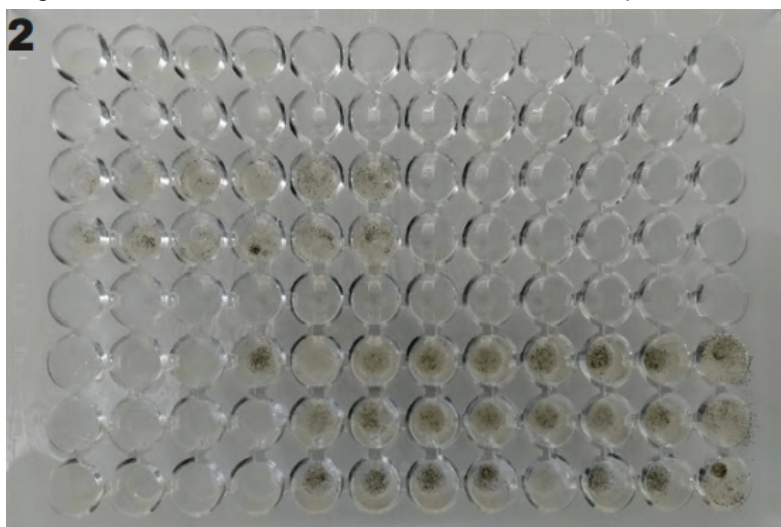
Fonte: Acervo pessoal

Já contra o fungo *Rhizopus stolonifer*, não houve diferença na inibição do crescimento fúngico ao comparar a emulsão com a nanoemulsão, como mostrado nas Figuras 8 e 9. Além disso, o antifúngico usado como controle não foi capaz de inibir o crescimento do *Rhizopus stolonifer*.

Figura 8 - Placa 1: Emulsão OE Cravo + *Rhizopus stolonifer*



Fonte: Acervo pessoal

Figura 9 - Placa 2: Nanoemulsão OE Cravo + *Rhizopus stolonifer*

Fonte: Acervo pessoal

Em seus ensaios, Li et al., (2019) obteve resultados semelhantes, observando que a atividade antifúngica das nanoemulsões de OE de Cidreira é mais fraca do que o óleo puro, assim como em estudos feitos por Ribes et al., (2016), onde nanoemulsões de OE de limão e bergamota também apresentaram menor atividade do que o óleo puro. Nesse caso, acredita-se que devido ao alto coeficiente de partição octanol-água, ou seja, a relação da concentração de determinada substância em um solvente orgânico e em água, do principal componente dos óleos testados, d-limoneno, as forças motrizes limitadas para a liberação do óleo para a fase aquosa reduzem a atividade antimicrobiana resultante (RIBES et al., 2016).

Há ainda algumas hipóteses elencadas por Li et al. (2019) para o resultado obtido, como o uso dos emulsificantes, que pode afetar a atividade antifúngica do OE, o uso dos ingredientes da nanoemulsão como substâncias nutritivas para os fungos, diminuindo o potencial antifúngico e também a complexidade da parede celular dos esporos, que pode torná-la impermeável a nanoemulsão.

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que a diminuição do tamanho de partícula das gotas de óleo em uma emulsão não está necessariamente relacionada à atividade antifúngica do óleo essencial de cravo da Índia, havendo outras variantes que exercem maior influência na bioatividade do OE quando este se encontra em

uma emulsão. Em contrapartida, ao produzir a nanoemulsão contendo o OE, outros desafios para aplicação são solucionados, como estabilidade, controle de liberação e da volatilidade, mostrando assim maior potencial para aplicação na pós colheita.

5. REFERÊNCIAS

AGUILAR-GONZÁLEZ, Ana Elena; PALOU, Enrique; LÓPEZ-MALO, Aurelio. Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 32, p. 181–185, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2015.09.003>.

ALEJANDRO, Lucia; GUZMÁN, Eduardo. Emulsions containing essential oils , their components or volatile semiochemicals as promising tools for insect pest and pathogen management. **Advances in Colloid and Interface Science**, n. November 2020, 2021. DOI: 10.1016/j.cis.2020.102330.

OLIVEIRA, Antonio Alberto Rocha; FILHO, Hermes Peixoto Santos. Podridão de *Rhizopus*. **Mamão em foco**, n. 26, p. 0–1, 2007.

ARORA, Daljit S.; KAUR, Jasleen. Antimicrobial activity of spices. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, n. 3, p. 257–262, 1999. DOI: 10.1016/S0924-8579(99)00074-6.

BAUTISTA-BAÑOS, Silvia; BOSQUEZ-MOLINA, Elsa; BARRERA-NECHA, Laura L. Chapter 1 – *Rhizopus stolonifer* (Soft Rot). **Elsevier**, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00001-6>.

BEZERRA, Dayanne Amorim; NÓBREGA, Thaiza Ferreira; JÚNIOR, Pedro Martins Ribeiro; FREITAS, Sérgio Tonetto; GUIMARÃES, Maria Angélica. Fungos associados às podridões pós-colheita em acerola. **XI Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semiárido**, 2016.

BHAVANIRAMYA, Sundaresan; VISHNUPRIYA, Selvaraju; AL-ABOODY, Mohammad Saleh. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 49–55, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2019.03.001>.

DONSÌ, Francesco; FERRARI, Giovanna. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, v. 233, p. 106–120, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.005>.

OLIVEIRA, Josemar Gonçalves Filho; SILVA, Guilherme da Cruz; AZEREDO, Henriette Monteiro Cordeiro; FERREIRA, Marcos David. Essential Oils as Natural Fungicides to Control *Rhizopus stolonifer* -Induced Spoiled of Strawberries. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 13244–13251, 2021.

FU, Yujie; ZU, Yuangang; CHEN, Liyan; SHI, Xiaoguang; WANG, Zhe; SUN, Su; EFFERTH, Thomas. Antimicrobial Activity of Clove and Rosemary Essential Oils Alone and in Combination, **Phytother. Res.**, v. 994, n. June, p. 989–994, 2007. DOI: 10.1002/ptr.

GALOVÍ, Lucia et al. Chemical Composition , In Vitro and In Situ Antimicrobial and Antibiofilm Activities of *Syzygium aromaticum* (Clove) Essential Oil. **Plants**, 2021, v. 10. Disponível em < <https://doi.org/10.3390/plants10102185> >

LI, Ze-Hua; CAI, Ming; LIU, Yuan-Shuai; SUN, Pei-Long; LUO, Shao-Lei. Antibacterial Activity and Mechanisms of Essential Oil from *Citrus medica L. var. sarcodactylis*. **Molecules**, v. 24, p. 1–10, 2019.

MATROSE, Neliswa A.; OBIKEZE, Kenekukwu; BELAY, Zinash A.; CALEB, Oluwafemi J. Plant extracts and other natural compounds as alternatives for post-harvest management of fruit fungal pathogens: A review. **Food Bioscience**, p. 100840, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100840>.

MBAVENG, A. T.; KUETE, V. *Syzygium aromaticum*. Elsevier Inc., 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6/00029-7>.

MOSSA, A. T. H., MOHAFRASH, S. M., ZIEDAN, E. S. H., ABDELSALAM, I. S., & SAHAB, A. F. (2021). Development of eco-friendly nanoemulsions of some natural oils and evaluating of its efficiency against postharvest fruit rot fungi of cucumber. **Industrial Crops and Products**, 159, 113049.

NATANIA, Kam; SETIAWAN, Fransisca. Characterization of Antimicrobial Edible Films with Single and Double Emulsions from Clove (*Syzygium aromaticum*) Oil. **Reaktor**, v. 20, n. 1, p. 38–46, 2020.

PAPOUTSIS, Konstantinos; MATHIOUDAKIS, Matthaïos M.; HASPERUÉ, Joaquín H.; ZIOGAS, Vasileios. Non-chemical treatments for preventing the postharvest fungal rotting of citrus caused by *Penicillium digitatum* (green mold) and *Penicillium italicum* (Blue mold). **Trends in Food Science & Technology**, v. 86, p. 479–491, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.053>.

PRAKASH, Nirmal; MEREDDY, Ram; LI, Li; SULTANBAWA, Yasmina. Formulation, characterisation and antibacterial activity of lemon myrtle and anise myrtle essential oil in water nanoemulsion. **Food Chemistry**, v. 254, n. September 2017, p. 1–7, 2018. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.01.173.

RANA, INDER SINGH; RANA, AARTI SINGH; RAJAK, Ram Charan. Evaluation Of Antifungal Activity In Essential Oil Of The *Syzygium Aromaticum* (L.) By Extraction, Purification And Analysis Of Its Main Component Eugenol. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1269–1277, 2011.

RIBES, Susana; FUENTES, Ana; TALENS, Pau; MANUEL, Jose; FERRARI, Giovanna; DONSI, Francesco. Influence of emulsifier type on the antifungal activity of cinnamon leaf , lemon and bergamot oil nanoemulsions against *Aspergillus niger*. **Food Control**, p. 1–12, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.044>.

SEOW, Yi-xin; YEO, Chia Rou. Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents **Critical Reviews in Food Science and Nutrition Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents**, n. March, 2017. DOI: 10.1080/10408398.2011.599504.

SINGH, Priyanka et al. Inhibitory effect of clove oil nanoemulsion of Fumosis isolated from maize kernels. **LWT - Food Science and Technology**, p. 110237, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110237>.

TARIQ, Saika; WANI, Saira; RASOOL, Waseem; BHAT, Muzzaffar Ahmad; PRABHAKAR, Anil; SHALLA, Aabid Hussain; RATHER, Manzoor. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. **Microbial Pathogenesis**, [S. l.], p. 103580, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>.

XIE, Yongjian; YANG, Zhilan; CAO, Danyu; RONG, Fei; DING, Hao; ZHANG, Dayu. Antitermitic and antifungal activities of eugenol and its congeners from the flower buds of *Syzygium aromaticum* (clove). **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 780–786, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.044>.

XIE, Yongdong; JIANG, Linhong; LI, Juan; ZHU, Jiawen; CAIHONG, Tu; JI, Liu; QILIANG Guo. Antifungal activity screening for 32 essential oils against *Rhizopus stolonifer*. **IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science**, v. 792, 2021. DOI: 10.1088/1755-1315/792/1/012014.