# INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DE FILMES POLIMÉRICOS INCORPORADOS COM EMULSÃO DE ORÉGANO E TOMILHO SOBRE FUNGOS FILAMENTOSOS E SEU EFEITO SOBRE A PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS EM GRÃOS DE MILHO

**Palavras-Chave: Filmes poliméricos, óleo essencial, fungos filamentosos, milho.**

**Autores(as):**

Isabelle Dias Vieira, FEA - UNICAMP

Aluna de Doutorado Colaboradora: Naara Aparecida Almeida, DCAN-FEA-UNICAMP

Orientadora: Prof(ª). Dr(ª). Liliana de Oliveira Rocha, DCAN-FEA-UNICAMP

## INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays L.*) é a segunda cultura mundial, sendo superada apenas pelo trigo. Consequentemente, desempenha um papel dinâmico nos sistemas agroalimentares globais e na segurança alimentar, sendo amplamente utilizado para a alimentação humana e animal. No Brasil, país com a Terceira maior produção mundial, é o cereal mais expressivo, com cerca de 57 milhões de toneladas. No contexto das mudanças climáticas, existe uma grande preocupação com os choques climáticos, como secas, chuvas e temperaturas extremas, e choques bióticos, como pragas e doenças causadas por fungos patógenos (Erenstein *et al.*, 2022; Embrapa, 2025).

A contaminação fúngica pode acontecer durante o cultivo, ou ainda, no período de armazenamento, o que pode resultar também em contaminação por micotoxinas produzidas por fungos filamentosos. As micotoxinas são substâncias químicas produzidas pelo metabolismo secundário do micro-organismo e apresentam risco à saúde de animais vertebrados que consumirem o alimento contaminado, além de causar impacto na qualidade e capacidade de germinação dos grãos. Dentre os principais fungos contaminantes do milho e produtores de micotoxinas estão *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Rhizopus* spp., sendo aflatoxinas, esterigmatocistina, fumonisina e zearalenona as principais micotoxinas reportadas (Goko *et al.*, 2021).

O aumento de incidência de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* em regiões de clima quente e alta umidade, como a região do Brasil, exige a aplicação de estratégias de controle integrado nas plantações, como mudança genética das plantas, uso de biocontroladores, entre outras (Goko *et al.*, 2021). Além do controle de temperatura e umidade durante o armazenamento, além de aplicações antifúngicas que aumentem a vida útil dos alimentos, como o uso de óleos essenciais (OEs). Os OEs, um extrato de plantas e estruturas vegetais composto por um complexo de componentes como monoterpenos, sesquiterpenos, aldeídos e terpenos, são uma alternativa eco-

amigável em substituição aos fungicidas sintéticos, bem como para a aplicação em embalagens ativas para o armazenamento, devido às suas propriedades antifúngicas (Almeida *et al.*, 2024).

No entanto, devido à volatilidade e suas características de oxidação quando em sua conformação pura, o uso dos óleos essenciais pode ser promissor quando aplicado em filmes, vaporizações, sachês, ou ainda, nanoencapsulação. O uso de filmes incorporados com óleos essenciais para cobrir a superfície do alimento e impedir a troca de umidade e gases do ambiente, mostra-se como uma boa alternativa para o controle de contaminação em etapas pós-colheita. Para a produção dos filmes, um dos polímeros mais utilizadas é a quitosana, obtido a partir de modificação química da quitina, presente na composição de conchas de crustáceos, cujas características demonstram vantagens para a formação de um filme, além de ser atóxico e biocompatível. Contudo, devido à baixa solubilidade em água dos óleos essenciais, que limita a incorporação do mesmo nos filmes produzidos, o uso dos OEs em forma de emulsão para o preparo dos filmes tem sido uma alternativa promissora (Almeida *et al.*, 2024; Castro *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2022).

Desse modo, o presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial antifúngico de filmes poliméricos incorporados com emulsões de óleos essenciais de tomilho e orégano, bem como a sua influência na produção de micotoxinas pelos fungos filamentosos *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticilioides* em grãos de milho.

## METODOLOGIA

Para a execução das análises, as cepas dos fungos filamentosos *A. flavus* e *F. verticilioides*, provenientes do banco de culturas do laboratório de análise de micro-organismos e micotoxinas – FEA/UNICAMP, foram reativadas em meio Ágar Batata Dextrose (PDA) e incubadas a 25°C durante 5 dias. Além disso, os óleos essenciais (OEs) de orégano e tomilho utilizados foram provenientes da indústria de condimentos Givaudan (Jaguaré – SP).

Primeiramente, para o preparo das emulsões, foram preparadas as fases aquosa e oleosa, sendo a aquosa, 1% (v/v) de Tween 80 e água ultrapura e a oleosa, 3% (v/v) dos OEs respectivos. A fase aquosa foi misturada à oleosa e, posteriormente, a mistura foi homogeneizada em Ultra-turrax (Ultra-Turrax® T8, IKA, Germany) durante 5 minutos a 13500 rpm (Badr, Badawy e Taktak, 2022). Após o preparo, o potencial antimicrobiano das emulsões foi avaliado a partir da concentração mínima inibitória (MIC) e concentração mínima fungicida (MFC), conforme metodologia proposta por Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais – CLSI (2022). Sendo assim, as suspensões dos inóculos foram padronizados a $10^5$ conídios/mL, determinado por hemocitômetro, em meio *Roswell Park Memorial Institute* – RPMI 1640. Em sequência, foi realizada a microdiluição seriada em microplacas de poliestireno de 96 poços, nas concentrações das emulsões entre 0,6 e 0,009 mg/mL, além dos poços de controle positivo e controle negativo. As microplacas foram incubadas durante 5 dias a 25°C. Posterior à leitura do resultado, foi realizada a inoculação do poço resultante do MIC e de seus anteriores em meio PDA e foram inoculados durante 5 dias a 25°C.

Para a caracterização das emulsões foram realizadas análises de potencial zeta (ZP), índice de dispersão de polímero (PDI) e tamanho de partícula, utilizando a técnica de dispersão dinâmica de luz (DLS) no equipamento Zetasizer r (Nano-ZS, Malvern Instruments, Reino Unido) a 25°C (Badr, Badawy e Taktak, 2022). Além disso, foi

realizada a leitura da formação estrutural de gota em microscópio confocal de varredura a laser – Zeins (Zeins, Wetzlar, Alemanha) (Li et al. 2021).

O filme foi preparado a partir de uma solução de quitosana a 1% em ácido glacial acético 1% (pH 5,3-5,6) a 50-55°C, sendo misturado sob agitação magnética durante 24 horas, a fim de garantir a solubilização completa da quitosana (Elshamy et al., 2021). Posteriormente, foi adicionado 2% de glicerol e 1% da respectiva emulsão. A mistura foi homogeneizada em Ultra-turrax (Ultra-Turrax® T8, IKA, Germany) durante 3 minutos a 13500 rpm, sendo depositada em placas de Petri 60x15 mm (10g) após a homogeneização e secos a temperatura ambiente durante 72 horas.

Para a determinação da permeabilidade em relação ao vapor d'água (WVTR), um pedaço do filme, já pesado, foi colocado em dessecador a temperatura ambiente durante 24 horas, sendo pesado novamente ao final do período. A fim de avaliar microscopicamente as estruturas de gota foi realizada a microscopia confocal de fluorescência (CLSM) do filme úmido corado com solução de vermelho de Nilo (Li et al., 2018). Para a avaliação do potencial antifúngico, foi realizada a medição do halo de inibição, em mm, conforme metodologia adaptada proposta por Gaba et al. (2022).

Para a avaliação *in vitro* do potencial antifúngico dos filmes, os milhos, esterilizados por radiação gama de 20 kGy, foram contaminados artificialmente com a suspensão de conídios preparada a $10^5$ conídios/mL. Após a contaminação dos grãos, 10 g foi depositada sobre uma placa revestida pelo filme e, em seguida, foi utilizada outra placa revestida sobre o cereal. As placas foram incubadas durante 10 e 30 dias em containers em uma estufa BOD com temperatura e umidade controlada, sendo 25°C e 97 a 99% de umidade Rocha et al. (2016). Após o período de incubação, foi realizada a análise de micobiota por diluição seriada.

Para a avaliação da produção de micotoxinas (AFB1 e AFB2, FB1), foi realizada a extração por QuEChERS e posterior análise por técnica cromatográfica por cromatografia líquida de alta eficiência (Acquity UPLC) acoplado a um espectômetro de massa triplo quadrupolo com ionização por eletrospray (ESI), sendo a fase móvel A composta por água ultrapura e 0,1% (v/v) de ácido fórmico e fase móvel B, metanol com ácido fórmico a 0,1% (v/v) (Rodríguez-Cañás, 2023). A análise estatística foi realizada utilizando o software de Análise Estatística (SAS) versão 9.1.

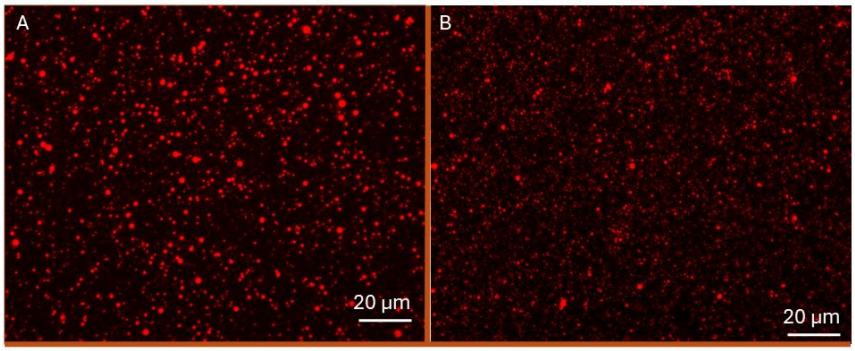
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos resultados obtidos de MIC, as emulsões apresentaram ação inibitória na concentração de 0,15 mg/mL. Já para a concentração mínima fungicida (MFC), as concentrações variaram entre 0,15 e 0,6 mg/mL, sendo a emulsão de orégano mais eficaz em comparação à de tomilho, possivelmente devido à variações dos teores de compostos voláteis.

A partir das análises para a caracterização das emulsões, foi possível observar que ambos são considerados sistemas polidispersos, uma vez que ambos resultados de índice de polidispersividade (PDI) estiveram próximo a 1, o que pode ser visualizado também a partir da microscopia confocal, conforme as Figuras 1 e 2, bem como apresentaram valores de potencial zeta (ZP) dentro dos valores esperados, sendo considerados sistemas com ótima estabilidade

eletrostática. Além disso, os resultados de tamanho médio de partícula apresentaram valores menores à emulsão de orégano.

**Figuras 1 e 2. Microscopia confocal das emulsões de orégano e tomilho.**




**A: Emulsão 3% de ORE; B: Emulsão 3% de TM**

Após a caracterização das emulsões, as propriedades físico-químicas e antimicrobiana dos filmes foram analisadas. Em relação à permeabilidade do filme, foi possível observar influência dos óleos essenciais nas propriedades de barreira ao vapor, em comparação ao filme preparado apenas com quitosana. Tal resultado pode ser em decorrência aos diferentes compostos químicos presentes na solução, influenciando diretamente na permeabilidade ao vapor e hidrofobicidade do óleo. A respeito da atividade antimicrobiana, os filmes apresentaram potencial de inibição entre 35 e 52%, sendo o filme de orégano com melhor ação inibitória para ambos os fungos filamentosos.

As análises realizadas in vitro em grãos de milho, demonstraram potencial dos filmes em redução de 4 logs UFC e 3 logs UFC do *F. verticilioides* para 10 e 30 dias de armazenamento. Já para o *A. flavus*, demonstrou potencial em redução de aproximadamente 5 log UFC para ambos os períodos de armazenamento. A partir desses resultados, é possível observar melhor ação inibitória dos tratamentos em relação ao *A. flavus*.

Por fim, foi analisada a produção de fumonisina B1 (FB1) e aflatoxinas (AFB1 e AFB2) nos períodos de 10 e 30 dias para os grãos de milho contaminados por *F. verticilioides* e *A. flavus*, respectivamente. No período de 10 dias de armazenamento dos grãos envoltos pelos filmes tratados (emulsão de orégano e tomilho), a produção de micotoxinas não foi detectada. No entanto, para o período de 30 dias, houve produção de aflatoxinas, ou seja, os tratamentos apresentaram maior eficácia ao *F. verticlioides*, em relação às micotoxinas.

## CONCLUSÃO

As emulsões preparadas foram caracterizadas como sistemas polidispersos, com boa estabilidade eletrostática e concentração mínima fungicida de 0,15 mg/mL. Já os filmes incorporados das emulsões apresentaram permeabilidade ao vapor influenciada pela presença do óleo essencial, além de potencial de inibição dos fungos filamentosos entre 35 e 52%, sendo os melhores resultados obtidos com o filme incorporado com a emulsão de orégano.

Por fim, durante os períodos de armazenamento dos grãos de milho contaminados artificialmente pelos fungos filamentosos, os filmes poliméricos apresentaram potencial de inibição em torno de 3 a 5 log UFC. Em relação às

micotoxinas, o filme permitiu a inibição da produção de micotoxinas até 10 dias de armazenamento para *A. flavus* e 30 dias para *F. verticilioides*.

Sendo assim, os filmes poliméricos preparados e utilizados como estratégia de controle fúngico, demonstraram resultados favoráveis para o controle de fungos filamentosos e sua micotoxinas em grãos de milho durante 10 dias de armazenamento.

## BIBLIOGRAFIA


ALMEIDA, Naara A. et al. Essential oils: An eco-friendly alternative for controlling toxigenic fungi in cereal grains. **Comprehensive reviews in food science and food safety,** v. 23, n. 1, p. e13251, 2024.

Badr, Mai M.; BADAWY, Mohamad EI; TAKTAK, Nehad EM. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of cinnamon essential oil and cinnamaldehyde nanoemulsions. **Journal of Essential Oil Research**, v. 34, n. 6, p. 544-558, 2022.

CASTRO, Jorge Iván et al. Chitosan/polyvinyl alcohol/tea tree essential oil composite films for biomedical applications**. Polymers**, v. 13, n. 21, p. 3753, 2021.

Elshamy, Samar et al. Chitosan-based film incorporated with essential oil nanoemulsion foreseeing enhanced antimicrobial effect**. Journal of Food Science and Technology**, v. 58, p. 3314-3327, 2021.

ERENSTEIN, Olaf et al. Global maize production, consumption and trade: trends and R&D implications**. Food security**, v. 14, n. 5, p. 1295-1319, 2022.

Gaba, Abdul Basit M. et al. Protective impact of chitosan film loaded oregano and thyme essential oil on the microbial profile and quality attributes of beef meat. **Antibiotics**, v. 11, n. 5, p. 583, 2022.

GOKO, M. L. et al. Identification and characterisation of seed-borne fungal pathogens associated with maize (Zea mays L.). **International Journal of Microbiology**, v. 2021, n. 1, p. 6702856, 2021.

GUO, Shuangfeng et al. Sustainable and effective Chitosan-based edible films incorporated with OEO nanoemulsion against apricots' black spot. **Food Control**, v. 138, p. 108965, 2022.

Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais Padrões de desempenho para testes de suscetibilidade antifúngica de leveduras (3ª ed.), **Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais**, 2022. Suplemento CLSI M27M44S.

Li, Jing et al. Combined effects of octenylsuccination and oregano essential oil on sweet potato starch films with an emphasis on water resistance**. International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 547-553, 2018.

**Produção - Portal Embrapa**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/milho/producao>.

Rodríguez-cañás, Inés et al. Detection of mycotoxins in cheese using an optimized analytical method based on a QuEChERS extraction and UHPLC-MS/MS quantification. **Food Chemistry**, v. 408, p. 135182, 2023.