

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL E BIOPROCESSOS

**Leonardo de Assunção Pinto**

PREPARAÇÃO DE NANOEMULSÕES COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE A  
*Aspergillus* spp. A PARTIR DE ESPÉCIES DA FLORA DO PARQUE NACIONAL DA  
RESTINGA DE JURUBATIBA

Rio de Janeiro

2024

Leonardo de Assunção Pinto

PREPARAÇÃO DE NANOEMULSÕES COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE A  
*Aspergillus* spp. A PARTIR DE ESPÉCIES DA FLORA DO PARQUE NACIONAL DA  
RESTINGA DE JURUBATIBA

Dissertação de Mestrado apresentado ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos (PBV)  
da Universidade Federal do Rio de Janeiro  
(UFRJ) como requisito parcial à obtenção do  
título de Mestre em Biotecnologia Vegetal e  
Bioprocessos

**Orientadores:** Prof. Dr. Leandro Rocha  
Prof. Dr. Luiz Antonio Moura Keller

Rio de Janeiro

2024

## FICHA CATALOGRÁFICA

### CIP - Catalogação na Publicação

P659p Pinto, Leonardo de Assunção  
PREPARAÇÃO DE NANOEMULSÕES COM ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA FRENTE A *Aspergillus* spp. A PARTIR DE  
ESPÉCIES DA FLORA DO PARQUE NACIONAL DA RESTINGA DE  
JURUBATIBA / Leonardo de Assunção Pinto. -- Rio de  
Janeiro, 2024.  
94 f.

Orientador: Leandro Rocha.  
Coorientador: Luiz Antonio Moura Keller.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do  
Rio de Janeiro, Decania do Centro de Ciências da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
Vegetal, 2024.


1. Antifúngicos Sustentáveis. 2. *Aspergillus*  
seção Flavi. 3. Produtos Naturais. 4. Nanoemulsão.  
5. Química de Produtos Naturais. I. Rocha, Leandro,  
orient. II. Keller, Luiz Antonio Moura, coorient.  
III. Título.

Leonardo de Assunção Pinto

PREPARAÇÃO DE NANOEMULSÕES COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE A  
*Aspergillus* spp. A PARTIR DE ESPÉCIES DA FLORA DO PARQUE NACIONAL DA  
RESTINGA DE JURUBATIBA


Dissertação de Mestrado apresentado ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos (PBV)  
da Universidade Federal do Rio de Janeiro  
(UFRJ) como requisito parcial à obtenção do  
título de Mestre em Biotecnologia Vegetal e  
Bioprocessos

Aprovada em 23 de maio de 2024

Documento assinado digitalmente  
 **ALANE BEATRIZ VERMELHO**  
Data: 25/05/2024 20:41:46-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Alane Beatriz Vermelho

Documento assinado digitalmente  
 **HILDEGARDO SEIBERT FRANÇA**  
Data: 27/05/2024 13:04:47-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Hildegardo Seibert França

Documento assinado digitalmente  
 **KELLY MOURA KELLER**  
Data: 27/05/2024 11:55:56-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Kelly Moura Keller

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos (PBV) e à CAPES. Também agradeço às Faculdade de Farmácia e Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF) e à FAPERJ. Instituições que auxiliaram durante os últimos dois anos no meu desenvolvimento científico, permitindo que meu mestrado tenha sido realizado.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Leandro Rocha e Luiz Antonio Moura Keller, por todo o apoio e incentivo desde a graduação e por estarem sempre presente com ensinamentos, incentivos e bom humor.

Às equipes do Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais (LTPN), Núcleo de Toxicologia e Sanidade Animal (NTSA) e Laboratório de Controle Físico-Químico. Ao Dr. Victor Moebus, meu orientador não oficial desde 2016, e ao colega 90% farmacêutico, Felipe Köeptcke, meus parceiros para tudo. Ao Dr. Francisco Machado, mentor desde o rascunho do projeto em 2019. A Dra. Bettina, Dr. Caio, Dr. Lucas, Fábio Jr., Cadu, Carol, Diogo, Júlia, Tati e a todos que me deram todo tipo de apoio.

Sempre aos meus pais, Carla e Michel, que nunca vou poder agradecer o suficiente. A meus avós, tias e tios que sempre fizeram tudo por mim, Angela, Ana Cecília, Cleber, Dalberto, Rachel, Érica, Leonardo, Igor e Daiara. Aos meus irmãos, Alexandre e Isabela; meus primos, Juliana e Hugo; e amigos que são também parte da família, Ian, Camilla, Gustavo, Anne, Rian, Bia e Lucas. Todos vocês são parte fundamental de tudo que faço.

E, claro, à Paula GAP. Uma das pessoas mais importantes na minha vida e que acompanhou meu mestrado do início ao fim com todas as experiências, vitórias e angústias. Obrigado por todo o apoio, incentivo, descanso e carinho.

Muito obrigado a todos que contribuíram para que eu seja quem eu sou e para que eu fizesse o que eu faço. Eu nada seria se não fossem vocês.

Aos outros, dou o direito de serem como são. A mim, dou o dever de ser cada dia melhor.

- *Chico Xavier*

## RESUMO

Pinto, Leonardo de Assunção. Preparação de nanoemulsões com atividade antifúngica frente a *Aspergillus* spp. a partir de espécies da flora do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. Rio de Janeiro, 2024. Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro,.

O gênero *Aspergillus* é um importante contaminante alimentar, agente de aspergilose e produtor de micotoxinas, em especial a aflatoxina B1. Inibir a contaminação por *Aspergillus* spp. é uma questão de saúde pública e prevenção da fome. O uso de derivados vegetais bioativos seguros para uso humano e ao meio ambiente são uma tendência atual, com diversas espécies da Mata Atlântica apresentando alta diversidade química e elevado potencial bioativo. Para utilização dos metabólitos secundários vegetais, os óleos essenciais possuem metodologias e atividades estabelecidas e uma aplicação biotecnológica promissora para associação é a nanoemulsão, um sistema heterogêneo de gotículas nanométricas metaestáveis. O presente estudo, portanto, buscou estudar a atividade das espécies *Ocotea indecora* (Lauracea) e *Eugenia sulcata* (Myrtacea) frente às espécies fúngicas *Aspergillus flavus* RC 2054, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 e *Aspergillus westerdjkiae* NRRL 3174, focando nos óleos essenciais das folhas, nas suas substâncias majoritárias e nas nanoemulsões formuladas a partir dos bioativos. Os derivados foram caracterizados quimicamente e testados em até cinco concentrações diferentes (256; 512; 1024; 2048 e 4096 µg/mL). As cepas foram incubadas em 25 mL de meio de cultura próprio para fungos de 72 a 120 horas e a 27,5 °C, com medições diárias do diâmetro das colônias. A produção de aflatoxinas foi posteriormente quantificada em CLAE. As espécies *O. indecora* e *E. sulcata* têm como majoritários, respectivamente, o sesquiosesquiterpeno (86,13%) e o β-cariofileno (34,40%). Todas as nanoemulsões avaliadas demonstraram capacidade de potencializar os efeitos dos seus bioativos, mostrando-se agentes fungistáticos contra as cepas testadas por pelo menos 24 horas, em concentração de 1024 µg/mL ou maior. A maior e mais duradoura inibição foi observada na espécie *A. westerdjkiae*, com inibição acima de 40% em concentração 16 vezes menor que o óleo essencial, que foi inefetivo. Houve ainda atividade acima de 25% nas duas maiores concentrações por pelo menos 96 horas. As maiores inibições em *A. parasiticus* e *A. flavus* foram observadas na presença da nanoemulsão de *E. sulcata* (acima de 40%) com menor tamanho de gotícula (66,80 ± 6,60 nm). Não houve alterações morfológicas ou na produção de aflatoxinas. Destaca-se a formulação da nanoemulsão e a elucidação da composição química dos óleos essenciais como fatores críticos para o

desenvolvimento de biopesticidas. As nanoemulsões apresentam excelente potencial de carrear bioativos, potencializando as atividades intrínsecas dos óleos essenciais de ambas as espécies.

**Palavras-chave:** Seção Flavi; aflatoxina; óleo essencial; sesquirosefurano;  $\beta$ -cariofileno.



## ABSTRACT

Pinto, Leonardo de Assunção. Preparação de nanoemulsões com atividade antifúngica frente a *Aspergillus* spp. a partir de espécies da flora do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. Rio de Janeiro, 2024. Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2024.

The *Aspergillus* genus is an important food contaminant, agent of aspergillosis and producer of mycotoxins, especially aflatoxin B1. Inhibit contamination by *Aspergillus* spp. is a matter of public health and hunger prevention. The use of bioactive plant derivatives that are safe for human use and the environment is a current trend, with several species from the Atlantic Forest presenting high chemical diversity and high bioactive potential. For the use of plant secondary metabolites, essential oils have established methodologies and activities. A promising biotechnological application is the association with nanoemulsion, a heterogeneous system of metastable nanometric droplets. The present study focused on the activity of *Ocotea indecora* (Lauraceae) and *Eugenia sulcata* (Myrtaceae) against the fungal species *Aspergillus flavus* RC 2054, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, and *Aspergillus westerdjikiae* NRRL 3174. It concentrated on the essential oils from the leaves, their primary substances, and nanoemulsions formulated from bioactive compounds. These derivatives were chemically characterized and tested at five different concentrations (256; 512; 1024; 2048; and 4096  $\mu\text{g/mL}$ ). The strains were incubated in 25 mL of culture medium suitable for fungi for 72 to 120 hours at  $27.5 \pm 2.5$  °C, with daily measurements of colony diameter. Aflatoxin production was subsequently quantified using high-performance liquid chromatography (HPLC). The predominant compounds in *O. indecora* and *E. sulcata* were sesquirosefuran (86.13%) and  $\beta$ -caryophyllene (34.40%), respectively. All evaluated nanoemulsions demonstrated the ability to enhance the effects of their bioactives, proving to be effective fungistatic agents against the evaluated strains for at least 24 hours, at concentrations of 1024  $\mu\text{g/mL}$  or higher. The most significant and longest-lasting inhibition was observed in *A. westerdjikiae*, with over 40% inhibition at a concentration 16 times lower than that of the essential oil, which proved ineffective. There was also activity above 25% at the two highest concentrations for at least 96 hours. The greatest inhibitions in *A. parasiticus* and *A. flavus* were noted with *E. sulcata* nanoemulsion with the smallest droplet size ( $66.80 \pm 6.60$  nm). No morphological changes or variations in aflatoxin production were observed. The formulation of nanoemulsions and the elucidation of the

chemical composition of essential oils are critical factors in developing effective biopesticides. Nanoemulsions hold substantial potential to transport bioactive compounds, thereby enhancing the intrinsic activities of essential oils from both species.

**Keywords:** Section Flavi; aflatoxin; essential oils; sesquirosefuran;  $\beta$ -caryophyllene.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Aflatoxinas
AFB <sub>1</sub>	Aflatoxina B1
ANOVA	Análise de Variância
ARS	<i>Agricultural Research Service</i>
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CYA	<i>Czapeck Yeast Agar</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDL	Espalhamento Dinâmico da Luz
EHL	Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
EM	Espectroscopia de Massas
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
FAO	Food and Agriculture Organization
FIFRA	<i>Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act</i>
FDA	Food and Drug Administration
FID	<i>Flame Ionization Detector</i>
FFP	Faculdade de Formação de Professores
GRAS	Generally Recognized As Safe
IA	Índice Aritmético
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ISO	International Standard Organization
IPd	Índice de Polidispersão
LADEG	Laboratório de Desenvolvimento Galênico
LAMATE	Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais
LdD	Limite de Detecção
LdQ	Limite de Quantificação
LTPN	Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
NE	Nanoemulsão
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NRRL	<i>Northern Regional Research Laboratory</i>
NTSA	Núcleo de Toxicologia e Sanidade Animal

OE	Óleo Essencial
P.A.	Padrão Analítico
PICD	Percentuais de Inibição do Crescimento em Diâmetro
PZ	Potencial Zeta
RC	<i>Rio Cuarto</i>
RFFP	Registro da Faculdade de Formação de Professores
SDA	Saboroud Dextrose Agar
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFF	Universidade Federal Fluminense
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UV	Ultravioleta visível

## Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	REVISÃO DA LITERATURA .....	15
2.1.	GÊNERO <i>Aspergillus</i> .....	15
2.1.1.	Fisiologia e Ecologia .....	15
2.1.2.	Metabólitos.....	17
2.1.3.	Prevenção e Controle .....	20
2.2.	DERIVADOS VEGETAIS.....	22
2.2.1.	Óleo Essencial .....	23
2.2.2.	Nanoemulsão .....	25
2.3.	ESPÉCIES VEGETAIS .....	27
2.3.1.	<i>Ocotea indecora</i> .....	28
2.3.2.	<i>Eugenia sulcata</i> .....	32
3.	OBJETIVOS .....	34
3.1.	OBJETIVO GERAL .....	34
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4.	METODOLOGIA.....	35
4.1.	LOCAL .....	35
4.2.	MATERIAIS.....	35
4.2.1.	Espécies Fúngicas.....	35
4.2.2.	Espécies Vegetais.....	35
4.2.3.	Produtos.....	36
4.3.	MÉTODOS.....	36
4.3.1.1.	Óleo Essencial .....	36
4.3.1.2.	Caracterização Química e Quantificação de OE .....	36
4.3.1.3.	Nanoemulsão .....	37
4.3.1.4.	Caracterização Físico-Química de NE.....	37
4.3.2.	Avaliação Antifúngica.....	38
4.3.2.1.	Condições de Cultivo .....	38
4.3.2.2.	Avaliação do Crescimento .....	38
4.3.2.3.	Avaliação Morfológica .....	39
4.3.2.4.	Extração de Micotoxinas.....	39
4.3.2.5.	Quantificação de Micotoxinas .....	39
4.3.3.	Análise Estatística .....	40

5.	DESENVOLVIMENTO .....	41
5.1.	ARTIGO 1 .....	41
5.2.	ARTIGO 2 .....	67
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO .....	86

## 1. INTRODUÇÃO

Fungos são importantes agentes deteriorantes de alimentos, com a *Food and Agriculture Organization* (FAO) estimando que 25% dos produtos alimentares vegetais produzidos no mundo são perdidos anualmente devido à contaminação por fungos e/ou micotoxinas (ESKOLA et al., 2020). Tal cenário é contraproducente quando cerca de 830 milhões de pessoas, quase 10% da população mundial, passaram fome em 2022 (GHI, 2022).

A contaminação fúngica está não só ligada ao desperdício de alimentos, mas também à saúde pública. Estima-se que 1,2 bilhão de pessoas sofram por ano com infecções causadas por fungos patogênicos e intoxicação por micotoxinas (DENNING; BROMLEY, 2015).

O gênero *Aspergillus* assume protagonismo em ambas as preocupações como espécies que apresentam a ligação mais forte com os estoques alimentares humanos (ZINEDINE, 2019), sendo várias de suas espécies vinculadas a aspergilose superficial e invasiva e à produção de aflatoxinas (AF) (FRISVAD et al., 2019). A ingestão de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), em especial, pode levar a danos nos órgãos de depuração e metabolização e a quadros de oncogênese hepática (FORSYTHE, 2002).

Inibir o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas mostra-se uma importante estratégia de combate à fome mundial e melhoria da saúde pública. Ambas são questões relacionadas aos 17 Princípios Sustentáveis das Nações Unidas - Objetivos de Desenvolvimento para 2030, principalmente aos objetivos 2, “Fome Zero” e 3, “Boa Saúde e Bem-estar” (UN, 2017).

O método usual para prevenir contaminações fúngicas, independente da etapa, é o uso de aditivos de síntese química. Entretanto, o impacto no ambiente e na saúde humana, bem como o desenvolvimento de cepas resistentes, tem estimulado a indústria nos últimos anos a buscar novas estratégias como alternativas (HARO-GONZÁLEZ et al., 2021).

Produtos de origem vegetal extraídos de plantas, neste contexto, têm recebido destaque como possíveis agentes conservantes de baixo impacto no ambiente e na saúde, sendo classificados, em maioria, como *Generally Recognized As Safe* (GRAS), traduzido como “geralmente reconhecidos como seguros” (ALTEMIMI et al., 2017; FDA, 2017). Tais produtos têm sido visados especialmente por indústrias farmacológicas e alimentícias, onde as demandas são constantes e crescentes, podendo ser usados na Europa e EUA como agentes antimicrobianos e como aditivos de alimentos e rações, tendo, inclusive, ampla aceitação pelos consumidores (GYAWALI; IBRAHIM, 2014; SALVIA-TUJILLO, 2014).

Diversos derivados vegetais são possíveis de se obter a partir da flora local com o objetivo de extrair e utilizar seus metabólitos bioativos. Óleo Essencial (OE) é um dos derivados mais tradicionais utilizados pela humanidade, sendo substâncias químicas voláteis encontrados em baixas concentrações nas plantas. Frequentemente o OE possui atividade biológica que beneficia a planta, mas que também é de interesse humano, como efeito repelente, fotoprotetor ou antimicrobiano (HARO-GONZÁLEZ et al., 2021).

Os derivados vegetais podem ainda ser associadas a inovações biotecnológicas promissoras para potencializar a atividade de interesse. A nanoemulsão (NE) óleo em água, por exemplo, é formada por uma fase líquida interna oleosa (como OE ou EV) dispersa em uma fase líquida externa aquosa, formando gotículas entre 20 e 200nm (LOPES MARTINS et al., 2021). Esse produto apresenta estabilidade por longo período e capacidade de aumentar a solubilidade, melhorando o contato entre o extrato e o micro-organismo e, logo, potencializando a eficácia (HILL; GOMES; TAYLOR, 2013; MARZUKI; WAHAB; HAMID, 2019).

É interessante frisar ainda que o Brasil possui a maior biodiversidade de flora do planeta (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018), possuindo potencial gigantesco para exploração biotecnológica. Em biomas como a Mata Atlântica, muitas espécies são endêmicas, o que, associado ao desmatamento local, evidencia a urgência e a importância destes estudos. Áreas de proteção ambiental são, portanto, imprescindíveis para preservação ecológica, porém, também permitem a obtenção de amostras para estudos.

Trabalhos sobre as espécies encontradas no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, no Estado do Rio de Janeiro, Brasil, demonstram alta diversidade de grupos metabólicos com diferentes e significativas bioatividades. Dentre estas espécies, foram selecionadas para o presente trabalho a *Ocotea indecora* e *Eugenia sulcata*, das famílias Lauracea e Myrtacea, respectivamente. Tais famílias contam com uma vasta literatura estabelecida e trabalhos, inclusive, no gênero *Aspergillus* (SALLEH; AHMAD, 2017), enquanto as espécies, encontradas apenas nos remanescentes da Mata Atlântica, apesar de ervas medicinais tradicionais, contam com poucos estudos (QUINET, 2015).

Mostra-se relevante, portanto, avaliar a atividade antifúngica de produtos obtidos a partir de espécies vegetais, visando uma avaliação da espécie e dos processos possíveis de serem empregados. Assim, o presente estudo focou em caracterizar quimicamente os óleos essenciais e as nanoemulsões das folhas da *O. indecora* e *E. sulcata*, e em avaliar suas atividades frente as cepas *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. westerdijkiae*.



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. GÊNERO *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* spp. é composto por fungos filamentosos, sapróbios, anamorfos, xerofílicos e geofílicos, presentes tanto no solo quanto no ar e com capacidade de crescimento em ampla faixa de temperatura e tolerância à baixa atividade de água e umidade. Conta atualmente com 339 espécies, distribuição global e possui alta importância econômica, social e histórica (FRISVAD et al., 2019; SAMSON et al., 2014).

Deve-se frisar, entretanto, as diferenças entre países de clima tropical e temperado, já que os países tropicais apresentam melhores condições climáticas para o crescimento fúngico e, portanto, tem maior ocorrência de contaminação (AYOFEMI, 2020; PITT, 2009). Isso demonstra a atenção necessária a países como o Brasil, cujo clima é ideal para o desenvolvimento fúngico, e possuem sua economia baseada no agronegócio.

A identificação é feita tradicionalmente por características morfológicas microscópicas e atualmente através da utilização de taxonomia polifásica, que permitiu novas identificações e reclassificações. O gênero é dividido, taxonomicamente, em diferentes seções, cuja seção *Flavi* contém algumas das espécies mais importantes do gênero, tanto em biotecnologia, quanto para alimentos e saúde (FRISVAD et al., 2019).

A seção *Flavi* contém 33 espécies divididas em oito clados, sendo o maior número de espécies (15) do Clado *Aspergillus flavus*. As mais comuns são as espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, principalmente em climas subtropicais e tropicais, havendo destaque ainda para as espécies *A. oryzae*, a forma domesticada de *A. flavus*, e *A. sojae*, a forma domesticada da espécie *A. parasiticus*, mesmo que morfológica e quimicamente semelhantes (FRISVAD et al., 2019).

Várias espécies também produzem algumas das mais importantes micotoxinas conhecidas, especialmente aflatoxinas e ocratoxinas, ainda que nenhuma seja capaz de produzir ambas. 18 espécies são produtoras de aflatoxinas e oito delas são capazes de produzir o tipo B e G (FRISVAD et al., 2019).

#### 2.1.1. Fisiologia e Ecologia

Suas características xerofílicas e geofílicas tornam os fungos do gênero *Aspergillus* organismos versáteis e adaptáveis, com potencial maior que bactérias para superar condições de estresse (PELES et al., 2021). Além disso, como as estratégias de conservação geralmente

focam no controle bacteriológico, os fungos muitas vezes ficam praticamente sem competidores e em condições facilmente superáveis por eles, com capacidade para colonizar itens alimentares antes, durante ou após a colheita, especialmente durante o armazenamento. Também seguem no interior de alimentos industrializados após processamento, sendo um risco constante (GALLO et al., 2020; PELES et al., 2021).

O gênero *Aspergillus* apresenta forte ligação com estoques alimentares humanos e, sendo fungos sapróbios e xerofílicos, são capazes de deteriorar uma ampla variedade de substratos, especialmente grãos e cereais como amendoim, milho, soja, sorgo, café, além de frutas frescas e secas (PITT, 2009; ZINEDINE, 2019). A contaminação pode resultar em perdas nutricionais, produtivas e econômicas, além de alterações sensoriais e físico-químicas dos alimentos, tornando-os indesejáveis para os consumidores (GALLO et al., 2020).

O potencial infeccioso fúngico, especialmente na etapa pré-colheita, associado à monocultura, é relacionado a contaminação ampla e generalizada dos itens alimentares, causando grandes perdas alimentares. Nesta etapa, destaca-se também o uso de conservantes ineficazes ou mal utilizados, com o uso de fungicidas azólicos já sendo relacionados ao desenvolvimento de resistência em espécies de *Aspergillus* (CHEN et al., 2020).

Um dos fatores de resistência mais proeminentes para as cepas fúngicas é a composição da sua parede celular. A composição da parede celular varia entre os fungos, porém, na maioria das espécies é constituída de polissacarídeos (80 a 90%), proteínas, lipídios e carboidratos, sendo os glucanos um dos polímeros mais significativos. A parede do gênero *Aspergillus* difere-se de outros gêneros por ser majoritariamente formada por quitina ( $\beta$ -glucano), sendo rica também em glicanas e mananas (ZŁOTKO et al., 2019).

A parede celular desempenha, desse modo, um papel diverso, não apenas fornecendo proteção e formato às células fúngicas, mas também facilitando a adesão celular e a formação de biofilmes, conferindo-lhes vantagem adaptativa e permitindo sua sobrevivência e disseminação em ambientes diversos. Ela possui influência na interação entre o patógeno e o hospedeiro, favorecendo a evasão do sistema imunológico e resistência contra fagocitose, sendo fundamental à virulência e patogenicidade das espécies de *Aspergillus* (ZŁOTKO et al., 2019).

As espécies da seção Flavi, além de associadas a deterioração de alimentos, são ainda agentes infecciosos, especialmente em hospitais e UTIs, onde fungos como *Aspergillus* spp. podem causar aspergilose superficial (cutânea) e invasiva, com danos pulmonares e cerebrais (FRISVAD et al., 2019). A propagação desses fungos por conídios os torna resistentes ainda a desinfetantes comuns como os empregados na assepsia e desinfecção de utensílios da

manipulação (FARIAS et al., 2023). Neste cenário, cerca de 1,2 bilhão de pessoas sofrem com fungos patogênicos, com altas taxas de mortalidade (DENNING; BROMLEY, 2015).

Assim, o gênero *Aspergillus* possui grande impacto na sociedade, principalmente no tocante a contaminação e deterioração de alimentos, potencial patogênico e produção de metabólitos, como as micotoxinas (CAST, 2003; GALLO et al., 2020).

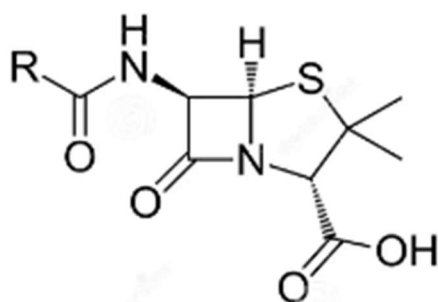
### 2.1.2. Metabólitos Fúngicos

Os metabólitos fúngicos são classificados em primários e secundários, resultado das reações metabólicas dos micro-organismos (CHROUMPI, 2020). Os metabólitos primários, como proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, são essenciais para o crescimento e manutenção celular dos organismos (KATZ; BALTZ, 2016). Já os metabólitos secundários desempenham papel essencial na interação dos fungos com o ambiente, regulando, equilibrando e adaptando os organismos ao habitat e clima, além de mediar interações ecológicas e adaptativas, como sinergismo e comunicação interespécies (COLLEMARE; SEIDL, 2019).

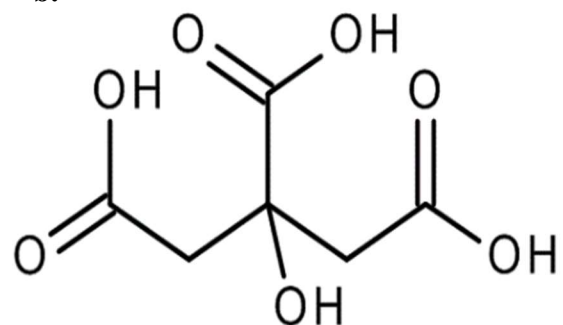
Os metabólitos secundários desempenham também um papel fundamental na defesa dos fungos contra ameaças ambientais, como predadores e patógenos, com vários agindo, por exemplo, para repelir insetos (FRISVAD et al., 2019). Algumas das moléculas produzidas são tóxicas e atuam como agentes de defesa contra uma variedade de ameaças, funcionando como fatores de virulência para infecções de organismos vivos e contribuindo para a defesa contra competidores ambientais, como o caso do antibiótico penicilina (Figura 1a), ou ácidos como o ácido cítrico (Figura 1b) (ARIAS et al., 2018; GURUCEAGA et al., 2019).

**Figura 1.** Estruturas Moleculares de: a. Penicilina; b. Ácido Cítrico

a.

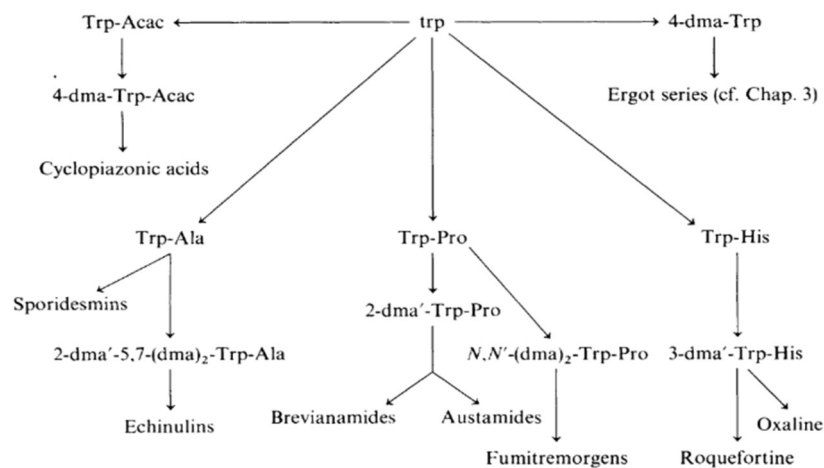


b.



Os fungos apresentam, dessa forma, um potencial biotecnológico significativo, especialmente no uso de seus metabólitos secundários na produção de uma variedade de produtos biológicos (FRISVAD et al., 2019; KATZ; BALTZ, 2016). A aplicação biotecnológica desses metabólitos desempenha atualmente papel significativo econômica e cientificamente, usados para extração de enzimas como as amilases, e contribuindo para a produção de substâncias como os já citados ácido cítrico e penicilina, além de outras substâncias amplamente utilizadas na indústria alimentícia, como as vistas pela rota biosintética na Figura 2 abaixo: (ARIAS et al., 2018; SCHUSTER et al., 2002).

**Figura 2.** Rotas Biossintéticas de Metabólitos Secundários Fúngicos



Fonte: Heidtmann-Bemvenuti et al. (2011)

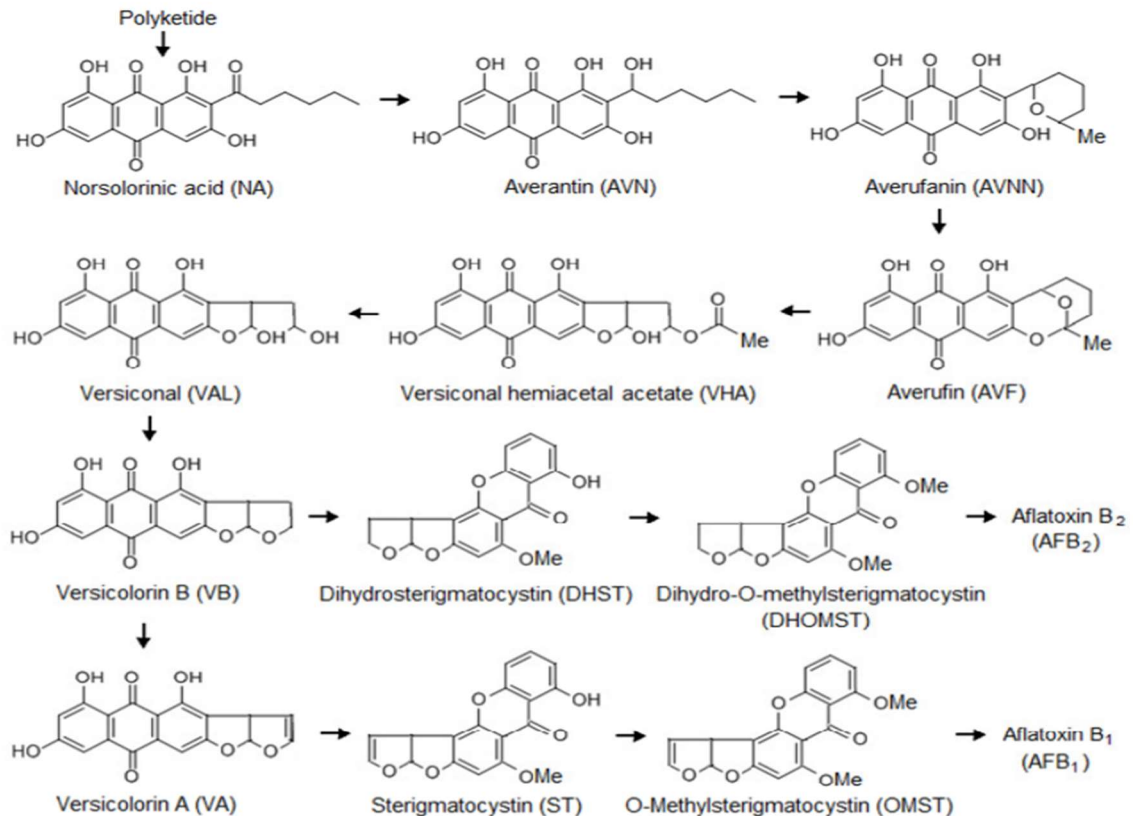
Estudos demonstraram a segurança das cepas industriais, porém, fungos filamentosos produzem também metabólitos secundários tóxicos com virulência para organismos vivos, sendo nocivos a animais e humanos (PITT, 2000). Os metabólitos são chamados de micotoxinas e são produzidos em situação de estresse ambiental por cerca de 100 espécies, principalmente pelos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (CAST, 2003; GALLO et al., 2020).

Micotoxinas são moléculas heterogêneas, com estruturas e pesos moleculares diversos, sendo atualmente identificadas 400 micotoxinas. Frequentemente são detectadas em produtos de origem vegetal e animal cerca de 30, principalmente as aflatoxinas (AF), fumonisinas, ocratoxina, tricotecenos e zearalenona (CAST, 2003; MOEBUS et al., 2023).

Importantes micotoxinas são associadas ao gênero *Aspergillus* e, dentre a seção *Flavi* podemos destacar o aflatoxicol, ácido ciclopiazônico e a ocratoxina, porém, a mais comumente produzidas pela seção e pelo gênero são as AF (FRISVAD et al., 2019). As AF são produzidas especialmente pelas espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, com as cepas de *A. flavus* produzindo

aflatoxinas B e as cepas de *A. parasiticus* produzindo aflatoxinas B e G (FRISVAD et al., 2019; PITT, 2000). As rotas biossintéticas para as aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) e B<sub>2</sub> estão abaixo na Figura 3.

**Figura 3.** Rotas Biossintéticas de Aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>



Fonte: Heidtmann-Bemvenuti et al. (2011)

As AF quimicamente são difuranocumarinas de estrutura rígida e plana que formam a estrutura das variantes mais importantes: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, sendo a nomenclatura referente à cor da fluorescência à luz ultravioleta (B = *Blue*, G = *Green*) (JALILI, 2016). A estabilidade química lhes confere alta resistência a tratamentos térmicos, pH extremos, altas pressões e tratamentos químicos de qualidade alimentar, tornando-os detectáveis em vários níveis da cadeia produtiva (LOI et al., 2017; PITT, 2000). A eliminação das AF, portanto, é uma tarefa difícil, sendo preferencial evitar a contaminação.

A AFB<sub>1</sub> é a mais tóxica dentre os tipos de aflatoxinas, e sua toxicidade está relacionada à sua biotransformação, que ocorre no fígado, através do sistema enzimático do citocromo P450. Os metabólitos gerados podem se ligar a macromoléculas celulares, incluindo material genético (DNA) ou proteínas, desencadeando quadros de doenças toxigênicas, como

hepatotoxicidade, teratogênese, mutagênese, imunossupressão e hemorragia renal e do trato intestinal (YAN et al., 2022).

Quadros agudos são associados especialmente a danos nos órgãos de depuração e metabolização, como fígado e rins, enquanto a exposição prolongada costuma levar aos quadros de oncogênese. Estas toxinas contaminam principalmente grãos como, amendoim, milho e soja, principalmente durante o armazenamento. De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer - IARC*) as AF estão classificadas no Grupo 1, comprovando o potencial cancerígeno para humanos (CAST, 2003; FORSYTHE, 2002; PITT, 2000; WHO, 1993).

Devido ao potencial nocivo em humanos e animais, todos os países regulamentam a presença de micotoxinas em diferentes matrizes, principalmente alimentares. A legislação brasileira, alinhada com o MERCOSUL, estabelece limites semelhantes às recomendações internacionais mais aceitas, como o *Codex Alimentarius* (FAO, 2020). Os limites vão de 5 a 20 mcg/kg, exceto para crianças, cujo limite é de 1,0 mcg/kg (BRASIL, 2022).

### **2.1.3. Prevenção e Controle Fúngico**

Diversas pesquisas nos últimos 30 anos comprovam a presença constante de fungos ao longo da cadeia produtiva de alimentos com a *Food and Agriculture Organization* (FAO) estimando que aproximadamente 25% dos grãos, cereais, frutas e vegetais colhidos, são perdidos para patógenos de plantas e deterioradores, principalmente fungos e/ou micotoxinas, tanto no campo quanto no armazenamento (ESKOLA et al., 2020; RÁDULY et al., 2020).

Embora mais grave nos países em desenvolvimento, a contaminação fúngica é um problema de importância mundial, com cerca de 80 espécies fúngicas de cinco filos distintos, sendo frequentes contaminantes de alimentos, afetando a produção agrícola e as exportações e causando prejuízos e perdas aos produtores (AYOFEMI, 2020; SAMSON, 2001).

Observa-se a extensão do potencial nocivo à saúde humana e a urgência para descobrir e desenvolver produtos capazes de inibir ou retardar o crescimento fúngico. Apenas o EUA, por exemplo, gasta anualmente cerca de 1 bilhão de dólares entre desperdício e conservantes (RÁDULY et al., 2020). Um problema dessa escala deve ter nível condizente de atenção e soluções para ele devem vir sem desencadear danos a população e natureza.

Os métodos de prevenção a contaminação de cultivos agrícolas, portanto, são essenciais para garantir a segurança e a qualidade dos alimentos, sendo tradicionalmente divididos em estratégias pré-colheita, colheita e pós-colheita (PELES et al., 2021).

No contexto pré-colheita, as condições de cultivo desempenham papel fundamental, com destaque para a irrigação e agendamento do plantio e colheita, já que a baixa umidade e altas temperaturas são pontos críticos para o crescimento fúngico e produção de micotoxinas. Além disso, pragas como insetos podem comprometer a integridade dos alimentos e facilitar a contaminação fúngica, destacando assim a importância de culturas resistentes, rotação de culturas e métodos de controle de pragas (PELES et al., 2021; RÁDULY et al., 2020).

A maioria das ameaças à segurança alimentar, porém, reside nos fatores pós-colheita, abrangendo desde os padrões de colheita até o transporte ao consumidor, destacando-se o armazenamento. O armazenamento de grãos limpos e íntegros e o controle da umidade e temperatura são medidas críticas para controlar os riscos infecciosos e químicos (PELES et al., 2021; RÁDULY et al., 2020). Estratégias de prevenção em todas as etapas se mostram fundamentais para segurança alimentar, qualidade dos produtos e a proteção da saúde pública.

Devido à estrutura complexa dos fungos, entretanto, há uma grande dificuldade em impedir seu crescimento, levando aos métodos usuais contra contaminação fúngica serem baseados no uso de aditivos de síntese química. Dentre os pesticidas fungicidas, alguns dos mais utilizados estão na Tabela 1 abaixo:

**Tabela 1.** Pesticidas fungicidas e seus mecanismos de ação de acordo com o Comitê de Ação a Resistência a Fungicidas - FRAC (2022).

Classe Fungicida	Exemplo	Mecanismo
Benzamidas	Fluopicolide e Zoxamide	Inibe a multiplicação celular
Carboxamidas	Boscalid e Captfol	Inibe a respiração mitocondrial
Hidroclorocarbonetos	Hexaclorbenzeno	Peroxidação de lipídios
Organofosfatos	Edifenfos e Iprobenfos	Inibe a síntese de glicerofosfolipídios
Clorofenis	Dicloran e Quintozeno	Inibe a síntese de lipídios

Cada vez mais estudos ressaltam a conexão entre o uso de conservantes sintéticos e danos à saúde e ao meio ambiente. Destaca-se a resistência dos vetores de pragas e a metabolização das substâncias tóxicas por parte dos consumidores e animais não-alvo. O contato com os conservantes se relaciona a diversos danos à saúde, seja em doses diretamente letais ou doses subletais que modificam a fisiologia natural e, frequentemente, acarreta o desenvolvimento de cânceres (ANAND; SATI, 2013; NASROLLAHZADEH, 2022).

Nesse cenário, o impacto prejudicial dos conservantes sintéticos forçou a população, e conseqüentemente a indústria, a se voltarem para estratégias alternativas, possuindo menos

efeitos indesejáveis (HARO-GONZÁLEZ et al., 2021). Produtos derivados de plantas, portanto, demonstram importante ascensão nas indústrias como conservantes desejados e estudos com tal foco são cada vez mais relevantes e visados (GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

## 2.2. DERIVADOS VEGETAIS

Plantas são capazes de produzir metabólitos secundários como uma forma de defesa contra diversas ameaças ambientais, desde predadores a patógenos. Esses metabólitos têm papel fundamental, regulando, equilibrando e adaptando o indivíduo ao habitat e clima. Eles podem também ser explorados no desenvolvimento de produtos, como fármacos, cosméticos, suplementos alimentares e pesticidas agrícolas (HARO-GONZÁLEZ et al., 2021).

A biodiversidade nos ambientes tropicais e equatoriais oferece um potencial rico em compostos biologicamente ativos que podem servir como modelos para a química medicinal e a descoberta de medicamentos (VALLI et al., 2021). O Brasil, em especial, apresenta a maior biodiversidade do mundo, possuindo mais de 15% da biodiversidade de todas as espécies vivas do planeta (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018).

A flora brasileira, devido aos diferentes biomas terrestres presentes em sua vasta extensão territorial (Floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Pampas), conta com uma diversidade química extraordinária. Apesar de ainda pouco explorada, a química de produtos naturais é um campo de pesquisa tradicional no Brasil, sendo as propriedades medicinais das plantas foco de diversas pesquisas (VALLI et al., 2012, 2018).

Apesar da importância associada a linha de pesquisa, diariamente há grande perda de biodiversidade no país, principalmente em áreas como a Mata Atlântica e o Cerrado. Apesar do Brasil ter medidas de preservação, como a Convenção sobre Diversidade Biológica e outros acordos internacionais, cerca de 0,5% das cerca de 300 mil espécies de plantas catalogadas e conhecidas no mundo são endêmicas do país. Associado ainda a perda de conhecimentos da população tradicional, pode-se perder inúmeras espécies vegetais com classes distintas e desconhecidas, além de seus usos (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018).

Destaca-se, assim, a urgência e importância de ações para conservar os diferentes ecossistemas e o conhecimento tradicional associado a eles, sendo essencial a colaboração interdisciplinar para o uso racional e a conservação das áreas florestais remanescentes. Apenas assim pode-se manter os avanços significativos realizados no último século, especialmente no fracionamento, isolamento e elucidação estrutural de metabólitos secundários de plantas (NEWMAN; CRAGG, 2020).



É essencial esclarecer as diferentes atividades biológicas associadas a cada metabólito, sendo muitas inestimáveis científica e tecnologicamente e capazes de melhorar a qualidade de vida da população. Portanto, muitos países investigam, supervisionam e incentivam o uso de derivados vegetais (NEWMAN; CRAGG, 2020; VALLI et al., 2021).

Para explorar suas atividades, é necessário extrair da planta seus metabólitos secundários, sendo a metodologia empregada para tal fundamental para determinar as propriedades e o tipo de produto que irá se obter. Assim, tradicionalmente, utiliza-se extratos obtidos por solventes orgânicos e óleos essenciais voláteis, havendo características e aplicações específicas a cada produto (NEWMAN; CRAGG, 2020; VALLI et al., 2021).

### 2.2.1. Óleo Essencial

Óleos essenciais (OE) são metabólitos secundários lipofílicos e altamente voláteis de plantas aromáticas, geralmente com peso molecular inferior a 300 Da. OE são armazenados em tricomas glandulares, papilas e canais secretores existentes principalmente nas folhas e flores, mas também podem ser encontrados no interior de talos, cascas e raízes (HYLDGAARD, 2012; KONARSKA et al., 2023).

A Organização Internacional de Padrões (*International Standard Organization – ISO*) define óleos essenciais como “produtos obtidos a partir de matéria-prima natural de origem vegetal, por destilação a vapor, processos mecânicos ou destilação seca, após a separação da fase aquosa (se houver) por processos físicos” (ISO, 2021).

A composição dos OE é complexa, variando com a espécie e com os fatores ambientais de cultivo, como a localização, estação, temperatura, chuva e altitude. Entretanto, compostos fenólicos são frequentemente fundamentais e, dentre as substâncias encontradas nos OE, costuma haver majoritariamente terpenos ou fenilpropanos. Os terpenos são formados pela combinação de dois (monoterpeno), três (sesquiterpeno) ou quatro (diterpeno) unidades de isopreno, enquanto os fenilpropanoídeos são compostos não-terpenoídeos contendo um grupo fenilpropanol. Há também grupos menos expressivos, como álcoois, aldeídos, ácidos, fenóis, cetonas, éteres, ésteres, lactonas e hidrocarbonetos (MAURYA, 2021).

Os OE desempenham funções principalmente relacionadas a proteção e reprodução, agindo como agentes de polinização, mecanismo de defesa contra patógenos e predadores e até mesmo como antioxidantes na presença de luz. Há relatos de atividade repelente, irritante, antibacteriana e antifúngica (HARO-GONZÁLEZ et al., 2021; RIVERO-CRUZ et al., 2011).

Na história da humanidade, diversas civilizações utilizaram o potencial e as atividades relacionadas aos OE, bem como suas fragrâncias, para diversos propósitos. Culturas como os fenícios, gregos, romanos, maias e astecas possuíam uma vertente cultural bastante influenciada e baseada nos derivados vegetais, incluindo cerimônias religiosas, produção de perfumes e agentes terapêuticos (SONWA, 2000).

Atualmente há mais de 3000 OE descritos e aproximadamente 300 são utilizados amplamente nas indústrias de perfume, alimentos e farmacêuticas. Porém, tais produtos também são visados e pesquisados como uma importante alternativa aos pesticidas sintéticos no controle fitossanitário para agricultura. Explora-se assim sua baixa toxicidade e suas propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, nematicidas, inseticidas e antioxidantes (HARO-GONZÁLEZ et al., 2021; RIVERO-CRUZ et al., 2011).

O uso industrial em larga escala, entretanto, enfrenta fortes dificuldades, principalmente no tocante ao rendimento de extração dos metabólitos e da padronização entre os lotes. Apesar dos empecilhos, o mercado mundial atingindo USD 8,74 bilhões em 2021, com previsão de aumentar para USD 18,25 bilhões até 2028 (Future Business Insights, 2021).

A classificação do FDA como *Generally Recognized as Safe* (GRAS) permite o uso na Europa e EUA como agentes antimicrobianos e como aditivos de alimentos e rações. Além disso, nos EUA, o *Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act* (FIFRA) da *Environmental Protection Agency* (EPA) registra e controla o uso de defensivos agrícolas, incluindo derivados de plantas. No Brasil, o Ministério Público Ambiental e a Embrapa realizam essa função (GYAWALI; IBRAHIM, 2014; SALVIA-TUJILLO, 2014; TUREK; STINTZING, 2013).

A obtenção dos OE é realizada através de técnicas de separação, como a destilação, simples ou por arraste de vapor; prensagem ou espremedura, para cascas de frutas cítricas; enfloragem, com lipídeos extraíndo as substâncias sem alterá-las, geralmente a partir das flores; e maceração, que realiza a extração das substâncias por difusão (ISO, 2021).

O método tradicional e mais utilizado, entretanto, é a destilação por arraste a vapor, que se baseia na volatilidade do óleo e seu carreamento pelo vapor ascendente, seguida de rápida condensação. Através desta técnica, pode-se obter OE a partir da planta inteira ou a partir de diferentes partes, como casca, raízes, folhas, flores, frutas ou sementes, sejam frescas, parcialmente desidratadas ou secas (HARO-GONZÁLEZ et al., 2021; HYLDGAARD, 2012; ISO, 2021; KONARSKA et al., 2023).

Para a identificação das substâncias presentes no OE, atualmente é utilizado predominantemente o método de Cromatografia Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de

Massa (EM) equipado com detector de ionização de chama (*Flame Ionization Detector* - FID) (MACHADO et al., 2023).

As substâncias voláteis presentes nos OE, entretanto, são insolúveis em água devido à sua natureza lipofílica e isso torna limitada a interação com microrganismos (HARO-GONZÁLEZ et al., 2021; TUREK; STINTZING, 2013). Se associados a inovações biotecnológicas, porém, problemas como este podem ser resolvidos. O processo de nanoemulsificação, por exemplo, é capaz de melhorar o contato com o micro-organismo, potencializando, e possivelmente garantindo, a atividade dos bioativos (HILL; GOMES; TAYLOR, 2013; MARZUKI; WAHAB; HAMID, 2019).

### 2.2.2. Nanoemulsão

Emulsões são sistemas heterogêneos nos quais um líquido, denominado fase interna, é disperso em outro líquido, a fase externa, na forma de gotículas, com a presença de um agente emulsionante (tensoativo/surfactantes). Nanoemulsões (NE), por sua vez, são uma evolução das emulsões tradicionais, caracterizadas por terem gotículas em escala nanométrica (20 a 200nm) (LOPES MARTINS et al., 2021).

A escala nanométrica das gotículas faz com que as NE apresentem uma aparência translúcida e reflexo azulado característico, fruto da dispersão de luz do efeito Tyndall (ALJABRI; SHI; CAVAZOS, 2022). Apesar de serem cineticamente estáveis, são termodinamicamente instáveis, e, assim como as emulsões tradicionais, os tensoativos são essenciais para estabilizar a interface entre as fases, evitando a separação e coalescência das gotículas (WILSON et al., 2022).

O tamanho reduzido das gotículas gera sistemas metaestáveis, ou seja, que apresentam melhor e prolongada estabilidade físico-química, aumentando a vida útil do produto. Também permite melhora na solubilidade, biodisponibilidade, liberação e eficácia dos seus princípios ativos, com aumento na atividade biológica no geral. Permite ainda redução de sabores e aromas intensos, melhorando a palatabilidade de ativos como OE (MARZUKI; WAHAB; HAMID, 2019; LIU et al., 2019; REIS; AMBROSI; DI LUCCIO, 2022; ZHANG et al., 2021).

As NE podem ser preparadas por diferentes métodos, sendo os dois de maior destaque o método de alto aporte energético e o método de baixo aporte energético. O primeiro se baseia em equipamentos como homogeneizadores de alta pressão ou aparelhos de ultrassom para romper as gotículas por meio de forças intensas de cisalhamento, gerando nanoemulsões com tamanho reduzido e distribuição homogênea. Porém, os processos de alta energia muitas vezes

são desfavoráveis para aplicações industriais, necessitando de equipamentos caros e custos elevados, além de maior demanda de energia (MUSTAFA; HUSSEIN, 2020).

Já o método de baixo aporte energético explora as propriedades físico-químicas do sistema para formar as NEs, produzindo gotículas de diâmetro reduzido a até 20 nm. O método pode ser classificado pela mudança na estrutura do tensoativo durante a formação das nanoemulsões, sendo dividido em Emulsificação Espontânea e Inversão de Fase.

A Emulsificação Espontânea ocorre quando a formação das NEs é desencadeada pela rápida difusão do tensoativo a partir da fase dispersa para a fase contínua, sem envolver modificações na curvatura do tensoativo. Já a Inversão de Fase ocorre com alterações na curvatura do tensoativo. Essa inversão ocorre ao gotejar lentamente a fase dispersante sobre a fase dispersa com agitação, alterando o Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) do sistema, reduzindo a tensão interfacial e favorecendo a emulsificação.

No entanto, uma desvantagem do método de inversão é a limitação quanto aos tipos de fase oleosa e tensoativos que podem ser empregados, sendo necessário, em alguns casos, maiores quantidades de tensoativo. A utilização de altas concentrações pode causar alterações indesejáveis no produto, como textura e sabor, tornando-o indesejável para aplicações alimentícias, além dos custos e questões regulatórias. Ainda assim, o método apresenta grandes vantagens, sendo mais simples de implementar e adequado para produção em larga escala, gerando menor custo de equipamentos e energia (MUSTAFA; HUSSEIN, 2020; OSTERTAG; WEISS; MCCLEMENTS, 2012).

O fenômeno da maturação de Ostwald é um dos principais problemas para obtenção de nanoemulsões estáveis, devido a transferência das substâncias hidrofílicas das gotículas menores para as maiores (RAI, 2018). Portanto, substâncias mais lipofílicas na fase interna podem evitar este processo, mantendo a distribuição e estabilidade do sistema a longo prazo, especialmente quando há presença de monoterpenos (RAO, 2012).

A seleção cuidadosa do agente, ou combinação de agentes, emulsificante para cada fase dispersa é essencial para garantir a eficácia e segurança da NE, influenciando a eficiência antimicrobiana, estabilidade e desempenho como veículo (PRAKASH et al., 2018). A seleção é feita pela solubilidade nas fases oleosa e aquosa, valor EHL, toxicidade, estabilidade e capacidade de emulsificação (AZEEM, 2009; RAI, 2018; SHARMA et al., 2022). Geralmente os surfactantes não-iônicos com valor EHL 8–16 são os preferidos com base nestes critérios (CHOUDHURY, 2013; FLORENCE, 2003; RAI, 2018).

Assim, o controle e caracterização das nanoemulsões são essenciais para garantir sua estabilidade, eficácia e segurança. O tamanho e distribuição das gotículas e a carga superficial

(potencial zeta) estão diretamente relacionados com a estabilidade das nanoemulsões, sendo ambos geralmente determinados por meio da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL) utilizando o aparelho *zeta sizer* (PATTNI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015; RAI, 2018).

Outras avaliações importantes são a estabilidade a longo prazo e os estudos de estabilidade termodinâmica. No primeiro, são determinadas pelo *zeta sizer* possíveis variações durante o armazenamento das NEs em temperatura ambiente ou refrigeração por até seis meses. Já o segundo é um método de curta duração para avaliar a resposta a variações rápidas de temperatura. As NEs são monitoradas em ciclos de aquecimento e resfriamento (-20 a 80 °C). Ambos buscam avaliar a qualidade e integridade do sistema frente as possíveis alterações que pode enfrentar (PATTNI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015; RAI, 2018).

Devido as suas propriedades, as NE demonstram ser promissores carreadores de substâncias ativas, já sendo utilizada nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia. Outra aplicação para um mercado em crescimento é o desenvolvimento de biopraguicidas, sendo o princípio ativo derivado de plantas (MACHADO et al., 2023; VIANA et al., 2023). O uso de NE potencializa efeitos biológicos de derivados vegetais pela maior eficácia do contato com os micro-organismos, resultando em melhor atividade antimicrobiana (HILL; GOMES; TAYLOR, 2013; REIS; AMBROSI; DI LUCCIO, 2022) . Além disso, tais produtos representam uma alternativa viável contra a resistência crescente dos microrganismos aos produtos sintéticos, enquanto apresentam menor impacto ambiental e à saúde humana (DUARTE, 2020; TUREK; STINTZING, 2013).

### 2.3. ESPÉCIES VEGETAIS

O Brasil apresenta a maior biodiversidade do mundo, com diversidade química e substâncias biologicamente ativas para exploração biotecnológica. Biomas como a Mata Atlântica se destacam com diversas espécies endêmicas (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018).

Dentre os biomas brasileiros, as restingas aparecem como ecossistemas de grande relevância, sendo definidos pela legislação brasileira como: “depósito arenoso paralelo à linha da costa, de forma geralmente alongada, produzido por processos de sedimentação, onde se encontram diferentes comunidades que recebem influência marinha, com cobertura vegetal em mosaico, encontrada em praias, cordões arenosos, dunas e depressões, apresentando, de acordo com o estágio sucessional, estrato herbáceo, arbustivo e arbóreo, este último mais interiorizado” (BRASIL, 2012).

A influência marinha gera um ambiente único. Fatores edafoclimáticos como salinidade; deposição de nutrientes como o fósforo; ventos fortes; instabilidade do substrato e temperaturas elevadas afetam diretamente a composição química das espécies vegetais locais para se adaptarem às condições da região. Assim, as restingas possuem um potencial bioquímico significativo e diverso, sendo um importante sítio para estudos e descoberta de novos metabólitos secundários bioativos (LOURENÇO Jr et al., 2009, 2019).

O Brasil enfrenta diariamente uma significativa perda de biodiversidade para o desmatamento, acarretando a extinção de espécies vegetais com propriedades e usos desconhecidos. As restingas são parte dessas áreas de risco, sendo reconhecidas por abrigar espécies vegetais únicas, muitas endêmicas e em risco de extinção. O desmatamento intensifica a urgência na proteção ambiental, destacando a necessidade de estudos e a criação de áreas de preservação. (LOURENÇO Jr. et al., 2019; VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018).

O Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba é um dos locais de preservação mais importantes do Estado do Rio de Janeiro. Criado em abril de 1998, o parque abrange 44 quilômetros de costa, 18 lagoas costeiras e uma extensão total de 14.860 hectares, sendo a maior área de conservação de restinga no estado, englobando os municípios de Macaé, Carapebus e Quissamã. O parque visa preservar e restaurar o ecossistema frente a devastação ambiental, enquanto promove lazer, educação, pesquisa e conscientização ambiental para população (COSTA, et al., 2022; LUZ et al., 2022).

O Parque de Jurubatiba é lar de espécies vegetais geograficamente restritas com diversos trabalhos destacando a alta diversidade de metabólitos secundários e descrevendo suas bioatividades (ROCHA; RUPPELT; SANTOS, 2023). Selecionar e investigar as diferentes espécies da região, portanto, mostra-se uma linha de pesquisa importante e promissora, permitindo criar um registro a longo prazo das composições químicas, enquanto avalia atividades biológicas inexploradas e capazes beneficiar a sociedade em retorno.

### **2.3.1. *Ocotea indecora***

A *Ocotea indecora* pertence à família Lauraceae e é popularmente conhecida no norte fluminense como canela-sassafrás. A espécie pode chegar a 15 m de altura e possui folhas simples, alternadas, rígidas e aromáticas, de formato elíptico a obovado, e seus frutos frequentemente contidos em uma espécie de cálice (SALLEH; AHMAD, 2017).

A espécie é nativa do Brasil e encontrada especialmente nos remanescentes da Mata Atlântica no Sul e Sudeste do país, com destaque para a restinga do estado do Rio de Janeiro.

A Mata Atlântica, entretanto, é um dos biomas mais devastados do país, com menos de 7% de sua área original preservada, fazendo a espécie ser considerada vulnerável enquanto carece ainda de estudos aprofundados (QUINET et al., 2015; SALLEH; AHMAD, 2017).

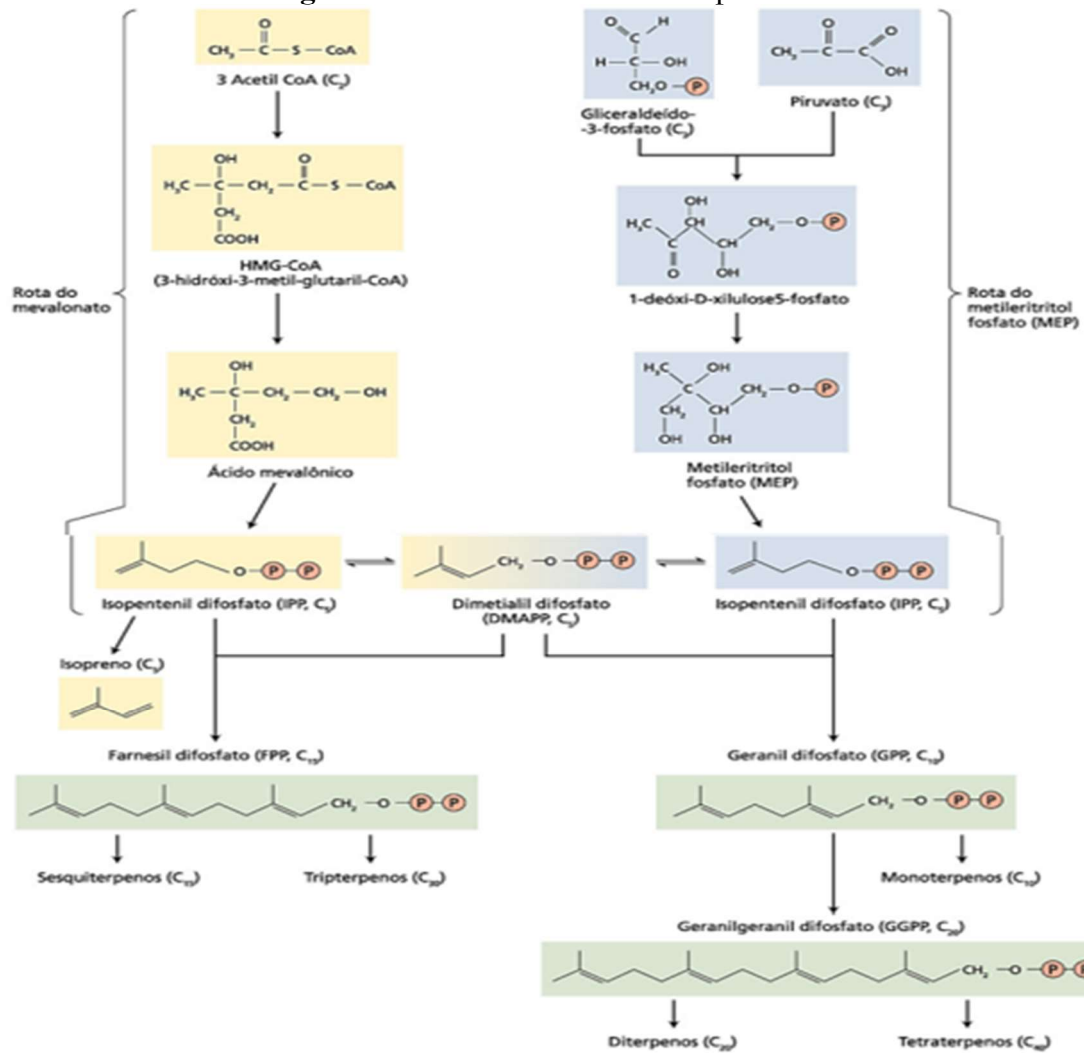
A família Lauraceae engloba mais de 50 gêneros e mais de 3000 espécies em diversos países tropicais. No Brasil são reconhecidas mais de 300 espécies, sendo mais de 200 endêmicas. O gênero *Ocotea*, por sua vez, conta com mais de 350 espécies com aproximadamente 170 no Brasil e mais de 100 sendo endêmicas (BATISTA et al., 2010; PASSOS et al., 2022; QUINET et al., 2015).

Muitos gêneros da família Lauraceae possuem significativa importância econômica, sendo utilizada na construção e marcenaria (*Nectandra*, *Ocotea*, *Persea*) e na cultura agrícola (abacateiro - *Persea americana*). Dentre a família e o gênero *Ocotea*, muitas espécies são também valorizadas pelos seus óleos essenciais, utilizados nas indústrias farmacêutica, química, alimentícia e cosmética pelas suas propriedades aromáticas, antioxidantes e antimicrobianas. Por exemplo as espécies *O. caudata* (pau-rosa peruano), *O. pretiosa* (sassafrás brasileiro) e *O. usambarensis* (cânfora africana) são amplamente empregadas na indústria de perfumaria (FIGUEIREDO et al., 2018; PRIETO, 2010; SALLEH; AHMAD, 2017).

A família Lauraceae apresenta grande diversidade de metabólitos secundários com relevante bioatividade, destacando-se na literatura principalmente os esteroides, terpenoides e alcaloides. Nos últimos 20 anos, diversas espécies do gênero *Ocotea* tiveram sua composição elucidada, com as mesmas classes predominando, além de neolignanais, fenóis alílicos, cumarinas e sesquiterpenolactonas (FIGUEIREDO et al., 2018; SALLEH; AHMAD, 2017).

Para o gênero *Ocotea* já é bem estabelecida a composição dos OE, sendo caracterizados pela presença predominante de sesquiterpenoides, com monoterpenos e sesquiterpenos representando 70% da composição (SALLEH; AHMAD, 2017). As vias metabólicas estão na Figura 4 abaixo.

Figura 4. Rota Biosintética de Terpenos



Fonte: Aulas X - Fisiologia Vegetal. UFC

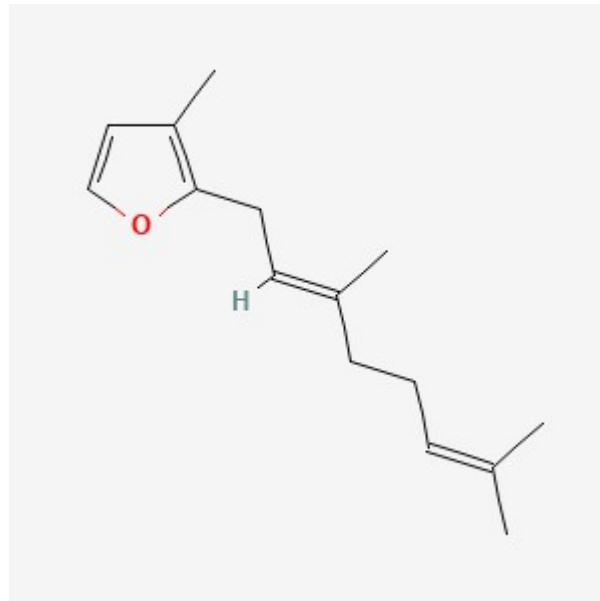
Entre os compostos voláteis identificados no gênero, destacam-se o biciclogermacreno, recorrentemente um dos principais compostos em espécies da Mata Atlântica brasileira (PASSOS et al., 2022). O β-cariofileno é outro majoritário frequente, sendo geralmente encontrados α-terpinoleno, α-pineno, β-pineno e α-cadinol (PRIETO, 2010). Quanto aos extratos, entretanto, a química é escassa na literatura. Há relatos dos extratos etanólicos por Barbosa et al. (2013) e Santos et al. (2013) e extratos de hexano, acetato de etila e etanol das folhas por Conceição et al. (2017), sendo predominantemente sesquiterpenoides. Observa-se a necessidade de mais estudos sobre os extratos de *Ocotea*, especialmente em relação à diversidade de substâncias presentes.

Em relação ao OE da *Ocotea indecora*, de acordo com a literatura, apresenta uma aparência amarelo claro e odor agradável. Já sobre a caracterização química, destaca-se o



sesquiterpeno sesquirosefurano (Figura 5), representando 70-95% da. (FIGUEIREDO et al., 2018; MACHADO et al., 2023; NASCIMENTO et al., 2020). A produção de substâncias não usuais por espécies de biomas específicos pode ser relacionada à adaptação climática/ambiental, com muitas substâncias sendo agentes alelopáticos, interagindo com a fauna e flora locais, funcionando, por exemplo, como atrativos para polinizadores ou repelentes contra predadores (PASSOS et al., 2022).

**Figura 5.** Estrutura Química do Sesquirosefurano



Fonte: PubChem (2024)

Plantas do gênero *Ocotea* possuem reconhecimento como medicina tradicional e são utilizadas no tratamento de várias doenças, como a *O. bullata* para dores de cabeça e infecções urinárias (RAKOTONDRAIBE et al., 2015). Além disso, os furanosesquiterpenos apresentam atividades diversas evidenciadas por outros estudos: antioxidante, herbicida, antibacteriana e antifúngica (FIGUEIREDO et al., 2018; MACHADO et al., 2023; MARONGIU et al., 2012; MERAD et al., 2021; NASCIMENTO et al., 2020; VIANA et al., 2023).

Diferentes espécies do gênero, como *O. quixos*, *O. odorífera* e *O. acutifolia*, apresentam relatos de atividade antifúngica frente a cepas de *Aspergillus* (PASSOS et al., 2022; PINO et al., 2018). Substâncias como cânfora,  $\beta$ -cariofileno e sesquiterpenos (hidrogenados e oxigenados) foram já relacionadas a atividades antifúngicas, sendo especulado como o mecanismo de ação a ruptura da membrana pelos terpenoides (MEZZOMO et al., 2019; PASSOS et al., 2022).

Assim, a composição química do gênero *Ocotea* e os possíveis efeitos inibitórios associados a seus derivados destacam a *O. indecora* como uma opção interessante para pesquisa. Associado ainda a devastação de seu local nativo e o caráter endêmico da espécie, observa-se a urgência e importância desta pesquisa para o desenvolvimento biotecnológico de novos produtos com potencial retorno a sociedade.

### 2.3.2. *Eugenia sulcata*

A família Myrtaceae é uma das mais abrangentes conhecidas, com mais de 140 gêneros e mais de 5500 espécies de arbustos e árvores ao redor do mundo, predominantemente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil há mais de 20 gêneros e 900 espécies e, na flora fluminense, se encontram 17 gêneros e mais de 300 espécies (BFG 2018; CALDAS; BAUMGRATZ; DA COSTA SOUZA, 2020; SOBRAL et al. 2015).

As espécies da família Myrtaceae são reconhecidas por sua alta produção de polpa, rica em substâncias antioxidantes, gerando frutos comestíveis e exóticos, com valor comercial significativo (BORGES; CONCEIÇÃO; SILVEIRA, 2014; DE SOUZA et al., 2018). As folhas, por sua vez, são consideradas resíduos pelas indústrias, apesar de cerca de 70% das espécies da família possuir atividade biológica e serem utilizadas na medicina tradicional (CALDAS; BAUMGRATZ; DA COSTA SOUZA, 2020; OLIVEIRA et al., 2018; STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011). Assim, destaca-se o potencial aproveitamento do material vegetal para aplicações biotecnológicas, especialmente de espécies pouco visadas, mas de gêneros já relevantes, como o caso da *Eugenia sulcata*.

O gênero *Eugenia*, juntamente com o gênero *Myrcia*, destacam-se como os mais diversos. O gênero neotropical *Eugenia* representa aproximadamente um terço das espécies da família Myrtaceae, com cerca de 1000 espécies distribuídas do sul do México até o norte da Argentina (DE SOUZA et al., 2018). Estima-se que aproximadamente 400 espécies foram catalogadas no Brasil, sendo 300 endêmicas e com maior concentração nas regiões sul e sudeste da Mata Atlântica (SOBRAL et al., 2015).

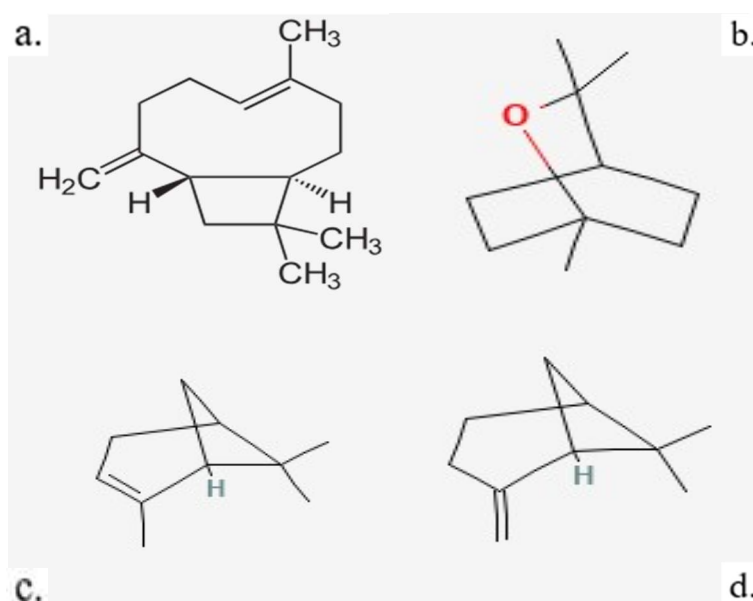
O gênero *Eugenia* é composto por árvores de até 30m e arbustos perenes, com frutos comestíveis, e substrato saprofítico ou terrestre (DE SOUZA et al., 2018). O gênero apresenta, por suas características, significativa importância econômica, com muitas espécies sendo utilizadas na indústria madeireira ou para ornamentação, além das espécies como a *Eugenia uniflora* (pitanga) que são amplamente consumidas, *in natura*, sucos e doces (YOKOMIZO; NAKAOKA-SAKITA, 2014).

Os OE do gênero *Eugenia* apresentam alta diversidade, com mais de 300 substâncias identificadas em mais de 350 espécies (DE SOUZA et al., 2018; STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011). A composição química é caracterizada principalmente pela presença de sesquiterpenos cíclicos, seguido de monoterpenos em menor quantidade, flavonoides e traços de substâncias alifáticas e aromáticas, com fenilpropanoides, triterpenoides e taninos (DE SOUZA et al., 2018; STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011).

A espécie mais pesquisada é a *Eugenia uniflora*, com derivados oxigenados de sesquiterpenos sendo os principais constituintes (49,89%) (LAGO et al., 2011). A substâncias  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -pinene, porém, são os mais abundantes na maioria dos estudos, com o  $\beta$ -cariofileno sendo um marcador importante e majoritário em vários estudos (FEDER et al., 2019; LIMA et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2022).

Dentro das espécies endêmicas do gênero, a *Eugenia sulcata* Spring ex Mart encontra-se especialmente na região sudeste do Brasil e é popularmente conhecida como "murtinha" e "pitangueira silvestre" (SANTOS et al., 2019). A composição química encontrada na literatura é majoritariamente em relação aos OE das folhas da espécie e destaca as substâncias:  $\alpha$ -pineno (16,9-34,2%),  $\beta$ -cariofileno (15-24,6%), 1,8-cineol (19%),  $\beta$ -pineno (10,2-14,5%), globulol (11,8%) e óxido cariofileno (9,8%) (GONZALES et al., 2014; LIMA et al., 2012; RAMOS et al., 2010; SILVEIRA et al., 2021). A biossíntese dos sesquiterpenos está presente na Figura 4 enquanto as estruturas das principais substâncias da espécie encontram-se na Figura 6:

**Figura 6.** Estruturas Moleculares de: a.  $\beta$ -cariofileno; b. 1,8-cineol; c.  $\alpha$ -pineno; d.  $\beta$ -pineno



Fonte: PubChem (2024)

A maioria das substâncias tanto do gênero quanto da espécie apresentam propriedade farmacológicas comprovadas e significativas, como atividades antidiabéticas, antirreumáticas, antidiarreicas, antipiréticas, anti-inflamatórias, antifúngicas, antibacterianas, antioxidantes e citotóxicas (DE SOUZA et al., 2018; STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011).

Estudos recentes têm destacado a atividade antifúngica do gênero e do marcador  $\beta$ -cariofileno, especialmente frente a fungos filamentosos e ao gênero *Aspergillus* (CASTELLANOS et al., 2020; DAHHAM et al., 2015; MAGALHÃES et al., 2022). Ressalta-se assim o potencial da espécie para desenvolvimento de antifúngicos alternativos, tornando interessante o aprofundamento de pesquisas biotecnológicas com tal objetivo.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a suscetibilidade do crescimento e da produção de micotoxinas de cepas de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus westerdjkiae* na presença de derivados vegetais das espécies *Ocotea indecora* e *Eugenia sulcata*.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Extrair e caracterizar quimicamente por CG-MS o óleo essencial a partir das folhas de *O. indecora* e *E. sulcata*;
- b) desenvolver e caracterizar formulações de nanoemulsão a partir dos óleos essenciais obtidos e de suas substâncias majoritárias;
- c) avaliar a viabilidade e crescimento das cepas de *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. westerdjkiae* na presença de diferentes concentrações dos óleos essenciais obtidos, das suas substâncias majoritárias e das nanoemulsões formuladas;
- d) extrair e quantificar as aflatoxinas produzidas por cada uma das colônias de *Aspergillus* na presença dos bioprodutos testados.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. LOCAL

As plantas utilizadas neste estudo foram coletadas no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba na cidade de Carapebus, situada no norte do Estado do Rio de Janeiro.

A extração e desenvolvimento dos derivados foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais (LTPN) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

A composição química dos óleos essenciais foi elucidada no Laboratório da Central Analítica Multiusuário da Faculdade de Farmácia da UFF.

A caracterização das nanoemulsões foi realizada no Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais (LAMATE) do Instituto de Química da UFF e no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LADEG) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

O ensaio biológico foi desenvolvido em parceria com o Núcleo de Toxicologia e Sanidade Animal (NTSA) no Laboratório de Controle Físico-Químico da Faculdade de Veterinária da UFF.

### 4.2. MATERIAIS

#### 4.2.1. Espécies Fúngicas

As cepas utilizadas neste estudo foram *Aspergillus flavus* RC 2054, *A. parasiticus* NRRL 2999 e *A. westerdijkiae* NRRL 3174. Todas são cepas de referência, com a primeira arquivada na Universidade de *Rio Cuarto* na Argentina e as duas seguintes no *ARS Culture Collection* no Estados Unidos da América. As cepas são reconhecidamente produtoras de micotoxinas.

#### 4.2.2. Espécies Vegetais

As folhas frescas de *Ocotea indecora* e *Eugenia sulcata* foram coletadas no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Carapebus, RJ, Brasil. A coleta foi realizada no verão, entre os meses de janeiro e março de 2022. A obtenção e pesquisa do material vegetal foram autorizadas pelo SisBio/ICMBio (13659-14) e SisGen (A0D648D). As espécies foram identificadas pelo botânico Professor Doutor Marcelo Guerra, da Universidade Estadual do Rio

de Janeiro - Faculdade de Formação de Professores (UERJ - FFP). Um espécime foi depositado no herbário da instituição com registro RFFP 16.873 para a *Ocotea indecora* e RFFP 13.788 para a *Eugenia sulcata*.

#### 4.2.3. Produtos

Os tensoativos polissorbato 80 e polissorbato 20, o padrão de  $\beta$ -cariofileno ( $\geq 80\%$ ) e AFB1, e os solventes de grau P.A., CLAE e CG diclorometano, clorofórmio, metanol e acetonitrila foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O dimetilsulfóxido (DMSO) e sulfato de sódio anidro foram obtidos da Vetec (RJ, Brasil). Os meios de cultura Caldo *Sabouraud*, Caldo *Czapek Yeast* e Ágar ágar, foram da marca Kasvi. Água ultrapura e deionizada foram utilizadas para os procedimentos gerais.

### 4.3. MÉTODOS

#### 4.3.1.1. Óleo Essencial

Todos os procedimentos para extração e caracterização dos OE de *O. indecora* e *E. sulcata* foram baseados no descrito por Machado et al. (2023). Para cada espécie, separadamente, folhas frescas (350 g) foram turbolizadas (Spolu-Benese do Brasil Ltda.) com água destilada e, em seguida, adicionadas em balão de fundo redondo de 5,0 L. O balão foi acoplado a um aparato do tipo Clevenger modificado e o material vegetal submetido a hidrodestilação por 4 horas. Os OE foram recolhidos, secos com sulfato de sódio anidro e acondicionados em frascos de vidro âmbar para armazenamento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.3.1.2. Caracterização Química e Quantificação de OE

A identificação química do OE foi realizada por CG-EM nos equipamentos GC-MS QP2010 (Shimadzu, Quioto, Japão) e a quantificação através do GC-2014 (Shimadzu, Quioto, Japão) com detector de ionização por chama (FID).

O OE foi diluído em diclorometano grau CG (1000 ppm) e injetado a  $260\text{ }^{\circ}\text{C}$  em modo *split* 1:40. O arraste foi por gás hélio em fluxo de 1 mL/min. A coluna RTX-5MS (RESTEK, 0.25 mm ID x 30 m x 0.25  $\mu\text{m}$ ) foi usada para separação com forno a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  e aumento de 3

°C/min até 270 °C. A espectrometria de massas foi realizada com uma voltagem de 70 eV e taxa de varredura de 1 scan/s. A análise CG-FID foi semelhante, porém a temperatura do FID foi de 290 °C.

A abundância relativa (%) foi determinada por meio da normalização das áreas de pico obtidas nas análises acima. A identificação das substâncias foi realizada comparando o índice aritmético (IA) das substâncias do OE a partir do tempo de retenção de uma série de n-alcenos (C7-C40), utilizando como bancos de dados ADAMS (2017), PHEROBASE (2020) e o *National Institute of Standards and Technology* (NIST).

#### 4.3.1.3. Nanoemulsão

Todos os procedimentos para formulação e caracterização das NE foram baseados no descrito por Machado et al. (2023). As formulações foram preparadas pelo método de baixa energia com uma massa final de 2 g. A fase oleosa foi composta de OE ou monoterpreno, sendo homogeneizada com surfactantes não iônicos em vórtex (AP56, Phoenix). A fase aquosa utilizada foi água deionizada e gotejada lentamente na fase oleosa sob homogeneização contínua. Após preparadas, as NE foram armazenadas em frascos de vidro âmbar (5 mL) a temperatura ambiente (25 °C).

A NE de OE de *O. indecora* foi composta por 96% (p/p) de água destilada, 2% (p/p) de OE e 2% (p/p) dos surfactantes polissorbato 20 e monooleato de sorbitano 80 em proporção 4:1, sendo está uma formulação já otimizada para a composição química do OE (MACHADO et al, 2023). Já as formulações de OE de *E. sulcata* e sua substância majoritária,  $\beta$ -cariofileno, foram compostas de 90% (p/p) de água deionizada e 10% (p/p) de fase oleosa, utilizando polissorbato 20 ou 80, cuja relação surfactante-óleo foi avaliada em diferentes proporções (5:5 → 9:1) de forma a determinar a formulação mais adequada.

#### 4.3.1.4. Caracterização Físico-Química de NE

Após avaliação macroscópica relacionada à transparência, translucidez e presença de cremeamento e/ou separação de fases, as NE foram diluídas em água destilada e passaram por análises de tamanho de gotícula (nm), potencial zeta (PZ) e índice de polidispersão (IPd) por Espalhamento Dinâmico da Luz (EDL) em um *Zetasizer Advance Lab Blue* (Malvern Instruments®, Worcestershire, UK) e *Nanosizer S90* (Malvern, UK).

Após análise dos parâmetros, foram selecionadas as formulações de OE de *E. sulcata* e  $\beta$ -Cariofileno que apresentaram tamanho de partícula < 200 nm e índice de polidispersão < 0,3 para dar continuidade nos estudos de bioatividade.

A nanoemulsão de *O. indecora* foi submetida a ensaio de estresse térmico utilizando os parâmetros acima e com incremento 10 °C entre as análises, até alcançar 65 °C.

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.3.2. Avaliação Antifúngica

##### 4.3.2.1. Condições de Cultivo

Os métodos e concentrações preconizados para avaliação fungicida e fungistática deste projeto foram adaptados da metodologia descrita em Rodrigues et al., (2019).

Todos os bioativos foram previamente esterilizados através da combinação de microfiltração por membrana filtrante (0,45  $\mu$ m) e irradiação com luz ultravioleta (365 nm) por 15 minutos. O método foi utilizado devido às propriedades intrínsecas das substâncias presentes nos derivados vegetais, sujeitas a degradação em altas temperaturas.

Inóculos de 10  $\mu$ L da suspensão de conídios a  $10^6$  UFC/mL de cada cepa fúngica foram realizados em placas sem aditivos para incubados a  $27,5 \pm 2,0$  °C por 5 dias (120 horas) com cinco medições diárias do diâmetro das colônias de forma a representarem um grupo controle. O DMSO puro também foi adicionado no meio de cultura em ambas as concentrações de trabalho, seguido do inóculo, incubação e as medições no mesmo protocolo estabelecido. O mesmo foi feito para a nanoemulsão formulada sem o OE.

O OE e o  $\beta$ -Cariofileno foram diluídos em DMSO 10% e testado na concentração de 4096  $\mu$ g/mL para a *O. indecora* e 1024  $\mu$ g/mL para a *E. sulcata* e o  $\beta$ -Cariofileno. As nanoemulsões feitas a partir destes princípios ativos foram aplicadas diretamente sem diluição ao meio de cultura nas concentrações de 256; 512; 1024 e 2048  $\mu$ g/mL. Após difusão completa no meio, foram feitos os inóculos e procedimentos como o protocolo estabelecido

##### 4.3.2.2. Avaliação do Crescimento

O diâmetro das colônias foi medido cinco vezes ao dia durante cinco dias. Os valores Percentuais de Inibição do Crescimento em Diâmetro (PICD) foram determinados de acordo com a equação abaixo:



$$\text{PICD (\%)} = 100 \times \frac{(\text{Diâmetro do controle} - \text{Diâmetro da amostra})}{\text{Diâmetro do controle}}$$

#### 4.3.2.3. Avaliação Morfológica

Para cada colônia observada foi coletado um pedaço de 1 mm. As amostras foram dispostas em lâminas próprias para microscópio óptico com uma gota de água destilada e fixadas com a lamínula. As lâminas foram observadas em microscópio ótico Nikon ALPHAPHOT-2 YS2-H em um aumento de 1000x (ZULKIFLI., 2015).

#### 4.3.2.4. Extração de Micotoxinas

As colônias passaram por extração de aflatoxina segundo Geissen (1996). Foram retirados três pontos de aproximadamente 1 mm de diâmetro de cada replicata com crescimento fúngico para serem adicionados em tubo de centrífuga do tipo eppendorf. As análises foram realizadas em triplicata.

Em cada tubo foi adicionado 1,0 mL de clorofórmio para, em seguida, serem centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos. Após a separação foi retirada a fase líquida para secagem em criotubo. Os resíduos foram ressuspensos com 1,0 mL de metanol 70% para quantificação por CLAE.

#### 4.3.2.5. Quantificação de Micotoxinas

A quantificação utilizou a coluna HPLC RP18 Capital® (250 mm × 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel foi a mistura de acetonitrila:metanol:água-milli-Q (35:25:50 v/v/v) em eluição isocrática e fluxo de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 50 µL e a temperatura do forno foi 35 °C. O detector de fluorescência (Shimadzu) teve comprimento de onda de excitação de 365 nm e emissão de 445 nm. A curva de calibração de padrão de AFB1 foi na faixa de 1 a 100 µg/mL. O tempo de retenção foi de 5,5 min, com Limite de Detecção (LdD) 0,0025 ng/mL e Limite de Quantificação (LdQ) 1,15 ng/mL.

### 4.3.3. Análise Estatística

A avaliação dos dados foi realizada por Análise de Variância (ANOVA). O teste de Tukey foi utilizado com nível de significância de  $p < 0,05$  para comparação dos dados nas diferentes apresentações e concentrações dos produtos avaliados, considerando a variação de tempo de incubação e crescimento. As análises foram conduzidas usando o programa computacional *GraphPad Prism* (versão 8).

## 5. DESENVOLVIMENTO

### 5.1. ARTIGO 1

Characterization and Inhibitory Effects of Essential Oil and Nanoemulsion from *Ocotea indecora* (Shott) Mez in *Aspergillus* Species

Pinto, L.d.A.; Machado, F.P.; Esteves, R.; Farias, V.M.; Köptcke, F.B.N.; Ricci-Junior, E.; Rocha, L.; Keller, L.A.M. Characterization and Inhibitory Effects of Essential Oil and Nanoemulsion from *Ocotea indecora* (Shott) Mez in *Aspergillus* Species. **Molecules** 2023, 28, 3437. <https://doi.org/10.3390/molecules28083437>

Publicado: 13 de abril de 2023

#### Abstract

The *Aspergillus* genus, the etiological agent of aspergillosis, is an important food contaminant and mycotoxin producer. Plant extracts and essential oils are a source of bioactive substances with antimicrobial potential that can be used instead of synthetic food preservatives. Species from the Lauraceae family and the *Ocotea* genus have been used as traditional medicinal herbs. Their essential oils can be nanoemulsified to enhance their stability and bioavailability and increase their use. Therefore, this study sought to prepare and characterize both nanoemulsion and essential oil from the *Ocotea indecora*'s leaves, a native and endemic species from the Mata Atlântica forest in Brazil, and evaluate the activity against *Aspergillus flavus* RC 2054, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, and *Aspergillus westerdijkiae* NRRL 3174. The products were added to Sabouraud Dextrose Agar at concentrations of 256, 512, 1024, 2048, and 4096 µg/mL. The strains were inoculated and incubated for up to 96 h with two daily measurements. The results did not show fungicidal activity under these conditions. A fungistatic effect, however, was observed. The nanoemulsion decreased the fungistatic concentration of the essential oil more than ten times, mainly in *A. westerdijkiae*. There were no significant changes in aflatoxin production.

**Keywords:** Flavi section; fungistatic; aflatoxin; natural products; sesquirosefuran; sesquiterpenes

## 1. Introduction

One of the most critical problems reported in human history is hunger. Even with all the breakthroughs and innovations since the implementation of agriculture, it was not enough to free us from this malady. In 2022, almost 830 million people, about 10% of the global population, suffered from hunger [1].

The Food and Agriculture Organization (FAO) estimates that up to 25% of the world's cereal grains are contaminated by fungi and/or mycotoxins in the field or during storage [2,3], leading to a mass wastage of food.

Members of the genus *Aspergillus* spp. have the strongest ecological link to the human food supply [4]. The genus presents a worldwide distribution, with 339 species [5], divided into sections and clades. The clade *A. flavus*, in section Flavi, is important for containing the most common agents of superficial and invasive aspergillosis [6].

The species of the *A. flavus* clade are still linked to the production of mycotoxins, secondary metabolites with harmful toxic effects on animals and humans [7]. The main mycotoxins produced by fungi of the genus *Aspergillus* spp. are aflatoxins (AF) and difuranocoumarins, with rigid and flat structures that form the four major substances: B1, B2, G1, and G2 [8]. This chemical stability gives them high resistance to heat treatments, extreme pH values, high pressures, and food-grade chemical treatments [9], making them also detectable at various levels of the production chain [7].

The ingestion of AFB1 can lead to acute conditions associated with cellular damage and metabolism disruption. Chronic conditions can cause damage to the metabolization organs, especially those related to nephrotoxicity and hepatotoxicity, including oncogenesis [10,11]. Such hazardous substance, as expected, has a strict limit for concentrations in each medium, particularly for food supplies. The limits are determined by legislation worldwide and vary for each country. The Brazilian legislation, aligned with the MERCOSUL designations, established similar limits to the most accepted international recommendations, the ones in the *Codex Alimentarius* [12]. The limits range from 5 to 20 µg/kg, except for those outlined for children, with a limit of 1 µg/kg [13].

Inhibiting the growth and mycotoxin production of the food-related strains, therefore, shows itself as an essential strategy to combat worldwide hunger and is a matter of public health. These issues interconnect with the United Nations 17 Sustainable Development Goals for 2030, principally goals 2 and 3, respectively, “Zero Hunger” and “Good Health and Well-Being” [14].

Fungal and aflatoxin contamination can occur before, during, or after harvest, especially during storage and processing. Methods for preventing contamination can be divided into pre-harvest, harvest, and post-harvest strategies [15].

Pre-harvest factors include seed and cultivation conditions and the prevention of fungal infestations, considering environmental factors that influence infection [16]. Most of the threats, however, are post-harvest factors. These range from harvesting patterns to transport to the consumer, with a particular focus on storage [15]. About 25% of harvested fruits and vegetables are lost due to diseases, mainly caused by fungi. Although more severe in developing countries, it is not insignificant in developed countries, as the annual economic loss of the United States is around US\$ 1 billion [16].

The usual method to prevent fungal contaminations in pre- and post-harvest is using chemical additives. The environmental and human health impact and the possible development of new resistant strains have forced the industry to seek new strategies as “clean label” alternatives [17].

Products extracted from plants and their formulations are mainly classified by the Food and Drug Administration (FDA) as Generally Recognized as Safe (GRAS) [18]. These products can be used in Europe and the USA as antimicrobial agents in pre- and post- harvest and food and feed additives, with a wide acceptance by consumers [19].

Among the plant-based products that can be obtained, essential oils (EO) are an option with proven methodologies and recognized potential, aiming to isolate the volatile chemicals found in low concentrations in plants. EOs stand out among plant derivatives because they often present biological activity [20]. In addition, they can be used in formulations such as nanoemulsions (NE), that may enhance their properties.

Nanoemulsions, like traditional emulsions, are dispersions of one immiscible liquid in another. Both are kinetically stable, but thermodynamically unstable systems. To reduce the natural tendency of phase separation by creaming, flocculation, coalescence, or Ostwald ripening, surfactants are ordinarily used to decrease the interfacial tension and improve the long-term stability of the nanodispersions [21].

The principal difference between nanoemulsion and traditional emulsion is that nanoemulsion droplets are on a nanometer scale, between 20 and 200 nm. Another difference is the translucent monophasic appearance, often with the bluish color of the Tyndall optical effect of light dispersion [22].

The conventional applicability of nanoemulsions is to enable oily phases, such as essential oils, in aqueous matrices. Recently, nanoemulsified essential oils have been

spotlighted for developing new antimicrobial products [23]. They are a promising tool for antimicrobial delivery, and among the advantages are bioavailability enhancement, increased stability, a larger surface area, and improved bioactivity, allowing more effective interactions with microorganisms [24,25].

*Ocotea indecora* (Lauraceae) is a native endemic plant from Brazil. Species from this family and genus have been used as traditional medicinal herbs. Regarding *Ocotea* genus, they present several groups of secondary metabolites recognized in the literature, especially steroids, terpenoids, and alkaloids [26]. This plant species is found in the remaining Mata Atlântica forest in Brazil's south and southeast regions, especially in the sandbank areas of Rio de Janeiro state [27]. However, the coastal ecosystem where most of the current population resides is the highest deforested biome in the country, having less than 7% of its original area [28]. The devastation associated with the endemic nature of the species highlights the urgency and importance of its study.

The main metabolite related to the *Ocotea indecora*'s essential oil from leaves is the furanosesquiterpene sesquirosefuran. Even though most of the reports are about insecticidal effects [29–31], furanosesquiterpenes have several activities recognized in the literature as antioxidant, herbicidal, antibacterial, chemo-preventive agents, and principally for this study, antifungal [32,33]. Thus, essential oils and their possible effects are important research proposals for the biotechnological development of sustainable products.

The objectives of this work were to evaluate the effectiveness of the *O. indecora* leaves' essential oil and nanoemulsion on the growth of *A. flavus* (RC 2054), *A. parasiticus* (NRRL 2999), and *A. westerdjkiae* (NRRL 3174), and the inhibition of aflatoxins.

## 2. Results

### 2.1. Essential Oil Extraction and Chemical Characterization

The EO yielded 0.4% and allowed the identification of three substances, totaling 91.93% of the oil (Table 1). The sesquirosefuran (86.13%) was widely predominant, followed by the sesquiterpenes hydrocarbons: (*Z*)- $\beta$ -farnesene (3.33%) and allo-aromadendrene (1.55%).

**Table 1.** Chemical characterization of the EO by GC-MS and GC-FID.

	RT	AI <sub>exp</sub>	AI	Substances	%
1	26.970	1448	1440	(Z)-β-Farnesene a	3.33965
2	27.323	1457	1458	allo-Aromadendrene a	1.55898
3	30.802	1545	1549	Sesquirosefuran b	86.13331
				Total identified	91.03194
				Sesquiterpene hydrocarbons	04.89863
				Sesquiterpene oxygenated	86.13331

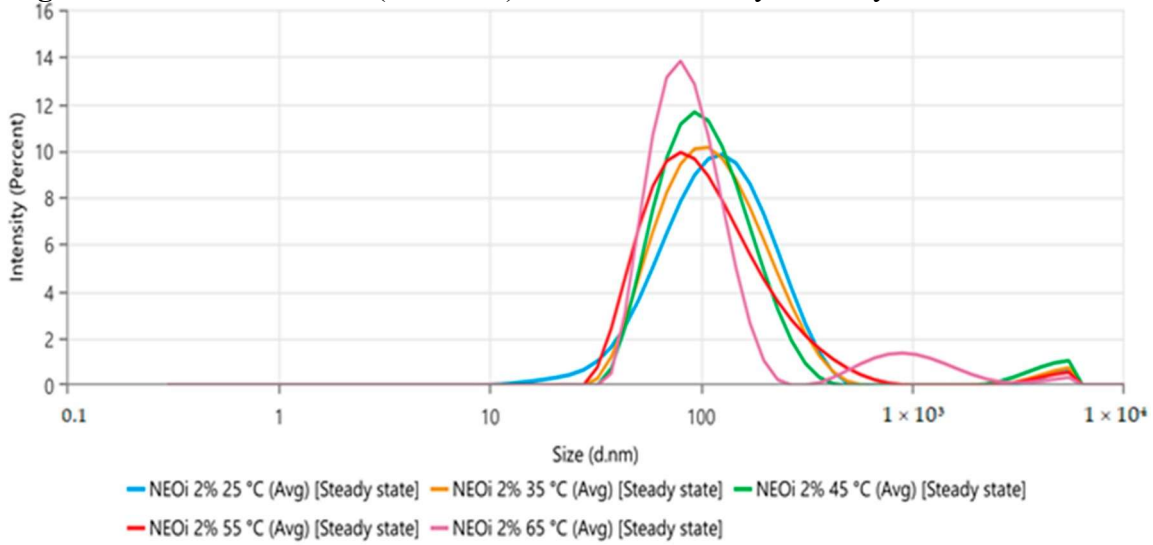
RT: retention index; AI: arithmetic index; AI<sub>exp</sub>: arithmetic index calculated; a - Identified from Adams [34]. b - Identified from Pherobase (El-Sayed) [35].

## 2.2. Nanoemulsion Preparation, Characterization, and Thermal Stress Stability

The NE presented a white-bluish coloration (Figure 1), and the dynamic light scattering (DLS) analysis showed a mean droplet size (nm) of  $103.4 \pm 0.9$ . The polydispersity index (PdI) was  $0.268 \pm 0.010$ , and the zeta potential was  $32.83 \pm 0.8208$  after preparation at room Temperature (25 °C). The thermal stress stability of the nanoemulsion was realized initially at room temperature (25 °C) and increased to 65 °C at 10 °C/analysis. The size distribution by intensity represented in Figure 2 shows no relevant alterations in the nanoemulsion's stability, while the droplet size and PdI values at each temperature can be seen in Table 2, showing statistical differences above 35 °C. After the thermal stress, no macroscopic changes were observed and the droplet size was  $89.38 \pm 2.153$ , the PdI was  $0.246 \pm 0.003$ , and the zeta potential was  $-34.85 \pm 0.5284$ .



**Figure 1.** Nanoemulsion: bluish-white color characteristic of the Tyndall effect with 2% of NE.

**Figure 2.** NE thermal stress (25–65 °C) size distribution by intensity.**Table 2.** NE mean size and PDI values from the thermal stress stability study (25–65 °C).

Temperature (°C)	Average Size (nm)	Polydispersity Index
25	103.40 ± 0.90	0.239 ± 0.010
35	102.90 ± 0.519	0.247 ± 0.015
45	98.97 ± 0.312 *	0.241 ± 0.018
55	91.58 ± 0.515 *	0.252 ± 0.009
65	89.38 ± 2.15 *	0.246 ± 0.003

\* The values were recognized as statistically significant at a confidence interval of 95%.

### 2.3. Inhibitory Effects on *Aspergillus* Strains

#### 2.3.1. *Aspergillus flavus*

The effects of the EO at 4096 µg/mL and the NE at 256, 512, 1024, and 2048 µg/mL on the growth of the *A. flavus* strain are presented in Table 3.



**Table 3.** Diameter (mm) of *A. flavus* colonies in the presence of EO and NE at 48, 72, and 96 h.

<b>Bioproduct</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>	<b>96 h</b>
Control	20.90 ± 1.838	32.75 ± 3.942	43.35 ± 3.470
EO 4096 µg/mL	17.20 ± 3.960	32.90 ± 0.990	42.30 ± 2.121
NE 256 µg/mL	20.00 ± 1.212	31.90 ± 2.402	43.30 ± 1.900
NE 512 µg/mL	18.50 ± 1.769	30.60 ± 1.200	42.30 ± 1.513
NE 1024 µg/mL	16.50 ± 0.854	28.50 ± 1.114	40.00 ± 1.682
NE 2048 µg/mL	15.00 ± 2.287 *	28.50 ± 2.921	37.80 ± 3.651

\* The values were recognized as statistically significant at a confidence interval of 95%.

The colonies developed in the presence of the EO and the NE, demonstrating no fungicidal activity at the tested concentrations. The EO also showed no significant reduction ( $p > 0.05$ ) compared to the control groups, evidencing no fungistatic activity.

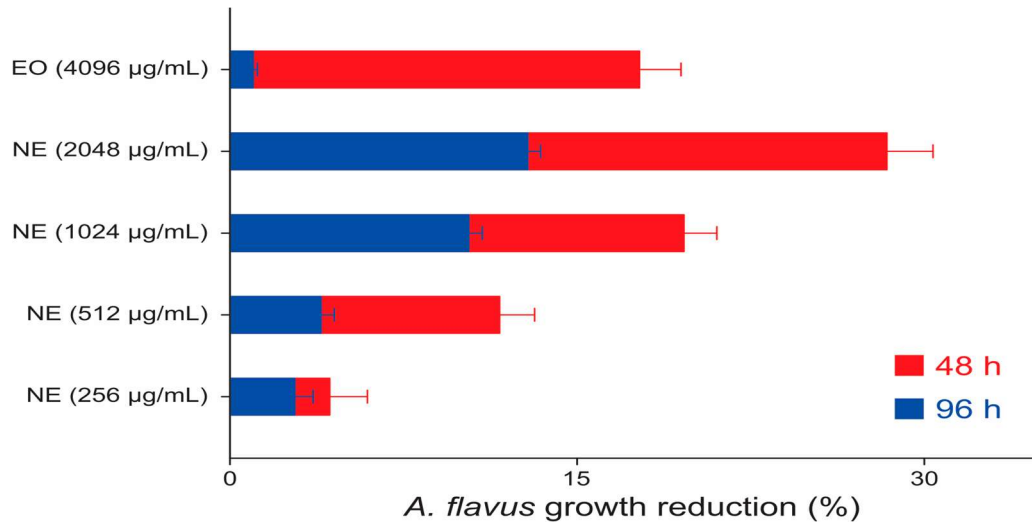
As seen in Table 3, there was only a significant reduction up to 48 h ( $df = 5$ ;  $F = 4.11$ ;  $p = 0.021$ ), but only for the NE in the concentration of 2048 µg/mL ( $p = 0.020$ ). The statistical analysis for the 48 h incubation is shown in Table 4. No statistical significance was observed for the 72 h ( $p = 0.210$ ) and 96 h ( $p = 0.135$ ) incubations.

**Table 4.** One-way ANOVA between *A. flavus* colonies with or without the EO and the NE.

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b><i>p</i></b>	<b><i>q</i></b>	<b><i>p</i></b>
Control 48 h vs. EO	3.700	6	3.055	0.322
Control 48 h vs. 2048 ppm	5.900	6	5.524	0.020 *
Control 48 h vs. 1024 ppm	4.400	6	4.119	0.104
Control 48 h vs. 512 ppm	2.400	6	2.247	0.620
Control 48 h vs. 256 ppm	0.900	6	0.843	0.989

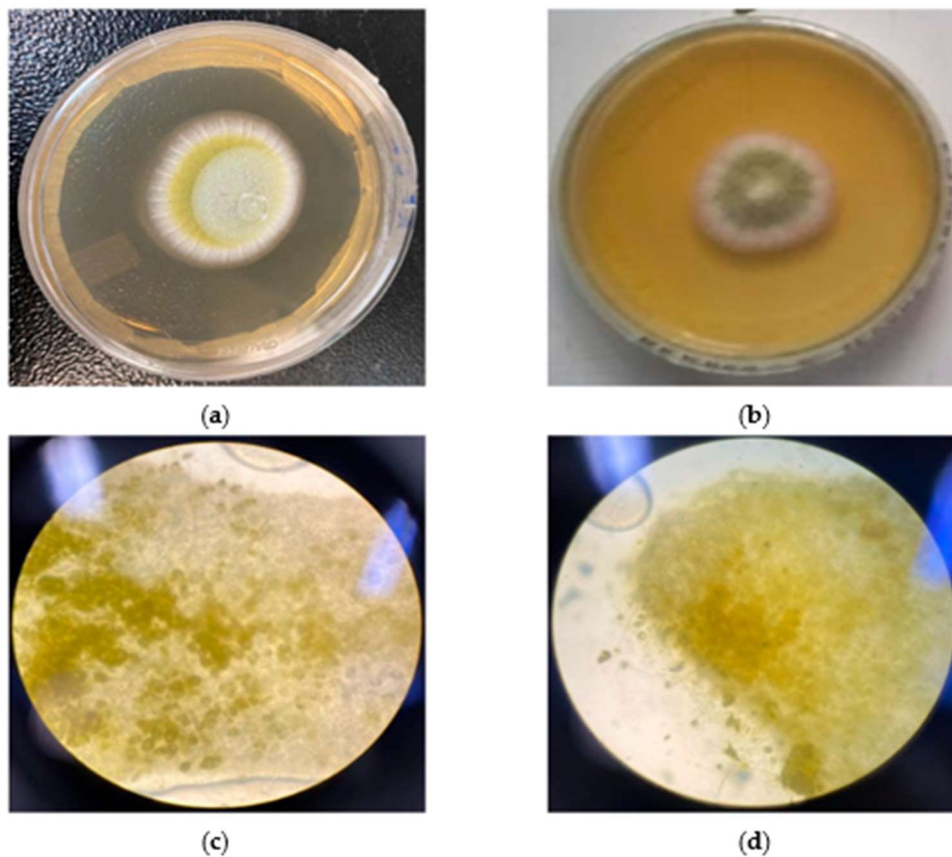
\* The values were recognized as statistically significant at a confidence interval of 95%.

The percentages of reductions are shown in Figure 3, demonstrating the intensity and duration of the effects correlated to the tested concentrations. The highlight is the only significant inhibition that reached a 28.20% reduction in the colony diameter.



**Figure 3.** Inhibition of the *A. flavus* colonies by the concentrations of EO and NE at 48 and 96 h.

Figure 4 compares the control colony and the colony with NE at 2048 µg/mL, showing a significant result. The photos were taken with a 48 h growth time and no difference was observed in either the macroscopic or microscopic morphology.



**Figure 4.** Macroscopic and microscopic comparison between the control colony and the colony with the NE at 2048 µg/mL at 48 h: (a) *A. flavus* colony, (b) *A. flavus* colony in the presence

of the NE at 2048  $\mu\text{g/mL}$ , (c) microscopy of *A. flavus*, and (d) microscopy of *A. flavus* in the presence of the NE at 2048  $\mu\text{g/mL}$ .

The mycotoxicological analysis, on average, showed that the production in all concentrations of the bioproduct did not show a difference with the control groups. The results are shown in Table 5.

**Table 5.** AFB1 production by *A. flavus* colonies in the presence of EO and NE at 48, 72, and 96 h.

Bioproduct	Concentration*
Control	$9.06 \pm 1.50 \mu\text{g/kg}$
EO 4096 $\mu\text{g/mL}$	$9.81 \pm 1.09 \mu\text{g/kg}$
NE 256 $\mu\text{g/mL}$	$9.79 \pm 1.07 \mu\text{g/kg}$
NE 512 $\mu\text{g/mL}$	$9.55 \pm 1.61 \mu\text{g/kg}$
NE 1024 $\mu\text{g/mL}$	$9.48 \pm 1.72 \mu\text{g/kg}$
NE 2048 $\mu\text{g/mL}$	$9.38 \pm 1.52 \mu\text{g/kg}$

\* No significant difference observed in the Tukey's test ( $p > 0.05$ ) for the different concentrations.

### 2.3.2. *Aspergillus parasiticus*

The trials' results are shown in Table 6, demonstrating the effects of the EO at 4096  $\mu\text{g/mL}$  and the NE at 256, 512, 1024, and 2048  $\mu\text{g/mL}$  on the *A. parasiticus*' growth.

**Table 6.** Diameter (mm) of *A. parasiticus* colonies in the presence of the EO and the NE at 48, 72, and 96 h.

Bioproduct	48 h	72 h	96 h
Control	$21.75 \pm 2.453$	$35.60 \pm 4.510$	$45.30 \pm 6.056$
EO 4096 $\mu\text{g/mL}$	$18.20 \pm 0.141$	$31.40 \pm 2.828$	$41.30 \pm 3.110$
NE 256 $\mu\text{g/mL}$	$19.20 \pm 1.852$	$32.30 \pm 3.676$	$43.10 \pm 3.105$
NE 512 $\mu\text{g/mL}$	$17.10 \pm 3.804$	$28.20 \pm 4.518$	$42.40 \pm 1.952$
NE 1024 $\mu\text{g/mL}$	$16.20 \pm 1.735$ *	$28.10 \pm 2.797$	$38.50 \pm 2.835$
NE 2048 $\mu\text{g/mL}$	$13.30 \pm 1.873$ *	$27.90 \pm 3.579$	$37.90 \pm 1.411$

\* The values were recognized as statistically significant at a confidence interval of 95%.

The colonies showed growth in the presence of the EO at 4096  $\mu\text{g/mL}$ , and compared to the control groups, showed no significant difference ( $p > 0.05$ ). This demonstrates the essential oil concentration's lack of fungicidal and fungistatic activity.

The growth of colonies in the presence of the NE showed no fungicidal activity and no significant effects were observed at both 72 h ( $p = 0.093$ ) and 96 h ( $p = 0.164$ ) of incubation. However, inhibition was observed in the first 48 h ( $\text{df} = 5$ ;  $F = 9.96$ ;  $p < 0.001$ ).

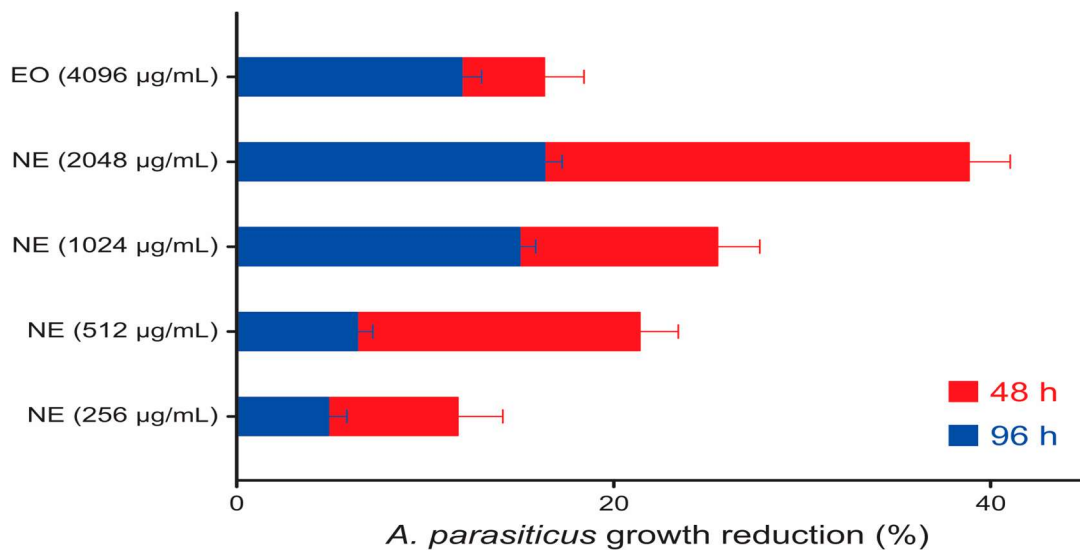
While the NE concentrations of 256 and 512  $\mu\text{g/mL}$  showed no effects even at 48 h, in the 1024 and 2048  $\mu\text{g/mL}$  concentrations, a significant reduction in colonies' growth was observed in the timeframe ( $p = 0.003$  and  $p < 0.001$ , respectively), as shown in Table 7.

**Table 7.** One-way ANOVA between *A. parasiticus* colonies after 48 h of incubation with the EO and the NE.

Comparison	Diff of Means	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>p</i>
Control 48 h vs. EOOi	0.392	6	2.932	0.361
Control 48 h vs. 2048 ppm	1.017	6	8.627	<0.001 *
Control 48 h vs. 1024 ppm	0.844	6	7.159	0.003 *
Control 48 h vs. 512 ppm	0.333	6	2.827	0.396
Control 48 h vs. 256 ppm	0.280	6	2.373	0.569

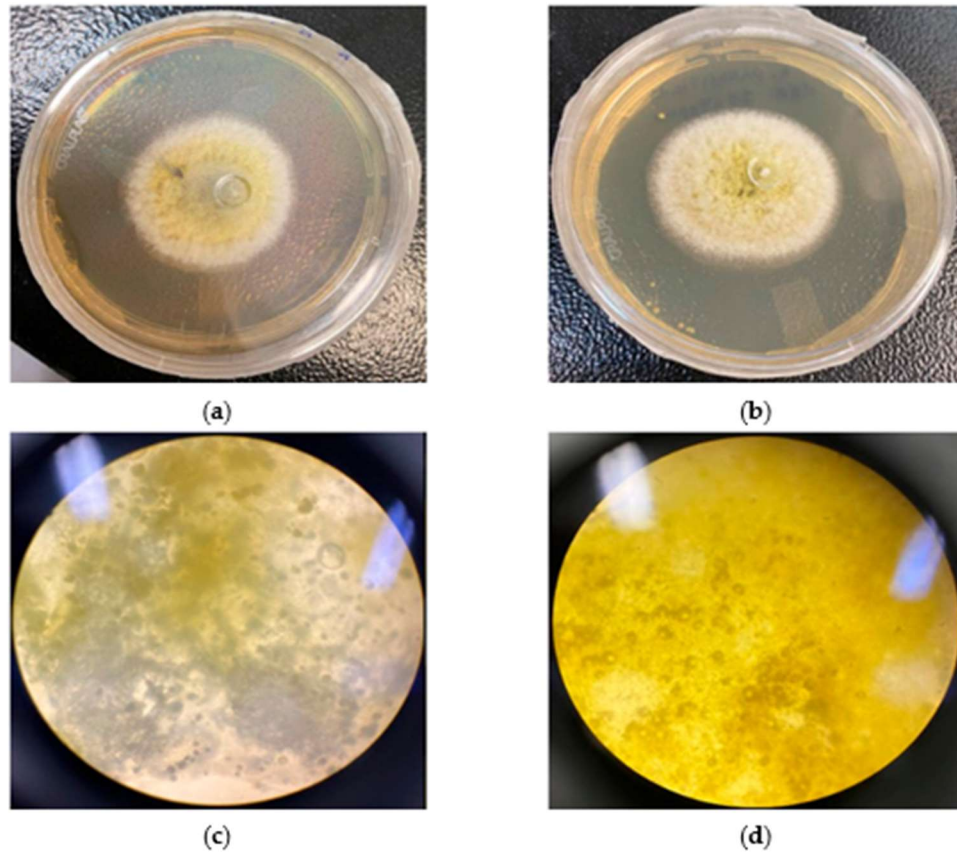
\* The values were recognized as statistically significant at a confidence interval of 95%.

The duration and intensity of the effects are shown in Figure 5, especially the NE at 1024  $\mu\text{g/mL}$  and 2048  $\mu\text{g/mL}$ , which reached, respectively, 25.5% and 38.9% of inhibition.



**Figure 5.** Inhibition of the *A. parasiticus* colonies by a concentration of the EO and the NE at 48 and 96 h.

The macroscopic and microscopic comparisons of the control colonies with the colonies in the presence of the NE at 2048  $\mu\text{g/mL}$  at 48 h are shown in Figure 6, but no relevant morphological differences could be seen.



**Figure 6.** Macroscopic and microscopic comparison between the control colony and the colony with the NE at 2048  $\mu\text{g/mL}$  at 48 h: (a) *A. parasiticus* colony, (b) *A. parasiticus* colony in the presence of the NE at 2048  $\mu\text{g/mL}$ , (c) microscopy of *A. parasiticus*, and (d) microscopy of *A. parasiticus* in the presence of the NE at 2048  $\mu\text{g/mL}$ .

The AFB1 detection for all concentrations of the bioproduct again showed no activity compared to the controls. The quantification is shown in Table 8.

**Table 8.** AFB1 production by *A. parasiticus* colonies in the presence of EO and NE at 48, 72, and 96 h.

<b>Bioproduct</b>	<b>Concentration *</b>
Control	31.71 ± 4.67 µg/kg
EO 4096 µg/mL	36.24 ± 5.35 µg/kg
NE 256 µg/mL	33.81 ± 4.28 µg/kg
NE 512 µg/mL	33.67 ± 3.64 µg/kg
NE 1024 µg/mL	31.88 ± 2.36 µg/kg
NE 2048 µg/mL	30.14 ± 3.64 µg/kg

\* No significant difference observed in the Tukey's test ( $p > 0.05$ ) for the different concentrations.

### 2.3.3. *Aspergillus westerdjikiae*

Table 9 shows the effects on the growth of the *A. westerdjikiae* strain caused by the EO at 4096 µg/mL and the NE at 256, 512, 1024, and 2048 µg/mL.

**Table 9.** Diameter (mm) of *A. westerdjikiae* colonies in the presence of the EO and the NE at 48, 72, and 96 h.

<b>Bioproduct</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>	<b>96 h</b>
Control	11.90 ± 0.779	20.20 ± 1.922	31.00 ± 1.858
EO 4096 µg/mL	9.80 ± 0.990	20.20 ± 1.556	29.20 ± 1.273
NE 256 µg/mL	6.60 ± 1.735 *	16.50 ± 2.227	25.10 ± 3.509
NE 512 µg/mL	6.40 ± 1.682 *	16.30 ± 1.744	24.20 ± 3.064
NE 1024 µg/mL	6.30 ± 1.539 *	15.60 ± 1.800 *	21.80 ± 2.987 *
NE 2048 µg/mL	3.70 ± 2.894 *	11.20 ± 3.764 *	18.70 ± 4.414 *

\* The values were recognized as statistically significant at a confidence interval of 95%.

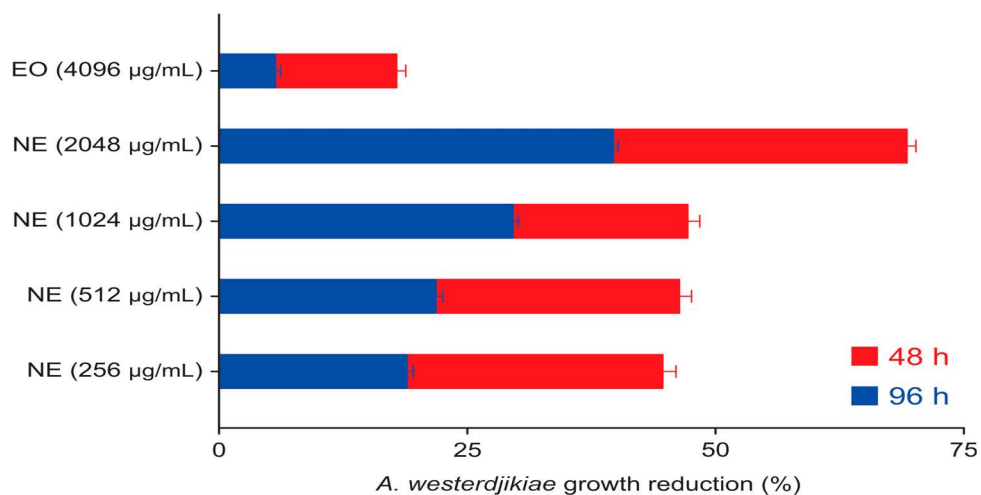
The growth of the control groups and the EO at 4096 µg/mL showed no significant difference ( $p > 0.05$ ) in the tested strain, indicating no fungicidal or fungistatic effect caused by the concentration of the tested EO. The NE in all concentrations also demonstrated a lack of fungicidal activity, but it did show fungistatic activity, as seen in Table 10.

**Table 10.** One-way ANOVA between *A. westerdijkiae* colonies with the EO and the NE in all incubation periods.

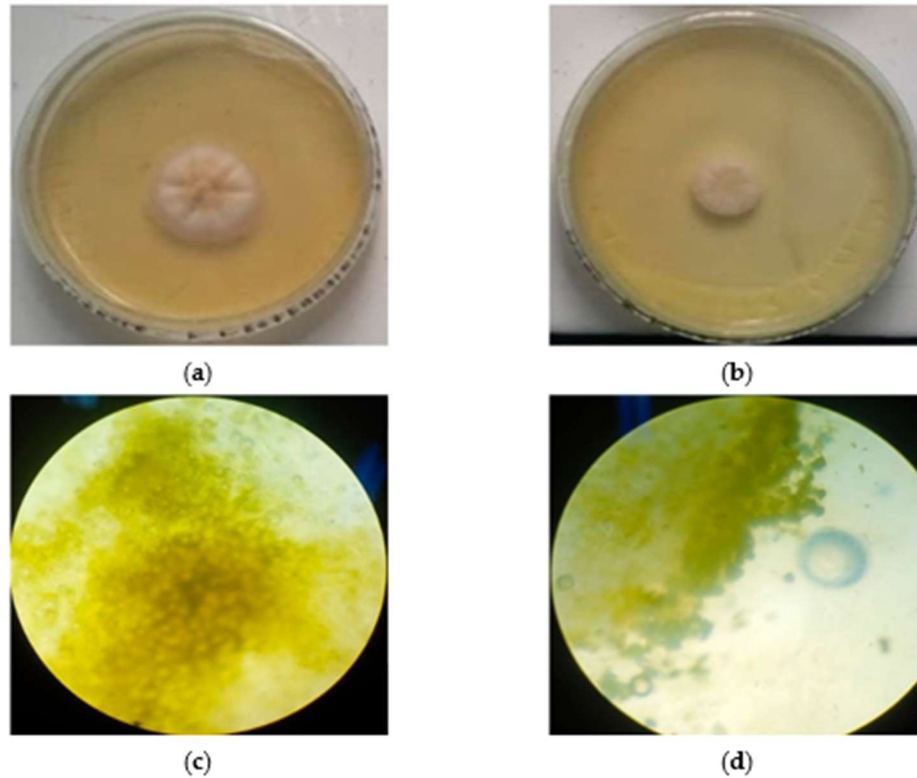
Comparison	48 h				72 h				96 h			
	Diff of Means	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>p</i>	Diff of Means	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>p</i>	Diff of Means	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>p</i>
Control vs. EOOi	2.100	6	1.989	0.723	3.553	6	2.506	1.000	1.775	6	0.947	0.982
					$10^{-15}$		$10^{-15}$					
Control vs. 2048 ppm	8.200	6	8.805	<0.001 *	9.000	6	7.198	0.003 *	12.275	6	7.422	0.002 *
Control vs. 1024 ppm	5.600	6	6.013	0.011 *	4.600	6	3.679	0.035 *	9.175	6	5.548	0.019 *
Control vs. 512 ppm	5.500	6	5.906	0.013 *	3.900	6	3.119	0.303	6.775	6	4.097	0.107
Control vs. 256 ppm	5.300	6	5.691	0.016 *	3.700	6	2.959	0.352	5.875	6	3.552	0.195

\* The values were recognized as statistically significant at a confidence interval of 95%.

In the first 48 h, all concentrations led to a significant reduction ( $df = 5$ ;  $F = 9.53$ ;  $p < 0.001$ ), approximately 44% to 48%, except the concentration of 2048  $\mu\text{g/mL}$  that reached 69% inhibition. The reduction by NE at 512 and 256  $\mu\text{g/mL}$  decreased to nearly 20% after 48 h, while the 1024  $\mu\text{g/mL}$  and 2048  $\mu\text{g/mL}$  concentrations remained significant at 72 h ( $df = 5$ ;  $F = 6.28$ ;  $p = 0.004$ ) and 96 h ( $df = 5$ ;  $F = 7.03$ ;  $p = 0.003$ ), when they decreased to, respectively, 29.6% and 39.7% inhibition. All the reductions are graphically demonstrated in Figure 7.

**Figure 7.** Inhibition of the *A. westerdijkiae* colonies by a concentration of EO and NE at 48 and 96 h.

The photos in Figure 8 compare the colonies after 48 h of incubation in the presence of the NE at 2048  $\mu\text{g/mL}$  with the control colonies. The macroscopic and microscopic morphological comparison showed no observable difference.



**Figure 8.** Macroscopic and microscopic comparison between the colonies with or without the NE at 2048  $\mu\text{g/mL}$  at 48 h: (a) *A. westerdijkiae* colony, (b) *A. westerdijkiae* colony in the presence of the NE at 2048  $\mu\text{g/mL}$ , (c) microscopy of *A. westerdijkiae*, and (d) microscopy of *A. westerdijkiae* in the presence of the NE at 2048  $\mu\text{g/mL}$ .

As for the production of mycotoxins, the average of each strain in the presence of the products had no observable effects compared to the control production. The analysis outcome is demonstrated in Table 11.



**Table 11.** AFB1 production by *A. westerdijkiae* colonies in the presence of EO and NE at 48, 72, and 96 h.

Bioproduct	Concentration *
Control	15.79 ± 3.18 µg/kg
EO 4096 µg/mL	16.09 ± 2.86 µg/kg
NE 256 µg/mL	15.59 ± 2.54 µg/kg
NE 512 µg/mL	14.83 ± 2.73 µg/kg
NE 1024 µg/mL	13.92 ± 2.54 µg/kg
NE 2048 µg/mL	13.52 ± 2.48 µg/kg

\* No significant difference observed in the Tukey's test ( $p > 0.05$ ) for the different concentrations.

### 3. Discussion

The essential oil from the leaves of *O. indecora* showed approximately 86% of sesquirosefuran, corroborating with the *O. indecora* chemical profile and sesquirosefuran amount (88–92%) described previously by other authors [29,31].

The sesquirosefuran is a furanosesquiterpene registered under CAS number 39007-93-7, with the molecular formula C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O and a molecular weight of around 218 u [36]. It has a log *p* of 5.847 and a TPSA equal to 13.140; then, according to the Pfizer Rule, it is likely to be toxic, especially as an inhibitor of some CYP family enzymes and a probable human hepatotoxic substance. The sesquirosefuran, however, is unlikely to cause severe skin, respiratory, and eye damage [37].

In this way, it is possible that the bioproduct can be used as an external preservative, as long as it does not involve direct consumption, and reinforcing that it is important to choose carefully where to use it in order not to cause unwanted damage to fauna, flora, and workers.

The sesquirosefuran has few reports about the molecule bioactivity, mainly insecticide activity [29,31], and none related to its antifungal potential. Sesquiterpenes and furanosesquiterpenes, in turn, have several recognized activities, and among them, Marongiu et al. [33] demonstrated activity against several *Aspergillus* sp. by essential oils rich in furanosesquiterpenes.

The furanosesquiterpenes action mechanisms are not yet fully elucidated, but several studies describe antifungal effects related to the furan group in natural molecules [38,39]. Loi et al. [40], however, describe sesquiterpenes isolated from different plants capable of altering the mitochondrial function of mammals. The mitochondrial membrane potential is maintained in healthy individuals by an electrochemical gradient. The mechanism of action is not clearly

understood, but it is theorized that a disturbance in the protons of the osmotic balance affects the electrochemical potential. As ATP levels decrease, metabolism and functions reduce until cell death, thus explaining the observed fungistatic effect.

The effect observed in mammal mitochondria is possibly similar in fungal mitochondria, as Campbell et al. [41] related similarities between both. This would explain the fungistatic effect and the absence of morphological alteration, as the inhibition could be a decrease in the metabolism caused only by the reduction in the ATP concentration.

Despite this report, *O. indecora*'s EO did not demonstrate a fungicidal or fungistatic effect at 4096  $\mu\text{g/mL}$  and could not inhibit the aflatoxin production in the three *Aspergillus* strains tested. However, when the EO is nanoemulsified, the results are promising. The NE at 2048  $\mu\text{g/mL}$  showed a fungistatic effect in the three strains, at least at 48 h, while the EO at a concentration two times higher did not show the same capacity.

The production of the EO nanoemulsion is an exciting tool to enable these lipophilic matrices into viable products and has been widely used in pharmaceutical and food industries [23]. In this study, the *O. indecora*'s EO was nanoemulsified by a low-energy approach to maintain the chemical profile since it does not use heat treatment in the nanoemulsification process, which avoids thermal degradation and volatilization of the terpenoids in the EO [42].

There are two prevailing forces crucial to the stability of nanoemulsified systems: the gravitational (droplet size and weight) and the electrostatic repulsion (zeta potential). Together, they influence the physicochemical maintenance of a nanodispersion's collective parameters [21,43]. The prepared nanoemulsion showed a bluish-white appearance consistent with the Tyndall effect, a reduced droplet diameter of  $103.4 \pm 0.9$ , and a  $0.268 \pm 0.010$  PdI. As for the surface charge, one of the parameters related to the nanodroplets' stability, the NE zeta potential, was  $-32.83 \pm 0.8208$ , indicating good short-term stability, with coulombic repulsion between the negatively charged nanodroplets, and in that way, favoring the droplets' Brownian motion [43]. Due to all these parameters, the product was characterized as a conventional monodispersed nanoemulsion [22].

The different nanoemulsion physicochemical properties, such as the reduced droplet diameter, may justify the higher effect of the NE in comparison to the EO. The increased fungistatic effect may be associated with higher bioavailability of the substances present in the EO. Furthermore, the increase of hydrophilicity and the nanoscale of the particles can lead to higher dispersion and stability in the medium [24] and may facilitate the absorption and metabolization of the substances present in the bioproduct [25]. The activity of the EO can be

optimized in this way, by increasing the contact between the metabolites in the essential oil and the fungal cells.

Comparing the reduction pattern, a dose-dependent response of the NE against the strains was observed (Figures 3, 5 and 7). The fungistatic effect for the *A. flavus* strain was not significant below 2048 µg/mL but became significant upon reaching this concentration. The turning point for the *A. parasiticus* strain was even lower, as at 1024 µg/mL it had already shown a significant difference.

The comparison was even wider for the *A. westerdjikiae* strain, as all concentrations showed significant activity in the first 48 h, and the higher ones up to 96 h. The greater susceptibility of *A. westerdjikiae* to bioproducts was already reported in other studies, such as those of Rodrigues et al. [44] and Schlösser and Prange [45].

Even though all concentrations of the NE were active against the *A. westerdjikiae* strain, the dose-dependent effect was still visible. The NE showed activity that the OE in a concentration 16 times higher did not, therefore endorsing the potential caused by the nanoemulsification process.

The observed correlation between dosage and effect, and the NE showing a better result than the EO, even though it was in lower concentrations, indicate how the formulation can trigger and potentiate effects, whether expected or not, as observed in the study by Do Carmo Silva [46].

However, despite the potential, no concentration of the NE showed fungicidal activity in any of the strains. A concentration higher than 2048 µg/mL may be necessary to increase the bioavailability of the molecule even more to cause a proper fungicidal effect.

Another limitation observed was the drastic decrease in activity after 48 h of incubation as, after this point, only a fungistatic effect was observed in the colonies of the *A. westerdjikiae* strain and only with the NE at 1024 and 2048 µg/mL. This behavior may be due to the consumption of all the present NE by the fungal colonies, and only the residual effect was observed afterward. Another possibility is degradation over time in the incubation temperature and/or medium.

However, in the thermal stress stability study of the *O. indecora* nanoemulsion, only temperatures from 35 °C slightly reduced the droplet size (nm). As the incubation temperature was 25 to 30 °C, it is unlikely that a significant degradation occurred. The droplet reduction is probably associated with the increased solubility of essential oil terpenoids due to the higher temperature in the aqueous phase [47].

Regarding the size homogeneity of the nanodroplets, there was no statistical significance ( $p < 0.05$ ) in the polydispersity index between all temperatures analyzed (25 to 65 °C). The zeta potential after the thermal stress was  $-34.85 \pm 0.5284$ , suggesting no relevant alteration in the nanodroplets' surface charge [43]. Both parameters reassured the improbability of degradation.

While the bioproduct showed a short period of a fungistatic effect and no fungicidal effect, it was still significant. The activity was seen in the exponential phase of growth for the three strains and, even though it did not establish a stationary range, the reduction in the log phase points to a potential for concomitant use with other antifungal products. The promising potential in associated substances of plant origin and commercial products was also described by Chagas [48].

Another point worth noting is that high-complexity food matrices can lead to reduced effectiveness of antimicrobials. Therefore, a larger amount of preservative than the one used in vitro tends to be necessary to achieve the same results. Higher concentrations, however, can impair the organoleptic properties of foods. To avoid this problem, lower concentrations of bioproducts with fungistatic effects can be used [39]. This highlights the use of nanoemulsions as food preservatives, as long as they are obtained from safe plant derivatives, since the present work demonstrated that they have exactly this desired capacity.

As for the quantification of AF, the variations were considered insignificant, according to statistical results, regardless of the concentration. However, there are reports of the chemical properties of the AFs being modified in different ways after incubation with plant extracts, including removal of the furan double bond in AFB1 and modification of the lactone ring, resulting in a significant decrease in cytotoxicity and carcinogenicity [49].

About the variations, considering the high sensitivity of the AF production [50], the oscillation may be due to the alteration in the fungal metabolism and its metabolites [51]. When comparing the results obtained with other descriptions in the literature, it is observed that this is the first study to report the antifungal properties of *Ocotea indecora* and its major substance, sesquirosefuran. Other studies on the genus have been carried out, however, few species have a chemical composition similar to the *O. indecora*. Furthermore, most trials are on the clinically important leviduriform fungal species.

Focusing only on species with a high content of sesquiterpenes in their EO and their activities on filamentous fungi, the studies by Prieto et al. [52] stand out, where *Ocotea macrophylla* is observed with 70% of the constituents being sesquiterpenes, and this oil demonstrates antifungal activity against species of the genus *Fusarium*. Another significant trial

is that carried out by Mezzomo et al. [53], who observed *Ocotea puberula*'s EO with 17% of sesquiterpenes and reported weak antifungal activity in two *Aspergillus* species, *alternate* and *flavus*.

The low antifungal effect was, therefore, concordant with the literature. However, the potentiation demonstrated by the nanoemulsification of the *O. indecora* essential oil qualifies the nanoemulsion as a fungistatic agent for the tested strains. Combined with their biodegradation and metabolization properties, the nanoemulsion was demonstrated as an appropriate option for pre-harvest treatment that, if well-used, will not compromise the environment or the workers' and consumers' health.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Plant Material

The fresh leaves of *O. indecora* were collected in the Restinga of Jurubatiba National Park, Carapebus, RJ, Brazil (“22°12.683' S”, “41°35.283' O”, “22°12.703' S”, and “41°35.336' O”). The obtention and research of the plant material were authorized by SisBio/ICMBio (13659-14) and SisGen (A0D648D). The species was identified, and a voucher specimen was deposited at Universidade Estadual do Rio de Janeiro—Faculdade de Formação de Professores (UERJ—FFP) herbarium, under registration number RFFP: 16.873.

### 4.2. Essential Oil Extraction and Chemical Characterization

Fresh leaves of *O. indecora* (250 g) were crushed into a blender with distilled water, transferred to a 5.0 L round-bottom flask, and subjected to hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus for 4 h. After that, the essential oil was dried over anhydrous sodium sulfate and stored in an amber glass vial at 4 °C.

The essential oil was analyzed in a GC-MS QP2010 (Shimadzu) gas chromatograph equipment coupled with a mass spectrometer and a GC-2014 (Shimadzu) gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID). The chromatographic conditions were a 260 °C injector temperature, with the carrier gas helium, the flow rate was 1 mL/min, and the split ratio was 1:40. Initially, the oven temperature began at 60 °C and then increased to 290 °C (3 °C/min rate). The essential oil (1 µL) was dissolved in dichloromethane (1:100 µL) and injected into a DB-5 column for MS (0.25 mm ID, 30 m in length, 0.25 µm film thickness). The mass

spectrometry conditions were 70 eV electron ionization and a 1 scan/s scan rate. The GC-FID analysis was similar to the MS, except for the injection in a DB-5 column (0.25 mm ID, 30 m in length, 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness) and the FID temperature at 290 °C. The arithmetic index (AI) was calculated by interpolating the retention times of a mixture of aliphatic hydrocarbons (C7–C40) and analyzed under the same chromatographic methods. Substances were identified by comparing their retention indices and mass spectra with those reported in the literature [34,35]. Compounds' mass spectra fragmentation pattern was also compared with NIST mass spectrum libraries. GC-FID performed the relative abundance of the chemical constituents under the same conditions as GC-MS. The FID peak area normalization method obtained the percentages of these compounds.

#### 4.3. Nanoemulsion Preparation, Characterization, and Thermal Stress Stability

The formulation of the nanoemulsion of *O. indecora* was previously described by Machado et al. [29]. The nanoemulsion was prepared by the low-energy method. The NE aqueous phase was 96% (w/w) of distilled water, and the oil phase was made up of 2% (w/w) of EO, and 2% (w/w) of the surfactants polysorbate 20 and sorbitan monooleate 80 in a 4:1 proportion, respectively. The oil phase was homogenized in a vortex for 1 min, and then the aqueous phase was slowly dripped into the oil phase in continuous agitation.

The droplet size (nm), zeta potential (ZP), and polydispersity index (PDI) from the NE diluted with distilled water (1:40) were characterized by dynamic light scattering (DLS) in a Zetasizer Advance Lab Blue (Malvern Instruments®, Worcestershire, UK).

The *O. indecora* nanoemulsion was submitted to thermal stress after preparation to assess the trend of the nanoemulsion droplet size, zeta potential, and polydispersity index with a temperature increment from 25 to 65 °C, with an increase of 10 °C between analyses. The characterization was realized under the same conditions described above.

#### 4.4. Fungal Strains

The strains used were *A. flavus* RC 2054, *A. parasiticus* NRRL 2999, and *A. westerdijkiae* NRRL 3174, all reference strains known to produce aflatoxin B1 (AFB1).

#### 4.5. Inoculation and Incubation Conditions

The methodology was adapted from Rodrigues et al. [54], with the direct addition of the bioproduct in the medium and then needle-inoculating the strains.

The EO samples were diluted with 10% dimethylsulfoxide (DMSO) and tested at a 4096 µg/mL concentration in the culture medium. As for the NE, the concentrations of 256, 512, 1024, and 2048 µg/mL were tested in the medium.

The medium used was Kasvi's Sabouraud Dextrose Agar (SDA), with a standardized volume of 25 mL being used for each culture, thus allowing control of the study concentrations [55]. The EO and the NE samples were added to the SDA in sufficient volume to reach the determined concentrations.

The Petri plates with the bioproducts were needle-inoculated centrally with 10 µL of the spore suspension. The plates were incubated at 25–30 °C for 96 h, with daily observation and diameter measurement.

Plates containing SDA medium without essential oil were used as a control group (Control 1), and the diluents, DMSO, and a nanoemulsion without the EO were used as a second control group (Control 2).

#### 4.6. Growth Assessment

The diameter of the growing colonies was measured daily for four days. The percentages of inhibition of diameter growth (PIDG) values were determined according to the equation below:

$$\text{PIDG (\%)} = 100 \times \frac{(\text{Diameter of control} - \text{Diameter of sample})}{\text{Diameter of control}}$$

#### 4.7. Microscopic Evaluation

A 1 mm piece of the colonies was collected for each plate of the three strains for the observed points. The pieces were then placed in proper slides for the optical microscope with one drop of distilled water and then set with the coverslip. The slides were observed in a Nikon ALPHAPHOT-2 YS2-H at 1000× magnification.

#### 4.8. Aflatoxin Analyzes

The detection and quantification of aflatoxins was performed based on Geissen [56], taking a three-point sample for each plate with fungal growth and placing it in microtubes in duplicates. Later, 0.5 mL of chloroform was added to each microtube and then centrifuged at 4000 rpm for 10 min. After precipitation, the extract was removed and transferred to another microtube to dry, and the contents were resuspended with 70% methanol. The quantification was realized by HPLC.

#### 4.9. Statistical Analyses

Data evaluations were performed by analysis of variance (ANOVA). Data were transformed using the logarithmic function,  $\log_{10}(x + 1)$ , before ANOVA, and when necessary, the data were transformed with a root square to obtain a homogeneous data distribution. Tukey's test was used to compare the enumeration data of the different concentrations of the evaluated products, the different presentations of the tested products, and the variations in incubation and growth times. All analyses were based on evaluating these substances' fungicidal or fungistatic potential. Analyses were conducted using the PROC GLM computer program in SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA).

## 5. Conclusions

The *O. indecora* essential oil did not show fungicidal potential at the concentrations tested against *A. flavus* RC 2054, *A. parasiticus* NRRL 2999, and *A. westerdjikiae* NRRL 3174. However, the *O. indecora* nanoemulsion showed fungistatic potential in *Aspergillus* strains. At 256 and 512  $\mu\text{g/mL}$ , the EO affected the growth of the *A. westerdjikiae* strain for 48 h. At 1024  $\mu\text{g/mL}$ , the EO inhibited the growth in both *A. parasiticus* and *A. westerdjikiae* for 48 and 96 h. The higher concentration, 2048  $\mu\text{g/mL}$ , showed activity in all three strains up to 48 h, and up to 96 h for the *A. westerdjikiae*.

The nanoemulsion of the *Ocotea indecora* can be considered a fungistatic agent for the tested strains, and the formulation of the essential oil in the nanoemulsion triggered and potentiated effects that otherwise would not be significant.

The aflatoxin evaluation indicated that the products in the tested concentration had no significant effect on the production of secondary metabolites by the studied strains.

The study indicated an exciting line of research not only in the prospection of natural products but also for the application of nanoemulsions as a bioactive carrier, especially those



that have, by nature, hydrophobic properties, and the results should be applied to other promising plant derivatives.

## References

1. Von Grebmer, K.; Bernstein, J.; Wiemers, M.; Reiner, L.; Bachmeier, M.; Hanano, A.; Towey, O.; Ní Chéilleachair, R.; Foley, C.; Gitter, S.; et al. *Global Hunger Index: Food Systems Transformation and Local Governance*; Welthungerhilfe: Bonn, Germany, 2022.
2. Council for Agricultural Science and Technology. *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems*; Task Force Report No. 139; Council for Agricultural Science and Technology: Ames, IA, USA, 2003.
3. Eskola, M.; Kos, G.; Elliott, C.T.; Hajšlová, J.; Mayar, S.; Krska, R. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited ‘FAO estimate’ of 25. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 2773–2789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Zinedine, A.; El Akhdari, S. Food safety and climate change: Case of mycotoxins. In *Handbook of Research on Global Environmental Changes and Human Health*; IGI Global: Hershey, PA, USA, 2019; pp. 74–97.
5. Abdel-Azeem, A.M.; Salem, F.M.; Abdel-Azeem, M.A.; Nafady, N.A.; Mohesien, M.T.; Soliman, E.A. Biodiversity of the genus *Aspergillus* in different habitats. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*; Gupta, V.K., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 3–28.
6. Frisvad, J.C.; Hubka, V.; Ezekiel, C.N.; Hong, S.B.; Nováková, A.; Chen, A.J.; Arzanlou, M.; Larsen, T.O.; Sklenář, F.; Mahakarnchanakul, W.; et al. Taxonomy of *Aspergillus* section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Stud. Mycol.* **2019**, *93*, 1–63. [[CrossRef](#)]
7. Pitt, J.I. Toxicogenic fungi and mycotoxins. *Br. Med. Bull.* **2000**, *56*, 184–192. [[CrossRef](#)]
8. Jalili, M. A review on aflatoxins reduction in food. *Iran. J. Health Saf. Environ.* **2016**, *3*, 445–459.
9. Loi, M.; Fanelli, F.; Liuzzi, V.C.; Logrieco, A.F.; Mulè, G. Mycotoxin biotransformation by native and commercial enzymes: Present and future perspectives. *Toxins* **2017**, *9*, 111. [[CrossRef](#)]
10. Forsythe, S.J. *Microbiologia da Segurança Alimentar*; Artmed: Guelph, ON, Canada, 2002.
11. Wang, Y.; Liu, F.; Zhou, X.; Liu, M.; Zang, H.; Liu, X.; Shan, A.; Feng, X. Alleviation of Oral Exposure to Aflatoxin B1-Induced Renal Dysfunction, Oxidative Stress, and Cell Apoptosis in Mice Kidney by Curcumin. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1082. [[CrossRef](#)]
12. Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization. *Codex Alimentarius International Food Standards*; FAO: Rome, Italy; WHO: Geneva, Switzerland, 2020.
13. Brasil. *Instrução Normativa—In N° 160, de 1° de julho de 2022 (Publicada no DOU n° 126, de 6 de julho de 2022) Estabelece os Limites Máximos Tolerados (LMT) de Contaminantes em Alimentos*; Ministério da Saúde—MS, Agência Nacional de Vigilância Sanitária—ANVISA: Brasília, Brasil, 2022.
14. UN Statistical Commission. *Global Indicator Framework for the Sustainable Development Goals and Targets of the 2030 Agenda for Sustainable Development*; United Nations: Washington, DC, USA, 2017.

15. Peles, F.; Sipos, P.; Kovács, S.; Gyo“ri, Z.; Pócsi, I.; Pusztahelyi, T. Biological control and mitigation of aflatoxin contamination in commodities. *Toxins* **2021**, *13*, 104. [CrossRef] [PubMed]
16. Ráduly, Z.; Szabó, L.; Madar, A.; Pócsi, I.; Csernoch, L. Toxicological and medical aspects of *Aspergillus*-derived mycotoxins entering the feed and food chain. *Front. Microbiol.* **2020**, *10*, 2908. [CrossRef]
17. Turek, C.; Stintzing, F.C. Stability of essential oils: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2013**, *12*, 40–53. [CrossRef]
18. Centers for Food Safety Applied Nutrition Generally Recognized as Safe (GRAS), U.S. Food and Drug Administration. 2017. Available online: <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras> (accessed on 17 March 2023).
19. Salvia-Trujillo, L.; Rojas-Graü, M.A.; Soliva-Fortuny, R.; Martin-Belloso, O. Impact of microfluidization or ultrasound processing on the antimicrobial activity against *Escherichia coli* of lemongrass oil-loaded nanoemulsions. *Food Control.* **2014**, *37*, 292–297. [CrossRef]
20. Rivero-Cruz, I.; Duarte, G.; Navarrete, A.; Bye, R.; Linares, E.; Mata, R. Chemical composition and antimicrobial and spasmolytic properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* essential oils. *J. Food Sci.* **2011**, *76*, 309–317. [CrossRef] [PubMed]
21. Wilson, R.J.; Li, Y.; Yang, G.; Zhao, C.X. Nanoemulsions for drug delivery. *Particuology* **2022**, *64*, 85–97. [CrossRef]
22. Aljabri, N.M.; Shi, N.; Cavazos, A. Nanoemulsion: An emerging technology for oilfield applications between limitations and potentials. *J. Pet Sci. Eng.* **2022**, *208*, 109306. [CrossRef]
23. Sharma, K.; Babaei, A.; Oberoi, K.; Aayush, K.; Sharma, R.; Sharma, S. Essential oil nanoemulsion edible coating in food industry: A review. *Food Bioprocess Technol.* **2022**, *15*, 2375–2395. [CrossRef]
24. Che Marzuki, N.H.; Wahab, R.A.; Abdul, H.M. An overview of nanoemulsion: Concepts of development and cosmeceutical applications. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2019**, *33*, 779–797. [CrossRef]
25. Hill, L.E.; Gomes, C.; Taylor, T.M. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT-Food Sci. Technol.* **2013**, *51*, 86–93. [CrossRef]
26. Salleh, W.M.N.H.; Ahmad, F. Phytochemistry and biological activities of the genus *Ocotea* (Lauraceae): A review on recent research results (2000–2016). *J. Appl. Pharm. Sci.* **2017**, *7*, 204–218. [CrossRef]
27. Quinet, A.; Baitello, J.B.; Moraes, P.L.R.; Assis, L.; Alves, F.M. Lauraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Published 2015. Available online: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8463> (accessed on 17 March 2023).
28. Valli, M.; Russo, H.M.; Bolzani, V.S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. *An. Acad. Bras. Ciências* **2018**, *90*, 763–778. [CrossRef]
29. Machado, F.P.; Folly, D.; Enriquez, J.J.S.; Mello, C.B.; Esteves, R.; Araújo, R.S.; Toledo, P.F.; Mantilla-Afanador, J.G.; Santos, M.G.; Oliveira, E.E.; et al. Nanoemulsion of *Ocotea indecora* (Shott) Mez essential oil: Larvicidal effects against *Aedes aegypti*. *Ind. Crops Prod.* **2023**, *192*, 116031. [CrossRef]
30. Figueiredo, A.; Nascimento, L.M.; Lopes, L.G.; Giglioti, R.; Albuquerque, R.D.; Santos, M.G.; Falcão, D.Q.; Nogueira, J.A.; Rocha, L.; Chagas, A.C.S. First report of

- the effect of *Ocotea elegans* essential oil on *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Vet Parasitol.* 2018, 252, 131–136. [CrossRef]
31. Nascimento, L.M.; Apolinario, R.; Machado, F.P.; Correa, A.L.; Caldas, G.R.; Ruppelt, B.M.; Souza, K.F.C.; Gouveia, G.; Burth, P.; Falcao, D.Q.; et al. Effects of nanoemulsion and essential oil from the leaves of *Ocotea elegans* against *Dysdercus peruvianus*. *Res. Soc. Dev.* 2020, 9, e909108424. [CrossRef]
  32. Merad, N.; Andreu, V.; Chaib, S.; de Carvalho Augusto, R.; Duval, D.; Bertrand, C.; Boumghar, Y.; Pichette, A.; Djabou, N. Essential oils from two Apiaceae species as potential agents in organic crops protection. *Antibiotics* 2021, 10, 636. [CrossRef] [PubMed]
  33. Merad, N.; Andreu, V.; Chaib, S.; de Carvalho Augusto, R.; Duval, D.; Bertrand, C.; Boumghar, Y.; Pichette, A.; Djabou, N. Antifungal activity and chemical composition of essential oils from *Smyrniium olusatrum* L. (Apiaceae) from Italy and Portugal. *Nat. Prod. Res.* 2012, 26, 993–1003. [CrossRef]
  34. Adams, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. *Biochem. Syst. Ecol.* 2017, 24, 594. [CrossRef]
  35. El-Sayed, A.M. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals [Internet]. 2021. Available online: <https://www.pherobase.com/> (accessed on 17 March 2023).
  36. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 5366078, Sesquirosefuran. Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/sesquirosefuran> (accessed on 5 March 2023).
  37. ADMETlab 2.0. Sesquirosefuran (CC(C)=CCCC(C)=CCc1occc1C). Available online: <https://admetmesh.scbdd.com/service/evaluation/cal> (accessed on 17 March 2023).
  38. Chandrika, K.M.; Sharma, S. Promising Antifungal Agents: A Minireview. *Bioorg. Med. Chem.* 2020, 28, 115398. [CrossRef]
  39. Rymbai, E.M.; Chakraborty, A.; Choudhury, R.; Verma, N.; De, B. Review on Chemistry and Therapeutic Activity of the Derivatives of Furan and Oxazole: The Oxygen Containing Heterocycles. *Der Pharma Chem.* 2019, 11, 20–41.
  40. Loi, M.; Paciolla, C.; Logrieco, A.F.; Mulè, G. Plant Bioactive Compounds in Pre- and Postharvest Management for Aflatoxins Reduction. *Front. Microbiol.* 2020, 11, 243. [CrossRef]
  41. Campbell, A.; Mrázek, J.; Karlin, S. Genome Signature Comparisons among Prokaryote, Plasmid, and Mitochondrial Dna. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 9184–9189. [CrossRef]
  42. Ostertag, F.; Weiss, J.; McClements, D.J. Low-Energy Formation of Edible Nanoemulsions: Factors Influencing Droplet Size Produced by Emulsion Phase Inversion. *J. Colloid Interface Sci.* 2012, 388, 95–102. [CrossRef]
  43. Rai, V.K.; Mishra, N.; Yadav, K.S.; Yadav, N.P. Nanoemulsion as Pharmaceutical Carrier for Dermal and Transdermal Drug Delivery: Formulation Development, Stability Issues, Basic Considerations and Applications. *J. Control. Release* 2018, 270, 203–225. [CrossRef]
  44. Rodrigues, M.P.; De Oliveira, Á.A.; Biscoto, G.L.; Pinto, P.N.; Dias RR, D.S.; Salvato, L.A.; Keller, K.M. Inhibitory Effect of Gras Essential Oils and Plant Extracts on the Growth of *Aspergillus westerdijkiae* and *Aspergillus carbonarius* Strains. *Molecules* 2022, 27, 6422. [CrossRef]
  45. Schlösser, I.; Prange, A. Effects of Selected Natural Preservatives on the Mycelial Growth and Ochratoxin a Production of the Food-Related Moulds *Aspergillus*

- westerdijkiae* and *Penicillium verrucosum*. *Food Addit. Contam. Part A* 2019, 36, 1411–1418. [CrossRef] [PubMed]
46. do Carmo Silva, L.; Miranda, M.A.C.M.; de Freitas, J.V.; Ferreira, S.F.A.; de Oliveira Lima, E.C.; de Oliveira, C.M.A.; Kato, L.; Terezan, A.P.; Rodriguez, A.F.R.; Faria, F.S.E.D.V.; et al. Antifungal Activity of Copaíba Resin Oil in Solution and Nanoemulsion against *Paracoccidioides* spp. *Braz. J. Microbiol.* 2020, 51, 125–134. [CrossRef] [PubMed]
  47. Viana, V.C.R.; Machado, F.P.; Esteves, R.; Duarte, J.A.D.; Enríquez, J.J.S.; Campaz, M.L.M.; Oliveira, E.E.; Santos, M.G.; Ricci-Junior, E.; Ruppelt, B.M.; et al. Green Nanobioinsecticide of a Brazilian Endemic Plant for the *Aedes aegypti* Control. *Sustain. Chem. Pharm.* 2023, 32, 100992. [CrossRef]
  48. Chagas, A.C.S. Medicinal Plant Extracts and Nematode Control. *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet Sci. Nutr. Nat. Resour.* 2015, 10, 1–8. [CrossRef]
  49. Loi, M.; Fanelli, F.; Zucca, P.; Liuzzi, V.C.; Quintieri, L.; Cimmarusti, M.T.; Monaci, L.; Haidukowski, M.; Logrieco, A.F.; Sanjust, E.; et al. Aflatoxin B1 and M1 Degradation by Lac2 from *Pleurotus Pulmonarius* and Redox Mediators. *Toxins* 2016, 8, 245. [CrossRef] [PubMed]
  50. El-Nagerabi, S.A.; Al-Bahry, S.N.; Elshafie, A.E.; Alhilali, S. Effect of Hibiscus Sabdariffa Extract and *Nigella Sativa* Oil on the Growth and Aflatoxin B1 Production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* Strains. *Food Control.* **2012**, 25, 59–63. [CrossRef]
  51. Vuorela, P.; Leinonen, M.; Saikku, P.; Tammela, P.; Rauha, J.P.; Wennberg, T.; Vuorela, H. Natural Products In the Process of Finding New Drug Candidates. *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11, 1375–1389. [CrossRef]
  52. Prieto, J.A.; Pabón, L.C.P.; Oscar, J.; Delgado, W.A.; Cuca, L.E. Constituyentes químicos, actividad insecticida y Antifúngica de los aceites esenciales de hojas de dos especies colombianas del género *ocotea* (lauraceae). *Rev. Colomb. Química* **2010**, 39, 199–209.
  53. Mezzomo, P.; Sausen, T.L.; Paroul, N.; Roman, S.S.; Mielniczki AA, P.; Cansian, R.L. Antifungal activity of *Ocotea odorifera* (Vell.) Rowher, *Ocotea puberula* (rich.) Nees and *Cinnamodendron dinisii* Schwanke essential oils. *BioRxiv* **2019**. [CrossRef]
  54. Rodrigues, M.P.; Astoreca, A.L.; Oliveira, Á.A.D.; Salvato, L.A.; Biscoto, G.L.; Keller, L.A.M.; Rosa, C.A.D.R.; Cavaglieri, L.R.; Azevedo, M.I.D.; Keller, K.M. In Vitro Activity of Neem (*Azadirachta indica*) Oil on Growth and Ochratoxin a Production by *Aspergillus carbonarius* Isolates. *Toxins* **2019**, 11, 579. [CrossRef] [PubMed]
  55. Pitt, J.L.; Hocking, A.D. *Fungi and Food Spoilage*, 3rd ed.; Black Academia & Professional Chapman & Hall: New York, NY, USA, 2009; p. 520.
  56. Geisen, R. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *Syst. Appl. Microbiol.* 1996, 19, 388–392. [CrossRef]

## 5.2. ARTIGO 2

Inhibitory potential of *Eugenia sulcata* essential oil and its nanoemulsions against *Aspergillus* spp.

da Silva, D. S., Pinto, L. A., Keller, L. A. M., Machado, F. P., Eiriz, D. N., Rocha, L., & Fernandes, C. P. (2024). Inhibitory potential of *Eugenia sulcata* essential oil and its nanoemulsions against *Aspergillus* spp. *Journal of Natural Pesticide Research*, 7, 100064. <https://doi.org/10.1016/j.napere.2023.100064>

Publicado: 20 de dezembro de 2023

### **Abstract**

Natural products are in the spotlight of novelty for obtaining ecofriendly agents against pests. In this context, searching for new antifungal alternatives for control of grain microorganism is recommended. In this paper we show a brief description of nanoemulsification as a valuable tool for modification of essential oil properties. Low energy method was used for the preparation of *Eugenia sulcata* nanoemulsion. This approach was also used for the preparation of this type of colloid with  $\beta$ -caryophyllene, the main component of this essential oil. Especially regarding *Aspergillus parasiticus*, it was possible to observe increment of bioactivity by nanoemulsification of *E. sulcata*. This short communication contributes to better knowledge of mechanism in the rationalization of antifungal nanoemulsions based in essential oil and its main constituents, providing relevant insights that can be used for other complex volatile mixtures.

**Keywords:** Natural products; Antifungal;  $\beta$ -caryophyllene.

### **1. Introduction**

The Food and Agriculture Organization (FAO) estimates that 25% of the grains and cereals produced in the world are lost annually due to contamination by fungi and/or mycotoxins (Eskola et al., 2020). The genus *Aspergillus* stands out in this scenario, being strongly linked to human food (Zinedine and El Akhdari, 2019). Its species also are related to superficial and invasive aspergillosis and aflatoxin production (Frisvad et al., 2019).

The standard procedure against fungal contamination is the utilization of chemical synthetic additives (Turek and Stintzing, 2013). Benzoates, sorbates, nitrates, nitrites and sulfites are wide used due to their ability of preventing spoilage. Natamycin, a polyene macrolide anti-mycotics produced by microorganism is also approved in several countries (Salas et al., 2017). Environmental and human health impacts, and the development of resistant strains, have led researchers seeking novel alternative strategies (Turek and Stintzing, 2013).

It is interesting, therefore, to evaluate the antifungal activity of products of natural origin, especially those derived from secondary plant metabolism. The development of plant-based products is of great value for the pharmaceutical, cosmetic, and particularly for the food industry, as they are a great source of bioactive substances applicable for various purposes (Salvia-Trujillo et al., 2014; Dutra et al., 2016; Ríos, 2016). In that regard, many studies have already investigated the antifungal potential of natural products (e.g., essential oils) against *Aspergillus* spp. (Ferreira et al., 2021; Castellanos et al., 2020; Bendifallah and Merah, 2023).

In this context, essential oils (EOs) are considered promising alternatives for pest control, including microorganism that affect cereals (TAHERI, SOWEIZY AND TARIGHI, 2023). EOs are aromatic and volatile complex mixtures, generally composed of monoterpenes, sesquiterpenes, and/or phenylpropanoids. They are obtained from different plant parts such as flowers, stems, leaves, seeds, and fruits and are often extracted by hydrodistillation or steam distillation methods (Chamorro et al., 2012; Awadalla et al., 2017).

The EO incorporation in aqueous media is still a challenge since they are composed of lipophilic substances. Therefore, nanoemulsions (NEs) are advantageous since they allow the dispersion of nanometric-sized EO droplets, which offer several advantages such increase in water availability, improvement of physicochemical properties of the formulations, proper penetration into surfaces, and others (Barradas, de Holanda e Silva, 2021). Due to the nanometric scale of droplets, NEs have a single-phase translucent appearance, with a bluish reflection, characteristic of the Tyndall light scattering optical effect (Aljabri et al., 2022). These systems are kinetically stable but thermodynamically unstable and therefore, it is necessary to reduce the natural tendency for phase separation. Thus, different surfactants are used in different concentrations to decrease interfacial tension and improve long-term stability (Wilson et al., 2022).

Myrtaceae is a botany family known by containing several EO-producer species. Among them, it can be highlighted the *Eugenia sulcata* Spring ex Mart (ES), an endemic species of the Atlantic Rainforest popularly known as “murtinha” and “pitangueira silvestre” (Santos et al., 2019). Previous studies have shown the antimicrobial and anti-fungal potential

of plants of the genus *Eugenia* (Castellanos et al., 2020) and  $\beta$ -caryophyllene ( $\beta$ C) (Dahham et al., 2015), the major component in the ES essential oil (Magalhaes et al., 2022). However, to the best of our knowledge, there are no reports regarding the antifungal action of the essential oil of *E. sulcata* (EOES) or other high-value derived products of this species.

As part of our ongoing studies with EOs obtained from species of the Atlantic Rainforest and their NEs against pests, the aim of this work was to evaluate the antifungal effects of the EOES and its NE against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Moreover, the same approach was performed for  $\beta$ C, the main constituent of EOES.

## 2. Methodology

### 2.1. Chemicals

Polysorbate 80, polysorbate 20, and  $\beta$ -caryophyllene ( $\geq 80\%$ ), were obtained from Sigma-Aldrich. DMSO and anhydrous sodium sulfate was obtained from Vetec (RJ, Brazil). Deionized water was used for general procedures.

### 2.2. Plant Material

Leaves of *Eugenia sulcata* (4950 g) were collected in Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Carapebus, Rio de Janeiro, Brazil (22°12.984'S 41°35.008'W and 22°13.050'S 41°35.121'W). A specimen voucher was deposited at the herbarium of the State University of Rio de Janeiro under registration RFFP 13.788. The collection and prospection of plant material were authorized by SISBio/ICMBio under registration number 13659-18 and SISGen under registration code A491A56.

The plant parts were separated, and the fresh leaves were ground in distilled water and subjected to extraction by hydrodistillation in modified Clevenger-type apparatus. The extraction time was 4 h and after this period the obtained EOES was dried over anhydrous sodium sulfate and stored in an amber bottle (20 °C).

The chemical characterization of EOES was performed by gas-chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) using the SHIMADZU GCMS-QP500 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) gas chromatograph. The carrier gas was Helium, and the injection temperature was 260 °C with flow rate of 1 mL/min, split injection (1:40). The oven temperature initiated at 60 °C and increased at 3 °C/min rate to 290 °C. One microliter of the sample was

dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:100 mg/ mL) and injected into an RTX-5MS (RESTEK, 0.25 mm ID x 30 m x 0.25 μm). The mass spectrometry (MS) electron ionization was 70 eV and the scan rate was 1 scan/s. The arithmetic index (AI) was calculated by interpolating the retention times of a standard mixture of aliphatic hydrocarbons (C7-C40) and analyzed under the same conditions. The chemical identification was performed by comparing the obtained AI and fragmentation patterns of the mass spectrum with literature data (Adams, 2017). The fragmentation profiles of the substances were also compared with the mass spectrum database of the National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, US (NIST).

The EOES was also analyzed by flame ionization gas chromatography (GC-FID) in GC-2014 (Shimadzu) under the same conditions of the GC- MS in order to determine the relative abundance of the volatiles. Peak area normalization was used for the achievement percentages of these compounds.

## *2.4. Nanoemulsion preparation and characterization*

### *2.4.1. Nanoemulsification method*

The formulations were prepared at a final mass of 2 g and consisted of 90% (w/w) of deionized water and 10% (w/w) of oil phase (EOES or βC, and surfactants). The EOES or βC was homogenized (around 500 rpm) by vortex stirring (model AP56, Phoenix) with non-ionic surfactants (polysorbate 20 or 80). Then, deionized water was added dropwise to the oil phase under continuous homogenization.

### *2.4.2. Factors of influence*

The surfactant type was evaluated by preparing the NEs with poly- sorbate 80 (P80) or polysorbate 20 (P20). The surfactant-to-oil ratio was evaluated by preparing the NEs at different proportions (5:5 → 9:1).

### *2.4.3. Dynamic light scattering characterization*

The NEs were prepared and stored at room temperature (25 °C). After macroscopical evaluation related to transparency, translucence and presence of creaming and/or phase separation, the most promising systems were characterized in term of droplet size and



polydispersity index by dynamic light scattering (DLS) in a Nanosizer S90 (Malvern, UK). All DLS analyses were performed in triplicate and dilutions (1:10) were performed with deionized water in order to avoid multiple scattering.

### 2.5. Fungal strains

In the present study the following fungal strains were used: *Aspergillus flavus* RC 2054 and *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 strains, respectively from the Universidad de Rio Cuarto in Argentina and the Agricultural Research Service (ARS) Culture Collection in the United States of America.

### 2.6. Inoculation, incubation conditions, and growth assessment

The methods and concentrations used in the antifungal evaluation were based on the methodology described by Pinto et al. (2023). The EOES or the  $\beta$ C were separately solubilized in 25% dimethylsulfoxide (DMSO) with sterile distilled water, filtered in a 0.45  $\mu$ m nylon micro- filter and sterilized in ultraviolet light (UV) at 365 nm for 15 min. The solutions were added separately to 25 mL of Czapek medium Yeast Agar (CYA) reaching a concentration of 1024  $\mu$ g/mL. NEs were also added to the standardized volume of CYA medium reaching 1024  $\mu$ g/mL and, consequently, 10.24  $\mu$ g/mL of EOES or  $\beta$ C in the medium.

After dispersing the samples in the medium, 10  $\mu$ L of agar-water solution was inoculated with the conidia of each fungal species. Plates were incubated at 27.5 °C for 72 h with daily diameter measurements.

NEs control (dispersion of surfactants without active ingredient) and EOES control (25% aqueous solution of DMSO) was also analyzed to determine if the formulation cause any alteration. Growth parameters were established by comparison with fungus colonies in CYA medium without any additive (growth control). The diameter growth inhibition percentage (DGIP) was determined by:

### 2.7. Statistical Analyzes

Analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test was realized in GraphPad Prism (ver. 8) with a significance level of  $p < 0.05$ .

### 3. Results and discussion

The extraction of fresh leaves yielded 1.02% (w/w) of an EOES with clear transparent aspect. The chemical composition revealed presence of 10 identified substances, with the largest fraction (66.2%) corresponding to sesquiterpenes. The  $\beta$ -caryophyllene ( $\beta$ C) was the major component (34.4%), followed by  $\alpha$ -pinene (14.7%) and trans-calamenene (10.0%). The complete list of substances in the essential oil is shown in Table 1.

**Table 1.** Chemical characterization of the essential oil from *Eugenia sulcata* leaves. Identification performed by GC-MS and relative abundance by GC-FID.

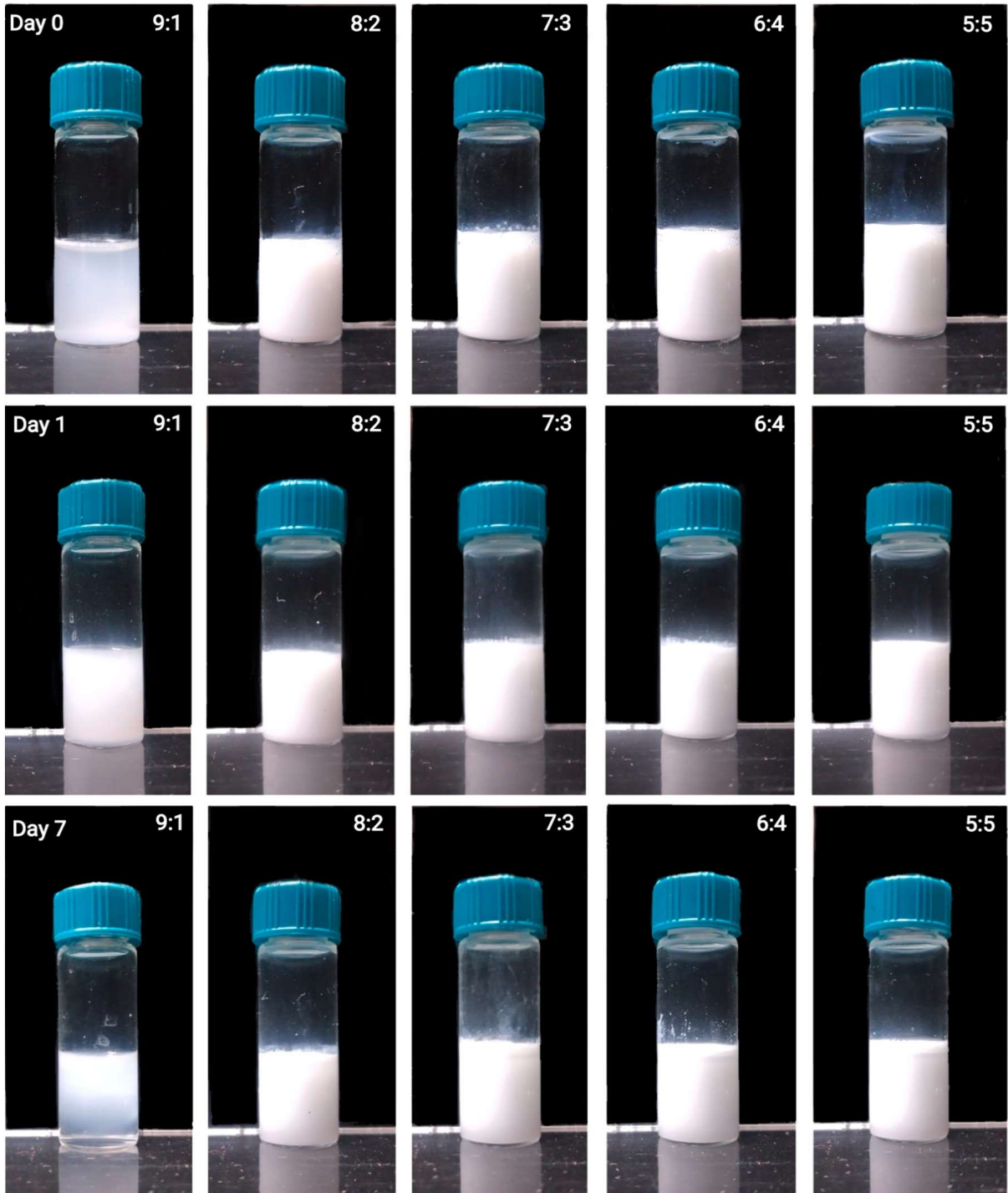
AI <sub>EXP</sub>	AI <sub>LIT</sub>	Substances	Relative abundance (%)
933	932	$\alpha$ -pinene	14.70
977	974	$\beta$ -pinene	9.30
1030	1026	1,8-cineole	6.30
1192	1186	$\alpha$ -terpineol	1.50
1376	1374	$\alpha$ -copaene	3.20
1419	1417	$\beta$ -caryophyllene	34.40
1453	1452	$\alpha$ -humulene	7.20
1524	1521	trans-calamenene	10.00
1533	1533	trans-cadina-1,4-diene	3.60
1582	1582	Caryophyllene oxide	2.30
		Total Identified	92.50
		Monoterpenes hydrocarbons	24.00
		Oxygenated monoterpenes	7.80
		Sesquiterpenes hydrocarbons	58.40
		Oxygenated sesquiterpenes	2.30

\*AI<sub>EXP</sub>: Arithmetic Index experimental; AI<sub>LIT</sub>: Arithmetic Index from the literature.

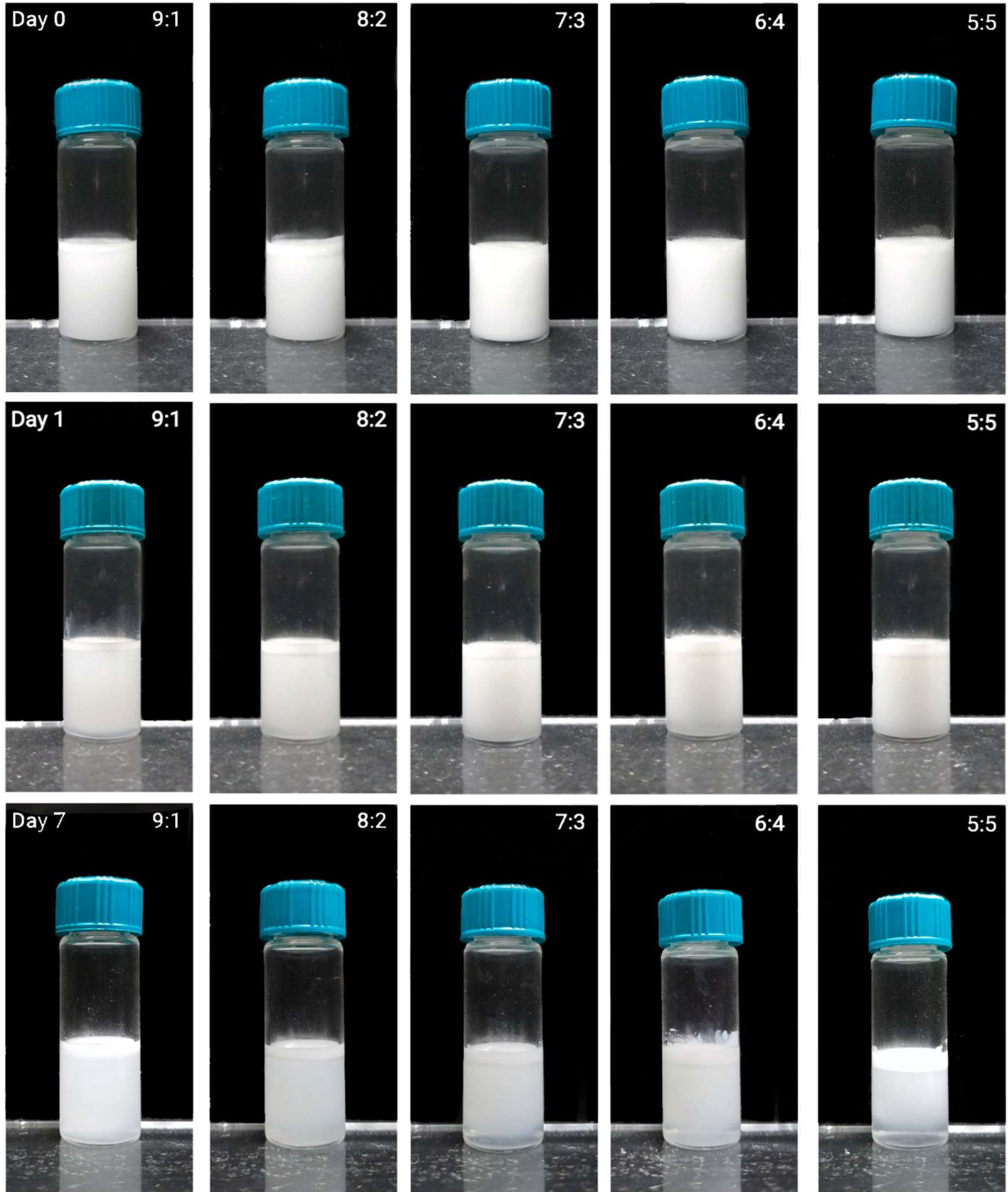
ES is a Brazilian endemic plant and sesquiterpenes were previously reported as a main representative class of compounds of the EOES. In this context,  $\beta$ C was the major secondary metabolite, followed by the monoterpene  $\alpha$ -pinene (Lima et al., 2012; Feder et al., 2019; Magalhães et al., 2022). In the other hand, Ramos et al. (2011) reported a different chemical profile, describing the largest fraction of the oil composed of monoterpenes. The major

compound of this class was 1,8-cineole (19.6%) and a high  $\alpha$ -pinene abundance (12.2%) was also observed.

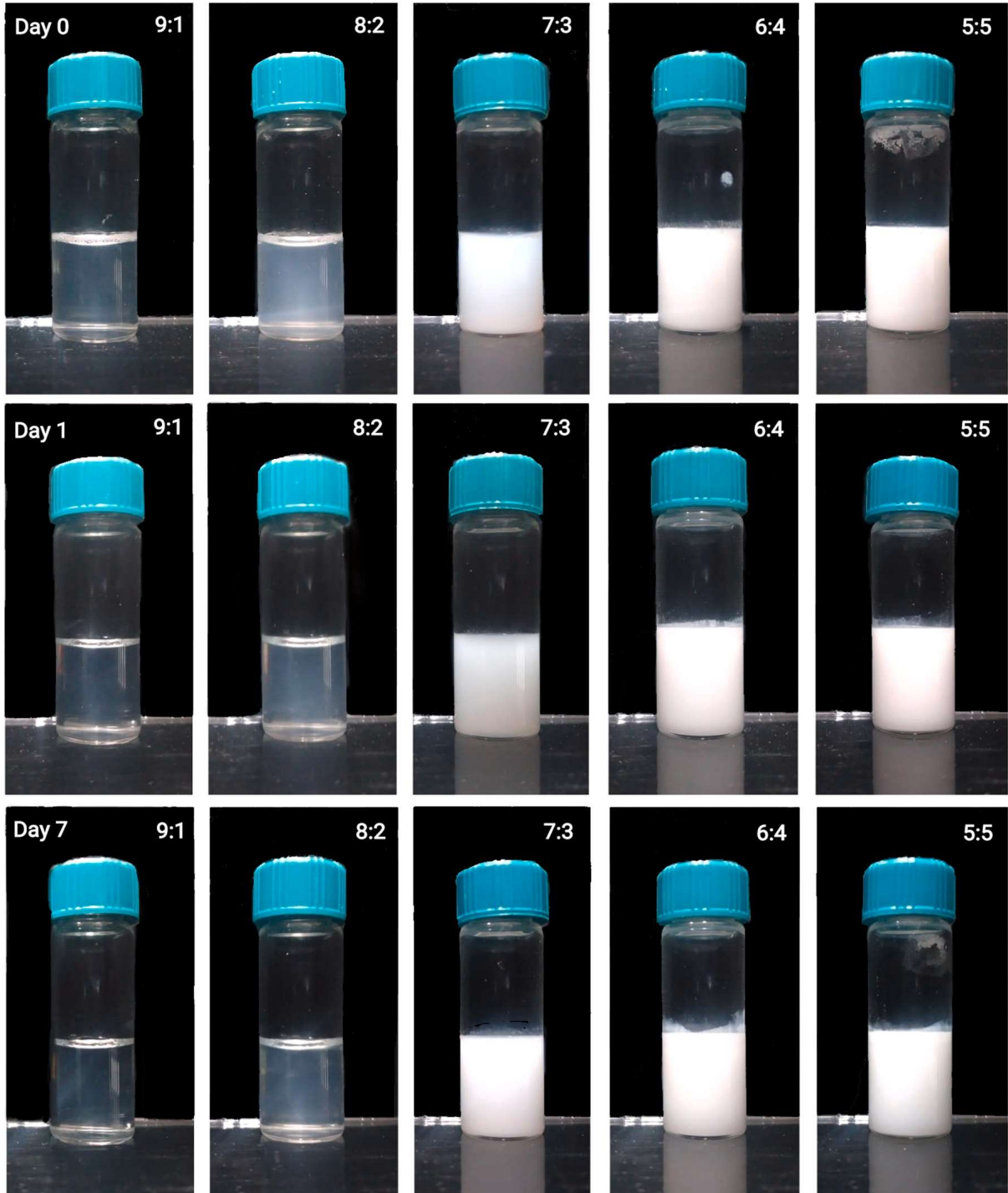
Chemical differences in EOs may occur among different plant specimens. Quantitative and qualitative variations in the chemical profile can be explained by intrinsic and extrinsic factors, such as the location of occurrence, climate, collection time, extraction type, and soil nutrients, among others (Gobbo-Neto and Lopes, 2007). Although some variations in chemical composition of the different studies, the presence of  $\beta$ C as a major component of the EOES in most of the works published so far, suggests that this substance is a relevant phytochemical marker for the EO of the species.



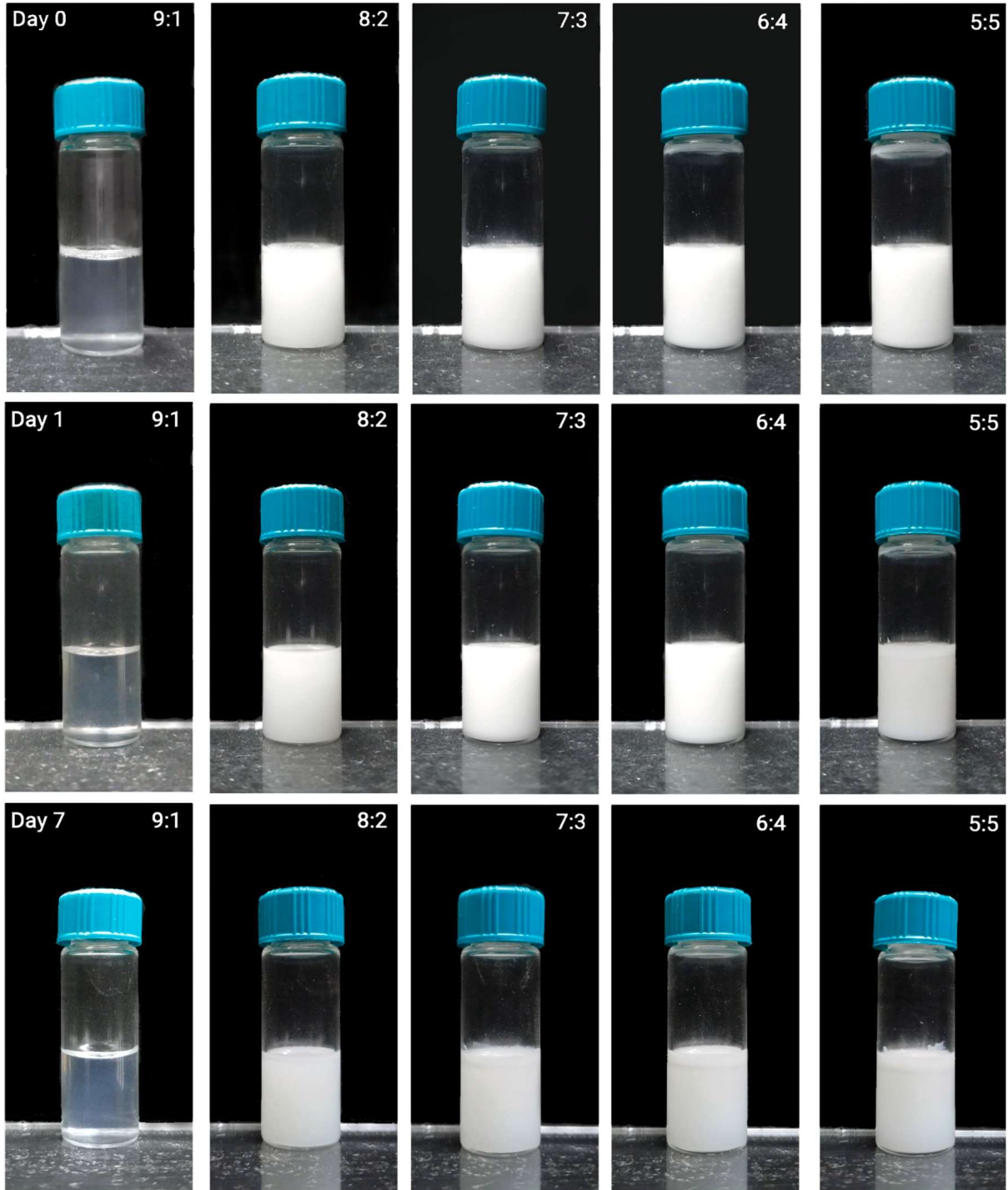
**Fig. 1.** Macroscopic characteristics of the *Eugenia sulcata* essential oil nanoemulsions prepared with polysorbate 20 at different surfactants to oil ratios in the day of preparation (Day 0) and after 1 and 7 days of preparation.



**Fig. 2.** Macroscopic characteristics of the  $\beta$ -caryophyllene nanoemulsions prepared with polysorbate 20 at different surfactants to oil ratios in the day of preparation (Day 0) and after 1 and 7 days of preparation.



**Fig. 3.** Macroscopic characteristics of the *Eugenia sulcata* essential oil nanoemulsions prepared with polysorbate 80 at different surfactants to oil ratios in the day of preparation (Day 0) and after 1 and 7 days of preparation.



**Fig. 4.** Macroscopic characteristics of the  $\beta$ -caryophyllene nanoemulsions prepared with polysorbate 80 at different surfactants to oil ratios in the day of preparation (Day 0) and after 1 and 7 days of preparation.

The P20-based NEs prepared with EOES showed an opaque appearance at SOR 5:5 → 8:2. Over time, creaming was observed in these systems. Despite the NE obtained in the 9:1 ratio was translucent at the day of preparation, it became opaque after one day of preparation and a clear destabilization with lower transparent / upper opaque layer was observed after 7 days of storage (Fig. 1). Regarding the formulations with P20/ $\beta$ C, despite a tendency for better performance regarding gravitation separation was observed as SOR increased, all the systems were opaque and presented different levels of creaming (Fig. 2).

Regarding the NEs prepared with P80 and EOES, it was observed that the formulation at SOR 9:1 presented transparent aspect and the formulation with SOR 8:2 was translucent, while the others presented an opaque white appearance (Fig. 3). Moreover, the absence of creaming at these higher SOR (9:1 and 8:2), when compared to the unstable analogues prepared with P20, highlight the potential of P80 in the generation of NE-EOES.

Ostwald ripening is the main breakdown mechanism for destabilization of NEs. It is associated to release of most hydrophilic compounds of a complex oil, being transferred from smaller to bigger droplets through external phase. Considering that P20 is more hydrophilic than P80, it is probably contributing to solubilization of compounds and therefore inducing lower stable NEs by this mechanism. In the other hand, the presence of more lipophilic compounds in the internal phase may avoid the Ostwald ripening by a maintenance of the composition in the droplets. This mechanism is called compositional ripening and presence of some monoterpenes may be decisive for this stabilization (Rao and McClements, 2012).

The formulation prepared with P80 and  $\beta$ C at SOR 9:1 presented a transparent/translucent appearance with a bluish reflection, while the other proportions presented an opaque and/or milky appearance (Fig. 4). Despite at SOR 8:2 it presented lower macroscopical indicative of fine droplets when compared to P80-based NE-EOES, it was capable of inducing better performance than the analogue P20- $\beta$ C-NE at the same SOR. Beyond possible explanations regarding compositional ripening as an opposite force to Ostwald ripening, the macroscopical data related to NEs prepared solely with  $\beta$ C may be due to a better the compatibility of P80 with this sesquiterpene. Often when the required hydrophilic-lipophilic balance (rHLB) value of an oil is close to the hydrophilic-lipophilic value of a surfactant or surfactant mixture, formation of fine droplets occurs. In this context, probably the rHLB of the  $\beta$ C is close to 15.0 (HLB value of P80), also contributing for better stabilization of EOES by formation of interfacial film and reduction of surface tension.



**Table 2.** Dynamic light scattering data for the nanoemulsions prepared with the essential oil of *Eugenia sulcata* (NE-EOES) or  $\beta$ -caryophyllene (NE- $\beta$ C). Data is expressed as mean  $\pm$  standard deviation associated to intensity distribution (Z-average) or volume distribution (D4,3). Representative peak sizes (Peak 1) associated to intensity or volume are also presented.

	Z-average			D4,3		
	Size (d. nm)	PdI	Peak 1 (nm)	Intensity (%)	Peak 1 (nm)	Volume (%)
NE-EOES (9:1)	80.90 $\pm$	0.482 $\pm$	134.30 $\pm$	90.10 $\pm$	10.40 $\pm$	98.10 $\pm$
	0.70	0.005	6.80	0.40	0.60	0.30
NE-EOES (8:2)	66.80 $\pm$	0.749 $\pm$	266.60 $\pm$	80.90 $\pm$	12.0 $\pm$	98.80 $\pm$
	6.60	0.206	34.00	3.60	3.40	0.20
NE- $\beta$ C (9:1)	47.60 $\pm$	0.691 $\pm$	159.90 $\pm$	74.20 $\pm$	10.50 $\pm$	99.70 $\pm$
	0.20	0.002	3.70	0.30	0.30	0.00
NE- $\beta$ C (8:2)	172.60 $\pm$	1.00 $\pm$	621.40 $\pm$	67.60 $\pm$	12.30 $\pm$	98.90 $\pm$
	2.6	0.00	329.10	8.40	0.30	0.10

Thus, the NEs selected for the antifungal assays were those prepared with P80-EOES and  $\beta$ C at SOR 9:1 and 8:2. DLS analysis showed average size around 47.6 – 80.9 nm for the systems prepared with EOES (SORs 9:1 and 8:2) and  $\beta$ C (SOR 9:1), while the system prepared with  $\beta$ C at SOR 8:2 presented average size around 172.6 nm (Table 2). This data corroborates macroscopical appearance, since larger droplets scatters more light and are associated to increased turbid systems.

The inhibition of *A. parasiticus* and *A. flavus* colonies indicate a fungistatic effect in the 72 h incubation period, even though no fungicidal activity was observed. There was no significant difference ( $p > 0.05$ ) between the inoculum growth control and blank nanoemulsions (without active), indicating that the surfactants present in the nanoemulsion formulations didn't affect the *A. flavus* and *A. parasiticus* colonies' growth.

In the first 24 h of incubation, the ESEO did not affect *A. parasiticus* growth ( $p > 0.05$ ), however, a fungistatic effect was observed against the *A. flavus* (21.50%;  $p < 0.01$ ). The sesquiterpene  $\beta$ C affected both strains ( $p < 0.001$ ) (*A. flavus*: 19.50%; *A. parasiticus*: 15.00%). No statistical difference ( $p > 0.05$ ) was observed by comparing the EOES and  $\beta$ C, even though 29.97% of the essential oils refer to the sesquiterpene  $\beta$ C. This may indicate that, despite having

some inhibition level in the *Aspergillus* strains, the  $\beta$ C it's not the only agent in the EOES that may be associated with the fungistatic effect.

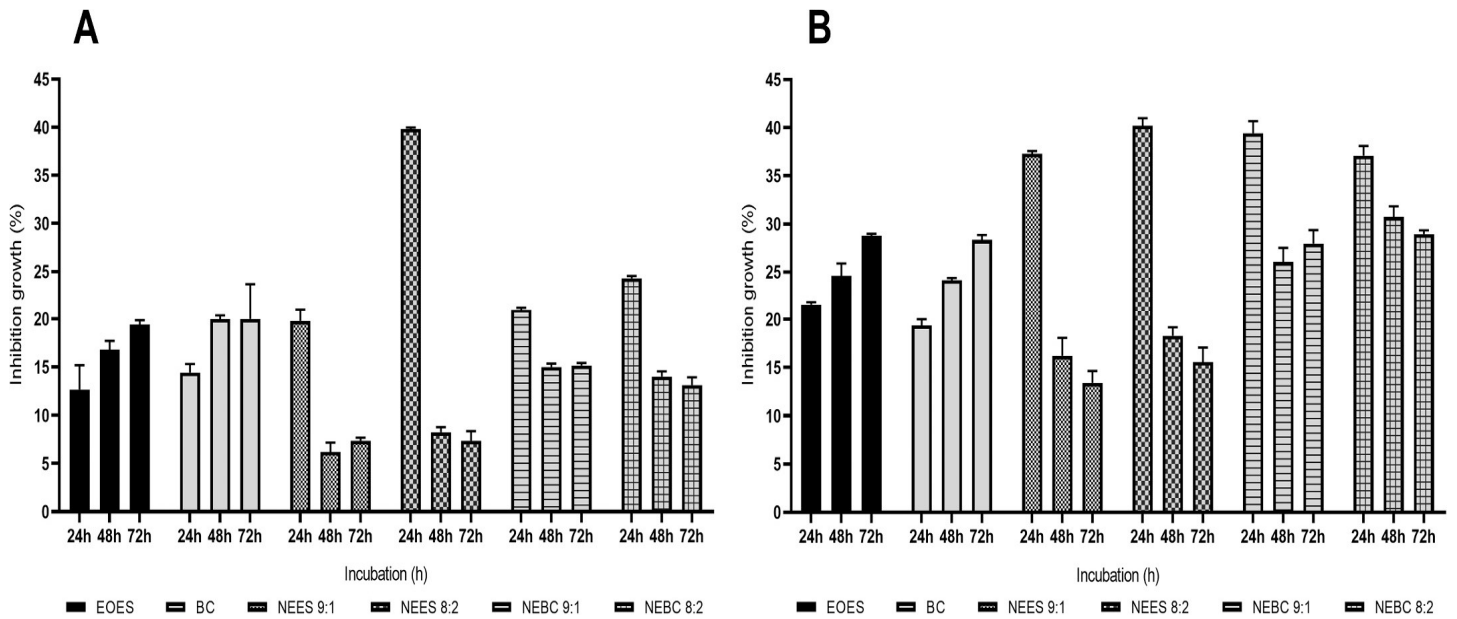
From 48 h of incubation, EOES show significant inhibition even in the *A. parasiticus* ( $p < 0.01$ ), while  $\beta$ C showed a significant ( $p < 0.05$ ) increase in the inhibition against both strains. The EOES and  $\beta$ C maintain the response at 72 h ( $p > 0.05$ ), reaching the higher inhibition, as seen in Fig. 5, with, respectively, 19.00% and 24.50% in *A. parasiticus* and 28.50% and 30.00% in *A. flavus*. The increasing effect observed over time in the fungistatic activity may be related to the fact that EOES and  $\beta$ -caryophyllene have limited solubility in hydrophilic media, requiring more time to the fungistatic effects be observed.

All NEs potentialized the bioactive responses at 24 h ( $p < 0.05$ ), causing a superior inhibition even at concentration 100 times lower than the EOES. The potentiation may be due nanometric-sized droplets of droplets that therefore present a higher surface area and provide a better distribution of the bioactive agent (Hammoud et al., 2022). Those characteristics can improve the bioavailability and, in that way, facilitate consumption or metabolization by *Aspergillus* colonies. This would, hypothetically, generate less time for the effect to be observed.

No difference was observed ( $p > 0.05$ ) between the formulations, with the exception of the NE-EOES 8:2 against the *A. parasiticus* strains, which showed the greatest inhibition (45.00%;  $p < 0.0001$ ) in comparison to the other three NE formulations (20 – 25%;  $p < 0.05$ ). The higher fungistatic activity against *A. flavus* was also induced by NE-EOES 8:2. It reached 43.00% ( $p < 0.0001$ ), while the remaining reached around 37.00 – 41.00% ( $p < 0.0001$ ).

The higher fungistatic activity by the NEs were observed in the 24 h, followed by a significant ( $p < 0.05$ ) decrease in their activity between 24 h and 48 h. The decrease was more prominent in the *A. parasiticus* colonies, as exemplified in the NE-EOES 8:2 reduction for both strains ( $p < 0.001$ ).

No significant ( $p > 0.05$ ) change was observed in the effect between 48 h and 72 h, suggesting the maintenance of the effect in this period. The NE-EOES 8:2, however, showed no more fungistatic effect ( $p > 0.05$ ) at 72 h. The other formulations show equivalence to their bioactives ( $p > 0.05$ ). One would expect the decrease in the NE fungistatic effects, since the EOES oil didn't have fungicide properties in the *Aspergillus* strains. The greater hydrophilicity and penetration of the NE in the media may facilitate the consumption and reduce the amount of bioactive substances. A reduction in the time of contact with the colony may lead to a smaller duration of its effect. The  $\beta$ CNE showed an effect significantly ( $p < 0.05$ ) greater than the NE-EOES.



**Fig. 5.** Percentage of growth inhibition against *Aspergillus parasiticus* (A) and *Aspergillus flavus* (B) after 24, 48, and 72 h of incubation. *Eugenia sulcata* essential oil (EOES) and its nanoemulsion (NE-EOES).  $\beta$ -caryophyllene (BC) and its nanoemulsion (NE-BC).

Several authors have described the synergic effects related to the presence of essential oils. Moreover, modulation of droplet size can alter the biological properties when compared to bulk material (Viveka-nandhan et al., 2023). Dynamic light scattering is a main technique for characterization of nanostructured systems. According to the Stokes-Einstein equation, the hydrodynamic radius can be obtained and the z-average diameter of the disperse nanostructures deduced on intensity is wide used, however, measurements in term of volume can also provide supporting information (Bhattacharjee, 2016).

Table 2 shows that in term of D4,3 all the nanoemulsions present similar size volume (~10 nm) with high percentage (>98%). Results associated to NE-EOES are probably due to close percentages of droplets in a sub-micron nanometric range that do not alter the biological potential (SOLANS and SOLE', 2012). However, combined factors may explain a main tendency for consideration of NE-EOES (8:2) as a potential agent. EOES is a complex mixture physically obtained through hydrodistillation, while the  $\beta$ -caryophyllene is a single compound that needs be chemically obtained, showing that NE-EOES is in accordance with sustainable concepts.

NE-EOES (8:2) presented the highest activity against *A. parasiticus*, being in accordance with literature data reporting differences of a nanomaterial against pests

taxonomically close (Vivekanandhan et al., 2023). Interestingly lower size values were observed for NE- $\beta$ C (9:1) and NE-EOES (8:2). Despite supporting material of most abundant peaks can also provide additional information, suggesting contribution of higher droplets for NE-EOES, the most important parameter is the z-average value expressed as intensity. One would expect lower droplets, e.g. NE- $\beta$ C (9:1), would induce higher bioactivity. However, the widest technique used for colloid characterization, the DLS, has an intrinsic limitation when size is too close at a ratio disable distinguishment of droplets (Bhattacharjee, 2016).

In the case of the present study, another factor is associated to the fact that NE-EOES (8:2) is prepared with lower surfactant than NE- $\beta$ C (9:1), favoring its stabilization against Ostwald ripening (slight lower surface area and less amount of hydrophilic surfactant capable of inducing mass transport of molecules). Moreover, NE- $\beta$ C (9:1) is prepared with a single-component, being also more susceptible to destabilization in the tested media, while the NE-EOES can protect release through compositional ripening (Rao and McClements, 2012).

#### 4. Conclusions

An overall pattern of reduction of inhibition growth as function of time for the NEs. By exploring the behavior of *A. parasiticus*, some interpretation data related to some basis of nanostructuring natural products can be obtained. In the beginning of the experiment, the nanoemulsification was capable of exerting antifungal activity by enhancing the bioactivity of the EOES due to better penetration and dispersion in the culture media. The present study details possible correlation between colloidal behavior and bioactivity, also showing a design that can be used for selection of surfactants with macroscopical and spectroscopical information that can help further studies and contributes to chemistry of colloids with applications in pest control.

#### References

- Aljabri, N.M., Shi, N., Cavazos, A., 2022. Nanoemulsion: an emerging technology for oil field applications between limitations and potentials. *J. Pet Sci. Eng.* 208, 109306 <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2021.109306>.
- Awadalla, S.S., Zayed, G.M., Hashem, A.S., 2017. Chemical composition and bioactivity of three plant essential oils against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus oryzae* (L.). *J. Plant Prot. Path Mansoura Univ.* 8, 535–539. <https://doi.org/10.21608/JPPP.2017.46601>.
- Bhattacharjee, S., 2016. DLS and zeta potential – what they are and what they are not? *J. Control. Release* 235 (2016), 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.

Barradas, T.N., de Holanda e Silva, K.G., 2021. Nanoemulsions of essential oils to improve solubility, stability and permeability: a review. *Environ. Chem. Lett.* 19, 1153–1171. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01142-2>.

Bendifallah, L., Merah, O., 2023. Phytochemical and biocidal properties of *Artemisia campestris* subsp. *campestris* L. (Asteraceae) essential oil at the southern region of Algeria. *J. Nat. Pestic. Res.* 4, 100035 <https://doi.org/10.1016/j.napere.2023.100035>.

Castellanos, L.M., Olivas, N.A., Ayala-Soto, J., Contreras, C.M., Ortega, M.Z., Salas, F.S., Hernandez-Ochoa, L., 2020. 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.). *Int. J. Microbiol.* 2020, 1702037 <https://doi.org/10.1155/2020/1702037>.

Chamorro, E.R., Zambon, S.N., Morales, W.G., Sequeira, A.F., Velasco, G.A., 2012. Study of the chemical composition of essential oils by gas chromatography. In: Salih, B., Çelikbıçak, O. (Eds.), *Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications*. In Tech, Rijeka, pp. 307–324. <https://doi:10.5772/33201>.

Dahham, S.S., Tabana, Y.M., Iqbal, M.A., Ahamed, M.B.K., Ezzat, M.O., Majid, A.S.A., Majid, A.M.S.A., 2015. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene  $\beta$ -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules* 20 (7), 11808–11829. <https://doi.org/10.3390/molecules200711808>.

Dutra, R.C., Campos, M.M., Santos, A.R., Calixto, J.B., 2016. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol. Res.* v. 112, 4–29. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>.

Eskola, M., Kos, G., Elliott, C.T., Hajslová, J., Mayar, S., Krska, R., 2020. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: validity of the widely cited 'FAO estimates of 25%. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 60 (16), 2773–2789. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1658570>.

Feder, D., Gonzalez, M.S., Mello, C.B., Santos, M.G., Rocha, L., Kelecom, A., Folly, E., 2019. Exploring the Insecticide and acaricide potential of development regulators obtained from restinga vegetation from Brazil. *An. Da Acad. Bras. De Ciências* 91 (1), e20180381. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180381>.

Ferreira, O.O., Silva, S.H.M., Oliveira, M.S., Andrade, E.H.A., 2021. Chemical composition and antifungal activity of *Myrcia multiflora* and *Eugenia florida* essential oils. *Molecules* 2021 26 (23), 7259. <https://doi.org/10.3390/molecules26237259>.

Frisvad, J.C., Hubka, V., Ezekiel, C.N.A.J., Arzanlou, M., Larsen, T.O., Sklenar, F., Mahakarnchanakul, W., Samson, R.A., Houbraken, J., 2019. Affiliations expand. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Stud. Mycol.* 93, 1–63. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.06.001>.

- Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabolitos secundarios. *Quím. Nova* 30 (2), 374–381. <https://doi.org/10.1590/S010040422007000200026>.
- Hammoud, Z., Abada, M.B., Greige-Gerges, H., Elaissari, A., Jemaa, J.M.B., 2022. Insecticidal effects of natural products in free and encapsulated forms: an overview. *J. Nat. Pestic. Res.* 1, 100007 <https://doi.org/10.1016/j.napere.2022.100007>.
- Magalhaes, B.Q., Machado, F.P., Sanches, P.S., Lima, B., Falcao, D.Q., von Ranke, N., Bello, M.L., Rodrigues, C.R., Santos, M.G., Rocha, L., 2022. *Eugenia sulcata* (Myrtaceae) nanoemulsion enhances the inhibitory activity of the essential oil on P2×7R and inflammatory response in vivo. *Pharmaceutics* 14 (5), 911. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14050911>.
- Lima, B.G., Tietbohl, L.A.C., Fernandes, C.P., Cruz, R.A.S., Botas, G.S., Santos, M.G., Silva-Filho, M.V., Rocha, L.M., 2012. Chemical composition of essential oils and anticholinesterasic activity of *Eugenia sulcata* Spring ex Mart. *Lat. Am. J. Pharm.* 31, 152–155.
- Pinto, L.A., Machado, F.P., Esteves, R., Farias, V.M., Koptcke, F.B.N., Ricci-Junior, E., Rocha, L., Keller, L.A.M., 2023. Characterization and inhibitory effects of essential oil and nanoemulsion from *Ocotea indecora* (Shott) Mez in *Aspergillus* Species. *Molecules* 28 (8), 3437. <https://doi.org/10.3390/molecules28083437>.
- Ríos, J.L., 2016. Essential oils: what they are and how the terms are used and defined. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Academic Press, pp. 3–10. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00001-8>
- Salas, M.L., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., Coton, E., 2017. Antifungal microbial agents for food biopreservation—a review. *Microorganisms* 5 (3), 37.
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M.A., Soliva-Fortuny, R., Martin-Belloso, O., 2014. Impact of microfluidization or ultrasound processing on the antimicrobial activity against *Escherichia coli* of lemongrass oil-loaded nanoemulsions. *Food Control* 37, 292–297. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.015>.
- Santos, K.T., Silva, F.O.L., Schneider, L.A., Santos, C.E.R., Silva, S.E.B., Fernandes, M.B., Rocha, L., Oliveira, L.F.S., Machado, M.M., Moreira, C.M., 2019. Essential oil of the leaves of *Eugenia sulcata* preserve myocardial contractility and does not present immunotoxicity. *Braz. J. Pharm. Sci.* 55, e17742 <https://doi.org/10.1590/s21757902019000117742>.
- Turek, C., Stintzing, F.C., 2013. Stability of essential oils: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 12, 40–53. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>.
- Vivekanandhan, P., Panikar, S., Sethuraman, V., Usha-Raja-Nanthini, A., Muthugounder, S.S., 2023. Toxic and synergetic effect of plant essential oils along with nano-emulsion for control of three mosquito species. *J. Nat. Pestic. Res.* 5, 100045 <https://doi.org/10.1016/j.napere.2023.100045>.
- Wilson, R.J., Li, Y., Yang, G., Zhao, C.X., 2022. Nanoemulsions for drug delivery. *Particuology* 64, 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2021.05.009>.

Zinedine, A., El Akhdari, S., 2019. Food safety and climate change: case of mycotoxins. *Handb. Res. Glob. Environ. Chang. Hum. Health* 74–97. <https://doi.org/10.4018/978-1-7998-5354-1.ch003>.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Os OEs das espécies *Ocotea indecora* e *Eugenia sulcata* apresentaram ampla predominância de sesquiterpenos, se destacando, respectivamente, o sesquirosefurano (86,13%) e o  $\beta$ -cariofileno (34,40%). Observando a composição dos OEs e os efeitos biológicos semelhantes, infere-se que a classe, já relacionada a diversas atividades biológicas, apresenta também potencial fungistático.

O sesquirosefurano e o  $\beta$ -cariofileno, entretanto, são substâncias estruturalmente bem diferentes e, ainda mais, em concentrações diferentes em seus respectivos óleos essenciais. Isso não só inviabiliza o uso de uma mesma formulação de nanoemulsão para ambos, sendo necessário adaptá-las para as diferentes composições de cada OE, como dificulta uma comparação direta entre seus efeitos nas cepas de *Aspergillus* utilizadas no trabalho.

Os OEs tanto da *O. indecora* quanto da *E. sulcata* e o  $\beta$ -cariofileno, substância majoritária no OE da *Eugenia sulcata*, apresentam baixa ou lenta bioatividade nas cepas fúngicas, em todos os ensaios há aumento significativo da atividade quando são formulados em NE. Demonstra-se assim a capacidade das NE em potencializar os efeitos dos bioativos, sendo possível relacionar o fenômeno à maior hidrofiliabilidade e melhor interação com os organismos. Sugere-se assim que a mudança físico-química pode facilitar a dispersão e reduzir a concentração necessária para atividade, aumentando a eficácia.

O maior e mais duradouro efeito de inibição foi observado frente a espécie *Aspergillus westerdijkiae*. Em todas as concentrações testadas da NE de *O. indecora*, observou-se atividade fungistática acima de 40% e, na maior concentração, acima de 65%, havendo ainda atividade acima de 25% nas maiores concentrações por pelo menos 96 horas. Porém, não se observou alteração morfológica, macroscópica ou microscópica, nesta ou nenhuma cepa. Também não se registrou alteração na produção de micotoxinas, como a própria morfologia já indicava.

A cepa de *A. parasiticus* demonstrou sensibilidade equivalente aos bioprodutos, com as NE na concentração de 1024  $\mu\text{g/mL}$  gerando inibição de aproximadamente 25%. Por outro lado, na espécie *A. flavus* observou-se atividade fungistática mais elevada na presença das formulações de *E. sulcata*, inclusive em concentrações inferiores. As maiores inibições em ambas as cepas foram observadas na presença da nanoemulsão preparada a partir do óleo essencial de *Eugenia sulcata* na proporção de 8:2 (NE-EOES 8:2), com inibições acima de 40%, apesar da queda acentuada da atividade ao longo do tempo.

Um fator importante é o tamanho da gotícula, uma vez que a formulação NE-EOES 8:2 apresenta o menor tamanho de gotícula ( $66,80 \pm 6,60$  nm) de OE. Sua atividade, portanto,



está em acordo com o estabelecido na literatura sobre a relação entre o tamanho de gotícula e efeito nos microrganismos. Enfatiza-se a importância da seleção de formulações de NE, pois, uma composição que leve ao menor tamanho de gotícula e o mantenha estável por longo período pode melhorar a manutenção da atividade. O menor tamanho de gotícula, entretanto, foi observado no NE de  $\beta$ -cariofileno ( $47,60 \pm 0,20$  nm). A característica físico-química das nanoemulsões e a porcentagem de  $\beta$ -cariofileno no OE, sugerem, quando comparados aos resultados antifúngicos, que a substância majoritária não é o único agente associado ao efeito fungistático da *E. sulcata*. Tal fato destaca a função que complexidade química dos OE desempenha nas atividades biológicas e como sua elucidação é essencial para a otimização do desenvolvimento de produtos.

As características físico-químicas das NE também podem causar uma queda na atividade ao longo do tempo. A maior difusão e absorção podem levar a diminuição rápida da concentração e, conseqüentemente, em uma perda de eficácia. Além disso, a interação das NE com outros componentes do meio pode afetar a estabilidade e a atividade do princípio ativo, o que pode contribuir para a redução de atividade ao longo do tempo. Assim, a seleção adequada da formulação da nanoemulsão é crítica para o desenvolvimento de produtos eficazes.

Outro destaque é o potencial do OE ser mais vantajoso que o uso de substâncias isoladas ou quimicamente sintetizadas, destacando novamente a biodiversidade com seu potencial inestimável. É interessante estudar outras formas de derivados vegetais que contenham metabólitos secundários, como os extratos vegetais, que possuem propriedades e substâncias diferentes dos OE e tem metodologias e bioatividades reconhecidas na literatura. O estudo de extratos e frações das espécies *O. indecora* e *E. sulcata*, que já demonstraram atividade antifúngica no presente trabalho, pode auxiliar na compreensão da biodiversidade da restinga fluminense e permitiria uma visão mais ampla da bioatividade da espécie.

É possível ainda que estudos complementares permitam o desenvolvimento de biopesticidas sustentáveis, com menos danos à saúde e ao meio ambiente, porém, o entendimento da composição química e comportamento biológico das substâncias naturais é crítico para garantir a segurança do uso dos bioprodutos, especialmente com destino a alimentação. Como não há estudos elucidando as conseqüências do consumo dos bioativos, estudos focados na toxicidade devem ser empregados para os extratos e frações a serem testados, bem como para os OE e nanoemulsões avaliados, determinando sua viabilidade.

O presente estudo, portanto, permite concluir que a classe dos sesquiterpenos possui atividade fungistática no gênero *Aspergillus* e evidencia que a complexidade química dos óleos essenciais pode resultar em efeitos superiores às substâncias puras. Todas as nanoemulsões

demonstraram atividade na concentração de 1024  $\mu\text{g/mL}$  ou maior, com as formulações sendo agentes fungistáticos mais eficazes que os óleos essenciais contra as cepas estudadas. Tal fato, destaca novamente a capacidade da nanoemulsão de potencializar os efeitos de seus bioativos e, neste caso, reduzir por pelo menos 24 horas o metabolismo primário das espécies de *Aspergillus* testadas.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, n. 594, 2017.
- ALJABRI, N. M.; SHI, N.; CAVAZOS, A. Nanoemulsion: An emerging technology for oil field applications between limitations and potentials. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, Elsevier, 2022.
- ALTEMIMI, A. et al. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. **Plants**, MDPI, 2017.
- ANAND, S.; SATI, N. Artificial Preservatives and their Harmful Effects: Looking Toward Nature for Safer Alternatives. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 7, p. 2496, 2013.
- ARIAS, M. et al. Preparations for invasion: Modulation of host lung immunity during pulmonary aspergillosis by gliotoxin and other fungal secondary metabolites. **Frontiers in Immunology**, v. 9, NOV, p. 1–12, 2018.
- AYOFEMI, O. A. S. Aflatoxigenic fungi and mycotoxins in food: a review. **Critical Review in Food Sciences and nutrition**, v. 60, n. 5, p. 709-721, 2020.  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1548429>
- AZEEM, A.; RIZWAN, M.; AHMAD, F. J.; IQBAL, Z.; KHAR, R. K.; AQIL, M.; TALEGAONKAR, S. Nanoemulsion components screening and selection: a technical note. **Aaps Pharmscitech**, v. 10, p. 69-76, 2009.
- BARBOSA, C. D. S.; BORGES, L. M. F.; NICÁCIO, J., ALVES, R. D.; MIGUITA, C. H.; VIOLANTE, I. M. P.; GARCEZ, F. R. In vitro activities of plant extracts from the Brazilian Cerrado and Pantanal against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Experimental and applied acarology**, n. 60, p. 421-430, 2013
- BORGES, L. L.; CONCEIÇÃO, E. C.; SILVEIRA, D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. **Food Chemistry**, v. 153, p. 224–233, 2014.
- BRASIL. Lei Nº 12.651, de 25 de maio de 2012. **Diário Oficial da União**. Brasil, DF, 2012.
- BRASIL. Instrução Normativa—In Nº 160, de 1º de julho de 2022 (Publicada no DOU nº 126, de 6 de julho de 2022). Estabelece os Limites Máximos Tolerados (LMT) de Contaminantes em Alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasil, DF, 2022.

CALDAS, D. K. D.; BAUMGRATZ, J. F. A.; DA COSTA SOUZA, M. Flora of the state of Rio de Janeiro: *Myrciaria*, *Neomitranthes* and *Siphoneugena* (Myrtaceae). **Rodriguesia**, v. 71, 2020.

CAST - Council for Agricultural Science and Technology. Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. 2003.

CASTELLANOS, L.M.; OLIVAS, N.A.; AYALA-SOTO, J.; CONTRERAS, C.M.; ORTEGA, M.Z.; SALAS, F.S.; HERNANDEZ-OCHOA, L. 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 Microbiology**, 2020.

CHEN, Y. et al. High azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from Strawberry Fields, China, 2018. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2020.

CHOUDHURY, S.; DASGUPTA, S.; PATEL, D. K.; RAMANI, Y. R.; GHOSH, S. K.; MAZUMDER, B. Nanoemulsion as a carrier for topical delivery of aceclofenac. **Advanced Nanomaterials and Nanotechnology**, Springer Berlin Heidelberg, p. 1–19, 2013.

CHROUMPI, T.; MÄKELÄ, M. R.; DE VRIES, R. P. Engineering of primary carbon metabolism in filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, v. 43, n. May, p. 107551, 2020.

COLLEMARE, J.; SEIDL, M. F. Chromatin-dependent regulation of secondary metabolite biosynthesis in fungi: Is the picture complete? **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 6, p. 591–607, 2019.

CONCEICAO, R. S.; CARNEIRO, M. M. A. D. A.; REIS, I. M. A.; BRANCO, A.; VIEIRA I. J. C.; BRAZ-FILHO, R.; BOTURA, M. B. In vitro acaricide activity of *Ocotea aciphylla* (Nees) Mez. (Lauraceae) extracts and identification of the compounds from the active fractions. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 8, n. 2, p. 275-282, 2017.

COSTA, V. P. P.; HOLANDA, A. C.; DO PRADO COSTA, M. Vegetation structure as an indicator of disturbance and resilience in a conservation unit in the Atlantic Forest. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, v. 50, 2022. DOI: 10.18671/SCIFOR.V50.14.

DAHAM, S.S.; TABANA, Y.M.; IQBAL, M.A.; AHAMED, M.B.K.; EZZAT, M.O.; MAJID, A.S.A.; MAJID, A.M.S.A. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene  $\beta$ -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 11808–11829, 2015. <https://doi.org/10.3390/molecules200711808>.

DENNING, D. W.; BROMLEY, M. J. Infectious Disease: How to bolster the antifungal pipeline. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1414-1416, 2015.

DE SOUZA, A. M. et al. Traditional Uses, Phytochemistry, and Antimicrobial Activities of *Eugenia* Species - A Review. **Planta Médica**, v. 84, n. 17, p. 1232–1248, 17 jul. 2018.

ESKOLA, M. et al. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited “FAO estimate of 25%”. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2020.

FARIAS, V. M.; PEREIRA, B. C. S. F.; PINTO, L. A.; KÖPTCKE, F. B. N.; KELLER, L. A. M.; FRANCO, R. M. Caracterização da microbiota e detecção de aflatoxina M1 em fórmulas infantis. **Revista Caribeña De Ciencias Sociales**, v. 12, n. 4, p. 1828–1839, 2023. <https://doi.org/10.55905/rcssv12n4-018>

FEDER, D.; GONZALEZ, M. S.; MELLO, C. B.; SANTOS, M. G.; ROCHA, L.; KELECOM, A.; FOLLY, E. Exploring the Insecticide and acaricide potential of development regulators obtained from restinga vegetation from Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 1, 2019. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180381>.

FIGUEIREDO, A. et al. First report of the effect of *Ocotea elegans* essential oil on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 252, p. 131–136, 2018.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; World Health Organization. *Codex Alimentarius* International Food Standards; FAO: Rome, Italy; WHO: Geneva, Switzerland, 2020.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Centers for Food Safety Applied Nutrition Generally Recognized as Safe (GRAS), U.S. 2017. Accessed on 17 March 2024 - online: <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>.

FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Porto Alegre: Artmed, 422p, 2002

FRAC - COMITÊ DE AÇÃO A RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS. 2022. Disponível em: <https://irac-online.org/documents/classificacao-do-modo-de-acao>. Acesso em: 12 jun. 2024.

FRISVAD, J. C. et al. Taxonomy of *Aspergillus* section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 93, p. 1–63, 2019.

GALLO, M.; FERRARA, L.; CALOGERO, A.; MONTESANO, D.; NAVIGLIO, D. Relationships between food and diseases: What to know to ensure food safety. **Food Research International**, v. 137, 2020.

GEISEN, R. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. **Systematic and Applied Microbiology**, n. 19, p. 388–392, 1996.

GONZALES, M.S.; LIMA, B.G.; OLIVEIRA, A.F.R.; FEDER, D. Effects of essential oil from leaves of *Eugenia sulcata* on the development of agricultural pest insects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 413-418, 2014.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food control**, v. 46, p. 412-429. 2014.

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**, MDPI, 2021.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R., MENDES, G. L., SCAGLIONI, P. T., BADIALE-FURLONG, E., SOUZA-SOARES, L. A. Biochemistry and metabolism of mycotoxins: A review. **African Journal of Food Science**, v. 5, n. 16, p. 861-869, 2011.

HILL, L. E.; GOMES, C.; TAYLOR, T. M. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. **LWT**, v. 51, n. 1, p. 86–93, 2013.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 12, 2012.

ISO 9235:2021. Aromatic natural raw materials. Accessed on 17 March 2024 - online: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:ed-3:v1:en:sec:foreword>

JALILI, M. A review on aflatoxins reduction in food. **Iranian Journal of Health, Safety and Environment**, v. 3, n. 1, p. 445-459, 2016.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 2–3, p. 155– 176, 2016.

KONARSKA, A.; WERYSZKO-CHMIELEWSKA, E.; SULBORSKA-RÓZYCKA, A.; KIELTYKA-DADASIEWICZ, A.; DMITRUK, M.; GORZEL, M. Herb and Flowers of *Achillea millefolium subsp. millefolium* L.: Structure and Histochemistry of Secretory Tissues and Phytochemistry of Essential Oils. **Molecules**, v. 28, 2023.  
<https://doi.org/10.3390/molecules28237791>

LAGO, J. H. G. et al. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of Myrtaceae - *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) kausel. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 9827–9837, 2011.

LIMA, B. G.; TIETBOHL, L. A. C.; FERNANDES, C. P.; CRUZ, R. A. S.; BOTAS, G. S.; SANTOS, M. G.; SILVA-FILHO, M. V.; ROCHA, L. M. Chemical composition of essential

oils and anticholinesterasic activity of *Eugenia sulcata* Spring ex Mart. **Latin American Journal of Pharmacy**, n. 31, p. 152–155, 2012.

LOI, M. et al. Mycotoxin biotransformation by native and commercial enzymes: Present and future perspectives. **Toxins**, MDPI, 2017.

LOPES MARTINS, R. et al. Development of larvicide nanoemulsion from the essential oil of *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng against *Aedes aegypti*, and its toxicity in non-target organism. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 6, 2021.

LOURENÇO Jr., J.; NEWMAN, E. A.; VENTURA, J. A.; MILANEZ, C. R. D.; THOMAZ, L. D.; WANDEKOKEN, D. T.; ENQUIST, B. J. Drivers of plant traits and forest functional composition in coastal plant communities of the Atlantic Forest. **bioRxiv**, 2019.

LOURENÇO Jr., J.; CUZZUOL, G. R. F. Caracterização de solos de duas formações de restinga e sua influência na constituição química foliar de *Passiflora mucronata* Lam. (Passifloraceae) e *Canavalia rosea* (Sw.) DC. (Fabaceae). **Acta Botânica Brasílica**, v. 23, p. 239-246, 2009.

LUZ, C. F. P.; BARROS, M. A.; MISUMI, S. Y. Palynological and microfossil-based environmental reconstruction of the Lagoa Comprida coastal lagoon in the restinga de Jurubatiba National Park, Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 118, 2022. DOI: 10.1016/j.jsames.2022.103851.

MACHADO, F. P. et al. Nanoemulsion of *Ocotea indecora* (Shott) Mez essential oil: Larvicidal effects against *Aedes aegypti*. **Industrial Crops and Products**, v. 192, 2023.

MAGALHAES, B. Q.; MACHADO, F. P.; SANCHES, P.S.; LIMA, B.; FALCAO, D. Q.; VON RANKE, N.; BELLO, M. L.; RODRIGUES, C. R.; SANTOS, M. G.; ROCHA, L. *Eugenia sulcata* (Myrtaceae) nanoemulsion enhances the inhibitory activity of the essential oil on P2×7R and inflammatory response in vivo. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 5, p. 911, 2022. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14050911>.

MARONGIU, B. et al. Antifungal activity and chemical composition of essential oils from *Smyrniolum olusatrum* L. (Apiaceae) from Italy and Portugal. **Natural Product Research**, v. 26, n. 11, p. 993–1003, 2012.

MARZUKI, N. H. C.; WAHAB, R. A.; HAMID, M. A. An overview of nanoemulsion: Concepts of development and cosmeceutical applications. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, Taylor and Francis Ltd., 2019.

MAURYA, P.K.; MALIK, D.J.J. Bioaccumulation of xenobiotics compound of pesticides in riverine system and its control technique: a critical review, **Journal of Industrial Pollution Control**, v. 32, n. 2, 2016.

MERAD, N. et al. Essential oils from two Apiaceae species as potential agents in organic crops protection. **Antibiotics**, v. 10, n. 6, 2021.

MEZZOMO, P.; SAUSEN, T. L.; PAROUL, N.; ROMAN, S. S.; MIELNICZKI, A. A. P.; CANSIAN, R. L. Antifungal activity of *Ocotea odorifera* (Vell.) Rowher, *Ocotea puberula* (rich.) Nees and *Cinnamodendron dinisii* Schwanke essential oils. **BioRxiv**, 2019

MOEBUS, V.F.; PINTO, L.D.A.; KÖPTCKE, F.B.N.; KELLER, K.M.; ARONOVICH, M.; KELLER, L.A.M. In Vitro Mycotoxin Decontamination by *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Bovine Forage. **Fermentation**, v. 9, n. 585. 2023.  
<https://doi.org/10.3390/fermentation9070585>

MUSTAFA, I. F.; HUSSEIN, M. Z. Synthesis and technology of nanoemulsion-based pesticide formulation. **Nanomaterials**, MDPI, 2020.

NASCIMENTO, L. M. et al. Effects of nanoemulsion and essential oil from the leaves of *Ocotea elegans* against *Dysdercus peruvianus*. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e909108424, 19 set 2020.

BATISTA, A. N. L. et al. Aromatic compounds from three brazilian Lauraceae species. **Quimica Nova**. Disponível em: <<http://www.quimicanova.sbq.org.br>>.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, American Chemical Society, 2020.

NASROLLAHZADEH, A.; MOKHTARI, S.; KHOMEIRI, M.; SARIS, P.E.J. Antifungal Preservation of Food by Lactic Acid Bacteria. **Foods**, v. 11, p. 395, 2022.  
<https://doi.org/10.3390/foods11030395>

OSTERTAG, F.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 388, n. 1, p. 95–102, 2012.

PASSOS, B. G. et al. Essential oils from *Ocotea* species: Chemical variety, biological activities and geographic availability. **Fitoterapia**, Elsevier, 2022.

PATTNI, B. S.; CHUPIN, V. V.; TORCHILIN, V. P. New developments in liposomal drug delivery. **Chemical reviews**, v. 115, n. 19, p. 10938-10966, 2015.

PELES, F. et al. Biological control and mitigation of aflatoxin contamination in commodities. **Toxins**, MDPI AG, 2021.



PINO, J. A. et al. Chemical composition and biological activities of essential oil from *Ocotea quixos* (Lam.) leaves grown wild in Ecuador. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, v. 6, n. 1, p. 31–34, 2018.

PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British medical bulletin**, v. 56, n. 1, p. 184-192, 2000.

PRAKASH, B.; SINGH, P.; KEDIA, A.; DUBEY, N. K. Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and in vivo efficacy in food system. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 201-208, 2012.

PRIETO, J.A.; PABÓN, L.C.P.; OSCAR, J.; DELGADO, W.A.; CUCA, L.E. Constituyentes químicos, actividad insecticida y Antifúngica de los aceites esenciales de hojas de dos especies colombianas del género *Ocotea* (lauraceae). **Revista Colombiana de Química**, n. 39, p. 199–209, 2010.

QUINET, A.; BAITELLO, J. B.; MORAES, P. L. R. de; ASSIS, L.; ALVES, F. M. *Lauraceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8463>>.

RÁDULY, Z. et al. Toxicological and Medical Aspects of *Aspergillus*-Derived Mycotoxins Entering the Feed and Food Chain. **Frontiers in Microbiology**, Frontiers Media S.A., 2020.

RAI, V. K., MISHRA, N., YADAV, K. S., & YADAV, N. P. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. **Journal of controlled release**, v. 270, p. 203-225, 2018.

RAKOTONDRAIBE L. H.; GRAUPNER P. R.; XIONG Q.; OLSON M.; WILEY J. D.; KRAI P.; BRODIE P. J.; CALLMANDER M. W.; RAKOTOBÉ E.; RATOVOSON F.; RASAMISON V. E.; CASSERA M. B.; HAHN D. R.; KINGSTON D. G.; FOTSO S. Neolignans and other metabolites from *Ocotea cymosa* from the Madagascar Rain Forest and their biological activities. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 431-440, 2015.

RAMOS, M. F. S.; MONTEIRO, S. S.; DA SILVA, V. P.; NAKAMURA, M. J.; SIANI, A. C. Essential Oils from Myrtaceae Species of the Brazilian Southeastern Maritime Forest (Restinga). **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n. 2, p. 109–113, 2010.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. **Food hydrocolloids**, v. 29, n. 2, p. 326-334, 2012.

REIS, D. R.; AMBROSI, A.; DI LUCCIO, M. Encapsulated essential oils: A perspective in food preservation. **Future Foods**, v. 5, p. 100126, 2022.

- RIVERO-CRUZ, I. et al. Chemical Composition and Antimicrobial and Spasmolytic Properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* Essential Oils. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, 2011.
- ROCHA L.; RUPPELT, B. M.; GUERRA, M. S. Plantas da Restinga - Fitoquímica e Atividade Biológica. 1. ed., v. 1., Rio de Janeiro, 2023.
- RODRIGUES, M. P. et al. In vitro activity of neem (*Azadirachta indica*) oil on growth and ochratoxin a production by *Aspergillus carbonarius* isolates. **Toxins**, v. 11, n. 10, 2019.
- SALAS, M.L., MOUNIER, J., VALENCE, F., COTON, M., THIERRY, A., COTON, E. Antifungal microbial agents for food biopreservation – a review. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, p. 37, 2017.
- SALLEH, W. M. N. H. W.; AHMAD, F. Phytochemistry and biological activities of the genus *Ocotea* (Lauraceae): a review on recent research results (2000–2016). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 5, p. 204-218, 2017.
- SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, M. A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTIN-BELLOSO, O. Impact of microfluidization or ultrasound processing on the antimicrobial activity against *Escherichia coli* of lemongrass oil-loaded nanoemulsions. **Food Control**, n. 37, p. 292-297, 2014.
- SANTOS, K. T.; SILVA, F. O. L.; SCHNEIDER, L. A.; SANTOS, C. E. R.; SILVA, S. E. B.; FERNANDES, M. B.; ROCHA, L.; OLIVEIRA, L. F. S.; MACHADO, M. M.; MOREIRA, C. M. Essential oil of the leaves of *Eugenia sulcata* preserve myocardial contractility and does not present immunotoxicity. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, 2019. <https://doi.org/10.1590/s21757902019000117742>.
- SAMSON, R. A. Current fungal taxonomy and mycotoxins. **Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the century**, p. 21-25, 2001.
- SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, n. 1, p. 141–173, 2014.
- SHARMA, K. et al. **Essential Oil Nanoemulsion Edible Coating in Food Industry: a Review**. **Food and Bioprocess Technology**, Springer, 2022.
- SILVEIRA, R. M. et al. Diversidade da composição química dos óleos essenciais de *Eugenia* – Myrtaceae: uma revisão / Diversity of the chemical composition of essential oils of *Eugenia* (Myrtaceae): a review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 33276–33303, 2021.
- SONWA, M.M. Isolation and Structure Elucidation of Essential Oil Constituents: Comparative Study of the Oils of *Cyperus alopecuroides*, *Cyperus papyrus*, and *Cyperus rotundus*. Tese de Doutorado, University of Hamburg, Germany, 2000.

SOBRAL M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Acesso em março de 2024: <http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/FB10338>

STEFANELLO, M. E. A. PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. **Chemistry & biodiversity**, v. 8, n. 1, p. 73-94, 2011.

TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of essential oils: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, jan. 2013.

UN Statistical Commission. Global Indicator Framework for the Sustainable Development Goals and Targets of the 2030 Agenda for Sustainable Development; United Nations: Washington, DC, USA, 2017.

VALLI M.; PIVATTO M.; DANUELLO A.; SILVA D. H. S.; CASTRO-GAMBOA I.; CAVALHEIRO A. J.; ARAÚJO A. R.; FURLAN M.; LOPES M. N.; BOLZANI V. S. The Tropical Biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? **Química Nova**, n. 35, p. 2278-2287, 2012.

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 2018.

VALLI, M. et al. The potential of biologically active Brazilian plant species as a strategy to search for molecular models for mosquito control. **Planta Médica**, v. 87, n. 01/02, p. 6-23, 2021.

VIANA, V. C. R. et al. Green Nanobioinsecticide of a Brazilian endemic plant for the *Aedes aegypti* control. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 32, 1 maio 2023.

VON GREBMER, K.; BERNSTEIN, J.; WIEMERS, M.; REINER, L.; BACHMEIER, M.; HANANO, A.; TOWEY, O.; NÍ CHÉILLEACHAIR, R.; FOLEY, C.; GITTER, S.; **Global Hunger Index: Food Systems Transformation and Local Governance**; Welthungerhilfe: Bonn, Germany, 2022.

WHO - World Health Organization; IARC - International Agency for Research on Cancer. Aflatoxins – In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. **IARC Press**, v. 56, p. 245–395. France, 1993.

WILSON, R. J. et al. Nanoemulsions for drug delivery. **Particuology**, v. 64, p. 85–97, 2022.

YAN, J. et al. New Insights into the Persistent Effects of Acute Exposure to AFB1 on Rat Liver. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, JUN, 2022.

YOKOMIZO, N. K. S.; NAKAOKA-SAKITA, M. Atividade antimicrobiana e rendimento do óleo essencial de Pimenta *pseudocaryophyllus* var. *pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, n. 16, p. 513-520, 2014.

ZINEDINE, A.; EL AKHDARI, S. Food safety and climate change: case of mycotoxins. **Handbook of Research on Global Environmental Changes and Human Health**, p. 74–97, 2019.

ZŁOTKO, K. et al. A report on fungal (1→3) -  $\alpha$ -D-glucans: Properties, functions and application. **Molecules**, MDPI AG, 2019.

ZULKIFLI, N. A. Morphological and Molecular Identification of *Aspergillus* species isolated from Corn Feed in Penang. Tese de Doutorado, Universiti Sains Malaysia, Malásia, 2015.