



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE SISTEMAS NANOENCAPSULADOS
UTILIZANDO ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS
PARA CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

Vinícius Bertoncello Molon

CAXIAS DO SUL

2026

Vinícius Bertoncello Molon

Desenvolvimento e aplicação de sistemas nanoencapsulados utilizando óleos essenciais e seus compostos majoritários para controle de fungos fitopatogênicos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando o cumprimento dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Professor Dr. Thiago Barcellos da Silva.

CAXIAS DO SUL

2026

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

M728d Molon, Vinícius Bertoncello

Desenvolvimento e aplicação de sistemas nanoencapsulados utilizando óleos essenciais e seus compostos majoritários para controle de fungos fitopatogênicos [recurso eletrônico] / Vinícius Bertoncello Molon. – 2026.
Dados eletrônicos.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2026.

Orientação: Thiago Barcellos da Silva.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Nanotecnologia. 2. Agricultura sustentável. 3. Essências e óleos essenciais. 4. Fungos fitopatogênicos. I. Silva, Thiago Barcellos da, orient.
II. Título.

CDU 2. ed.: 620.3

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Carolina Machado Quadros - CRB 10/2236

Desenvolvimento e aplicação de sistemas nanoencapsulados utilizando óleos essenciais e seus compostos majoritários para controle de fungos fitopatogênicos

Vinicius Bertoncello Molon

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando o cumprimento dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientado: Professor Dr. Thiago Barcellos da Silva.

Tese aprovada em 03 de março de 2026.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Thiago Barcellos da Silva (orientador)
Universidade de Caxias do Sul (UCS)

Prof. Dra. Berta Maria Abreu Nogueiro Estevinho
Universidade do Porto (U.Porto)

Prof. Dr. João Paulo Fabi
Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. Cátia dos Santos Branco
Universidade de Caxias do Sul (UCS)

“Neste momento vem-me uma vaga saudade

E um vago desejo plácido

Que aparece e desaparece.”

Alberto Caeiro

AGRADECIMENTOS

Antes de nominar pessoas e instituições, gostaria de agradecer a todos que participaram dessa trajetória. De modo geral, como tudo na vida, algumas pessoas podem ter passado despercebidas ou até mesmo faltado à lembrança. Sendo assim, família, amigos, colegas e conhecidos: obrigado!

O mais especial agradecimento não poderia ser diferente: aos meus pais, Jovane Roberta Bertoncello e Valdomiro Leonel Molon, por tudo. As palavras não são suficientes para agradecer ao amor, à dedicação, à honestidade e a todos os tipos de dificuldades que enfrentaram para atingir seus objetivos. Outra parte tão importante da família é o Rafiki, irmão de quatro patas. Muito obrigado por tudo! Espero poder retribuir tudo o que fizeram, e ainda fazem. Amo vocês!

Meu mais sincero agradecimento a quem também me acompanhou nesses anos de caminhada científica, Prof. Thiago Barcellos da Silva, por todas as oportunidades, paciência, ensinamentos e parceria. E em muitos momentos, paciência. Sempre serei grato. Aproveito também para agradecer à sua companheira, Ana Elisa de Queiroz, cuja presença se fez constante em diversos momentos.

Agradeço também aos professores Ana Paula Delamare, Fernando Joel Scariot, Gabriel Fernandes Pauletti, Marli Camassola, Murilo Cesar dos Santos e Sidnei Moura e Silva, não apenas pelos ensinamentos, mas também por terem aberto as portas de seus laboratórios, onde parte dos ensaios foram realizados.

Gostaria de agradecer a todos os técnicos e funcionários da UCS pelo suporte e auxílio na montagem e execução dos experimentos. Em especial, à Camila Vicenço e à Márcia Regina Pansera. Agradeço também à Secretaria do PPGBIO, Fernanda André dos Santos, que sempre esteve presente e disposta.

Aos colegas e amigos que estão ou já passaram pelo Laboratório de Biotecnologia de Produtos Naturais e Sintéticos (LBIOP), agradeço a amizade, risadas e participação em momentos inesquecíveis durante os anos em que estive no laboratório. Aproveito para agradecer às alunas de iniciação científica Bruna Spido Vieira e Manuela Pires Onzi pela dedicação e auxílio na realização deste trabalho.

Aos amigos e amigas Danielle Restelatto, Eduardo Oliveira Rodrigues, Fernando Clementz, Gabriel Mendes Santana, Jordana Bortoluz, Maiara Gallon, Marina Mantova, Rafael Domingos Cassidori, Roberta da Silva Braga, Sophie Maillard von Eye, Thomás Pilot Nodari,

Trícia Dal Pubel e Wagner Augusto Albuquerque, a quem palavras talvez não sejam suficientes para representar meu agradecimento. Obrigado por todos os momentos juntos, pela parceria, risadas e desabafos. Apesar de ser filho único, considero todos os citados meus irmãos.

Deixo meu agradecimento às instituições de fomento CAPES, FAPERGS e CNPq; à empresa Launer Química, pela parceria no desenvolvimento do projeto de doutorado acadêmico para inovação; e à Universidade de Caxias do Sul, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIO).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	PANORAMA GLOBAL DA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS E SEGURANÇA ALIMENTAR.....	19
2.1.1	Produção mundial de frutas	21
2.2	ÓLEOS ESSENCIAIS: CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES	22
2.2.1	O emprego dos óleos essenciais na agricultura	23
2.3	NANOCARREADORES BIOPOLIMÉRICOS	25
2.3.1	Técnicas de nanoencapsulação	26
2.3.1.1	Emulsificação	26
2.3.1.2	Nanoprecipitação	28
2.3.1.3	Aprisionamento lipossomal	28
2.3.1.4	Gelificação iônica	29
2.3.1.5	Extrusão	30
2.3.1.6	Coacervação.....	31
2.4	FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	32
2.4.1.1	<i>Botrytis cinerea</i>	34
2.4.1.2	<i>Colletotrichum sp.</i>	36
2.4.1.2.1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	37
2.4.1.2.2	<i>Colletotrichum fructicola</i>	39
2.4.1.3	<i>Penicillium sp.</i>	40
2.5	OBJETIVO GERAL.....	42
2.6	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3	MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1	MATERIAIS.....	43
3.2	MÉTODOS	43
3.2.1	Obtenção e caracterização dos óleos essenciais.....	43
3.2.2	Obtenção dos conídios fúngicos.....	45
3.2.3	Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais	45
3.2.4	Ensaio de intumescimento dos polímeros PLA e Eudragit® S100 e RS100 ..	47
3.2.5	Otimização da síntese das nanocápsulas.....	47
3.2.6	Escalonamento do processo de formulação das nanocápsulas de PLA	48
3.2.7	Ensaio de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta (PZ)	48
3.2.8	Medida das eficiências de encapsulação	49

3.2.9	Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo	50
3.2.10	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	50
3.2.11	Análise termogravimétrica (TGA)	51
3.2.12	Avaliação da atividade antifúngica das nanocápsulas	51
3.2.12.1	Ensaio da atividade antifúngica <i>in vitro</i>	51
3.2.12.2	Citometria de fluxo	52
3.2.12.3	Ensaio antifúngicos <i>in vivo</i>	52
3.2.12.3.1	<i>Controle in vivo de B. cinerea em uvas pós-colheita por OECL e citral nanoencapsulados</i>	52
3.2.12.3.2	<i>Controle in vivo de C. gloeosporioides em maçãs pós-colheita utilizando OVEO nanoencapsulado</i>	53
3.2.13	Análise estatística	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1	CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	55
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	61
4.3	TESTE DE INTUMESCIMENTO	65
4.4	SÍNTESE DOS SISTEMAS NANOENCAPSULADOS	68
4.4.1	Nanocápsulas utilizando poli(ácido láctico)	68
4.4.2	Nanocápsulas utilizando Eudragit® S100	73
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	79
4.5.1	Nanocápsulas poliméricas de PLA utilizando óleo essencial de capim-limão e citral	79
4.5.1.1	Ensaio de germinação de conídios.....	79
4.5.1.2	Citometria de fluxo	80
4.5.1.3	Ensaio <i>in vivo</i> para o controle do fungo <i>B. cinerea</i> em uvas.....	81
4.5.2	Nanocápsulas poliméricas de Eudragit® S100 utilizando óleo essencial orégano	86
4.5.2.1	Ensaio de germinação	86
4.5.2.2	Ensaio <i>in vivo</i> para o controle do fungo <i>C. gloeosporioides</i> em maçãs	88
5	CONCLUSÕES	91
6	PRODUÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS	93
6.1	ARTIGO PUBLICADO	93
6.2	ARTIGOS EM REVISÃO.....	93
6.3	ARTIGO EM REDAÇÃO.....	93
6.4	APRESENTAÇÃO EM EVENTOS	93
6.5	PRÊMIOS	94

6.6	BANCA AVALIADORA EM TRABALHOS DE CONCLUSÃO DE CURSO .	94
6.7	BANCA JULGADORA EM EVENTOS	94
	REFERÊNCIAS	95

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SIGLAS

Citral–NC	Nanocápsulas de citral
CG	Capacidade de carga
DLS	Espalhamento dinâmico de luz, do inglês <i>dynamic light scattering</i>
DTG	Termogravimetria derivada do inglês <i>differential thermogravimetric</i>
EE	Eficiência de encapsulação
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, do inglês <i>Food and Agriculture Organization</i>
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
GC–FID	Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama, do inglês <i>Gas chromatography coupled with mass spectrometry</i>
GC–MS	Cromatografia gasosa acoplada à detector de massas, do inglês <i>Gas chromatograph connected to a flame ionization detector</i>
HPLC–UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Ultravioleta-Visível, do inglês <i>High-Performance Liquid Chromatography with ultraviolet detection</i>
LOD	Limite de Detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i>
LOQ	Limite de Quantificação, do inglês <i>Limit of Quantification</i>
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
OE	Óleo essencial
OECL	Óleo essencial de capim-limão
OECL–NC	Nanocápsulas de óleo essencial de capim-limão
OEOV	Óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>
OEOV–NC	Nanocápsulas de óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>
ONU	Organização das Nações Unidas
PCL	Policaprolactona
PGA	Poli(ácido glicólico)
pH	potencial hidrogeniônico
PLA	Poli(ácido láctico)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-glicólico)
PZ	Potencial Zeta
FEG–SEM	Microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão de campo do inglês <i>Field Emission Gun Scanning Electron Microscope</i>
TGA	Análise Termogravimétrica, do inglês <i>Thermogravimetric Analysis</i>
YPD	Extrato de Levedura Peptona Dextrose, do inglês <i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ranking de frutas mais produzidas por colheita e produção total por país em milhões de toneladas (Mt) em 2018.	21
Tabela 2. Compostos identificados no óleo essencial de capim-limão por cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massas e posterior cálculo do índice de retenção linear.	56
Tabela 3. Compostos identificados no óleo essencial de citronela através de cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas e posterior cálculo do índice de retenção linear.	57
Tabela 4. Compostos identificados no óleo essencial de eucalipto através de cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas e posterior cálculo do índice de retenção linear.	57
Tabela 5. Compostos identificados no óleo essencial de hortelã-pimenta através de cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas e posterior cálculo do índice de retenção linear.	58
Tabela 6. Compostos identificados no óleo essencial de ho-sho através de cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas e posterior cálculo do índice de retenção linear.	58
Tabela 7. Compostos identificados no óleo essencial de orégano através de cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas e posterior cálculo do índice de retenção linear.	59
Tabela 8. Compostos identificados no óleo essencial de tomilho através de cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas e posterior cálculo do índice de retenção linear.	60
Tabela 9. Atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos óleos essenciais contra o fungo <i>B. cinerea</i> em 24 e 48 horas.	62
Tabela 10. Atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos óleos essenciais contra o fungo <i>C. fruticola</i> em 24 e 48 horas.	62
Tabela 11. Atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos óleos essenciais contra o fungo <i>C. gloesporioides</i> em 24 e 48 horas.	63
Tabela 12. Atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos óleos essenciais contra o fungo <i>P. digitatum</i> em 24 e 48 horas.	63
Tabela 13. Formulação de nanocapsulas de PLA contendo citral e OECL como compostos	

ativos com suas respectivas respostas: eficiência de encapsulação (EE), capacidade de carga (CG), diâmetro hidrodinâmico médio (DM) e potencial zeta (PZ).....	71
Tabela 14. Formulações de nanocápsulas de Eudragit® S100 contendo OE OV como núcleo ativo e resultados obtidos das variáveis de resposta: eficiência de encapsulação (EE), capacidade de carga (CG), diâmetro hidrodinâmico médio (DM) e potencial zeta (PZ).....	75
Tabela 15. Atividade antifúngica <i>in vitro</i> de citral e OECL encapsulados e não encapsulados frente ao fungo <i>B. cinerea</i> após 24 horas.	79
Tabela 16. Efeito do citral e do OECL (livres e nanoencapsulados) na integridade da membrana celular de conídios de <i>B. cinerea</i>	81
Tabela 17. Atividade antifúngica <i>in vitro</i> do OE OV e do OE OV–NC–5 frente a <i>B. cinerea</i> e <i>C. fructicola</i> após 24 h e 48 h.....	87
Tabela 18. Atividade antifúngica <i>in vitro</i> do OE OV e do OE OV–NC–5 frente a <i>C. gloeosporioides</i> e <i>P. digitatum</i> após 24 h e 48 h.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentração e distribuição da insegurança alimentar por gravidade em 2023 diferenciada por regiões.....	20
Figura 2. Ilustração esquemática dos processos de preparação de nanoemulsões encapsuladas com OE através de métodos de: A) emulsificação simples e B) dupla emulsificação.	27
Figura 3. Ilustração esquemática dos processos de preparação de nanocápsulas poliméricas com OE através de métodos de nanoprecipitação	28
Figura 4. Ilustração esquemática dos processos de preparação de nanolipossomas com OE através de métodos de aprisionamento lipossomal.....	29
Figura 5. Ilustração esquemática dos processos de preparação de nanopartículas com OE através de métodos de gelificação iônica.....	30
Figura 6. Ilustração esquemática dos processos de preparação de nanopartículas com OE através do método de extrusão.....	31
Figura 7. Ilustração esquemática dos processos de preparação de nanopartículas com OE através do método de coacervação.	32
Figura 8. Representação das fases assexuada e sexuada de um fungo ascomiceto.....	34
Figura 9. Lesões causadas pelo fungo <i>B. cinerea</i> em diferentes frutos, flores e folhas.	35
Figura 10. Lesões causadas pelo fungo <i>C. gloeosporioides</i> em diferentes frutos e folhas.	38
Figura 11. Lesões causadas pelo fungo <i>C. fructicola</i> em diferentes frutos e folhas.	39
Figura 12. Lesões causadas pelo fungo <i>Penicillium sp.</i> em diferentes frutos.	41
Figura 13. Representação dos três estágios da escala de germinação dos fungos <i>B. cinerea</i> , <i>C. fructicola</i> , <i>C. gloeosporioides</i> e <i>P. digitatum</i> sob um microscópio (imagem microscópica em 400×). (I) conídios com crescimento de hifas, (II) conídios com emergência do tubo germinativo e (III) conídios sem a emergência de hifas observáveis.	46
Figura 14. Estruturas químicas dos constituintes majoritários identificados nos óleos essenciais de capim-limão, citronela, eucalipto, hortelã-pimenta, ho-sho, orégano e tomilho, determinadas por análises de GC-MS e GC-FID.....	61
Figura 15. Variação de massa durante o experimento de entumescimento do PLA na presença dos óleos essenciais.	66
Figura 16. Estrutura química dos polímeros A) PLA, B) Eudragit [®] RS100 e Eudragit [®] S100, utilizados nos ensaios de intumescimento.	67

- Figura 17.** Distribuição por intensidade do diâmetro das nanocápsulas obtidas por espalhamento de luz dinâmico e cálculo do diâmetro médio obtido por uma aproximação gaussiana para as formulações: A) Citral–NC–1, B) OECL–NC–1, C) Citral–NC–2, D) OECL–NC–2, E) Citral–NC–3, F) OECL–NC–3, G) Citral–NC–4, H) OECL–NC–4, I) Citral–NC–5, J) OECL–NC–5. 69
- Figura 18.** Valores de Potencial Zeta para as diferentes formulações de nanocápsulas contendo óleo essencial de capim-limão e citral. 70
- Figura 19.** Fluxograma do escalonamento da formulação das nanocápsulas. 72
- Figura 20.** Imagens obtidas utilizando microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campos, com magnificação de 50.000 vezes das nanocápsulas de poli(ácido láctico) contendo, A) citral e B) óleo essencial de capim-limão. 73
- Figura 21.** Distribuição por intensidade do diâmetro das nanocápsulas obtidas por espalhamento de luz dinâmico e cálculo do diâmetro médio obtido por uma aproximação gaussiana para as formulações: A) OEOV–NC–1, B) OEOV–NC–2, C) OEOV–NC–3, D) OEOV–NC–4, E) OEOV–NC–5. 74
- Figura 22.** Valores de Potencial Zeta para as diferentes formulações de nanocápsulas contendo óleo essencial de orégano. 75
- Figura 23.** Imagens obtidas utilizando microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campos, com magnificação de 50.000 vezes das nanocápsulas de Eudragit® S100 contendo, A) carvacrol e B) óleo essencial de orégano. 76
- Figura 24.** Caracterização do Eudragit® S100, do óleo essencial de *Origanum vulgare* (OEOV) e das nanocápsulas de Eudragit® S100 contendo óleo essencial de *Origanum vulgare* (OEOV–NC–5) por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). 77
- Figura 25.** Caracterização do Eudragit® S100, do óleo essencial de *Origanum vulgare* (OEOV) e das nanocápsulas de Eudragit® S100 contendo o óleo essencial de *Origanum vulgare* (OEOV–NC–5) por (A) análise termogravimétrica (TGA) e (B) derivada da TGA (DTG). 78
- Figura 26.** Efeito do óleo essencial de capim-limão e citral, não nanoencapsulados ou nanoencapsulados, sobre conídios de *B. cinerea* na integridade da membrana e na atividade esterásica. A) Controle; B) Citral 0,05% (v/v); C) Citral 0,10% (v/v); D) OECL 0,05% (v/v); E) OECL 0,10% (v/v); F) Citral–NC–5 0,05% (v/v); G) Citral–NC–5 0,10% (v/v); H) OECL–NC–5 0,05% (v/v); I) OECL–NC–5 0,10%

- (v/v)..... 81
- Figura 27.** Tratamento *in vivo* preventivo pós-colheita contra *B. cinerea* em uvas tratadas com OECL não encapsulado e encapsulado. A) Diâmetro das lesões em bagas de uva inoculadas com conídios de *B. cinerea*, medido em três tempos de armazenamento para os seis diferentes tratamentos. 83
- Figura 28.** Tratamento preventivo *in vivo* pós-colheita contra *B. cinerea* em uvas tratadas com citral encapsulado e não encapsulado. A) Diâmetro das lesões em bagas de uva inoculadas com conídios de *B. cinerea*, medido em três tempos de armazenamento para seis diferentes tratamentos. Para cada tempo de armazenamento, letras iguais indicam ausência de diferenças estatísticas entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). B) Gráfico de barras mostrando a progressão da infecção no mesmo grupo de tratamento ao longo dos períodos de armazenamento. Para cada tratamento, letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre os tempos, conforme o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). C) Imagens de três uvas representativas do grupo médio de tratamento após 168 horas de incubação..... 85
- Figura 29.** Uvas cortadas selecionadas de cada grupo de tratamento *in vivo* após 168 h. Cada imagem mostra a mesma baga: a casca à esquerda e o interior à direita. A) Controle negativo; B) Controle positivo; C) OECL 0,05% (v/v); D) OECL 0,10% (v/v); E) OECL–NC–5 0,05% (v/v); e F) OECL–NC–5 0,10% (v/v). 86
- Figura 30.** Uvas cortadas selecionadas de cada grupo de tratamento *in vivo* após 168 h. Cada imagem mostra a mesma baga: a casca à esquerda e o interior à direita. A) Controle negativo; B) Controle positivo; C) Citral 0,05% (v/v); D) Citral 0,10% (v/v); E) Citral–NC–5 0,05% (v/v); F) Citral–NC–5 0,10% (v/v). 86
- Figura 31.** Tratamento *in vivo* preventivo pós-colheita contra *C. gloeosporioides* em maçãs tratadas com OEOV não encapsulado e encapsulado. A) Diâmetro das lesões em maçãs inoculadas com conídios de *C. gloeosporioides*, medido em três tempos de armazenamento para os seis diferentes tratamentos. Para cada tempo de armazenamento, letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). B) Gráfico de barras mostrando a progressão da infecção no mesmo grupo de tratamento ao longo dos períodos de armazenamento. Para cada tratamento, letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre os tratamentos, conforme o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

C) Imagens de três maçãs que representam o grupo de tratamento médio após 21 d de incubação. 90

RESUMO

As doenças pós-colheita causadas por fungos fitopatogênicos representam um desafio crítico para a produção de frutas, uma vez que acarretam perdas econômicas expressivas e promovem o uso intensivo de fungicidas sintéticos, com implicações ambientais e riscos de resistência. Este estudo teve como objetivo desenvolver e aplicar sistemas nanoencapsulados poliméricos contendo óleos essenciais e seus compostos majoritários, visando aumentar a eficácia antifúngica e a estabilidade para o controle de doenças pós-colheita. Os óleos essenciais foram quimicamente caracterizados por GC-MS e GC-FID. A atividade antifúngica *in vitro* foi avaliada contra *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum fructicola*, *C. gloeosporioides* e *Penicillium digitatum* por meio de ensaios de germinação de conídios. Nanocápsulas contendo óleo essencial de capim-limão, óleo essencial de orégano, citral e carvacrol foram produzidas por nanoprecipitação utilizando poli(ácido láctico) (PLA) e Eudragit® S100, sendo caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz, potencial zeta, eficiência de encapsulação e microscopia eletrônica. O modo de ação das nanocápsulas contendo citral e óleo essencial de capim-limão foi investigado por citometria de fluxo. Ensaios preventivos *in vivo* foram conduzidos em uvas *Thompson Seedless* e maçãs *Malus domestica* 'Gala' inoculadas com fungos fitopatogênicos. Os óleos essenciais de capim-limão e orégano apresentaram a maior atividade antifúngica *in vitro*, inibindo a germinação de conídios em todos os fungos testados. As nanocápsulas de citral, capim-limão e orégano apresentaram diâmetros médios de até 224 nm (PLA) e 267 nm (Eudragit® S100), com potenciais zeta de -25,4 mV e -35,5 mV, respectivamente, e eficiências de encapsulação superiores a 80% para todas as formulações. Na concentração de 0,1% (v/v), as nanocápsulas contendo citral promoveram 100% de inibição da germinação de conídios de *B. cinerea* após 48 h. A citometria de fluxo revelou um aumento de 60% na permeabilidade de membrana em conídios tratados com citral encapsulado em comparação ao controle. Os ensaios *in vivo* demonstraram que as nanocápsulas de óleo essencial de capim-limão e citral reduziram o diâmetro médio das lesões causadas por *B. cinerea* em uvas em até 68%, enquanto as nanocápsulas de óleo essencial de orégano reduziram significativamente o desenvolvimento de lesões causadas por *C. gloeosporioides* em maçãs. De modo geral, a nanoencapsulação aumentou de forma expressiva a eficácia antifúngica, a estabilidade e o desempenho biológico dos óleos essenciais e de seus compostos majoritários, demonstrando forte potencial como estratégia sustentável e eficaz para o controle de doenças pós-colheita na produção de frutas.

Palavras-chave: Nanoencapsulação, nanocápsulas poliméricas, agricultura sustentável, óleos essenciais, fungos fitopatogênicos, controle pós-colheita.

ABSTRACT

Postharvest decay caused by phytopathogenic fungi represents a major challenge for fruit production, leading to significant economic losses and increased dependence on synthetic fungicides with environmental and resistance-related concerns. This study aimed to develop and apply polymeric nanoencapsulated systems containing essential oils and their major compounds to enhance antifungal efficacy and stability for postharvest disease control. Essential oils were chemically characterized by GC–MS and GC–FID. *In vitro* antifungal activity was evaluated against *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum fructicola*, *C. gloeosporioides*, and *Penicillium digitatum* through conidial germination assays. Nanocapsules containing lemongrass oil, oregano oil, citral, and carvacrol were produced by nanoprecipitation using poly(lactic acid) (PLA) and Eudragit[®] S100 and characterized by dynamic light scattering, zeta potential, encapsulation efficiency, and electron microscopy. Citral and lemongrass essential oil nanocapsules mode of action were investigated by flow cytometry. *In vivo* preventive assays were conducted on *Thompson Seedless* grapes and apples *Malus domestica* 'Gala' inoculated with phytopathogenic fungi. Lemongrass and oregano essential oils showed the highest *in vitro* antifungal activity, strongly inhibiting conidial germination of all tested fungi. Therefore, citral, lemongrass and oregano anocapsules exhibited mean diameters up to 224 nm (PLA) and 267 nm (Eudragit[®] S100), with zeta potentials of –25.4 mV and –35.5 mV, respectively, and encapsulation efficiencies above 80% for all formulations. At a concentration of 0.1% (v/v), citral-loaded nanocapsules resulted in 100% inhibition of *B. cinerea* conidial germination after 48 h. Flow cytometry revealed a 60% increase in membrane permeability in conidia treated with encapsulated citral compared to the control. *In vivo* assays demonstrated that lemongrass oil and citral nanocapsules reduced the average lesion diameter caused by *B. cinerea* in grapes by up to 68%, while oregano oil nanocapsules significantly reduced lesion development caused by *C. gloeosporioides* in apples. Overall, nanoencapsulation markedly enhanced the antifungal efficacy, stability, and biological performance of essential oils and their major compounds, demonstrating strong potential as a sustainable and effective strategy for postharvest disease control in fruit production.

Keywords: Nanoencapsulation, polymeric nanocapsules, sustainable agriculture, essential oils, phytopathogenic fungi, postharvest control.

1 INTRODUÇÃO

O controle de doenças fúngicas em culturas agrícolas representa um dos maiores desafios para a produção de alimentos, devido aos impactos diretos sobre o rendimento e a qualidade dos produtos. Fungos fitopatogênicos como *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum sp.* e *Penicillium sp.* estão entre os principais responsáveis por danos em campo e perdas pós-colheita, prejudicando significativamente a cadeia produtiva. Tradicionalmente, o controle desses patógenos tem sido feito por meio da aplicação de fungicidas sintéticos, cujo uso contínuo tem levantado preocupações quanto à resistência fúngica, contaminação ambiental e riscos à saúde humana e animal.

Nesse contexto, cresce o interesse por alternativas naturais e sustentáveis, entre as quais os óleos essenciais se destacam devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Extraídos de diversas partes de plantas aromáticas, os óleos essenciais são constituídos por uma mistura complexa de compostos voláteis. Apesar de seu potencial, o uso direto de óleos essenciais em ambientes agrícolas enfrenta limitações relacionadas à volatilidade, instabilidade frente à luz e temperatura, baixa solubilidade em água e rápida degradação. Essas características reduzem sua eficácia no campo, dificultando sua aplicação e viabilidade econômica. Por isso, estratégias que visem melhorar sua estabilidade, liberação controlada e tempo de ação são fundamentais para viabilizar o uso desses compostos naturais como agentes fitossanitários.

Nesse cenário, o desenvolvimento de sistemas de nanoencapsulação tem se mostrado uma alternativa promissora para superar essas limitações. A nanoencapsulação consiste na incorporação de substâncias bioativas em partículas com dimensões nanométricas, que funcionam como carreadoras, protegendo os compostos ativos de fatores ambientais adversos e promovendo sua liberação controlada no local de ação.

As nanopartículas permitem não apenas a proteção dos compostos voláteis presentes nos óleos essenciais, como também aumentam sua eficácia biológica, facilitam a dispersão em meio aquoso e promovem maior adesão às superfícies vegetais. Além disso, a liberação lenta e contínua dos compostos ativos pode prolongar a atividade antifúngica, reduzindo a frequência de aplicação e, conseqüentemente, os custos de manejo e o impacto ambiental. A nanotecnologia, portanto, apresenta-se como uma ferramenta inovadora no campo da fitossanidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PANORAMA GLOBAL DA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS E SEGURANÇA ALIMENTAR

O panorama global da produção de alimentos enfrenta desafios significativos em meio a uma crescente demanda por alimentos, mudanças climáticas, e desigualdades socioeconômicas. Estima-se que a população mundial alcance 9,7 bilhões até 2050, exigindo um aumento de 60% na produção de alimentos para atender a essa necessidade, segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2021a). Esse crescimento coloca uma enorme pressão sobre os sistemas agrícolas, já impactados por limitações de recursos naturais, degradação do solo e escassez hídrica (FAO et al., 2024).

Nas últimas duas décadas, houve uma tendência constante de aumento na produção agrícola mundial para atender à demanda crescente, com a produção de culturas primárias crescendo 54% entre 2000 e 2021, a produção de carne aumentando 53% e a produção de leite crescendo 58%. O crescimento da produção agrícola desde 2000 foi, portanto, mais rápido do que o crescimento da população (29%), devido à intensificação das atividades agrícolas (com maior uso de irrigação, pesticidas e fertilizantes, além da expansão de terras cultiváveis) e ao aprimoramento das tecnologias de produção (incluindo práticas agrícolas melhoradas e o uso de culturas de alto rendimento), tudo isso enfrentando os efeitos adversos das mudanças climáticas (FAO, 2021a).

Estima-se que até 2030, cerca de 122 milhões de pessoas adicionais estarão na pobreza extrema devido às mudanças climáticas e seus efeitos na agricultura. Culturas básicas, como trigo, milho e arroz, estão particularmente vulneráveis às variações climáticas, com implicações diretas para a segurança alimentar global (FAO, 2021a).

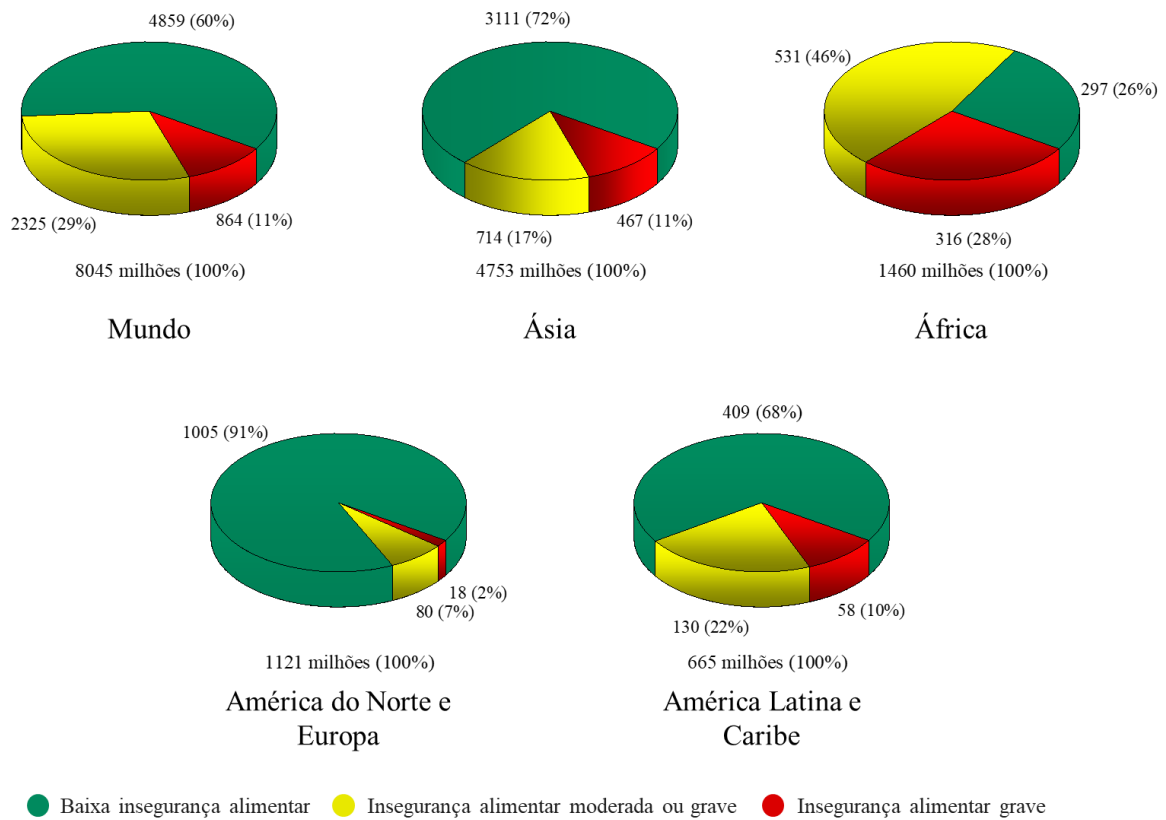
Além dos desafios climáticos, o desperdício de alimentos continua sendo um problema global significativo. Cerca de 1,3 bilhão de toneladas de alimentos são desperdiçadas anualmente, o que representa aproximadamente um terço de toda a comida produzida no mundo. Esse desperdício ocorre tanto nos países desenvolvidos, devido ao consumo excessivo e práticas ineficientes de varejo, quanto em países em desenvolvimento, onde problemas de armazenamento e transporte são predominantes (Buseti e Pace, 2022).

No contexto da segurança alimentar, a desigualdade de acesso aos alimentos é uma questão central. Embora a produção global de alimentos seja suficiente para alimentar toda a

população mundial, cerca de 828 milhões de pessoas enfrentavam fome crônica em 2021, de acordo com o relatório "O Estado da Segurança Alimentar e Nutrição no Mundo". Por outro lado, mais de dois bilhões de pessoas sofrem de sobrepeso ou obesidade, destacando o desequilíbrio no consumo e na distribuição de alimentos, além da disparidade entre regiões desenvolvidas e subdesenvolvidas (Figura 1)(FAO et al., 2024).

A cooperação internacional é essencial para abordar os desafios da segurança alimentar. Iniciativas como os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU, em particular o ODS 2, que visa acabar com a fome e promover a agricultura sustentável, buscam alinhar esforços globais para combater a insegurança alimentar (UNEP, 2021).

Figura 1. Concentração e distribuição da insegurança alimentar por gravidade em 2023 diferenciada por regiões.



Fonte: Adaptado de “The state of food security and nutrition in the world” (FAO, et al. 2024).

Inovações tecnológicas e científicas também oferecem esperança. Soluções como carne cultivada em laboratório, agricultura vertical e alimentos à base de plantas estão transformando a maneira como pensamos a produção de alimentos. Além disso, a digitalização dos sistemas agrícolas, com o uso de *big data*, drones e inteligência artificial, tem potencial para otimizar a produção e reduzir desperdícios.

2.1.1 Produção mundial de frutas

A produção mundial de frutas desempenha um papel essencial na alimentação, na economia e na sustentabilidade global. As frutas são fontes ricas de nutrientes e vitaminas, essenciais para uma dieta saudável, ao passo que o setor agrícola associado ao cultivo de frutas emprega milhões de pessoas ao redor do mundo. A produção global de frutas tem crescido de forma constante nas últimas décadas, acompanhando o aumento populacional e as mudanças nos padrões de consumo alimentar (FAO, 2021a).

Os principais países produtores de frutas são a China, a Índia, o Brasil, os Estados Unidos e o México, que se destacam pela diversidade climática e pelo uso de tecnologias avançadas no cultivo (Tabela 1). A China, por exemplo, é o maior produtor mundial, liderando em frutas como maçãs, peras e melancias. Já a Índia é conhecida por ser a maior produtora de bananas e mangas, enquanto o Brasil se destaca pela produção de frutas cítricas, especialmente laranjas, sendo responsável por mais de 30% do mercado global de suco de laranja (USDA, 2024).

Tabela 1. Ranking de frutas mais produzidas por colheita e produção total por país em milhões de toneladas (Mt) em 2018.

Fruta por colheita	Mt	Fruta por país	Mt
Banana	116	China	244
Melancia	104	Índia	99
Maçã	86	Brasil	40
Uva	79	México	33
Laranja	75	Estados Unidos da América	26
Manga, mangostão, goiaba	55	Turquia	24
Tangerina, mandarina, clementina	39	Indonésia	20
Abacaxi	34	Espanha	19
Melão	28	Irã	19
Pêssego e nectarina	27	Itália	18
Pera	24	Filipinas	17
Limão e lima	24	Egito	15
		Nigéria	12
		Colômbia	12
		Tailândia	12

Fonte: FAOSTAT (2020).

Entre as frutas mais produzidas no mundo estão as bananas, seguidas por melancias, maçãs, laranjas e uvas. Esses produtos são amplamente consumidos, tanto *in natura* quanto processados, em forma de sucos, doces e conservas. Segundo o relatório *Fruits and Vegetables* a demanda por frutas tropicais tem crescido significativamente nos mercados internacionais, impulsionada por consumidores da Europa, América do Norte e Ásia (FAO, 2021b).

A sustentabilidade tem sido uma preocupação crescente no setor de fruticultura. Muitos países têm adotado práticas agrícolas regenerativas, como a rotação de culturas, o uso eficiente da água e a redução de pesticidas químicos. Essas medidas visam proteger os ecossistemas e garantir que a produção de frutas possa atender à demanda global de forma responsável. Além do impacto ambiental, há também a preocupação com o desperdício de alimentos. Aproximadamente 30% da produção mundial de frutas é desperdiçada antes mesmo de chegar ao consumidor (Lipinski et al., 2016).

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS: CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES

O uso de óleos essenciais (OE) é uma prática comum desde as primeiras civilizações, com relatos do uso inicialmente no Oriente e no Oriente Médio, depois no Norte da África e na Europa (Macwan et al., 2016). O termo "Óleo Essencial" foi cunhado no século XVI pelo suíço Paracelsus von Hohenheim. Os óleos essenciais de plantas são geralmente misturas complexas de compostos naturais, tanto polares quanto apolares (Macwan et al., 2016; Masango, 2005). Conhecidos por suas propriedades antissépticas e medicinais, eles também já foram utilizados em embalsamamento e, devido à sua atividade antimicrobiana e antioxidante, como aditivos naturais em alimentos e produtos alimentícios (Bakkali et al., 2008a). A Organização Internacional de Normalização (ISO) (ISO/D1S9235.2) define um óleo essencial como: produto obtido por destilação com água ou vapor, por processamento mecânico ou por destilação seca de materiais naturais.

A interação entre os compostos de óleos essenciais pode produzir quatro tipos possíveis de efeitos: aditivo, antagônico, sinérgico ou indiferente. Um efeito aditivo é observado quando o efeito combinado é igual à soma dos efeitos individuais. O antagonismo é observado quando o efeito de um, ou de ambos os compostos, é menor quando aplicados juntos do que quando aplicados individualmente. O sinergismo é observado quando o efeito das substâncias combinadas é maior do que a soma dos efeitos individuais, enquanto a ausência de interação é definida como indiferença (Burt e Reinders, 2003).

A atividade antimicrobiana dos OE das espécies de *Thymus* e *Origanum* tem sido atribuída aos seus componentes fenólicos, como timol e carvacrol (Lambert et al., 2001), e a atividade dos OE de cravo da Índia (*Eugenia caryophyllus*) (Ait-Ouazzou et al., 2011) e manjerição verde (*Ocimum basilicum*) ao eugenol (Bassolé et al., 2010). Para o OE de caneleira-verdadeira (*Cinnamomum zeylanicum*) a atividade é relacionada ao seu conteúdo de cinamaldeído (Prabuseenivasan et al., 2006), embora óleos contendo cinamaldeído apresentem atividades antimicrobianas menores do que óleos contendo eugenol (Juliani Hector et al., 2004).

2.2.1 O emprego dos óleos essenciais na agricultura

A utilização de óleos essenciais na agricultura é um campo em expansão, com uma crescente busca por alternativas naturais e sustentáveis ao uso de pesticidas e fertilizantes sintéticos. A aplicação de óleos essenciais na agricultura encontra respaldo na agricultura sustentável, que propõe práticas agrícolas que respeitam os limites ecológicos e promovem a biodiversidade, ao mesmo tempo que asseguram a produção agrícola e a segurança alimentar (Gliessman, 2016).

Entre os produtos mais conhecidos para o controle biológico de pragas, destaca-se o óleo de nim (*Azadirachta indica*), obtido principalmente a partir das sementes, nas quais se encontra a azadiractina e diversos compostos análogos com reconhecida atividade inseticida, eficaz no controle de pragas como pulgões, ácaros e moscas-brancas, além de apresentar ação contra alguns fungos. Entretanto, diferentemente dos óleos essenciais clássicos, o óleo de nim não é consensualmente classificado como óleo essencial, uma vez que sua extração a partir das sementes resulta em um produto rico em ácidos graxos e outros lipídeos, com composição química distinta dos óleos voláteis obtidos por destilação. No Brasil, formulações comerciais como NemGuard[®] e Neemazal[®] associam o óleo de nim a outros compostos naturais.

Estudos mostram que o extrato de semente de nim (NeemAzal[®]) pode reduzir significativamente a taxa de crescimento do ácaro-branco (*Polyphagotarsonemus latus*), com concentrações acima de 0,13 g L⁻¹ de azadiractina resultando em extinção local da população (Venzon et al., 2008). Para o ácaro-vermelho-do-cafeeiro (*Oligonychus ilicis*), foi observado redução na taxa de crescimento em concentrações superiores a 0,065 g L⁻¹ de azadiractina (Venzon et al., 2005).

O óleo essencial de cravo (*Eugenia caryophyllus*) também se destaca, sendo comercializado em diferentes formulações para o controle de plantas daninhas. Por exemplo, o

Matran[®] contém até 50% de óleo essencial de cravo, enquanto o Weed Zap[®] é uma mistura de 15% de óleo essencial de cravo, 15% de óleo essencial de canela e 70% de vinagre. Aplicado em concentrações de 1–5%, o óleo essencial de cravo é eficaz no controle de plantas daninhas em estágio inicial de desenvolvimento (Tworkoski, 2002).

O óleo essencial de alecrim é composto principalmente por 25% de 1,8-cineol, além de borneol, cânfora e outros monoterpênicos, muitos dos quais possuem atividades inseticidas (Maggi et al., 2011). É eficaz no controle de pulgões, besouros, mosca-branca, ácaros e larvas de lagartas, entre outros. Produtos comerciais que contêm óleo essencial de alecrim incluem o Ecotrol[®] CE, da EcoSmart Technologies, que mistura 10% de óleo essencial de alecrim com 2% de óleo essencial de hortelã-pimenta.

A atividade dos óleos essenciais está intrinsicamente ligada a mecanismos antifúngicos complexos, atuando principalmente na desestabilização estrutural das células fúngicas. Um dos mecanismos mais amplamente descritos envolve a interação de compostos hidrofóbicos, como terpenos, fenóis e aldeídos, com a membrana plasmática do fungo. Compostos como timol, carvacrol e citral podem se inserir na bicamada lipídica, alterando sua fluidez e permeabilidade, o que leva ao extravasamento de íons e metabólitos essenciais, desequilíbrio osmótico e eventual colapso da integridade celular (Alhantoobi et al., 2025). Além disso, esses compostos interferem na biossíntese de ergosterol, um esteroide fundamental para a estabilidade da membrana fúngica, promovendo sua depleção e comprometendo a organização estrutural da célula. Evidências morfológicas demonstram que essa ação resulta em deformações hifais, vacuolização citoplasmática e perda de conteúdo intracelular, culminando na morte celular (Alhantoobi et al., 2025).

Além dos efeitos estruturais, os óleos essenciais também exercem interferência direta em processos metabólicos e moleculares fundamentais para o crescimento fúngico. Diversos componentes desses óleos podem inibir enzimas-chave envolvidas na biossíntese da parede celular e no metabolismo energético, como lanosterol 14 α -desmetilase, glucano sintase e quitina sintase, comprometendo a formação de β -glucanos e quitina, polímeros essenciais para a integridade da parede celular. Paralelamente, a inibição de enzimas mitocondriais, como NADH desidrogenase e citocromo c oxidase, prejudica a cadeia respiratória, reduzindo a produção de ATP e favorecendo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS). Esse aumento do estresse oxidativo é intensificado pela inibição de enzimas antioxidantes, como catalase e superóxido dismutase, o que amplifica os danos celulares e acelera a morte fúngica (Leiva-Mora et al., 2025).

Assim, é possível entender a abrangência e atividade dos óleos essenciais na agricultura, representando uma alternativa promissora e sustentável para o manejo de pragas, doenças e conservação de alimentos. Suas propriedades oferecem uma solução para reduzir a dependência de produtos químicos sintéticos. Contudo, apesar dos avanços promissores, desafios permanecem, como por exemplo a sua alta volatilidade e fotodegradação. Tendo isso em vista, os óleos essenciais se destacam não apenas como uma ferramenta complementar, mas como um caminho promissor para uma agricultura mais equilibrada e sustentável.

2.3 NANOCARREADORES BIOPOLIMÉRICOS

Os nanocarreadores biopoliméricos têm se destacado como uma solução promissora na agricultura, proporcionando sistemas eficientes para a entrega controlada de agroquímicos, como fertilizantes, pesticidas e herbicidas. Esses sistemas são compostos por biopolímeros naturais ou sintéticos, que apresentam vantagens como biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de encapsular moléculas ativas, reduzindo perdas por volatilização, lixiviação e degradação prematura (Kah et al., 2019)

Dentre os biopolímeros mais utilizados na formulação de nanocarreadores para aplicação agrícola, destacam-se a quitosana, o poli(ácido láctico)(PLA), o ácido poliglicólico (PGA) e seus copolímeros, como o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) (Ditta e Arshad, 2016).

A encapsulação de agroquímicos nesses nanocarreadores permite a proteção das moléculas ativas contra fatores ambientais adversos, como radiação UV e degradação microbológica. Além disso, a liberação controlada pode ser projetada para ocorrer de maneira responsiva a condições específicas do solo, como umidade e pH, garantindo maior eficiência e menor desperdício de insumos (Shang et al., 2019). Isso possibilita um aumento na produtividade agrícola e uma redução dos impactos ambientais associados à aplicação excessiva de agroquímicos convencionais.

Os nanocarreadores biopoliméricos também podem ser funcionalizados para promover o direcionamento específico a determinadas culturas ou pragas, otimizando a eficiência dos produtos agrícolas. Essa abordagem tem sido amplamente investigada na proteção contra insetos e fitoparasitas, em que a liberação controlada de pesticidas encapsulados permite um controle mais eficaz e sustentável, minimizando a contaminação ambiental (Kumar et al., 2019).

A produção desses nanocarreadores envolve diversas técnicas, incluindo emulsificação e evaporação de solvente, nanoprecipitação, polimerização em miniemulsão e gelificação iônica.

Cada método impacta diretamente as propriedades finais dos nanocarreadores, como tamanho, estabilidade e taxa de liberação do composto encapsulado (Grillo et al., 2015).

Apesar dos avanços significativos, desafios ainda precisam ser superados para a ampla aplicação agrícola dos nanocarreadores biopoliméricos. Questões relacionadas à escalabilidade da produção, custo de formulação e segurança ambiental ainda são objeto de estudo (Campos et al., 2015). Além disso, a biodegradabilidade dos biopolímeros precisa ser avaliada para garantir a sustentabilidade a longo prazo.

Diante desse cenário, os nanocarreadores biopoliméricos continuam a ser uma área de grande interesse para a nanotecnologia aplicada à agricultura. Estudos futuros devem focar na otimização de formulações, no desenvolvimento de novos biopolímeros com propriedades aprimoradas e na elucidação de seus mecanismos de interação com sistemas agrícolas.

2.3.1 Técnicas de nanoencapsulação

As técnicas de nanoencapsulação de materiais lipofílicos têm ganhado destaque devido ao seu potencial para melhorar a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos. Essas técnicas são amplamente aplicadas nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia para proteger ingredientes ativos contra degradação e controlar sua liberação no organismo. A nanoencapsulação envolve a formação de sistemas coloidais, como nanopartículas, lipossomas e nanoemulsões, que encapsulam o material lipofílico em uma matriz polimérica ou lipídica, proporcionando melhor dispersão em meios aquosos (Mora-Huertas et al., 2010).

Além de melhorar a estabilidade dos compostos encapsulados, a nanoencapsulação possibilita a liberação controlada dos ativos, otimizando sua absorção e reduzindo possíveis efeitos adversos (Beloqui et al., 2016).

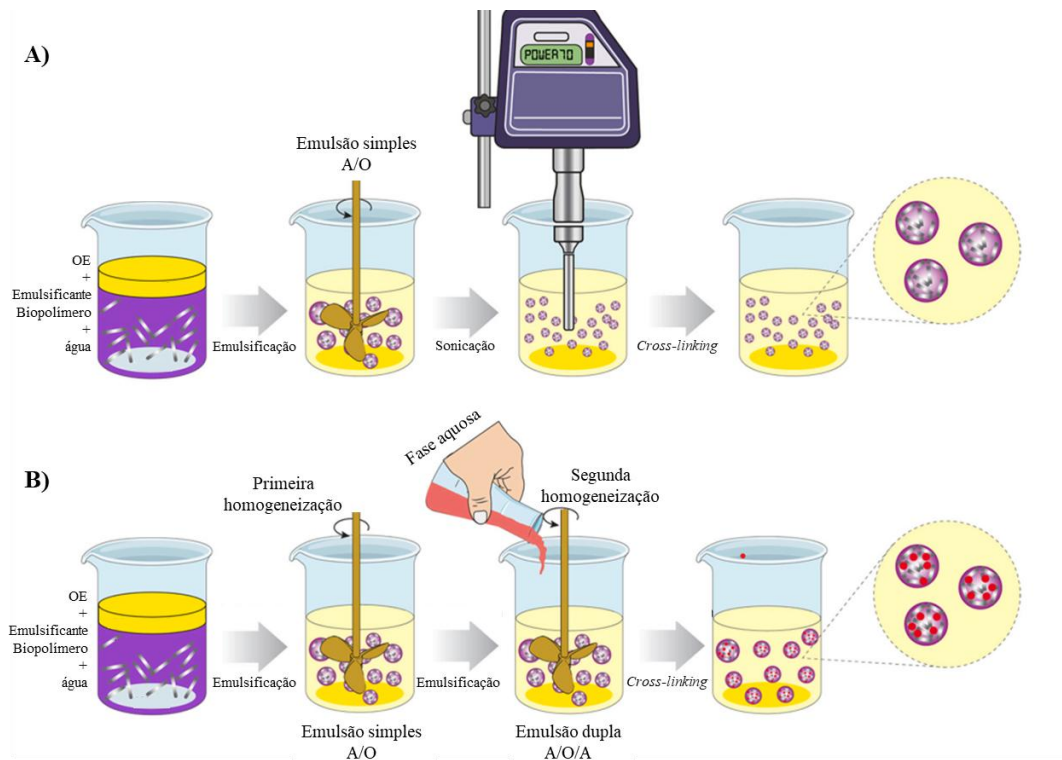
A escolha da técnica depende das propriedades físico-químicas do material a ser encapsulado e da aplicação desejada. Diferentes métodos podem ser utilizados para a nanoencapsulação de materiais lipofílicos, incluindo emulsificação, nanoprecipitação, aprisionamento lipossomal, gelificação iônica, extrusão e coacervação.

2.3.1.1 Emulsificação

As nanoemulsões são sistemas coloidais caracterizados por uma dispersão de duas fases

imiscíveis, no qual pequenas gotículas de uma fase (geralmente lipofílica) estão dispersas em uma fase contínua (geralmente aquosa). Devido ao seu tamanho nanométrico (10 a 100 nm), essas emulsões apresentam alta estabilidade, transparência óptica e maior biodisponibilidade de compostos ativos. Essas propriedades fazem das nanoemulsões uma alternativa promissora para diversas aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, especialmente na encapsulação e liberação controlada de compostos bioativos (Napiórkowska et al., 2024).

Figura 2. Ilustração esquemática dos processos de preparação de nanoemulsões encapsuladas com OE através de métodos de: A) emulsificação simples e B) dupla emulsificação.



Fonte: adaptado de Weisany et al (2022).

Tanto nanoemulsões simples quanto duplas podem ser utilizadas para encapsular substâncias lipofílicas, como óleos essenciais, permitindo sua dispersão em água (Figura 2). A principal vantagem das nanoemulsões em relação às emulsões convencionais é o tamanho reduzido de suas gotículas, o que aumenta sua estabilidade contra agregação e separação gravitacional (Wilson et al., 2022).

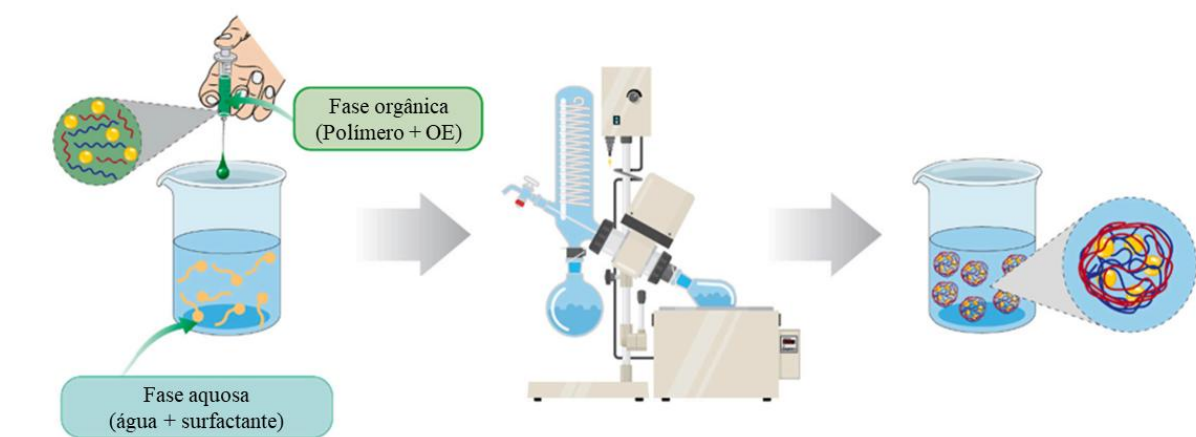
Além disso, as nanoemulsões podem ser produzidas em larga escala utilizando tecnologias de homogeneização já existentes. Métodos mecânicos, como homogeneizadores de alta pressão, sonicadores e microfluidizadores, são amplamente empregados na fabricação dessas estruturas. Alternativamente, abordagens físico-químicas, como emulsificação espontânea e inversão de fase, também podem ser utilizadas para a produção eficiente de nanoemulsões (Chavda et al., 2024).

2.3.1.2 Nanoprecipitação

Outra técnica que pode ser utilizada para o encapsulamento de substâncias é a nanoprecipitação, também conhecida como deslocamento de solvente ou deposição interfacial. Esse método permite a obtenção de partículas com diferentes composições, tamanhos e características de superfície, possibilitando propriedades funcionais para aplicações específicas (Mora-Huertas et al., 2010).

Esse processo envolve a dissolução da substância ativa e de um polímero em um solvente orgânico adequado, seguido da adição dessa mistura a um antissolvente (geralmente água) sob agitação contínua. Esse procedimento promove a precipitação do polímero, resultando na formação de nanopartículas poliméricas contendo o componente ativo, o solvente é então removido resultando em uma solução aquosa de nanocápsulas (Figura 3). Essa técnica permite a fabricação de nanopartículas carregadas com diferentes compostos ativos com pequenas dimensões e baixa distribuição de tamanho (Martínez Rivas et al., 2017).

Figura 3. Ilustração esquemática dos processos de preparação de nanocápsulas poliméricas com OE através de métodos de nanoprecipitação



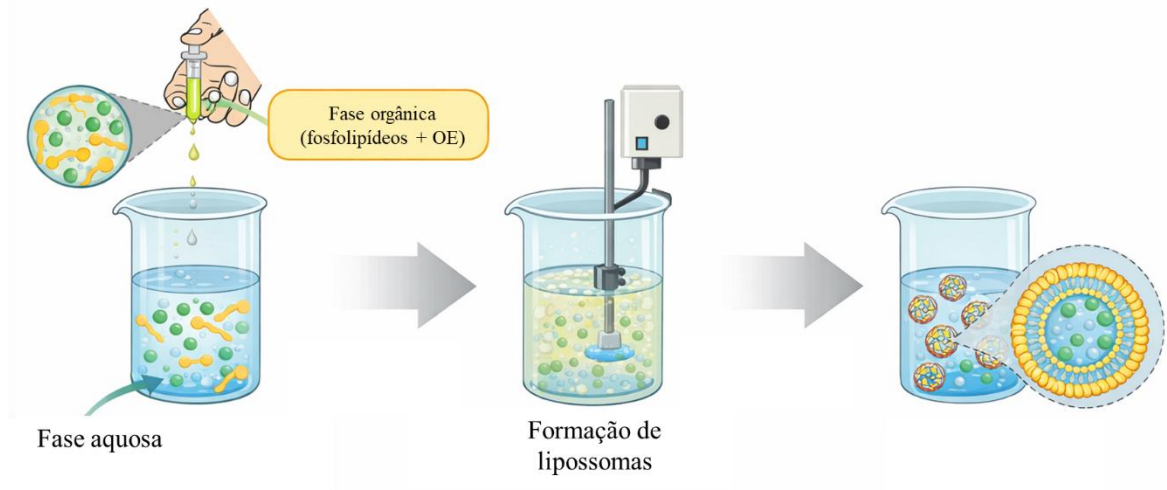
Fonte: adaptado de Weisany et al (2022).

2.3.1.3 Aprisionamento lipossomal

Encapsulações também podem ser em forma de nanolipossomas. Nanolipossomas são vesículas esféricas com diâmetros que variam entre 25 e 1000 nm, compostas por uma ou múltiplas bicamadas de fosfolipídios (Wang et al., 2022). Essas bicamadas possuem partes hidrofílicas e hidrofóbicas, permitindo a incorporação de moléculas bioativas com ambas as características (Figura 4). Substâncias hidrofóbicas se destacam nessa técnica, sendo a

encapsulação em nanolipossomas altamente eficiente, aumentando estabilidade, manuseio e potencial de aplicação (Ghaderi-Ghahfarokhi et al., 2017).

Figura 4. Ilustração esquemática dos processos de preparação de nanolipossomas com OE através de métodos de aprisionamento lipossomal.



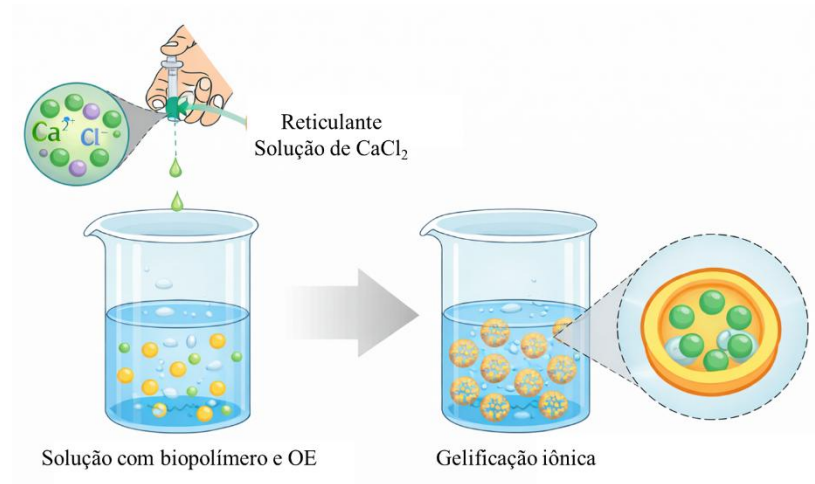
Fonte: o autor (2026).

2.3.1.4 Gelificação iônica

A técnica de gelificação iônica consiste na formação de micropartículas ou nanopartículas com base na interação eletrostática entre cargas opostas, envolvendo pelo menos um polímero sob condições de agitação mecânica (Figura 5). Polímeros como quitosana, carboximetilcelulose, alginato de sódio e pectina, bem como ânions, incluindo sais de cloreto (Ba, Ca, Mg, Cu, Zn e Co), sais de sulfato e sais de polifosfato, podem ser utilizados na síntese de nanopartículas (Pedroso-Santana e Fleitas-Salazar, 2020; Racoviță et al., 2009).

O método de gelificação iônica utiliza materiais simples, de fácil acesso e de baixo custo, além de equipamentos acessíveis, permitindo sua execução de forma rápida e segura em laboratórios convencionais. Além disso, como o mecanismo se baseia na interação eletrostática em vez de reações químicas, não há necessidade do uso de solventes orgânicos, reduzindo assim a toxicidade. No entanto, uma das limitações desse método é a dificuldade em obter nanopartículas de tamanho uniforme. Além disso, a pesquisa sobre outros polímeros além da quitosana ainda é restrita (Racoviță et al., 2009).

Figura 5. Ilustração esquemática dos processos de preparação de nanopartículas com OE através de métodos de gelificação iônica.



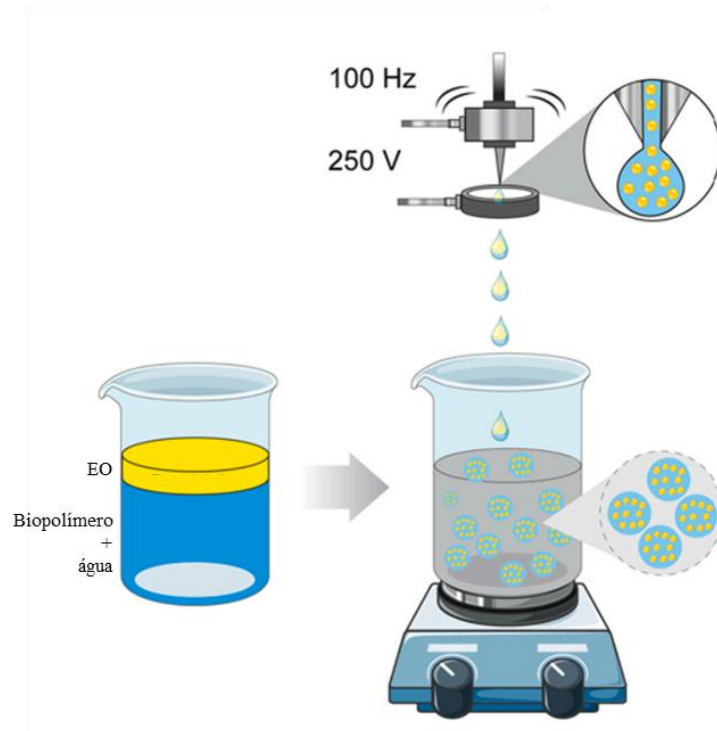
Fonte: o autor (2026).

2.3.1.5 Extrusão

Compostos ativos também podem ser encapsulados dentro de microgéis formados por processos de extrusão. Nessa técnica, emulsões com os compostos ativos são misturadas com uma solução de biopolímero, que é então forçada através de uma agulha de seringa para dentro de uma solução contendo um agente de reticulação (Figura 6). A interação entre a gotícula e o agente de reticulação na ponta da seringa resulta na formação de microgéis de biopolímero (Arora et al., 2020).

Esse método apresenta diversas vantagens, como sua simplicidade e o fato de não exigir condições de processamento rigorosas. No entanto, a produção de microgéis com diâmetros inferiores a aproximadamente 200 μm é dificultosa. Recentemente, novas tecnologias de extrusão foram desenvolvidas para produzir microgéis menores em maiores quantidades, sendo adequados para a encapsulação de compostos bioativos. Métodos como extrusão com múltiplos bicos, atomização por rotação ou vibração, bico concêntrico e tecnologia de corte por jato podem gerar microgéis de pequenas dimensões com diferentes estruturas (Bamidele e Emmambux, 2021).

Figura 6. Ilustração esquemática dos processos de preparação de nanopartículas com OE através do método de extrusão.



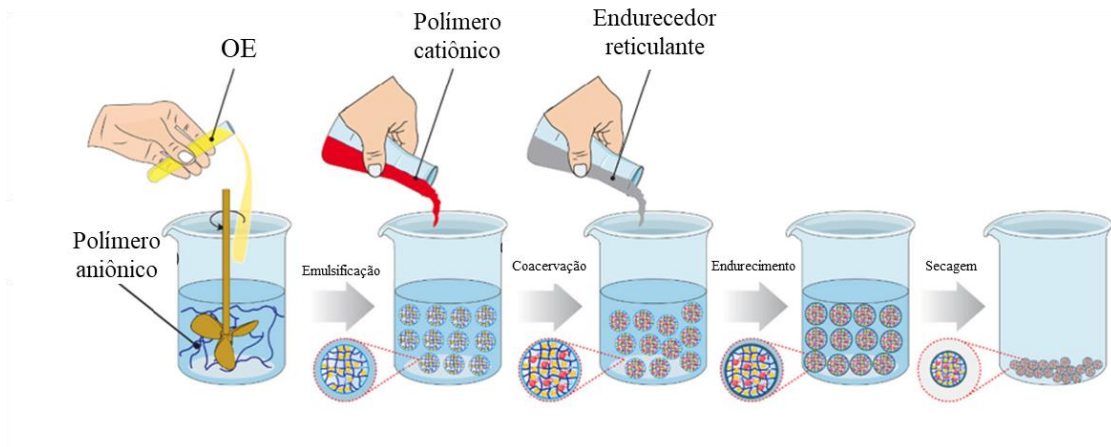
Fonte: adaptado de Weisany et al (2022).

A extrusão a quente também é uma alternativa para bioativas. No entanto, as altas temperaturas envolvidas podem causar a degradação química de substâncias sensíveis ao calor. Esse problema pode ser minimizado utilizando uma extrusora equipada com orifícios concêntricos (extrusão coaxial), permitindo a formação de microgéis em temperaturas mais baixas. No entanto, a extrusão coaxial pode resultar em microgéis com baixa uniformidade e eficiência reduzida (Chew e Nyam, 2016).

2.3.1.6 Coacervação

A encapsulação por coacervação refere-se à separação de fase de um ou mais hidrocoloides a partir da solução inicial, formando coacervados que atuam como camada protetora, enquanto os agentes ativos suspensos ou emulsionados compõem o núcleo. O processo de microencapsulação por coacervação complexa envolve quatro etapas principais: emulsificação, coacervação, gelificação e endurecimento (Figura 7)(Dong et al., 2008).

Figura 7. Ilustração esquemática dos processos de preparação de nanopartículas com OE através do método de coacervação.



Fonte: adaptado de Weisany et al (2022).

A estrutura das microcápsulas de coacervado é influenciada pela taxa de homogeneização durante a emulsificação. Em taxas de homogeneização mais baixas, formam-se microcápsulas mononucleares, enquanto taxas mais altas resultam em microcápsulas multinucleares (Dong et al., 2011). Vale destacar que o tamanho e a morfologia das microcápsulas de coacervado são fortemente influenciados pelas condições de processamento (Lemetter et al., 2009). Entre as principais vantagens desse método estão a alta eficiência de encapsulamento, a baixa concentração de biopolímeros necessária e as condições de processamento brandas (Eghbal e Choudhary, 2018).

2.4 FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Os fungos fitopatogênicos são microrganismos pertencentes ao reino Fungi, capazes de causar doenças em plantas, afetando significativamente a agricultura e os ecossistemas naturais. Esses organismos possuem uma ampla diversidade de espécies e são responsáveis por grandes perdas econômicas em culturas agrícolas, além de impactarem a biodiversidade vegetal (Agrios, 2024). A interação entre fungos fitopatogênicos e plantas é mediada por uma complexa rede de mecanismos bioquímicos e fisiológicos, que envolvem tanto a capacidade do patógeno de infectar o hospedeiro quanto a resposta de defesa da planta (Dean et al., 2012).

A reprodução é um dos fatores que contribuem para sua eficiência como patógenos. Eles podem se reproduzir de forma assexuada, por meio da produção de esporos como conídios, ou

de forma sexuada, gerando esporos como ascósporos ou basidiósporos (Alexopoulos et al., 1996). A reprodução assexuada permite uma rápida disseminação do patógeno, especialmente em condições ambientais favoráveis, como alta umidade e temperaturas moderadas. Já a reprodução sexuada promove variabilidade genética, o que pode aumentar a adaptabilidade e a virulência dos fungos (Kück e Pöggeler, 2009).

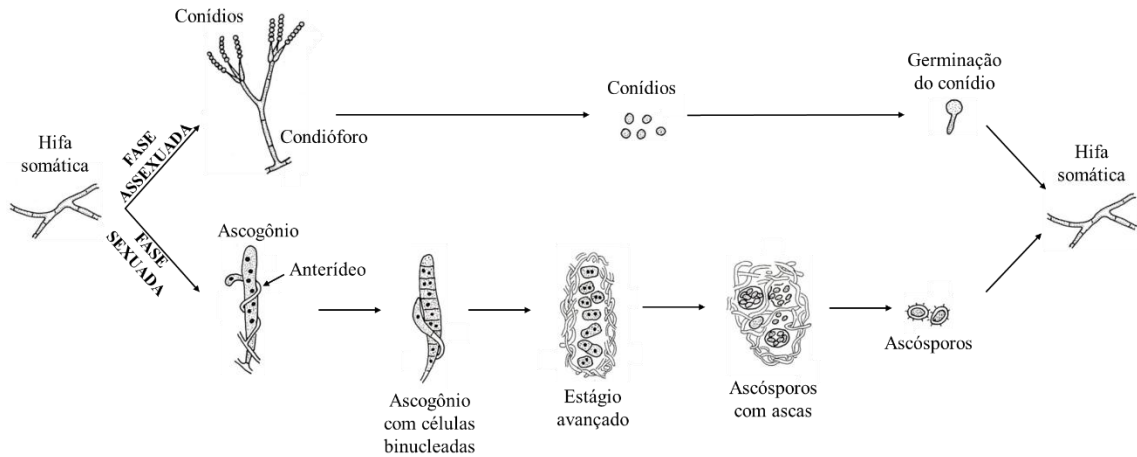
A infecção em sua maioria começa com a adesão do patógeno à superfície da planta, seguida pela penetração direta ou através de aberturas naturais, como estômatos. Uma vez dentro do tecido vegetal, os fungos podem secretar enzimas hidrolíticas, como celulasas e pectinases, que degradam a parede celular da planta, facilitando a colonização (Oliver e Ipcho, 2004). Além disso, muitas espécies produzem toxinas que interferem no metabolismo vegetal, causando sintomas como necrose, clorose e murcha (Agudo-Jurado et al., 2023).

A capacidade dos fungos fitopatogênicos de sobreviver em condições adversas também é notável. Eles podem formar estruturas de resistência, como esclerócios e clamidósporos, que lhes permitem permanecer viáveis no solo ou em restos culturais por longos períodos, até que as condições se tornem favoráveis para a infecção (Sarenqimuge et al., 2025). Essa característica dificulta o controle desses patógenos, exigindo estratégias integradas de manejo, como rotação de culturas, uso de variedades resistentes e aplicação de fungicidas (Wijayawardene, 2020).

Os fungos fitopatogênicos são classificados em diferentes grupos taxonômicos, com base em suas características morfológicas, reprodutivas e genéticas. Dentre as principais classes, destacam-se os ascomicetos, basidiomicetos e zigomicetos (Alexopoulos et al., 1996).

Os fungos ascomicetos pertencem ao filo Ascomycota e destacam-se por representam um dos grupos mais diversos do reino Fungi. Caracterizam-se pela produção de esporos em estruturas especializadas chamadas ascos, localizadas dentro de ascomas (Senanayake et al., 2022). Esses fungos apresentam reprodução sexuada e assexuada. Na reprodução sexuada, formam ascósporos dentro dos ascos, enquanto na reprodução assexuada, produzem conídios, que são esporos dispersos no ambiente. Desempenham papéis ecológicos essenciais, como decompositores de matéria orgânica, simbioses em líquens e patógenos de plantas e animais (Bennett e Turgeon, 2017).

Figura 8. Representação das fases assexuada e sexuada de um fungo ascomiceto.



Fonte: adaptado de Krugner e Bacchi (1995).

Geralmente, os ascósporos são liberados e se depositam na superfície do hospedeiro, onde germinam e penetram. Após a colonização, os fungos se reproduzem de forma assexuada, gerando conídios que dão origem aos ciclos secundários das doenças. Com a repetição de múltiplos ciclos assexuais, a reprodução sexuada ocorre, geralmente em resposta a condições ambientais adversas para o fungo (Senanayake et al., 2022). A Figura 8 ilustra os ciclos sexual e assexual.

2.4.1.1 *Botrytis cinerea*

B. cinerea é um fungo necrotrófico de grande relevância agrícola, sua fase assexuada (anamorfo) é a mais comum no ciclo de vida, caracterizada pela produção de conídios cinza-escureados em conidióforos ramificados, enquanto a fase sexual (teleomorfo), denominada *Botryotinia fuckeliana*, é raramente observada em condições naturais (Williamson et al., 2007). O fungo destaca-se pela capacidade de formar escleródios, estruturas de resistência que garantem sua sobrevivência em ambientes hostis, como solos e restos culturais (Dean et al., 2012).

Responsável pelo "mofo cinzento", o patógeno afeta mais de 200 espécies vegetais, incluindo culturas de alto valor, como uva, morango, tomate e flores ornamentais (Elad et al., 2016). Em videiras, por exemplo, a infecção pode resultar em perdas de 20% a 50% da produção, dependendo das condições climáticas e das práticas de manejo (Keller, 2020). Além das perdas quantitativas, o fungo compromete a qualidade pós-colheita, inviabilizando a comercialização de frutos sensíveis. A Figura 9 apresenta a doença em diferentes culturas.

Figura 9. Lesões causadas pelo fungo *B. cinerea* em diferentes frutos, flores e folhas.



Fonte: EMBRAPA (2025a).

Em contextos específicos, o *B. cinerea* assume um papel benéfico. Na produção de vinhos a "podridão nobre" induzida pelo fungo concentra açúcares e ácidos nas uvas, conferindo aromas complexos. No entanto, condições de umidade descontroladas transformam o processo em uma infecção destrutiva (Agrios, 2024).

Estima-se que os prejuízos anuais ultrapassem US\$ 10 bilhões, considerando custos diretos (perdas de produção) e indiretos (gastos com fungicidas e restrições de exportação) (UNEP, 2021). Em países com agricultura intensiva, o fungo é uma ameaça constante a cultivos protegidos, como tomate e morango em estufas, em que a alta umidade favorece sua proliferação (Nicot et al., 2016).

O controle químico permanece como a principal estratégia de manejo, com fungicidas como boscalida, iprodiona e fenhexamida. No entanto, o uso excessivo tem selecionado populações resistentes do patógeno. Estudos na Europa reportaram resistência a múltiplas classes químicas em regiões vitícolas, comprometendo a eficácia desses produtos (Fernández-Ortuño et al., 2014). Além disso, regulamentações ambientais, como a Diretiva 2009/128/CE da UE, limitam o uso de agroquímicos, pressionando por alternativas sustentáveis.

Dentre alternativas sustentáveis para a utilização desses agroquímicos se destacam os óleos essenciais. Trabalhos como o de Albuquerque Sousa e colaboradores (2024) relatam que os óleos essenciais de cravo, canela e capim-limão apresentaram uma boa atividade, com concentrações inibitórias menores a $0,85 \text{ mg mL}^{-1}$.

Soluções nanotecnologias para o controle de *B. cinerea* também são relatadas na literatura, como por exemplo no estudo de De Angelis e colaboradores (2022), onde foi avaliado o efeito de nanocápsulas de PLGA com terostilbeno, um composto natural, e o fluopiram, um fungicida sintético, no controle de germinação de conídios e micélios. Os resultados

demonstram uma inibição de germinação de conídios após 72 h em até 70% para as nanocápsulas contendo fluopiram em uma concentração de $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo superior ao composto não encapsulado, que apresentou uma inibição de germinação de 40%.

Corrêa e colaboradores (2024), por sua vez, avaliaram a atividade nanoemulsões utilizando Pluronic[®] F-127, óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo) e do nerolidol para a inibição de germinação de *B. cinerea*. Ambas as formulações inibiram efetivamente a germinação de esporos, sendo que, a formulação utilizando óleo essencial de *B. dracunculifolia* atingiu uma inibição de 97%, e a formulação de nerolidol de 98%, ambos na concentração de 25 mg mg^{-1} . Apesar dos bons resultados o estudo se limita apenas nos resultados *in vitro* de germinação de conídios, sem uma aplicação prática.

O estudo Tópor e colaboradores (2024), por sua vez, fornece evidências do efeito da nanoencapsulação no controle de *B. cinerea*, especialmente em ensaios *in vitro* para o controle do fungo e uma análise sensorial para comprovar o efeito de redução de odor do carvacrol. Nos testes *in vitro*, *B. cinerea* apresentou elevada sensibilidade ao carvacrol, com concentração inibitória mínima de $0,03 \text{ g L}^{-1}$ para a forma não encapsulada, valor que foi reduzido para $0,003 \text{ g L}^{-1}$ quando veiculado em nanocápsulas de Eudragit[®] RS100. Ao se tratar dos ensaios sensoriais, observou-se uma redução a um nível que não perceptível, demonstrando assim, que a utilização das nanocápsulas não modifica características sensoriais no fruto, diferente do composto não encapsulado.

Considerando o controle do fungo em ensaios *in vivo*, Jokarshourijeh e colaboradores (2025), observaram que a nanoformulação de óleo essencial de casca de citrus encapsulado em sílica mesoporosa PEGuilada (BNF) apresentou elevada eficácia no controle de *B. cinerea* em morangos. No ensaio de controle da doença, a aplicação de BNF na concentração de 10 g L^{-1} , sendo, 1 g L^{-1} a concentração presente de óleo essencial de citrus, resultou em 74,03% de inibição da doença, valor estatisticamente equivalente ao fungicida comercial Signum[®] (boscalida + piraclostrobina), que apresentou 77,52% de inibição, enquanto o controle tratado apenas com água apresentou apenas 13,01% de inibição.

2.4.1.2 *Colletotrichum sp.*

Colletotrichum é um gênero de fungos fitopatogênicos amplamente reconhecido como um dos grupos mais importantes de patógenos vegetais, responsável por causar antracnose em diversas culturas agrícolas e frutíferas (Cannon et al., 2012)

A antracnose manifesta-se em diferentes partes das plantas, folhas, ramos, flores e frutos, apresentando sintomas como lesões necróticas e podridões. Em frutos, o patógeno frequentemente se manifesta após a colheita, sob condições favoráveis de umidade e temperatura. Essa característica é responsável por grandes perdas econômicas em frutas destinadas ao consumo *in natura* e exportação, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (Law et al., 2025).

O manejo de doenças causadas por *Colletotrichum* baseia-se em estratégias integradas, incluindo uso de fungicidas, práticas culturais e controle biológico. No entanto, a resistência fúngica a compostos químicos tem sido amplamente relatada (Cortaga et al., 2023).

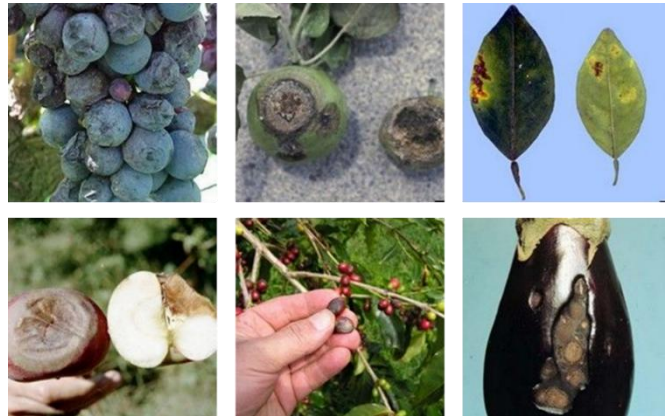
Esse cenário tem estimulado pesquisas com métodos alternativos, como a utilização de óleos essenciais, extratos vegetais e nanocarreadores bioativos, que demonstram potencial para o controle de antracnose (de Oliveira et al., 2023).

2.4.1.2.1 *Colletotrichum gloeosporioides*

O *C. gloeosporioides* é o fungo reconhecido como agente causal da antracnose em culturas de elevado valor econômico, como manga, mamão, abacate, goiaba e maracujá. A doença manifesta-se tipicamente por lesões escuras e afundadas em frutos e folhas, que podem evoluir para necrose total do tecido (Figura 10) (Dean et al., 2012).

Em mangas, as infecções surgem apenas durante a maturação ou o armazenamento, tornando a antracnose uma das principais causas de perdas pós-colheita (Moraes et al., 2013). A capacidade do patógeno de permanecer adormecido por longos períodos explica sua persistência mesmo após o uso de fungicidas preventivos. A reprodução assexuada, com produção de conídios hialinos e unicelulares em acérvulos, é predominante, enquanto o estágio sexual é raramente detectado (Weir et al., 2012).

Figura 10. Lesões causadas pelo fungo *C. gloeosporioides* em diferentes frutos e folhas.



Fonte: AGROLINK (2025b).

Trabalhos como o de Flores e Poveda (2025) relatam o controle desse fungo no crescimento micelial utilizando os óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) em concentrações de 0,1% (v/v) e 0,175% (v/v), respectivamente, após 6 dias. Os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), conforme relatado por Horst e colaboradores (2025) em concentrações superiores a 0,05% (v/v) também inibiram o crescimento micelial do fungo, e afetando a permeabilidade da membrana. Para o óleo essencial de alecrim, Yuan e colaboradores (2024) relataram a concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima de, respectivamente $15,625 \mu\text{L mL}^{-1}$ e $31,25 \mu\text{L mL}^{-1}$, onde, o mecanismo antifúngico do óleo essencial de alecrim envolveu a destruição da parede e membrana celular, a inibição da síntese de material genético e a divisão e diferenciação celular.

A grande maioria dos estudos disponíveis na literatura limita-se à avaliação do controle desses fungos em ensaios *in vitro*, havendo ainda uma lacuna significativa quanto a investigações *in vivo*. Nesse contexto, Antonioli e colaboradores (2020) relataram o controle de *C. gloeosporioides* em ensaios *in vivo* realizados em maçãs, utilizando nanocápsulas poliméricas de PLA contendo óleo essencial de capim-limão como composto ativo. Os autores observaram que, na concentração de 0,1% (v/v) de óleo essencial, houve redução de até 65% no diâmetro da necrose causada pelo fungo, em comparação ao tratamento sem a adição do composto bioativo. Ressalta-se que o óleo essencial na forma não encapsulada apresentou efeito fitotóxico sobre os frutos, resultando em lesões tão severas quanto aquelas observadas no controle contendo apenas o inóculo fúngico. Esses resultados demonstram que a nanoencapsulação foi eficaz não apenas no controle do crescimento fúngico, mas também na mitigação dos efeitos fitotóxicos do óleo essencial sobre o fruto.

2.4.1.2.2 *Colletotrichum fructicola*

C. fructicola é uma espécie do complexo *gloeosporioides* que se destaca por sua ampla distribuição geográfica e grande adaptabilidade a diferentes hospedeiros, incluindo manga, maçã, morango, café e pêssego (Figura 11)(Bragard et al., 2021).

A infecção por *C. fructicola* inicia-se geralmente a partir de ferimentos ou aberturas naturais, sob condições de alta umidade e temperatura entre 25 e 30 °C, em frutos, causa necrose tecidual, resultando em lesões e escurecimento dos frutos (Cai et al., 2009).

O patógeno é responsável por perdas expressivas, especialmente em maçã e café, nos quais causa a podridão amarga e a antracnose dos frutos. Essas doenças comprometem não apenas o rendimento, mas também a aparência e o valor de mercado do produto. A presença de infecção latente representa um desafio adicional, pois os sintomas muitas vezes surgem apenas durante o transporte ou armazenamento pós-colheita. (Cannon et al., 2012)

Figura 11. Lesões causadas pelo fungo *C. fructicola* em diferentes frutos e folhas.



Fonte: adaptado de Rockenbach (2016).

O controle químico tem sido amplamente empregado, porém a resistência de *C. fructicola* a fungicidas como carbendazim e tiabendazol já foi documentada em várias regiões Cortaga e colaboradores (2023). Esse contexto favorece o avanço de pesquisas com compostos naturais, como óleos essenciais.

Estudos para o controle de *C. fructicola* utilizando óleos essenciais já são presentes na literatura. Pansera e colaboradores (2023) ao empregarem os óleos essenciais extraídos de folhas de *Cupressus sempervirens* (cipreste-italiano) e *Cupressus lusitânica* (cipreste-português) observaram que estes foram ineficazes no controle de indivíduos adultos de *C. fructicola* em todas as concentrações avaliadas. No entanto, foi observada a atividade destes óleos sobre a germinação dos conídios, em que os óleos essenciais de *C. sempervirens* e *C. lusitânica* inibiram, respectivamente, 50% e 38% da germinação dos conídios de *C. fructicola* na concentração de 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$. O composto carvacrol, sendo comumente majoritário no óleo de tomilho, também foi relatado para o controle desse fungo, que após 6 dias e em

concentrações de 0,04% (v/v) controlou o crescimento micelial (Pei et al., 2020a).

Em relação a utilização de nanopartículas para o controle de *C. fructicola*, López-Bermúdez e colaboradores (2024) avaliaram o efeito antifúngico de nanopartículas de quitosana. Contudo as nanopartículas não inibiram o crescimento fúngico, entretanto, a viabilidade celular diminuiu à medida que a concentração de nanopartículas aumentou, sendo observada inibição completa da viabilidade na concentração de 5 g L⁻¹. Além disso, foi observado redução no comprimento médio das hifas. Estudos envolvendo a utilização de nanopartículas para o controle *in vivo* deste fungo não são relatados na literatura.

2.4.1.3 *Penicillium* sp.

Espécies do gênero *Penicillium* são fungos filamentosos saprófitas amplamente disseminadas no ambiente. No que se relaciona a agricultura, algumas espécies, como *Penicillium expansum*, *P. digitatum* e *P. italicum*, são reconhecidas como os principais agentes de podridões pós-colheita em frutos carnosos, especialmente maçãs, peras e citros. Esses fungos produzem conídios esverdeados e esporulam rapidamente sob alta umidade, colonizando tecidos danificados e causando deterioração significativa durante o armazenamento e transporte (Figura 12) (Duan et al., 2016).

Em citros, *P. digitatum* causa o mofo verde, enquanto *P. italicum* é responsável pelo mofo azul, ambos favorecidos por ferimentos mecânicos e pela elevada umidade relativa do ar (Bhatta, 2022). Já *P. expansum* é o agente causal da podridão azul da maçã, além de produzir a patulina, uma micotoxina de preocupação alimentar devido à sua toxicidade (Luciano-Rosario et al., 2020). Esses patógenos reduzem a vida útil dos frutos e comprometem a segurança alimentar, sendo um desafio recorrente na cadeia pós-colheita. Tradicionalmente, o controle desses fungos é realizado com fungicidas sintéticos, como imazalil, tiabendazol e pirimetanil.

Figura 12. Lesões causadas pelo fungo *Penicillium sp.* em diferentes frutos.



Fonte: AGROLINK (2026b).

O controle de fungos *Penicillium sp.* utilizando óleos essenciais já é relatado na literatura. García-Custodio e colaboradores (2025) para o controle de *P. digitatum* e *P. italicum* utilizou os óleos essenciais de rosmaninho maior (*Lavandula pedunculata subsp. sampaioana*), rozeira (*Lavandula stoechas subsp. luisieri*), hortelã-pimenta (*Mentha × piperita*), orégano (*Origanum vulgare subsp. virens*), *Thymus mastichina*, e *Thymus zygis subsp. Sylvestris*. Dentre esses óleos essenciais, o óleo essencial de *Thymus zygis subsp. Sylvestris*, com aproximadamente 68,83% de sua composição sendo de timol, apresentou a maior atividade antifúngica, com valores médios de halo de inibição de $60,50 \pm 5,77$ mm para *P. digitatum* e $54,33 \pm 2,93$ mm para *P. italicum*, respectivamente, após 96 horas.

O controle de *P. digitatum* utilizando nanotecnologia também se demonstra escasso na literatura. Gharzouli e colaboradores (2024) em seu estudo utilizaram nanocápsulas de policaprolactona (PCL) com os compostos ativos sendo os óleos essenciais de *C. citratus* e *Citrus limon* (limão siciliano) para o controle, *in vivo*, em laranjas. Utilizando as nanocápsulas, após 21 dias não foram observados sinais do crescimento de fungos, vale ressaltar que quando empregado as nanocápsulas contendo óleo essencial de *C. limon* as seguintes características não foram relatadas: desidratação, alterações de cor e escurecimento em frutos revestidos. Além disso, é relatado que no teste sensorial não houve diferenças significativas entre as amostras revestidas com as formulações de nanocápsulas de *C. limon* e o grupo controle.

2.5 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo óleo essencial e avaliação no controle de fitopatógenos em frutos pós-colheita.

2.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obtenção e caracterização dos diferentes óleos essenciais utilizados;
- b) Determinar a melhor metodologia para obtenção de nanocápsulas de Poli(ácido láctico), contendo óleo essencial de capim-limão e citral;
- c) Determinar a melhor metodologia para a obtenção de nanocápsulas de Eudragit[®] S100, contendo óleo essencial de orégano;
- d) Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais e das nanocápsulas sintetizadas no combate a fungos fitopatogênicos;
- e) Avaliar os danos causados pelo citral e o óleo essencial de capim-limão (encapsulados e não encapsulados) na parede celular e na atividade enzimática do fungo *Botrytis cinerea*.
- f) Avaliar a atividade antifúngica *in vivo*, em frutos pós colheita, das nanocápsulas formuladas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Com o objetivo de obter nanocápsulas contendo diferentes óleos essenciais e seus componentes majoritários, com potencial aplicação no controle de fitopatógenos, este capítulo apresenta os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento do estudo. São descritos os insumos empregados na produção das nanocápsulas, bem como os procedimentos experimentais adotados para sua síntese e caracterização. Adicionalmente, são detalhadas as metodologias utilizadas para avaliar o desempenho das nanocápsulas no controle *in vitro* e *in vivo* de fungos fitopatogênicos.

3.1 MATERIAIS

Acetona grau analítico foi adquirida da Dinâmica (Brasil). O monostearato de sorbitano (Span 60, Lote nº SLCN2059) foi obtido da Sigma-Aldrich. Acetonitrila grau HPLC foi adquirida da Merck, e o polissorbato 80 (Tween 80, Lote nº AUTO045242) da DEG Produtos Químicos (Brasil). O PLA (poli(ácido láctico)) utilizado foi o Ingeo Biopolymer 4060D da NatureWorks, lote FA1328B131, fornecido pela empresa Cargill. O Eudragit® S100 (Lote nº B211205208) e o Eudragit® RS100 (Lote nº B211008630) foram doados pela Evonik Brazil Industries AG (Evonik Brazil Ltda). O meio PDA (Potato Dextrose Agar, Lote nº VM1078630-411) foi obtido da Merck-Millipore. Todos os reagentes comerciais foram utilizados sem purificação prévia. A água deionizada foi preparada por um sistema de purificação de água Milli-Q.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtenção e caracterização dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) foram adquiridos da empresa Quinarí (Brasil). Os óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.), citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt), eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) e Ho-Sho (*Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* Y. Fujita) foram colhidos e extraídos por destilação a vapor a partir

de folhas jovens e maduras secas colhidas no ano de 2023. O material vegetal foi cultivado no campo experimental da Universidade de Caxias do Sul (29°08'28,9" S, 50°59'29,3" O). A composição química dos óleos essenciais foi determinada por cromatografia a gás. A densidade dos óleo essencial de capim-limão e orégano e do citral foram determinadas utilizando um densímetro portátil DMA-35n (Anton Paar) a 25 °C.

Os óleos essenciais foram caracterizados na Central de Análises do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul por cromatografia a gás com detector por ionização de chama (GC–FID) e cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (GC–MS).

As análises por GC–FID foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu 2010 Plus, utilizando uma coluna HP–Innowax (30 m × 320 µm i.d.) 0,50 µm espessura de filme (Hewlett Packard, Palo Alto, USA), temperatura da coluna, 40 °C (8 min) para 180 °C, 3 °C min⁻¹, 230 °C (10 min); temperatura do injetor 250 °C; *split ratio* 1:50, detector de ionização de chama com temperatura de 250 °C; gás de arraste H₂ (34 kPa), volume injetado de 1 µL diluído em hexano (1:10).

As análises por GC–MS foram realizadas em um cromatógrafo Hewlett Packard 6890, equipado com um detector seletivo de massas Hewlett Packard 6890/MDS5973, com o software HP Chemstation e espectroteca Wiley 275. Foi utilizada uma coluna capilar HP–Innowax (30 m × 320 µm i.d.) 0,50 µm espessura de filme (Hewlett Packard, Palo Alto, USA), temperatura da coluna, 40 °C (8 min) para 180 °C, 3 °C min⁻¹, 230 °C (10 min); temperatura do injetor 250 °C; interface 280 °C, *split ratio* 1:50; gás de arraste He (56 kPa); razão de fluxo: 1,0 mL min⁻¹; energia de ionização 70 eV; volume injetado 1 µL diluído em hexano (1:10).

A identificação química dos constituintes dos óleos foi obtida pela comparação dos respectivos espectros de massa com a biblioteca Wiley (GC–MS) e por comparação do índice de retenção linear (LRI) prático com dados da literatura (BABUSHOK; LINSTROM; ZENKEVICH, 2011). O índice de retenção linear foi calculado utilizando a equação proposta por H. van den Dool e D. J. Kratz (Equação 1) por se tratar de uma metodologia com programação linear de temperatura e utilizando um padrão de alcanos C7 a C30 da Sigma-Aldrich (DOOL; KRATZ, 1963; ZELLNER *et al.*, 2008).

$$LRI = 100.n + 100 \left(\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{R(n+1)} - t_{Rn}} \right) \quad \text{Equação 1}$$

Sendo:

n – número de carbonos do alcano linear menos retido pela fase estacionária do que o composto x;

t_{Rx} – tempo de retenção do composto desconhecido (x);

t_{Rn} – tempo de retenção do alcano linear menos retido pela fase estacionária do que o composto x;

$t_{R(n+1)}$ – tempo de retenção do alcano linear mais retido do que o composto x.

O cálculo do percentual relativo de cada composto no óleo essencial foi determinado a partir da área dos picos obtidos por GC–FID.

3.2.2 Obtenção dos conídios fúngicos

Amostras dos fitopatógenos causadores de doenças pós-colheita, *B. cinerea*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides* e *P. digitatum*, foram fornecidas pela coleção de fungos do Laboratório de Fitopatologia da Universidade de Caxias do Sul. Para a obtenção da suspensão de conídios fúngicos, placas de PDA foram inoculadas com cada fungo e mantidas a 25 °C por 14 dias, sob fotoperíodo de 12 h. Após esse período, as placas foram escovadas para a remoção das hifas e, em seguida, mantidas por mais 24 h a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 h (SL224/390-I, Solab, Brasil). Posteriormente, as placas foram lavadas com água destilada estéril. Os conídios fúngicos foram quantificados em câmara de Neubauer e ajustados para uma concentração final de 1×10^5 conídios mL⁻¹.

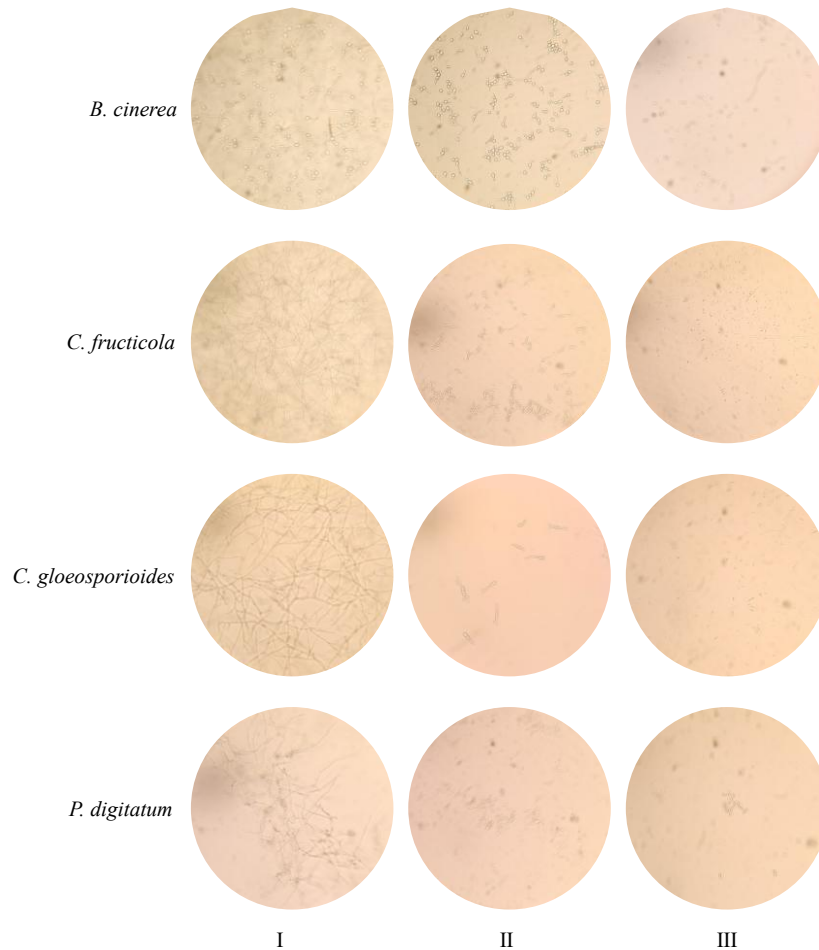
3.2.3 Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais

O ensaio de inibição da germinação de conídios para *B. cinerea*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides* e *P. digitatum* foi conduzido utilizando sete concentrações diluídas preparadas a partir de suspensões dos óleos essenciais de capim-limão, citronela, eucalipto, hortelã-pimenta, ho-sho, orégano e tomilho, nas concentrações de 0,4%, 0,2%, 0,1%, 0,05%, 0,025%, 0,0125% e 0,006% (v/v). As suspensões de óleos essenciais foram preparadas por diluição de uma solução com a concentração inicial de 0,8% (v/v) em solução aquosa contendo Tween 80

a 0,5% (m/v). Para o controle negativo, utilizou-se uma solução aquosa contendo apenas Tween 80 a 0,5% (m/v).

Em placas de microtitulação de 96 poços, adicionaram-se 50 μL de meio YPD e 50 μL de cada diluição em cada poço, seguidos da adição de 10 μL de uma suspensão de conídios (1×10^5 conídios mL^{-1}). As placas foram incubadas a 25 °C, por 48 h, sob fotoperíodo de 12 h. Os experimentos foram realizados em duplicata e avaliados em microscópio invertido (série VT, Meiji Techno Co., Japão) com aumento de 400 \times .

Figura 13. Representação dos três estágios da escala de germinação dos fungos *B. cinerea*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides* e *P. digitatum* sob um microscópio (imagem microscópica em 400 \times). (I) conídios com crescimento de hifas, (II) conídios com emergência do tubo germinativo e (III) conídios sem a emergência de hifas observáveis.



Fonte: o autor (2026).

As placas foram incubadas a 25 °C por 48 horas, sob um fotoperíodo de 12 horas. Os experimentos foram realizados em duplicata. As observações microscópicas foram realizadas após 24 e 48 horas de incubação. Com base no grau de germinação dos conídios, foi elaborada uma escala classificatória composta por três categorias: (I) conídios com crescimento de hifas,

(II) conídios com emergência do tubo germinativo e (III) conídios sem a emergência de hifas observáveis (Figura 13).

3.2.4 Ensaios de intumescimento dos polímeros PLA e Eudragit® S100 e RS100

Para os testes de intumescimento utilizando o PLA, um filme foi obtido por meio de prensagem em uma prensa hidráulica da marca Shulz, modelo PHS 15t no Laboratório de Polímeros da Universidade de Caxias do Sul, mantendo os *pellets* entre duas placas a 100 °C, e aplicação de uma força de fechamento de 5 toneladas, durante 5 minutos. Em seguida, realizou-se o resfriamento em prensa hidráulica da marca Bovenau – 10 ton, mantendo as 5 toneladas até atingir a temperatura ambiente.

Para a preparo do filme com o polímero Eudragit® S100, foi utilizado o método *casting*. Para isso, mediu-se 2,0 g do polímero que foram posteriormente solubilizados em 20 mL de acetona. Após, a solução foi vertida em placas de Petri e mantidas a 30 °C até a completa evaporação do solvente. O polímero Eudragit® RS100 foi utilizado na forma de *pellets*.

Os filmes obtidos foram cortados nas dimensões de 10 mm × 5 mm. Cada uma das placas, para os polímeros PLA e Eudragit® S100, e *pellets*, para o polímero Eudragit® RS100, tiveram as massas previamente determinadas e dispostas em frascos âmbar junto ao óleo essencial, em quantia suficiente para mantê-las submersas, e mantidos a temperatura ambiente. Em intervalos de tempo de 3, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 dias as placas foram retiradas dos óleos essenciais, secas com papel absorvente e, então, a massa foi novamente determinada (Guterres et al., 2000).

3.2.5 Otimização da síntese das nanocápsulas

A encapsulação dos óleos e seus componentes majoritários foi realizada por meio da deposição interfacial do polímero pré-formado, adaptando a metodologia previamente descrita por Fessi e colaboradores (1989). Inicialmente, 100 mg de PLA ou Eudragit® S100 (0,13% m/v) e 77 mg de monostearato de sorbitana (Span 60, 0,10% m/v) foram dissolvidos em 30 mL de acetona a 40 °C. Em um segundo frasco, 77 mg de polissorbato 80 (Tween 80, 0,10% m/v) foram dissolvidos em 50 mL de água deionizada à temperatura ambiente. Após uma hora de agitação de ambas as soluções, o composto ativo (OECL, citral ou OEOV), em um dos seguintes volumes: 100, 200, 300, 400 ou 500 µL) foi adicionado à fase orgânica sob agitação vigorosa e mantido por mais 10 minutos.

Em seguida, a fase orgânica foi injetada na fase aquosa sob agitação vigorosa, utilizando uma bomba dosadora automática (OFA 40D, OFA Ambiental, Brasil) com vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. A suspensão resultante foi mantida sob agitação vigorosa por mais 10 minutos. A acetona foi então evaporada sob pressão reduzida a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, obtendo-se um volume final de 50 mL de suspensão de nanocápsulas de OECL (OECL-NC), de citral (Citral-NC) ou de OEVO (OEVO-NC).

3.2.6 Escalonamento do processo de formulação das nanocápsulas de PLA

Em um frasco de vidro de 5 L, 4,0 g de PLA e 3,08 g de monostearato de sorbitana (Span 60, 0,10% m/v) foram dissolvidos em 1,2 L de acetona a $40 \text{ }^\circ\text{C}$. A mistura resultante foi mantida sob agitação magnética por uma hora, até completa dissolução. Em seguida, a temperatura foi reduzida para $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e adicionaram-se 20,0 mL do composto ativo, OECL (óleo essencial de capim-limão) ou citral, mantendo a mistura sob agitação por mais uma hora.

Essa solução orgânica foi injetada, a uma vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, por meio de uma bomba dosadora automática (OFA 40D, OFA Ambiental, Brasil) em uma solução aquosa composta por 3,08 g de polissorbato 80 (Tween 80, 0,10% m/v) diluídos em 2,0 L de água deionizada, contida em um frasco de vidro de 5 L equipado com um eixo de agitação com seis pás, operando a 250 rpm.

Ao final da adição, a suspensão resultante foi mantida sob agitação por mais uma hora. Por fim, a acetona foi removida por evaporação. Nessa etapa, foi montado um sistema de evaporação com banho-maria externo aquecido a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e pressão levemente reduzida (800 mbar) para remoção do solvente.

3.2.7 Ensaios de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta (PZ)

As análises de espalhamento de luz (DLS), potencial zeta (PZ) e polidispersão foram realizadas no Laboratório de Enzimas e Biomassas da Universidade de Caxias do Sul, em um equipamento ZetaSizer Pro-Blue (Malvern UK). Foram utilizados como parâmetros o índice de refração de 1,459 (PLA) e 1,390 (Eudragit[®] S100), temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, geometria esférica. Cubetas do modelo DTS0012 e DTS1070 para DLS e potencial Zeta, respectivamente. Os dados obtidos durante o ensaio foram adquiridos no software ZS Explorer v.3.3.1.5.

3.2.8 Medida das eficiências de encapsulação

As eficiências de encapsulação (EE) foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando um sistema cromatográfico Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) composto por duas bombas LC-20AD, um detector UV (SPD-20A) ajustado em 240 nm e 274 nm, para citral e carvacrol, respectivamente, e uma coluna de fase reversa Lichrospher RP18 (250 mm × 4,6 mm; 5 µm), mantida a 30 °C. A fase móvel utilizada foi acetonitrila:água (60:40) para citral e acetonitrila:água (50:50) para carvacrol, com fluxo de 0,5 mL min⁻¹ e tempo total de análise de 25 minutos. O volume de injeção foi de 5 µL.

A quantificação do citral ou do óleo essencial de capim-limão (OECL) nas nanocápsulas foi realizada com base em uma curva analítica construída apenas com o citral, por ser o principal componente do OECL. A curva obtida foi descrita pela equação $y = 418932864,22x + 458817,01$, construída em triplicata, com dez níveis de concentração variando de 0,0020 a 0,1000% (v/v), utilizando acetonitrila como solvente. O coeficiente de correlação (R^2) foi 0,999, e os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram 0,0015% (v/v) e 0,0047% (v/v), respectivamente.

Para o óleo essencial de orégano (OEOV), foi utilizado o carvacrol como padrão. A curva analítica obtida foi $y = 64030366,22x + 37022,95$, também construída em triplicata, com concentrações variando de 0,0020 a 0,1000% (v/v), utilizando acetonitrila como solvente. O coeficiente de correlação (R^2) foi 0,999, e os valores de LOD e LOQ foram 0,0019% (v/v) e 0,0053% (v/v), respectivamente.

A determinação de citral e carvacrol nas formulações nanoencapsuladas (OECL-NC, Citral-NC e OEOV-NC) foi realizada pelo método de ultrafiltração. Foram adicionados 200 µL da suspensão de nanocápsulas a filtros (Ultrafree[®]-MC 10000 MW, Millipore), seguidos de centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos. O material retido (nanocápsulas) foi solubilizado em 1 mL de acetonitrila, filtrado em membranas de nylon com poros de 0,2 µm e posteriormente analisado por HPLC.

A EE foi calculada considerando a quantidade de OECL, citral ou OEOV adicionada durante o processo de nanoencapsulação e a quantidade de citral ou carvacrol nanoencapsulado determinada por HPLC, de acordo com a Equação 2:

$$EE(\%) = \left[100 - \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \right] \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Sendo:

C_i – concentração de citral ou carvacrol (% v/v) adicionada na formulação;

C_f – concentração de citral ou carvacrol (% v/v) retida nas nanocápsulas ultrafiltradas.

Para o OECL, o valor obtido de EE foi corrigido dividindo-se por 0,7493, considerando que o citral representa 74,93% da composição do óleo na caracterização feita por GC–MS. Para o OEOV, a correção foi feita dividindo o resultado por 0,7019, devido à proporção de 70,19% de carvacrol em sua composição, também proveniente da caracterização por GC–MS.

A capacidade de carga (CG) foi calculada com base na eficiência de encapsulação obtida, de acordo com a Equação 3:

$$CG(\%) = \frac{m_e}{(m_e + m_p)} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Sendo:

m_e – massa de OECL, citral ou carvacrol encapsulado;

m_p – massa do PLA ou Eudragit® S100.

3.2.9 Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo

A morfologia das nanocápsulas foi avaliada por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão (FEG–SEM). As análises foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Professor Israel Baumvol, da Universidade de Caxias do Sul, utilizando um equipamento FEG–SEM de alta performance com emissor Schottky de alto brilho da Marca Tescan, modelo MIRA 3.

Para as imagens obtidas, o preparo fora feito com um aerógrafo direcionado a uma placa de silício, após a aspersão das soluções, a placa de silício foi presa a um *stub* utilizando fita de carbono. Então, o *stub* foi armazenado em dessecador por 24 horas antes de realizar a microscopia. As magnificações empregadas variaram de 3.000 a 20.000 vezes.

3.2.10 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) do filme de Eudragit® S100, do óleo essencial livre de *Origanum vulgare* (OVEO) e da formulação otimizada de

nanocápsulas (OVEO–NC–5, contendo 500 µL de óleo essencial) foram obtidos utilizando um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier Nicolet iS10 FTIR Spectrometer (Thermo Scientific), equipado com acessório de refletância total atenuada (ATR).

Os espectros foram adquiridos com resolução de 0,5 cm⁻¹, na faixa espectral de 4000–500 cm⁻¹. Para a análise das nanocápsulas, a amostra foi previamente concentrada utilizando um filtro (Ultrafree®–MC 10000 MW, Millipore), a 10000 rpm por 5 min, sendo posteriormente liofilizada para remoção da água residual.

3.2.11 Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica do Eudragit S100, do óleo essencial de *Origanum vulgare* (OVEO) e da formulação de nanocápsulas (OVEO–NC–5) foi determinada por análise termogravimétrica utilizando um microanalisador termogravimétrico Shimadzu TGA-50 Thermogravimetric Analyzer (Shimadzu, Kyoto, Japão). Aproximadamente 10 mg de cada amostra foram aquecidos de 25 °C a 700 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, sob atmosfera de nitrogênio (N₂) com fluxo de 50 mL min⁻¹.

3.2.12 Avaliação da atividade antifúngica das nanocápsulas

3.2.12.1 Ensaio da atividade antifúngica *in vitro*

Os ensaios de inibição da germinação para as suspensões de OECL–NC–5, Citral–NC–5 e OEOV–NC–5 foram conduzidos usando sete concentrações diluídas preparadas a partir do OECL–NC–5, Citral–NC–5 ou OEOV–NC–5, formulados nas concentrações de 0,4%, 0,2%, 0,1%, 0,05%, 0,025%, 0,0125% e 0,006% (v/v). Para estudo comparativo, emulsões óleo-água não encapsuladas de OECL, citral ou OEOV, contendo Tween 80 a 0,5% (m/v), foram preparadas nas mesmas concentrações. Para o controle negativo, foi utilizada uma solução aquosa contendo apenas Tween 80 a 0,5% (m/v). As avaliações e escalas de germinação feitas por microscópio ótico foram as mesmas descritas na sessão 3.2.3 (Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais).

3.2.12.2 Citometria de fluxo

Para a citometria de fluxo foram utilizadas as suspensões de OECL-NC-5 e Citral-NC-5 e o fungo *B. cinerea*. Para isso, os conídios de *B. cinerea* foram coletados de placas de BDA (Batata Dextrose Ágar) com 14 dias de idade. Os esporos foram lavados com água esterilizada, e a concentração foi ajustada subsequentemente para 1×10^5 esporos mL⁻¹ em meio SD (0,67% de *Yeast Nitrogen Base* (Y1250, Merk), 2% de glicose, pH 6,8) A suspensão de conídios tratada com OECL ou citral encapsulado ou não encapsulado nas concentrações de 0,05% e 0,10% (v/v), e os conídios não tratados, foram incubados por 6 horas em um agitador orbital (150 rpm, 28 °C).

A atividade da esterase e a integridade da membrana foram avaliadas por citometria de fluxo em um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson Biosciences, EUA) equipado com um laser de íon argônio emitindo a 480 nm. A integridade da membrana celular e a atividade da esterase foram determinadas utilizando o kit de vitalidade FungaLight Yeast™ CFDA, AM/iodeto de propídio (*Invitrogen*), que inclui diacetato de 5-carboxifluoresceína (5-CFDA) para determinar a atividade da esterase.

Dados de citometria de fluxo de 10.000 células foram adquiridos utilizando o *software* CellQuest Pro v.5.2 (BD Bioscience, EUA), e a análise dos dados foi realizada utilizando o FlowJo v.10 (*TreeStar, Inc.*, EUA).

3.2.12.3 Ensaio antifúngicos *in vivo*

3.2.12.3.1 Controle *in vivo* de *B. cinerea* em uvas pós-colheita por OECL e citral nanoencapsulados

A atividade antifúngica das suspensões de OECL-NC-5 e Citral-NC-5 foi avaliada em uvas *Thompson Seedless* (*Vitis vinifera* L.) adquiridas em um supermercado local da safra de 2025. Uvas maduras, de tamanho uniforme e sem sinais de dano ou infecção, foram cuidadosamente selecionadas, higienizadas com soluções de etanol 70% (v/v) e hipoclorito de sódio 0,5% (v/v), e posteriormente lavadas com água esterilizada. Para avaliar um tratamento preventivo contra *B. cinerea*, foram utilizadas suspensões de OECL, OECL-NC-5, Citral e Citral-NC-5 nas concentrações determinadas no ensaio *in vitro* (0,05% (v/v) e 0,10% (v/v)), além de um controle negativo constituído por uma solução aquosa de Tween 80 (0,5% m/v).

Foram utilizadas quatorze uvas para cada tratamento. Uma lesão de aproximadamente 1 mm de profundidade foi feita com uma agulha, e então aplicaram-se 10 μL do tratamento em cada ferimento, seguidos da adição de 10 μL de uma suspensão de conídios do fungo (1×10^5 conídios mL^{-1}), exceto no controle negativo. Um grupo de 14 uvas feridas, porém sem tratamento, foi utilizado como controle positivo. Os frutos foram acondicionados em caixas plásticas esterilizadas e mantidos a 24 ± 1 °C e umidade relativa de 95% por 168 h. O diâmetro das lesões foi medido em duas direções perpendiculares utilizando um paquímetro digital de aço inoxidável, após 96 h, 128 h e 168 h.

3.2.12.3.2 Controle *in vivo* de *C. gloeosporioides* em maçãs pós-colheita utilizando OVEO nanoencapsulado

Para a avaliação da atividade antifúngica das suspensões de OEOV–NC foram utilizadas 14 maçãs (*Malus domestica* 'Gala') para cada tratamento, adquiridas em mercado local da safra 2025 e higienizadas da mesma forma que fora feito com as uvas. Nesse caso o tratamento preventivo contra *C. gloeosporioides* foi feito utilizando suspensões de OEOV e OEOV–NC nas concentrações de 0,025 e 0,05% (v/v), com base no ensaio *in vitro*, além de um controle negativo composto por uma solução aquosa de Tween 80 (0,5% m/v). Foram utilizadas quatorze maçãs para cada tratamento. Com o auxílio de um bisturi esterilizado, realizaram-se cortes de aproximadamente 10 mm de comprimento e 1 mm de profundidade. Em seguida, aplicaram-se 5 mL da solução de tratamento em cada maçã utilizando um frasco pulverizador, seguidos da adição de 10 μL de uma suspensão de conídios do fungo (1×10^5 conídios mL^{-1}), exceto no controle negativo. Um grupo de 14 maçãs feridas, porém sem tratamento, foi utilizado como controle positivo. Os frutos foram acondicionados em caixas plásticas esterilizadas e mantidos a 24 ± 1 °C e umidade relativa de 95%, durante 21 dias. O diâmetro das lesões foi medido em duas direções perpendiculares utilizando um paquímetro digital de aço inoxidável, aos 7, 14 e 21 dias.

3.2.13 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R (R Core Team, Vienna, Austria).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos para a síntese e caracterização das nanocápsulas de poli(ácido lático) e Eudragit® S100 contendo óleo essencial e seus respectivos compostos majoritários. E por fim, seus desempenhos no controle, *in vitro* e *in vivo*, de fungos fitopatogênicos

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Para assegurar a qualidade e a composição química dos óleos essenciais a serem utilizados nesse trabalho, as amostras foram caracterizadas pela técnica de cromatografia a gás com detector por espectrometria de massas (GC-MS) e por cromatografia a gás com detector de ionização de chama (GC-FID). A identificação adequada dos picos observados nos cromatogramas, em associação à análise comparativa dos espectros de massas, foi realizada pela análise do índice de retenção linear (LRI), e comparado aos valores reportados na literatura (BABUSHOK; LINSTROM; ZENKEVICH, 2011; NIST, 2018).

A utilização do índice de retenção linear (LRI) é fundamental, pois constitui uma ferramenta eficaz para a identificação de compostos, mesmo diante de variações nos métodos analíticos empregados, como diferenças nas fases estacionárias, no fluxo do gás de arraste e nas rampas de temperatura. O princípio do LRI baseia-se na correlação entre o tempo de retenção dos compostos analisados e o de uma série de alcanos lineares (padrões de referência), utilizando equações específicas conforme o tipo de aquecimento aplicado durante a cromatografia gasosa (DOOL; KRATZ, 1963; ZELLNER et al., 2008; NIST, 2018).

No óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), foram quantificados quinze compostos, totalizando 94,03% da composição (Tabela 2). Dentre eles, destacam-se o neral e o geranial, que correspondem a 31,53% e 43,40%, respectivamente. Juntos, esses dois isômeros formam o citral, que representa 74,93% da composição total do óleo, caracterizando-o como o composto majoritário. O terceiro composto mais abundante é o micerno, com 13,29%.

Os valores encontrados estão de acordo com o que é relatado na literatura para a identificação e quantificação do óleo essencial de capim-limão. Cortes-Torres e colaboradores (2023), em seu trabalho, identificaram os compostos majoritários de *Cymbopogon citratus* resultando em 8,76% de mirceno, 27,58% de neral e 38,62% geranial.

Tabela 2. Compostos identificados no óleo essencial de capim-limão por cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massas e posterior cálculo do índice de retenção linear.

Ordem de eluição	LRI Calculado ¹	LRI Literatura	Composto identificado	Percentual relativo % ²
1	993	988	β -mirceno	13,29
2	1031	1026	1,8-cineol	0,24
3	1038	1036	Fenilacetaldéido	0,12
4	1087	1086	α -terpinoleno	0,23
5	1099	1095	linalol	0,89
6	1128	1122	mircenol	0,24
7	1138	1137	cis-verbenol	0,19
8	1145	1145	isopulegol	0,38
9	1159	1155	isoborneol	0,82
10	1228	1227	nerol	1,32
11	1238	1235	neral	31,53
12	1266	1264	geranial	43,40
13	1381	1380	cumarina	0,27
14	1492	1492	δ -selineno	0,42
15	1559	1555	elemicina	0,69
Total identificado				94,03

¹Calculado com base no espectro de GC-MS. ²Calculado com base no espectro de GC-FID.

No óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*), foram quantificados 11 compostos, totalizando 92,31% da composição (Tabela 3). O composto predominante foi o citronelal (48,22%), seguido por carvenona (19,51%) e citronelol (11,23%). Esses mesmos compostos foram relatados por Rodrigues e colaboradores (2013), que analisaram o óleo essencial de citronela proveniente do Maranhão – Brasil, encontrando concentrações de 26,5% de citronelal, 16,2% de geraniol e 7,3% de citronelol.

Tabela 3. Compostos identificados no óleo essencial de citronela através de cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas e posterior cálculo do índice de retenção linear.

Ordem de eluição	LRI Calculado ¹	LRI Literatura	Composto identificado	Percentual relativo % ²
1	1024	1022	<i>o</i> -cimeno	2,64
2	1151	1148	citronelal	48,22
3	1232	1223	citronelol	11,23
4	1253	1249	geraniol	19,51
5	1383	1380	coumarina	1,1
6	1464	1454	trans- β -farneseno	1,25
7	1486	1484	germacreno-d	0,73
8	1537	1537	α -cadineno	2,27
9	1538	1537	α -cadineno	1,81
10	1641	1602	ledol	0,96
11	1651	1649	β -eudesmol	2,59
Total identificado				92,31

¹Calculado com base no espectro de GC-MS. ²Calculado com base no espectro de GC-FID.

Para o óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), seis compostos foram quantificados, somando 95,31% do total. O composto majoritário foi o 1,8-cineol (65,49%), seguido por α -tujeno (21,40%) (Tabela 4). Os dados obtidos estão de acordo com o relatado na literatura, Silvestre e colaboradores (1997), ao analisarem amostras de óleo essenciais de *Eucalyptus globulus* obtidas de diferentes árvores em variados estágios de desenvolvimento proveniente de Portugal relataram que os compostos majoritários quantificados foram a-pineno (2-27%), 1,8-cineol (47-76%) e a-terpineol (1-10%).

Tabela 4. Compostos identificados no óleo essencial de eucalipto através de cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas e posterior cálculo do índice de retenção linear.

Ordem de eluição	LRI Calculado ¹	LRI Literatura	Composto identificado	Percentual relativo % ²
1	938	932	α -pineno	21,4
2	1046	1026	1,8-cineol	65,59
3	1062	1054	γ -terpineno	3,58
4	1202	1186	α -terpineol	2,91
5	1432	1417	cariofileno	1,04
6	1581	1564	aldeído <i>p</i> -metoxicinâmico	0,79
Total identificado				95,31

¹Calculado com base no espectro de GC-MS. ²Calculado com base no espectro de GC-FID.

No óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), foram identificados e quantificados nove compostos, totalizando 95,90%. O composto majoritário, representando 50,97% do total, foi o mentol, seguido pela mentona (24,88%) e o borneol (10,44%) (Tabela 5). Os dados presentes na literatura corroboram com os compostos encontrados, Kehili e

colaboradores (2020) ao analisarem o óleo essencial de hortelã-pimenta provenientes de Tipaza – Argélia, relataram os compostos majoritários sendo mentol (53%), mentona (16%), acetato de mentila (7%) e 1,8-cineol (5%).

Tabela 5. Compostos identificados no óleo essencial de hortelã-pimenta através de cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas e posterior cálculo do índice de retenção linear.

Ordem de eluição	LRI Calculado ¹	LRI Literatura	Composto identificado	Percentual relativo % ²
1	978	969	sabineno	0,53
2	1036	1026	1,8-cineol	2,51
3	1168	1148	mentona	24,88
4	1178	1165	borneol	10,44
5	1203	1167	mentol	50,97
6	1208	1195	metil chavicol	0,70
7	1249	1239	<i>o</i> -anisaldeído	0,70
8	1304	1294	Acetato de mentila	4,33
9	1413	1403	metileugenol	0,84
Total identificado				95,90

¹Calculado com base no espectro de GC-MS. ²Calculado com base no espectro de GC-FID.

O óleo essencial de ho-sho (*Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* Y.Fujita), que teve 96,94% quantificado, somou 10 diferentes compostos. O composto linalol, majoritário do óleo, representou 90,10%, seguido pela cânfora (3,7%) (Tabela 6). A quantificação do óleo de ho-sho também foi relatada por Vicenço e colaboradores (2021), que conforme os autores, o composto majoritário linalol também estava presente em uma concentração superior a 90%.

Tabela 6. Compostos identificados no óleo essencial de ho-sho através de cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas e posterior cálculo do índice de retenção linear.

Ordem de eluição	LRI Calculado ¹	LRI Literatura	Composto identificado	Percentual relativo % ²
1	948	932	α -pineno	0,22
2	978	984	3-p-menteno	0,16
3	995	1022	<i>o</i> -cimeno	0,32
4	1132	1095	linalol	90,1
5	1157	1141	cânfora	3,70
6	1413	1389	β -elemeno	1,23
7	1446	1434	γ -elemeno	0,41
8	1474	1454	trans- β -farneseno	0,45
9	1578	1559	germacreno-b	0,35
Total identificado				96,94

¹Calculado com base no espectro de GC-MS. ²Calculado com base no espectro de GC-FID.

No óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) foi possível identificar e quantificar 98,35%, compreendendo oito diferentes compostos. O principal componente foi o carvacrol

(70,19%), seguido pelo *o*-cimeno (13,34%) (Tabela 7). Esses resultados estão alinhados aos obtidos por Shiwakoti e colaboradores (2016), que avaliaram a composição do óleo essencial de orégano em diferentes estações do ano e identificaram como compostos majoritários o carvacrol (38–61%), *p*-cimeno (8–20%) e γ -terpineno (11–15%).

Tabela 7. Compostos identificados no óleo essencial de orégano através de cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas e posterior cálculo do índice de retenção linear.

Ordem de eluição	LRI Calculado ¹	LRI Literatura	Composto identificado	Percentual relativo % ²
1	932	932	α -pineno	1,1
2	946	946	canfeno	0,34
3	988	988	mirceno	1,85
4	1014	1014	α -terpineno	0,92
5	1026	1026	<i>o</i> -cimeno	13,34
6	1054	1054	γ -terpineno	4,94
7	1108	1089	<i>p</i> -cimeno	1,47
8	1305	1298	carvacrol	70,19
9	1417	1417	β -cariofileno	4,2
Total identificado				98,35

¹Calculado com base no espectro de GC–MS. ²Calculado com base no espectro de GC–FID.

E por fim, no óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*), foram possíveis identificar e quantificar 15 compostos, totalizando 98,35%. O composto presente em maior concentração foi o *p*-cimeno (37,01%), seguido pelo timol (28,47%) e γ -terpineno (10,84%) (Tabela 8). Esses compostos são descritos na literatura para o óleo essencial. Satyal e colaboradores (2016) ao analisarem o óleo essencial proveniente de plantas localizadas na França e Sérvia relataram que a concentração dos compostos majoritários, em ambas as localizações, variou entre 33 e 40% para o timol, 17 e 26% para o *p*-cimeno e 13 e 30% para o γ -terpineno.

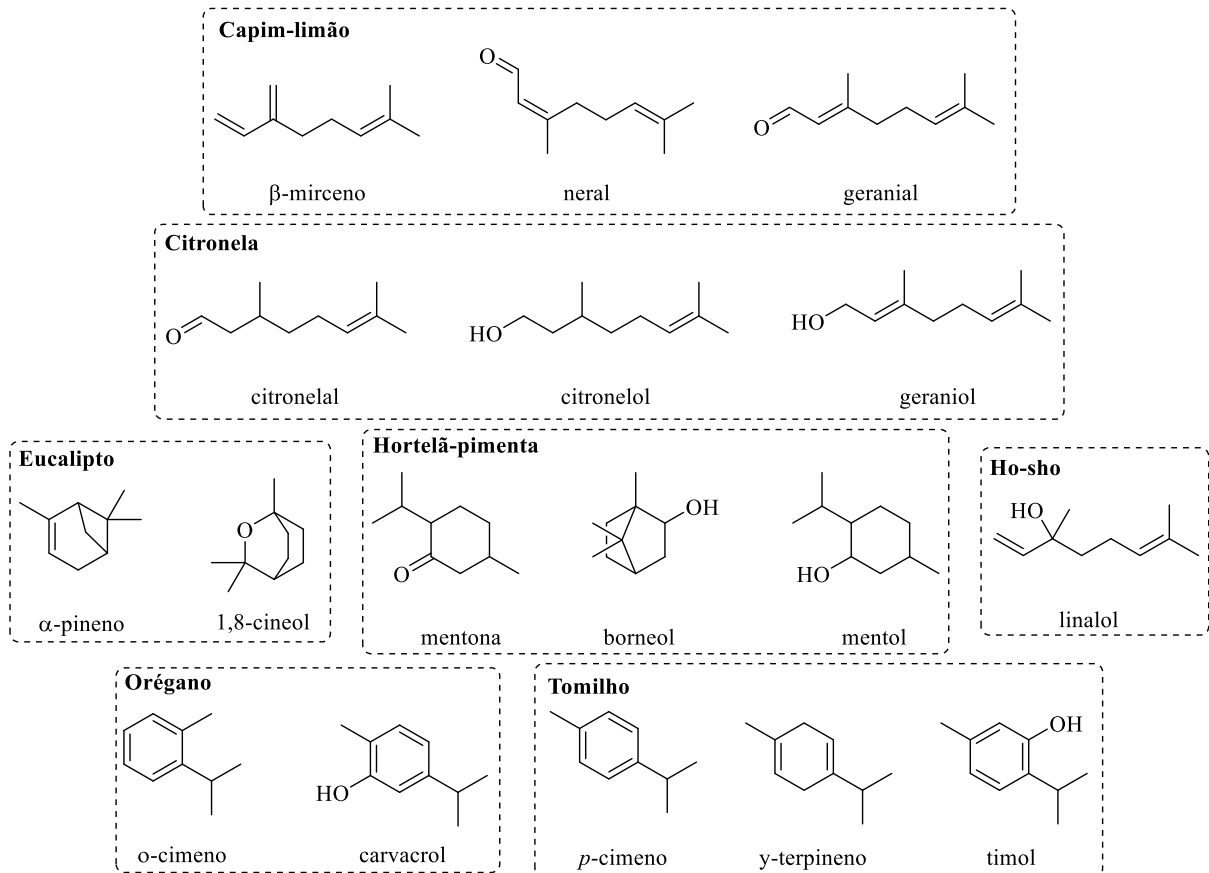
Tabela 8. Compostos identificados no óleo essencial de tomilho através de cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas e posterior cálculo do índice de retenção linear.

Ordem de eluição	LRI Calculado ¹	LRI Literatura	Composto identificado	Percentual relativo % ²
1	927	924	α -tujeno	1,4
2	933	932	α -pineno	1,21
3	948	969	sabineno	0,57
4	996	988	mirreno	3,39
5	1019	1014	α -terpineno	1,28
6	1035	1020	<i>p</i> -cimeno	37,01
7	1064	1054	γ -terpineno	10,84
8	1075	1083	fenchona	1,09
9	1111	1101	α -tujona	2,86
10	1171	1155	isoborneol	0,95
11	1183	1167	umbellulone	0,56
12	1286	1270	(<i>E</i>)-cinamaldeído	1,11
13	1322	1289	timol	28,47
14	1325	1403	metileugenol	1,76
15	1415	1496	valenceno	2,05
Total identificado				98,35

¹Calculado com base no espectro de GC-MS. ²Calculado com base no espectro de GC-FID.

Após a apresentação da composição química dos óleos essenciais, a **Figura 14** apresenta as estruturas químicas dos compostos majoritários, definidos como aqueles com participação superior a 10% da composição relativa em cada óleo essencial, conforme determinado pelas análises de GC-MS e GC-FID. A representação estrutural desses constituintes permite uma melhor visualização das principais classes de metabólitos presentes, predominantemente monoterpenos e seus derivados oxigenados, que caracterizam quimicamente os óleos avaliados.

Figura 14. Estruturas químicas dos constituintes majoritários identificados nos óleos essenciais de capim-limão, citronela, eucalipto, hortelã-pimenta, ho-sho, orégano e tomilho, determinadas por análises de GC-MS e GC-FID.



Fonte: o autor (2026).

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os óleos essenciais exercem efeito inibitório variável sobre a germinação de conídios de diferentes fitopatógenos, dependendo tanto da espécie fúngica quanto da concentração utilizada. Dentre os óleos testados, destacam-se o capim-limão e o orégano, que apresentaram os melhores resultados antifúngicos em praticamente todos os patógenos avaliados.

Para o fungo *B. cinerea*, observou-se que os óleos de capim-limão, citronela, ho-sho, hortelã-pimenta, orégano e tomilho foram eficazes na inibição total da germinação dos conídios em concentrações $\geq 0,1\%$, mesmo após 48 horas. Em contraste, o óleo de eucalipto mostrou-se pouco eficaz, permitindo germinação completa mesmo nas concentrações mais elevadas (0,4%), sugerindo menor atividade antifúngica frente a este patógeno (Tabela 9).

Tabela 9. Atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais contra o fungo *B. cinerea* em 24 e 48 horas.

Concentração %(v/v)	Capim-limão		Citronela		Eucalipto		Ho-sho		Hortelã- pimenta		Orégano		Tomilho	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
0,4	III	III	III	III	I	I	III	III	III	III	III	III	III	III
0,2	III	III	III	III	I	I	III	II	III	II	III	III	III	III
0,1	III	III	III	III	I	I	III	I	III	I	III	III	III	III
0,05	III	III	III	I	I	I	II	I	II	I	III	III	III	III
0,025	II	I	II	I	I	I	I	I	I	I	III	III	III	II
0,0125	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	III	II	I	I
0,00625	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
Controle	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I

Escala de germinação: (I) conídios com crescimento de hifas, (II) conídios com emergência do tubo germinativo e (III) conídios sem emergência de hifas observável.

No caso do *C. fructicola*, uma sensibilidade semelhante foi observada para capim-limão e orégano, que impediram a germinação em concentrações $\geq 0,05$ e 0,0125% (v/v), respectivamente. Já o OE de eucalipto demonstrou novamente baixa eficácia, ocorrendo a germinação dos conídios mesmo em altas concentrações. Óleos como ho-sho e hortelã-pimenta apresentaram ação inibitória parcial, sendo mais efetivos em concentrações mais altas (Tabela 10).

Tabela 10. Atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais contra o fungo *C. fructicola* em 24 e 48 horas.

Concentração %(v/v)	Capim- limão		Citronela		Eucalipto		Ho-sho		Hortelã- pimenta.		Orégano		Tomilho	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
0,4	III	III	III	III	I	I	III	III	III	III	III	III	III	III
0,2	III	III	III	III	I	I	III	I	III	III	III	III	III	III
0,1	III	III	III	I	I	I	I	I	III	II	III	III	III	I
0,05	III	I	I	I	I	I	I	I	I	I	III	III	III	I
0,025	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	III	III	I	I
0,0125	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	III	I	I	I
0,00625	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I	I
Controle	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I

Escala de germinação: (I) conídios com crescimento de hifas, (II) conídios com emergência do tubo germinativo e (III) conídios sem emergência de hifas observável.

Em relação ao *C. gloeosporioides*, o comportamento observado na atividade dos OE para os demais fungos mantido. O óleo de orégano inibiu completamente a germinação até 0,025%, o óleo de capim-limão, o segundo mais efetivo, controlou a germinação até 0,05%. O óleo de eucalipto, não foi eficaz em nenhuma das concentrações investigadas, sugerindo novamente uma menor ação antifúngica. Citronela, tomilho e hortelã-pimenta apresentaram efeito limitado,

sendo necessário concentrações superiores a 0,2% para apresentarem inibição efetiva (Tabela 11).

Tabela 11. Atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais contra o fungo *C. gloesporioides* em 24 e 48 horas.

Concentração %(v/v)	Capim- limão		Citronela		Eucalipto		Ho-sho		Hortelã- pimenta.		Orégano		Tomilho	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
0,4	III	III	III	III	III	I	III	III	III	III	III	III	III	III
0,2	III	III	III	III	I	I	III	III	III	III	III	III	III	III
0,1	III	III	III	III	I	I	I	I	I	I	III	III	III	III
0,05	III	III	III	III	I	I	I	I	I	I	III	III	III	I
0,025	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	III	II	I	I
0,0125	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
0,00625	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
Controle	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I

Escala de germinação: (I) conídios com crescimento de hifas, (II) conídios com emergência do tubo germinativo e (III) conídios sem emergência de hifas observável.

Para o *P. digitatum*, o comportamento dos óleos também seguiu o padrão observado, com os óleos de capim-limão, citronela, orégano e tomilho promovendo o controle mais efetivo. Destaca-se o óleo de orégano, controlando totalmente o crescimento fúngico em concentrações $\geq 0,05\%$. O óleo de hortelã-pimenta apresentou efeito intermediário, enquanto eucalipto e citronela foram os menos eficazes frente a esse patógeno, não sendo efetivos em nenhuma das concentrações testadas (Tabela 12).

Tabela 12. Atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais contra o fungo *P. digitatum* em 24 e 48 horas.

Concentração %(v/v)	Capim- limão		Citronela		Eucalipto		Ho-sho		Hortelã- pimenta.		Orégano		Tomilho	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
0,4	III	III	III	III	I	I	II	I	III	III	III	III	III	III
0,2	III	III	III	III	I	I	II	I	III	II	III	III	III	III
0,1	III	I	II	II	I	I	I	I	I	I	III	III	III	III
0,05	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	III	III	II	I
0,025	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	III	II	I	I
0,0125	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
0,00625	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
Controle	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I

Escala de germinação: (I) conídios com crescimento de hifas, (II) conídios com emergência do tubo germinativo e (III) conídios sem emergência de hifas observável.

Sendo assim, observando os resultados obtidos, os óleos essenciais mais eficientes para o controle dos fungos testados foram os óleos de orégano, capim-limão e tomilho.

Em relação ao óleo de orégano, os resultados demonstraram uma alta capacidade para o

controle de todos os conídios fúngicos em concentrações $\geq 0,05\%$. A eficácia do óleo essencial de orégano se dá principalmente devido ao carvacrol, composto com alta ação antifúngica, causando danos às organelas intracelulares e induzindo a geração de espécies reativas de oxigênio, resultando em lesão oxidativa da membrana celular (Pei et al., 2020b).

O óleo essencial de capim-limão inibiu totalmente a germinação de conídios de todas as espécies testadas até concentrações de 0,1%. Este resultado é coerente com estudos anteriores que destacam o citral, principal componente do óleo de capim-limão, como responsável por sua ação antifúngica. Segundo Scariot e colaboradores (2020), o citral atua desestabilizando a membrana celular dos fungos, levando à perda de integridade e morte celular.

O óleo de tomilho também apresentou resultados altamente eficientes, possivelmente esse resultado se dá pela alta concentração do composto timol presente no óleo essencial, Gao e colaboradores (2016) indicam que o timol possui alta eficiência fungicida para fungos como o *Fusarium graminearum*, devido aos danos à membrana celular originados pela peroxidação lipídica e pela perturbação da biossíntese de ergosterol.

No que diz questão ao óleo de citronela foi observado efeito inibitório, especialmente sobre *B. cinerea* e *C. gloeosporioides*. Estudos como o de Fontana e colaboradores (2021) também demonstraram a eficácia da citronela no controle de *B. cinerea* em frutas pós-colheita, atribuindo a atividade antifúngica à presença de citronelal e geraniol.

Por outro lado, o óleo de eucalipto foi pouco eficaz, permitindo germinação dos conídios mesmo em altas concentrações (0,4%). Essa menor atividade também foi observada por España e colaboradores (2017), que relataram baixa eficácia antifúngica do óleo essencial de eucalipto em *C. gloeosporioides*. A menor polaridade e a estrutura química menos reativa do eucaliptol podem explicar esse resultado.

O óleo de ho-sho e o de hortelã-pimenta apresentaram efeitos intermediários, com ação inibitória significativa em concentrações acima de 0,1%, mas reduzida em níveis mais baixos. Raut e Karuppayil (2014) destacaram o potencial de óleos mentolados e ricos em álcoois terpênicos como antimicrobianos moderados.

As diferenças observadas na eficácia antifúngica dos óleos essenciais avaliados podem ser diretamente associadas à sua composição química, em especial à natureza e à abundância de monoterpenos oxigenados. O óleo essencial de *O. vulgare*, que apresentou atividade antifúngica mais intensa e de maior espectro, é rico em carvacrol (70,19%), um monoterpeno fenólico amplamente reconhecido por sua elevada ação antifúngica. O carvacrol atua na desestabilização das membranas celulares fúngicas, promovendo alterações na permeabilidade

da membrana, colapso da força próton-motriz e indução de estresse oxidativo, culminando na morte celular (Pei et al., 2020a).

De forma semelhante, o óleo essencial de capim-limão apresentou elevada atividade inibitória frente a todos os patógenos testados, o que pode ser atribuído ao seu alto teor de citral (neral e geranial, >74%). O citral é conhecido por interagir com os lipídios de membrana e proteínas intracelulares, comprometendo a germinação de esporos e o crescimento micelial (Gutiérrez-Pacheco et al., 2023).

Em contraste, o óleo essencial de eucalipto, predominantemente composto por 1,8-cineol (65,59%), apresentou eficácia antifúngica limitada. A estrutura de éter cíclico desse composto apresenta menor reatividade frente às membranas fúngicas quando comparada a compostos fenólicos ou aldeídicos, o que pode explicar sua reduzida capacidade de inibição da germinação conidial (Bakkali et al., 2008b).

Entre os óleos essenciais avaliados, o óleo essencial de orégano destacou-se pela maior eficácia antifúngica, promovendo a inibição completa da germinação de conídios de todos os fungos fitopatogênicos testados em concentrações $\geq 0,05\%$ (v/v). Essa atividade fungicida pronunciada e de amplo espectro, observada em concentrações relativamente baixas, fundamentou a seleção do óleo essencial de orégano (OEOV) como ativo para o processo de nanoencapsulação utilizando o polímero Eudragit[®] S100.

4.3 TESTE DE INTUMESCIMENTO

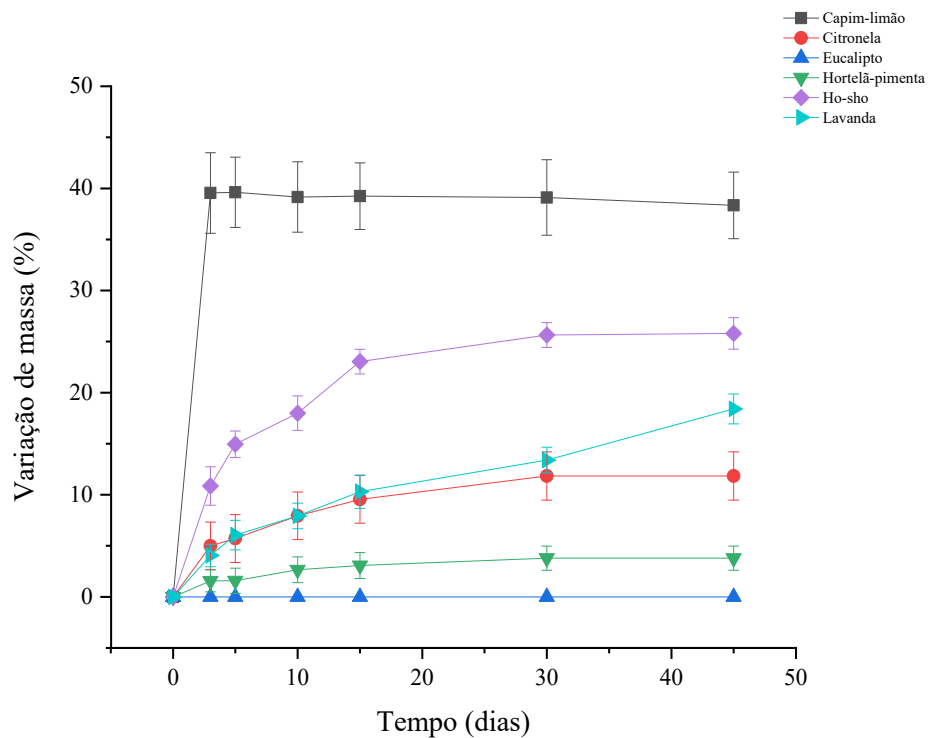
Para o desenvolvimento de sistemas nanoencapsulados, é fundamental assegurar a compatibilidade entre o material de parede (agente encapsulante) e os constituintes do núcleo, uma vez que essa interação influencia diretamente a formação e a estabilidade das nanocápsulas. Nesse contexto, o teste de intumescimento constitui uma etapa preliminar essencial, pois permite avaliar a solubilização ou a resistência à solubilização de polímeros quando em contato direto com óleos essenciais. A solubilização do polímero indica incompatibilidade entre os componentes, sugerindo a formação de nanoemulsões, enquanto a ausência de solubilização, associada à manutenção da integridade estrutural, indica maior adequação do polímero para atuar como material de parede em sistemas nanoencapsulados estáveis (Fessi et al., 1989).

Dessa forma, foi realizado inicialmente o teste de intumescimento para avaliar a compatibilidade dos polímeros poli(ácido láctico) (PLA), Eudragit[®] RS100 e Eudragit[®] S100

frente aos óleos essenciais de capim-limão, citronela, eucalipto, hortelã-pimenta, ho-sho, lavanda, orégano e tomilho.

Para o PLA, os resultados indicaram que sete dos nove óleos essenciais investigados apresentaram potencial para a nanoencapsulação, dentre eles, o óleo essencial de capim-limão, apresentou o maior grau de intumescimento (40%), e o óleo essencial de eucalipto, não promoveu intumescimento (0%) (Figura 15). Em contraste, os óleos essenciais de orégano e tomilho promoveram a solubilização do polímero, comportamento associado à elevada concentração de fenóis terpênicos, principalmente carvacrol e timol.

Figura 15. Variação de massa durante o experimento de entumescimento do PLA na presença dos óleos essenciais.



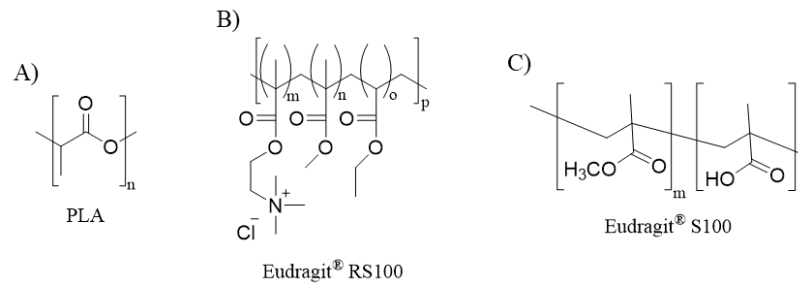
Fonte: o autor (2026).

O comportamento observado para o PLA pode ser explicado por suas características estruturais (Figura 16A). Trata-se de um polímero biodegradável, de caráter predominantemente hidrofóbico, estrutura semicristalina e cadeias relativamente rígidas, fatores que influenciam sua interação com compostos de baixa massa molar, como os constituintes dos óleos essenciais (Auras et al., 2004; Drumright et al., 2000).

O maior grau de intumescimento promovido pelo óleo essencial de capim-limão pode ser atribuído à elevada concentração de citral, um monoterpene oxigenado de caráter apolar,

favorecendo a penetração parcial na matriz polimérica. Por outro lado, a solubilização do PLA pelos óleos essenciais de orégano e tomilho está relacionada à alta concentração de carvacrol e timol, compostos com maior polarizabilidade e capacidade de estabelecer interações intermoleculares mais intensas (Fortunati et al., 2012; Souza et al., 2013).

Figura 16. Estrutura química dos polímeros A) PLA, B) Eudragit® RS100 e Eudragit® S100, utilizados nos ensaios de intumescimento.



Fonte: o autor (2026).

Em relação ao Eudragit® RS100 (Figura 16B), observou-se solubilização completa em contato com todos os óleos essenciais avaliados, evidenciando sua incompatibilidade como material de parede para a formação de nanocápsulas. Esse comportamento está associado à sua estrutura química, composta predominantemente por ésteres acrílicos e metacrílicos, além da presença de grupos amônio quaternário, que conferem ao polímero caráter amorfo, elevada flexibilidade de cadeia e ampla afinidade química com compostos apolares e moderadamente polares (Bodmeier e Chen, 1989; Siepmann e Siepmann, 2012). Os óleos essenciais utilizados neste estudo são ricos em monoterpênicos oxigenados e fenóis terpênicos, como citral, linalol, timol e carvacrol (Sánchez-González et al., 2011; Souza et al., 2013), o que favorece a penetração desses constituintes na matriz do Eudragit® RS100, reduzindo as interações intermoleculares entre as cadeias poliméricas e resultando na perda de integridade estrutural e consequente solubilização do polímero.

Diferente do observado para o Eudragit® RS100, o Eudragit® S100 (Figura 16C) não apresentou intumescimento ou solubilização quando exposto aos óleos essenciais testados, indicando maior resistência à interação com esses compostos. Esse comportamento pode ser atribuído à maior rigidez de sua cadeia polimérica e à presença de grupos carboxílicos aniônicos, que reduzem a afinidade com compostos hidrofóbicos neutros e limitam a difusão dos constituintes dos óleos essenciais no interior da matriz polimérica (Rowe et al., 2009). Assim, o Eudragit® S100 mostrou-se adequado para a formulação de nanocápsulas contendo os óleos essenciais avaliados, especialmente os óleos essenciais de orégano e tomilho, que promoveram solubilização nos demais polímeros testados.

Com base nesses resultados, para a continuidade do estudo foi selecionado o PLA para a formulação de nanocápsulas contendo óleo essencial de capim-limão, e o Eudragit® S100 para a formulação de nanocápsulas contendo óleo essencial de orégano, considerando a compatibilidade observada entre os polímeros e os respectivos compostos bioativos.

4.4 SÍNTESE DOS SISTEMAS NANOENCAPSULADOS

4.4.1 Nanocápsulas utilizando poli(ácido láctico)

Com o objetivo de formular sistemas nanoencapsulados com maior capacidade de carga, ou seja, com o aumento da quantidade de substância ativa em relação ao material de parede, ao mesmo tempo mantendo elevada uniformidade, estabilidade e eficiência de encapsulação foram realizados experimentos com diferentes concentrações do óleo essencial de capim-limão e seu composto majoritário citral. Com base no procedimento descrito previamente pelo grupo (Antoniolli et al. 2020) para a formulação de nanocápsulas de PLA contendo OE de capim-limão foram estabelecidos os seguintes parâmetros: massa do polímero (100 mg), solventes acetona (30 mL) e água (50 mL), surfactantes Tween 80 (0,077 g) e Span 60 (0,077 g). E para avaliar o aumento da capacidade de carga das nanocapsulas cinco volumes do composto bioativo foram avaliados: 100, 200, 300, 400 e 500 µL.

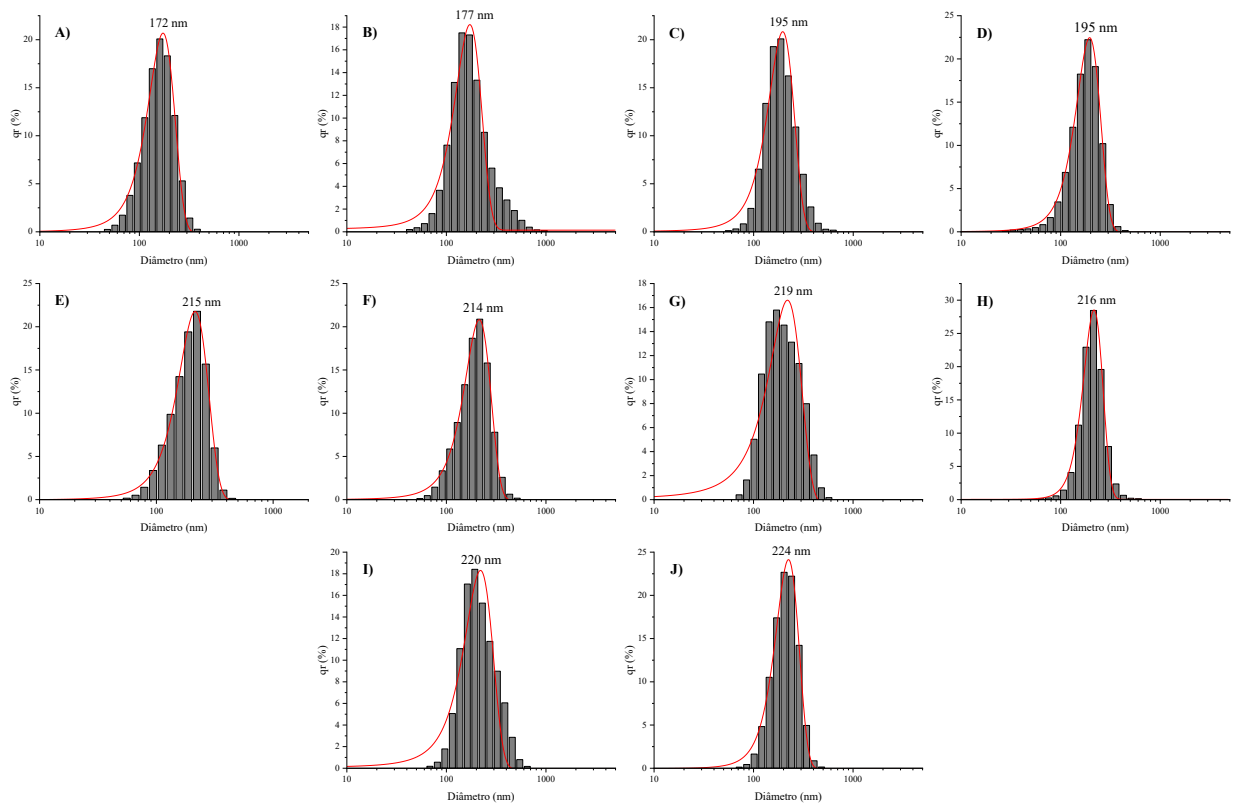
Ao aumentar a capacidade de carga, diferentes concentrações dos compostos ativos podem ser utilizados em experimentos *in vitro* e *in vivo* subsequentes, sem a necessidade de uma etapa adicional de evaporação de água. Além disso, no contexto de um processo de escalonamento, a etapa de evaporação de água, necessária para atingir uma concentração desejada, tem potencial para causar degradação das nanocápsulas (Ephrem et al., 2014).

As análises de DLS (*Dynamic Light Scattering*) e PZ (*Zeta Potential*) foram empregadas como ensaios iniciais para estabelecer a formação ou não das nanocápsulas, determinar o tamanho médio e avaliar a estabilidade das formulações. A técnica de DLS baseia-se na dispersão da luz laser pelas partículas em suspensão, medindo as flutuações na intensidade da luz espalhada para calcular o tamanho das nanopartículas. O potencial zeta (PZ), por sua vez, é uma medida da carga superficial efetiva de nanopartículas em dispersão que é baseada na movimentação das partículas sob um campo elétrico aplicado (Öztürk et al., 2024).

A Figura 17 apresenta a distribuição de diâmetro para cada formulação obtidos por espalhamento dinâmico de luz das nanocápsulas de OECL e de citral. Os perfis de distribuição

de tamanho de partículas revelaram distribuições unimodais para todas as formulações, indicando a formação de populações de nanopartículas homogêneas. Embora pequenas variações no tamanho médio das partículas tenham sido observadas entre as formulações, sendo o aumento relacionado com a carga de composto ativo empregado, não foi detectada a presença de populações secundárias, o que indica ausência de agregação.

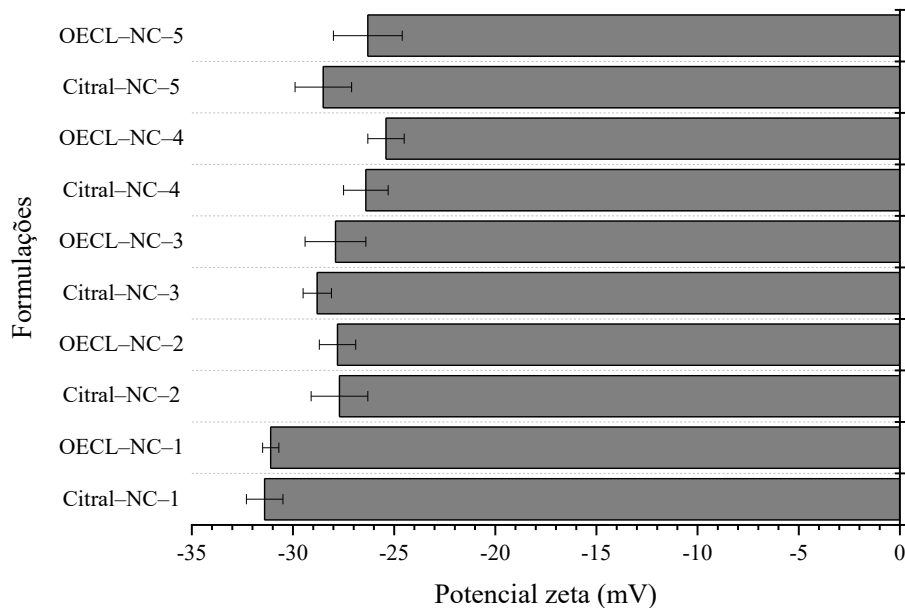
Figura 17. Distribuição por intensidade do diâmetro das nanocápsulas obtidas por espalhamento de luz dinâmico e cálculo do diâmetro médio obtido por uma aproximação gaussiana para as formulações: A) Citral-NC-1, B) OECL-NC-1, C) Citral-NC-2, D) OECL-NC-2, E) Citral-NC-3, F) OECL-NC-3, G) Citral-NC-4, H) OECL-NC-4, I) Citral-NC-5, J) OECL-NC-5.



Fonte: o autor (2026).

Os valores obtidos para o potencial zeta estão apresentados na Figura 18. Esse parâmetro é amplamente utilizado na avaliação da carga superficial de nanopartículas. O sinal positivo ou negativo do potencial zeta são determinados pela direção para a qual as partículas se deslocam durante a eletroforese, em relação aos eletrodos. No entanto, é a magnitude do potencial zeta que possui maior relevância para a análise (Mora-Huertas et al., 2010).

Figura 18. Valores de Potencial Zeta para as diferentes formulações de nanocápsulas contendo óleo essencial de capim-limão e citral.



Fonte: o autor (2026).

Como mostrado na Tabela 2, o aumento da quantidade de composto ativo na formulação não afetou a eficiência de encapsulação. Os resultados variaram de $79,39 \pm 0,79\%$ a $91,63 \pm 2,93\%$ para o citral e de $89,99 \pm 1,84\%$ a $94,11 \pm 0,78\%$ para o OECL. Como esperado, com o aumento da quantidade do núcleo bioativo, observou-se um incremento na capacidade de carga das nanocápsulas formadas. Em termos de eficiência de nanoencapsulação, este é um avanço importante, considerando que uma maior quantidade de composto ativo estará disponível, reduzindo assim a necessidade de material de parede e surfactantes adicionais.

O aumento da capacidade de carga foi acompanhado por um leve aumento no diâmetro hidrodinâmico médio (MD). Para as formulações que empregaram $500 \mu\text{L}$ dos compostos bioativos, o MD resultante foi de $220 \pm 15 \text{ nm}$ e $224 \pm 15 \text{ nm}$ para citral e OECL, respectivamente. Em relação ao potencial zeta, que é um indicador facilmente mensurável da estabilidade de dispersões coloidais, todas as medições apresentaram valores inferiores a -25 mV . Esse resultado indica alta estabilidade eletrostática, devido à maior repulsão entre as nanopartículas, contribuindo para uma vida útil estável (Öztürk et al., 2024).

Tabela 13. Formulação de nanocapsulas de PLA contendo citral e OECL como compostos ativos com suas respectivas respostas: eficiência de encapsulação (EE), capacidade de carga (CG), diâmetro hidrodinâmico médio (DM) e potencial zeta (PZ).

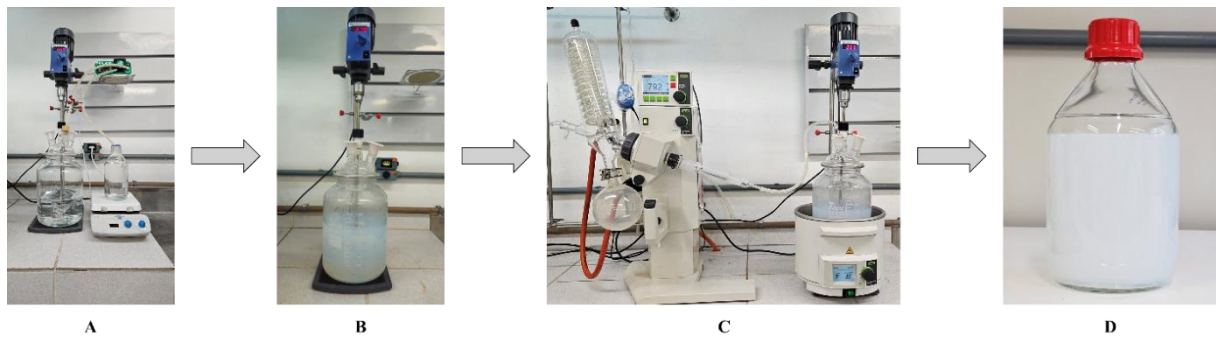
Formulação	Composto ativo(μL)	EE (%)	CG(%)	DM (nm)	PZ (mV)
Citral–NC–1	100	89,09 ± 1,24 ^{ab}	44,37 ± 2,86 ^d	172 ± 18 ^c	-31,4 ± 0,9
Citral–NC–2	200	87,96 ± 1,76 ^b	60,87 ± 3,07 ^c	195 ± 14 ^b	-27,7 ± 1,4
Citral–NC–3	300	79,39 ± 0,79 ^c	65,36 ± 5,21 ^b	215 ± 10 ^a	-28,8 ± 0,7
Citral–NC–4	400	91,63 ± 2,93 ^a	77,21 ± 1,59 ^a	219 ± 16 ^a	-26,4 ± 1,1
Citral–NC–5	500	89,37 ± 3,31 ^{ab}	80,12 ± 1,85 ^a	220 ± 15 ^a	-28,5 ± 1,4
OECL–NC–1	100	91,22 ± 5,88 ^A	45,91 ± 2,50 ^D	177 ± 17 ^C	-31,1 ± 0,4
OECL–NC–2	200	89,99 ± 1,84 ^{AB}	61,96 ± 2,50 ^C	195 ± 10 ^B	-27,8 ± 0,9
OECL–NC–3	300	81,06 ± 0,71 ^B	66,30 ± 4,68 ^B	214 ± 9 ^A	-27,9 ± 1,5
OECL–NC–4	400	94,11 ± 0,78 ^A	78,02 ± 1,05 ^A	216 ± 13 ^A	-25,4 ± 0,9
OECL–NC–5	500	93,60 ± 1,11 ^{AB}	81,46 ± 1,01 ^A	224 ± 15 ^A	-26,3 ± 1,7

Os resultados são expressos como as médias de triplicatas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Letras minúsculas referem-se às formulações contendo citral, enquanto letras maiúsculas referem-se às formulações contendo óleo essencial de capim-limão

O método de deposição interfacial de um polímero pré-formado via deslocamento de solvente, empregado neste estudo, envolve a simples dissolução do polímero pré-formado e do componente ativo em um solvente orgânico miscível em água, seguida de sua injeção em uma fase aquosa contendo um estabilizante. A rápida mistura na interface leva à difusão do solvente, resultando na formação de nanocápsulas com tamanho e morfologia controlados, além de compatibilidade com uma variedade de polímeros e ingredientes ativos (Fessi et al., 1989; Weisany et al., 2022). A simplicidade operacional do método permite a produção em escala industrial, o que é essencial ao se vislumbrar a aplicação dos sistemas nanoencapsulados na prevenção de doenças pós-colheita.

Após o estudo dos parâmetros de formulação das nanocápsulas, o passo seguinte foi concentrar-se no escalonamento do processo de produção das formulações Citral–NC–5 e OECL–NC–5. O processo envolveu a adaptação das condições otimizadas para uma escala 40 vezes maior (Figura 19). As formulações em escala ampliada mantiveram praticamente os mesmos valores de EE e LC observados para as formulações em escala otimizada. A formulação Citral–NC em escala ampliada apresentou EE de 84% e LC de 78,95%. A formulação OECL–NC apresentou EE e LC de 87% e 79,82%, respectivamente.

Figura 19. Fluxograma do escalonamento da formulação das nanocápsulas.

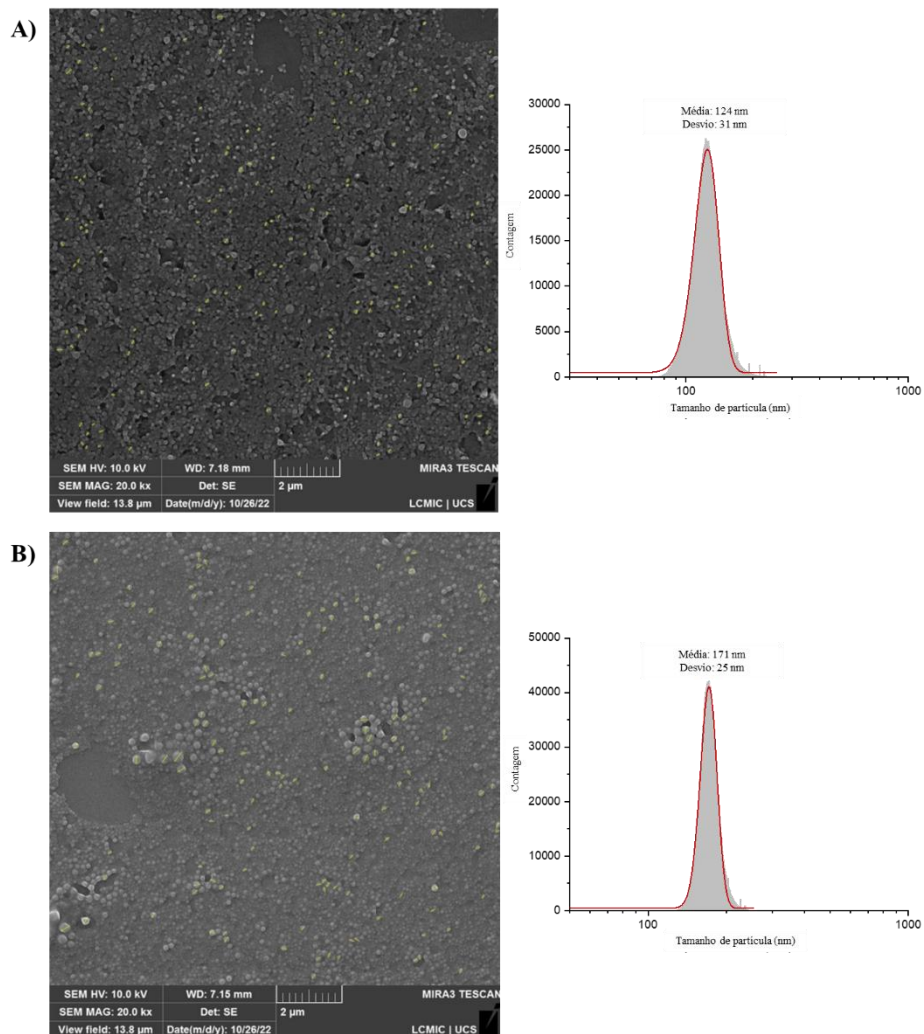


Fonte: o autor (2026).

Além disso, o diâmetro hidrodinâmico médio registrado para Citral-NC-5 e OECL-NC-5 em escala ampliada foi de 217 nm e 221 nm, respectivamente, mantendo os valores de potencial zeta de $-26,2$ e $-25,4$, respectivamente. A configuração do sistema permitiu a remoção e recuperação do solvente orgânico sob leve redução de pressão, resultando em uma suspensão coloidal aquosa nanoencapsulada de 2 L, com concentração final de 0,84% (v/v) de citral na formulação Citral-NC-5 ampliada e 0,87% (v/v) de OECL na formulação OECL-NC-5 ampliada.

As micrografias obtidas por FEG-SEM, apresentadas na Figura 20 revelam a morfologia esférica das nanocápsulas nas formulações em escala ampliada, esse resultado morfológico envolve fenômenos hidrodinâmicos interfaciais que, no processo de síntese, a adição da solução acetônica-oleosa resulta em uma emulsificação espontânea, dispersando a fase oleosa em nanogotas. Esse fenômeno pode ser atribuído à turbulência interfacial ou agitação espontânea que ocorre na interface entre duas fases líquidas fora de equilíbrio (Fessi et al., 1989). Além disso, o diâmetro médio das nanocápsulas foi medido a partir das micrografias de FEG-SEM utilizando 150 medições aleatórias de nanocápsulas (software ImageJ, National Institute of Health, EUA). Como resultado obtido das contagens, as nanocápsulas apresentaram diâmetros médios de 113 ± 19 nm para Citral-NC e 171 ± 28 nm para OECL-NC.

Figura 20. Imagens obtidas utilizando microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campos, com magnificação de 50.000 vezes das nanocápsulas de poli(ácido lático) contendo, A) citral e B) óleo essencial de capim-limão.



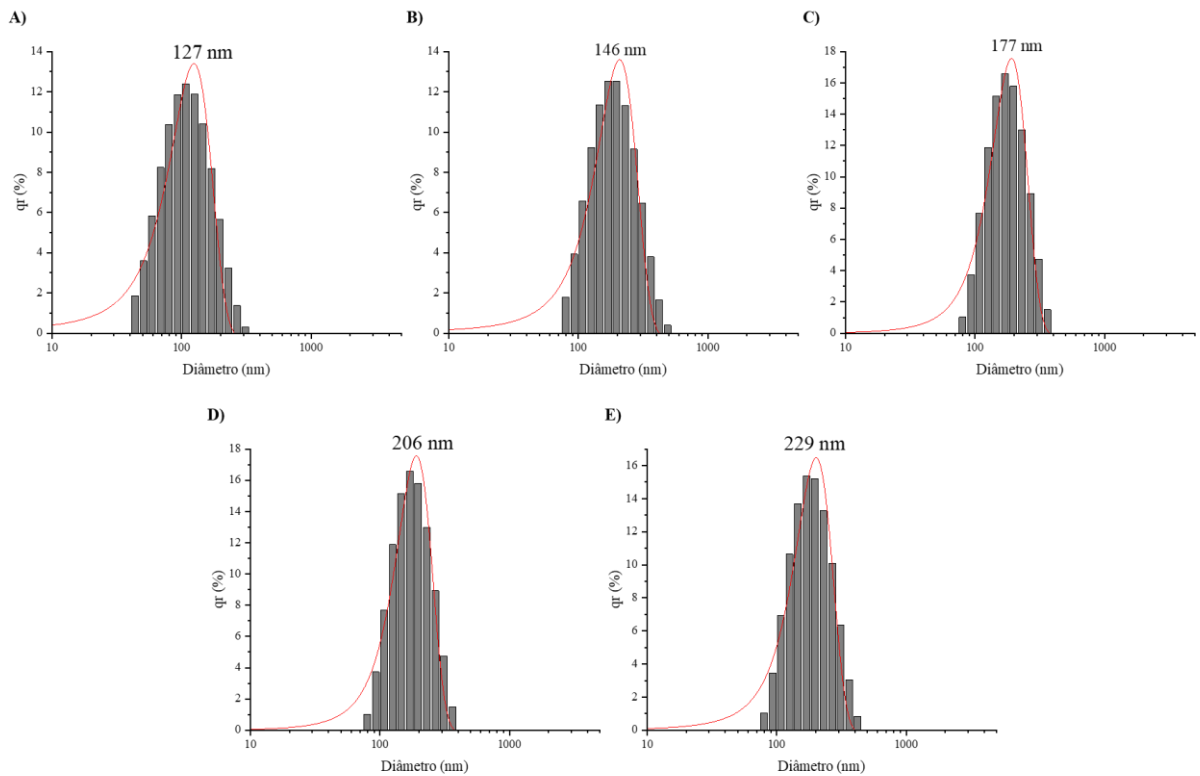
Fonte: o autor (2026).

4.4.2 Nanocápsulas utilizando Eudragit® S100

Tendo em vista a metodologia utilizada para a obtenção das nanocápsulas utilizando citral e óleo essencial de capim-limão com o PLA, verificou-se a possibilidade de ser modificado o composto bioativo para o óleo essencial de orégano e o material polimérico utilizado, que desta vez foi o Eudragit® S100, escolhido pelos resultados obtidos no teste de intumescimento. Para isso, foram utilizados seguintes parâmetros: massa do polímero (100 mg), solventes acetona (30 mL) e água (50 mL), surfactantes Tween 80 (0,077 g) e Span 60 (0,077 g) e do composto bioativo (100, 200, 300, 400 e 500 µL). Os fatores resposta utilizados para as nanocápsulas de PLA foram mantidos.

Quando observado o diâmetro médio das partículas nota-se o aumento progressivo com o volume de composto bioativo adicionado à formulação, seguindo a mesma tendência das nanocápsulas utilizando o PLA. Esse padrão sugere que maiores volumes de composto bioativo resultam em partículas maiores, o que pode estar relacionado ao aumento da carga de composto bioativo na formulação (Figura 21).

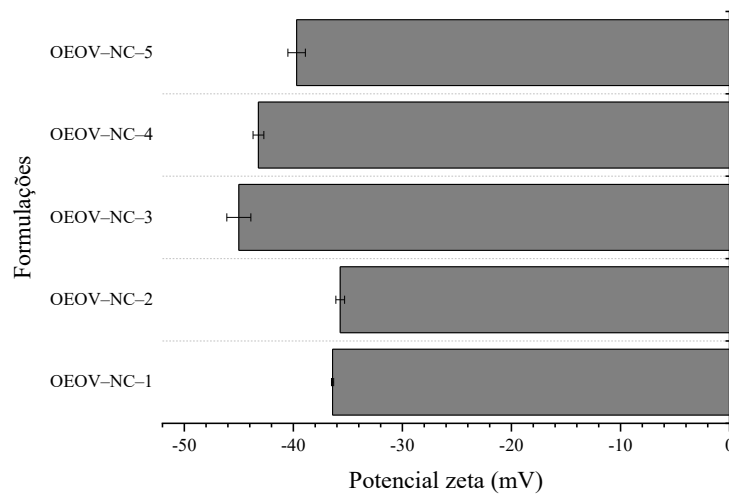
Figura 21. Distribuição por intensidade do diâmetro das nanocápsulas obtidas por espalhamento de luz dinâmico e cálculo do diâmetro médio obtido por uma aproximação gaussiana para as formulações: A) OEOV-NC-1, B) OEOV-NC-2, C) OEOV-NC-3, D) OEOV-NC-4, E) OEOV-NC-5.



Fonte: o autor (2026).

Quanto ao potencial zeta, os valores registrados são todos, variando de aproximadamente -35 mV a -45 mV. Tais valores indicam uma boa estabilidade coloidal das formulações, dificultando a sua aglomeração (Figura 22).

Figura 22. Valores de Potencial Zeta para as diferentes formulações de nanocápsulas contendo óleo essencial de orégano.



Fonte: o autor (2026).

Na Tabela 14 são apresentados todos os dados referentes ao diâmetro médio, potencial zeta e a eficiência de encapsulação. Como já relatado, observou-se um ligeiro aumento no diâmetro médio das nanocápsulas (DM) com o incremento do óleo essencial de orégano ou do carvacrol. Em termos de potencial zeta (PZ) não houve alteração significativa, sendo assim, todas as formulações de nanocápsulas demonstram-se estáveis. Além disso, a eficiência de encapsulação não foi afetada pela quantidade de óleo essencial ou carvacrol incorporada nas formulações, mantendo-se consistentemente acima de 87%.

Tabela 14. Formulações de nanocápsulas de Eudragit® S100 contendo OEOV como núcleo ativo e resultados obtidos das variáveis de resposta: eficiência de encapsulação (EE), capacidade de carga (CG), diâmetro hidrodinâmico médio (DM) e potencial zeta (PZ).

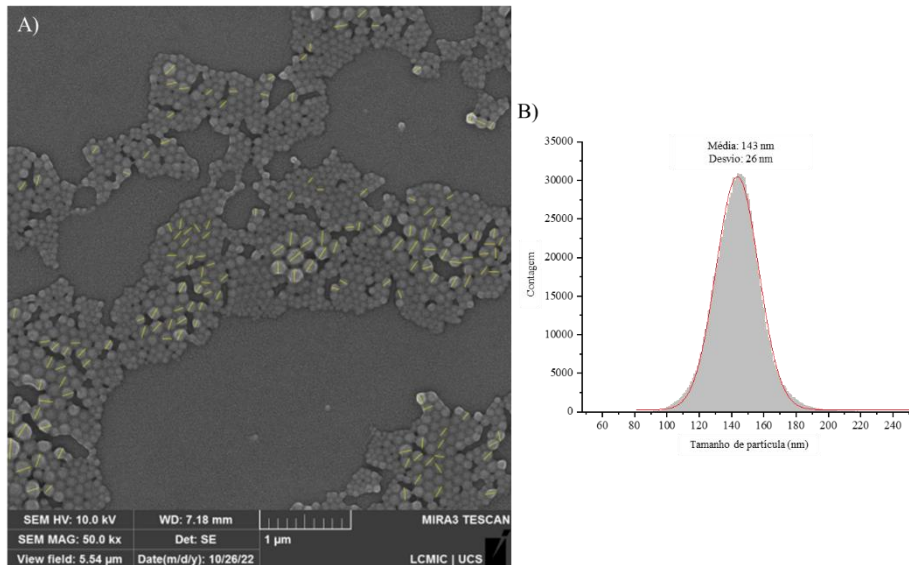
Formulação	Composto ativo (µL)	EE (%)	CG (%)	DM (nm)	PZ (mV)
OEOV-NC-1	100	93,78 ± 1,78 ^A	46,95 ± 1,63 ^A	127 ± 17 ^D	-36,4 ± 0,1 ^A
OEOV-NC-2	200	91,39 ± 0,85 ^A	62,61 ± 2,11 ^B	146 ± 21 ^{CD}	-35,7 ± 0,4 ^A
OEOV-NC-3	300	90,81 ± 1,17 ^A	71,27 ± 1,99 ^C	177 ± 07 ^{BC}	-45,0 ± 1,1 ^C
OEOV-NC-4	400	90,94 ± 2,71 ^A	76,93 ± 1,73 ^D	206 ± 19 ^{AB}	-43,2 ± 0,5 ^C
OEOV-NC-5	500	90,72 ± 2,10 ^A	81,18 ± 1,75 ^E	229 ± 16 ^A	-39,7 ± 0,8 ^B

Os resultados são expressos como médias de triplicatas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). A densidade relativa do OEOV utilizada foi de $0,9364 \pm 0,0001$.

Assim como as micrografias apresentadas para as nanocápsulas de capim-limão e citral utilizando o PLA, observa-se partir a micrografia de FEG-SEM das nanocápsulas de óleo essencial de orégano (Figura 2323) a formação de nanopartículas com morfologia esférica.

Assim como nas Citral-NC e OECL-NC, o diâmetro médio das nanocápsulas também foi medido a partir das micrografias utilizando 150 medições aleatórias de nanocápsulas (Figura 233B). Como resultado obtido das contagens, as nanocápsulas apresentaram diâmetros médios de 143 ± 26 nm.

Figura 23. Imagens obtidas utilizando microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campos, com magnificação de 50.000 vezes das nanocápsulas de Eudragit® S100 contendo, A) carvacrol e B) óleo essencial de orégano.



Fonte: o autor (2026).

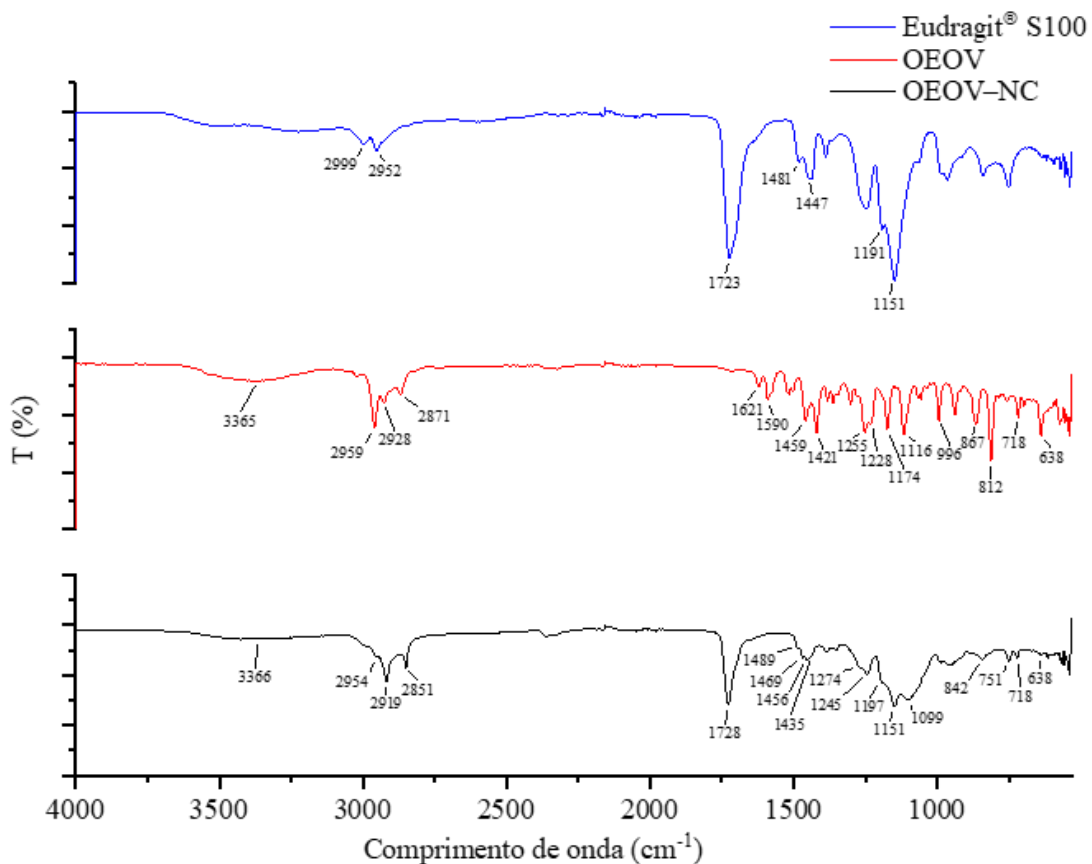
Além disso, também foi realizada a análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do Eudragit® S100, do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. e da formulação das nanocápsulas (OEOV-NC-5) para avaliar as interações entre o polímero e o material do núcleo (Figura 244). O espectro de FTIR da formulação das nanocápsulas contendo óleo essencial de orégano (OEOV-NC-5) indica a incorporação do óleo na matriz polimérica por meio de interações físico-químicas.

O polímero Eudragit® S100, um copolímero aniônico de ácido metacrílico e metacrilato de metila (2:1), apresenta a banda característica de estiramento do grupo carbonila do éster (C=O) em 1723 cm^{-1} , o estiramento C-O (éster) entre $1215\text{--}1145\text{ cm}^{-1}$ e o estiramento alifático C-H em 2999 e 2952 cm^{-1} . O óleo essencial (OEOV) exibe uma banda larga característica dos grupos fenólicos O-H na região de 3365 cm^{-1} , estiramento C-H aromático/alifático em $3000\text{--}2840\text{ cm}^{-1}$, vibrações C=C aromáticas em torno de $1638\text{--}1560\text{ cm}^{-1}$ e bandas de estiramento C-O (fenólicos/éteres) na região de $1270\text{--}950\text{ cm}^{-1}$, além de deformações aromáticas fora do plano =C-H abaixo de 900 cm^{-1} .

No espectro do OEOV-NC, observa-se a atenuação das bandas atribuídas ao OEOV, o

que é consistente com o aprisionamento do óleo dentro da matriz polimérica. Também ocorre um sobreposição parcial das bandas do OEOV com as do polímero, levando ao achatamento ou fusão de picos claramente visíveis no óleo puro e a um leve deslocamento da banda carbonila do Eudragit® S100, de 1723 cm^{-1} para 1728 cm^{-1} , sugerindo a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos fenólicos OH do OEOV e os grupos carbonila/éster do polímero.

Figura 24. Caracterização do Eudragit® S100, do óleo essencial de *Origanum vulgare* (OEOV) e das nanocápsulas de Eudragit® S100 contendo óleo essencial de *Origanum vulgare* (OEOV-NC-5) por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

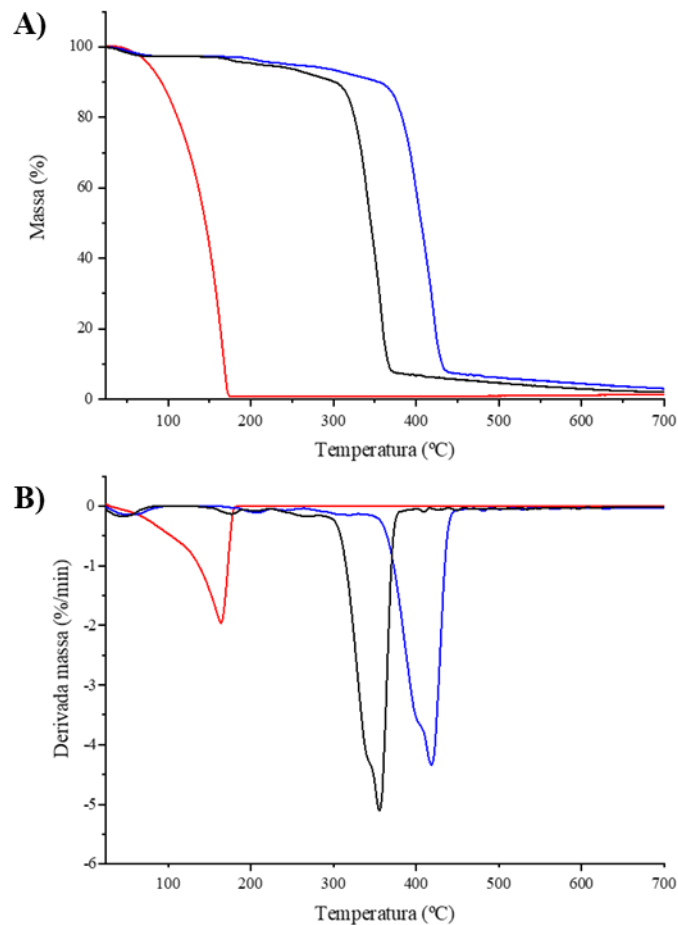


Fonte: o autor (2026).

A análise termogravimétrica (TGA) e sua derivada (DTG), apresentadas nas Figura 255A e B, respectivamente, revelaram diferenças marcantes no comportamento térmico do óleo essencial de orégano, do polímero Eudragit® S100 e do OEOV-NC-5. O OEOV apresentou perda de massa em um único estágio principal, começando a 30 °C e com perda de massa total a 183 °C . Isso é atribuído à volatilização e degradação de seus constituintes, conhecidos por sua alta labilidade térmica. Em contraste, o polímero Eudragit® S100 demonstrou maior estabilidade, sem perda de massa detectável até 339 °C , apresentando degradação no intervalo de 339 °C a 445 °C . O OVEO-NC-5 apresentou um perfil de perda de massa semelhante ao do

polímero puro. Nenhuma perda de massa inicial associada ao essencial foi detectada. No entanto, uma perda de massa inicial foi observada a 291°C, indicando o efeito protetor conferido pela matriz polimérica, atuando como uma barreira, retardando a decomposição térmica dos constituintes ativos.

Figura 25. Caracterização do Eudragit® S100, do óleo essencial de *Origanum vulgare* (OEOV) e das nanocápsulas de Eudragit® S100 contendo o óleo essencial de *Origanum vulgare* (OEOV-NC-5) por (A) análise termogravimétrica (TGA) e (B) derivada da TGA (DTG).



Fonte: o autor (2026).

O OEOV-NC-5 apresentou um perfil intermediário entre o óleo puro e o polímero. Foram detectadas perdas de massa iniciais associadas ao óleo essencial; contudo, estas ocorreram em temperaturas mais elevadas, indicando o efeito protetor conferido pela matriz polimérica, que atua como uma barreira ao retardar a decomposição térmica dos constituintes ativos. Esse mesmo comportamento foi identificado por Antonioli e colaboradores (2020) e Cui e colaboradores (2018).

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

4.5.1 Nanocápsulas poliméricas de PLA utilizando óleo essencial de capim-limão e citral

4.5.1.1 Ensaio de germinação de conídios

Para a avaliação e comparação do potencial antifúngico das nanocápsulas de capim-limão ou citral previamente aos ensaios *in vivo*, foram planejados ensaios de germinação de conídios frente aos compostos encapsulado e não encapsulados.

A inibição completa do crescimento do fungo *B. cinerea* foi observada no tratamento com óleo essencial encapsulado em concentração de 0,1% (v/v) e no tratamento com óleo essencial não-encapsulado a 0,05% (v/v) (Tabela 15). As concentrações inibitórias encontradas no ensaio corroboram com resultados encontrados no uso de óleo essencial para controle de *B. cinerea*, como descrito por Barrera-Necha e colaboradores (2008).

Tabela 15. Atividade antifúngica *in vitro* de citral e OECL encapsulados e não encapsulados frente ao fungo *B. cinerea* após 24 horas.

Concentração do tratamento % (v/v) ^a	Escala de germinação dos conídios ^b			
	Citral	Citral-NC	OECL	OECL-NC
0,4	III	III	III	III
0,2	III	III	III	III
0,1	III	III	III	III
0,05	III	III	III	III
0,025	II	II	I	I
0,0125	I	I	I	I
0,00625	I	I	I	I
Controle	I	I	I	I

^a As concentrações finais do citral e do OECL encapsulados ou do citral foram preparadas a partir das formulações em escala ampliada de Citral-NC e OECL-NC, com concentrações iniciais de 0,84% (v/v) e 0,87% (v/v), respectivamente. ^b (I) conídios com crescimento de hifas, (II) conídios com emergência do tubo germinativo e (III) conídios sem emergência de hifas observável.

A diferença na atividade entre o composto bioativo encapsulado e o não encapsulado pode estar atrelada ao fato de que, no início do ensaio, o óleo essencial não encapsulado já está em contato direto com os conídios do fungo. Já o óleo essencial encapsulado é liberado gradualmente com a difusão do composto em direção ao meio externo.

4.5.1.2 Citometria de fluxo

O mecanismo antifúngico dos óleos essenciais tem sido associado à interação dos principais componentes apolares dos óleos com a membrana celular, resultando em sua ruptura e aumento da permeabilidade da membrana. Monoterpenos, como o citral, também podem promover o acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) e inibir enzimas fúngicas (Pedroso et al., 2024; Scariot et al., 2020). Assim, a análise por citometria de fluxo foi utilizada com o intuito de compreender o efeito do citral e do OECL encapsulados e não encapsulados sobre a integridade da membrana dos conídios.

Com base no teste de germinação *in vitro*, foram selecionadas as concentrações de 0,05% (v/v) e 0,10% (v/v). O gráfico de densidade de fluorescência dos conídios de *B. cinerea* não tratados (Figura 266A) mostrou 66,23% de atividade de esterase (quadrantes 2 e 3), enquanto os 33,74% restantes da população estão localizados no quadrante 4. O quadrante 4 geralmente representa o ruído de fundo, detritos ou células não coradas que exibem pouca ou nenhuma atividade metabólica. No entanto, a natureza espessa e resistente da membrana celular do conídio pode impedir a entrada do corante 5-CFDA, resultando em atividade de esterase indetectável. Essa observação já foi relatada anteriormente em análises por citometria de fluxo de conídios de *B. cinerea* (Romero Bernal et al., 2019). Além disso, a maior parte da população de conídios (93,4%) foi encontrada no quadrante 4, sem coloração por PI, confirmando, portanto, a integridade da membrana.

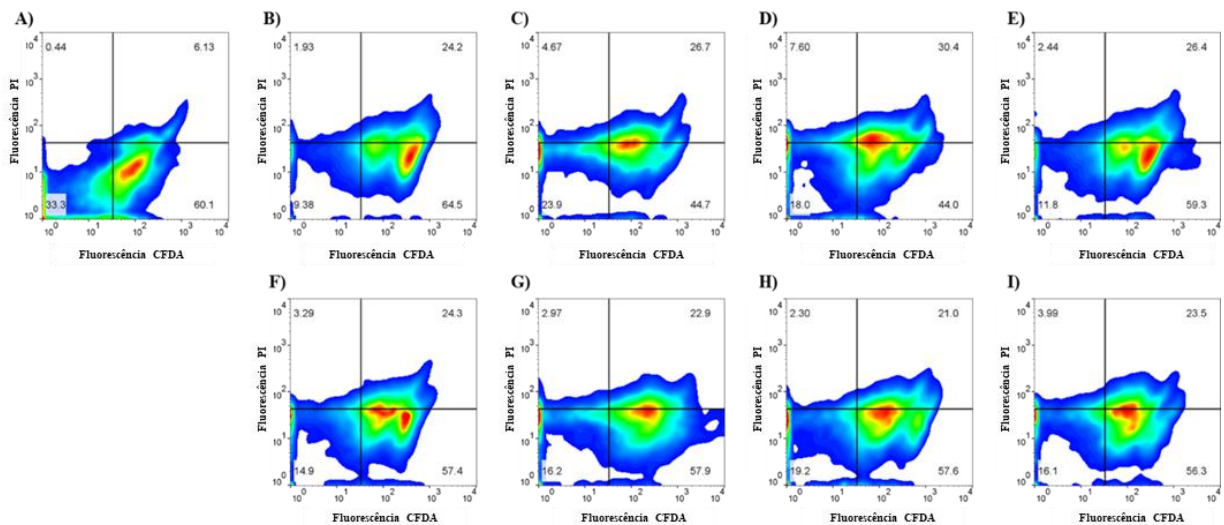
Como mostrado em outros gráficos de densidade de fluorescência (Figura 266B a I), os conídios expostos a ambas as concentrações de citral ou OECL, encapsulados ou não encapsulados, apresentaram redução na integridade da membrana celular em comparação ao controle, como indicado por um leve aumento na captação de iodeto de propídio (Tabela 16).

O aumento da atividade de esterase, com a migração da maior parte da população para os quadrantes 2 e 3, pode ser devido ao aumento da permeabilidade da membrana causado pelos compostos ativos, permitindo melhor acesso do corante CFDA ao interior da célula. Embora nenhum conídio danificado tenha sido detectado na análise por citometria de fluxo, esse resultado indica que os compostos ativos atuam comprometendo a integridade da membrana, resultando em um estado de “estresse” dos conídios.

Tabela 16. Efeito do citral e do OECL (livres e nanoencapsulados) na integridade da membrana celular de conídios de *B. cinerea*.

		Concentração % (v/v)	Integridade da membrana celular (%IP positivo)
A)	Controle	–	6,57
B)	Citral	0,05	26,13
C)	Citral	0,1	31,37
D)	OECL	0,05	38,00
E)	OECL	0,1	28,84
F)	Citral–NC	0,05	27,59
G)	Citral–NC	0,1	25,87
H)	OECL–NC	0,05	23,30
I)	OECL–NC	0,1	27,49

Figura 26. Efeito do óleo essencial de capim-limão e citral, não nanoencapsulados ou nanoencapsulados, sobre conídios de *B. cinerea* na integridade da membrana e na atividade esterásica. A) Controle; B) Citral 0,05% (v/v); C) Citral 0,10% (v/v); D) OECL 0,05% (v/v); E) OECL 0,10% (v/v); F) Citral–NC–5 0,05% (v/v); G) Citral–NC–5 0,10% (v/v); H) OECL–NC–5 0,05% (v/v); I) OECL–NC–5 0,10% (v/v).



Fonte: o autor (2026).

4.5.1.3 Ensaio *in vivo* para o controle do fungo *B. cinerea* em uvas

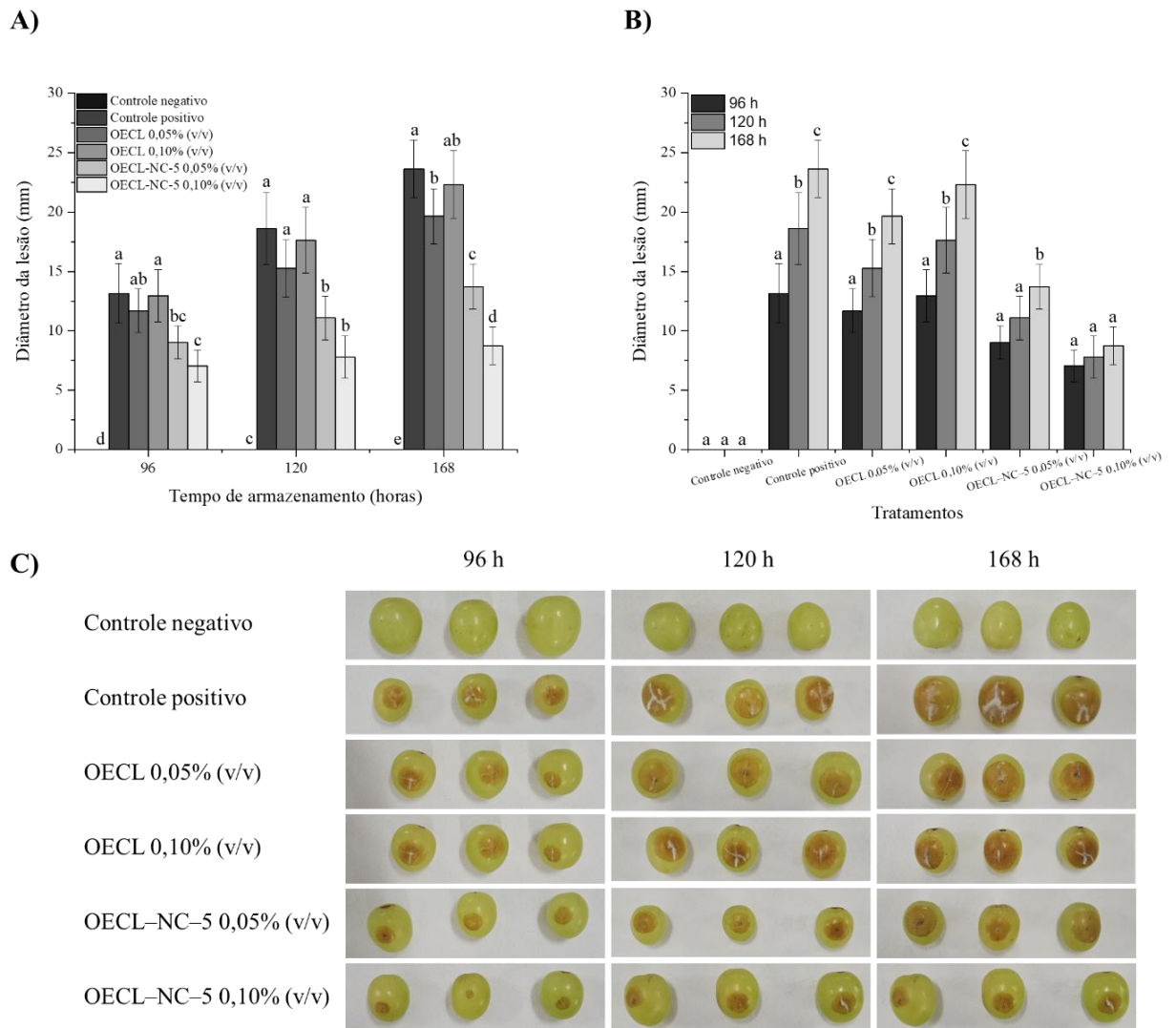
Para o ensaio *in vivo* foram escolhidas uvas devido à importância mundial do mofo-cinzento como doença pós-colheita, responsável por uma redução significativa na quantidade e na qualidade das bagas maduras (Rahman et al., 2024). Além disso, a progressão da necrose causada pelo fungo pode ser facilmente medida devido aos sintomas visíveis na superfície das bagas. O citral e o OECL, encapsulados e não encapsulados, foram escolhidos nas

concentrações de 0,05% (v/v) e 0,10% (v/v) com base em estudos *in vitro*, e os diâmetros das lesões foram avaliados após 96 h, 120 h e 168 h.

No estudo comparativo envolvendo o OECL, foi demonstrado que as uvas não tratadas desenvolveram extensa deterioração necrótica, com aumento progressivo dos diâmetros das lesões durante o período de avaliação. As uvas tratadas com OECL nas concentrações de 0,05% e 0,10% não apresentaram eficácia significativa na prevenção da necrose em comparação com o grupo controle positivo, conforme mostrado no gráfico de barras da Figura 2727A. Em contraste, os tratamentos com OECL-NC inibiram a expansão das lesões e a severidade da doença. Além disso, foi observado um efeito dependente da dose. O OECL-NC-5 na concentração de 0,10% (v/v) apresentou a redução mais significativa na progressão fúngica, com diminuição de 63% nos diâmetros das lesões após 168 h em comparação ao controle positivo, conforme mostrado na Figura 277A. Ademais, não foi observada necrose no controle negativo.

Ao comparar os diâmetros das lesões do mesmo grupo tratado medidos nos três períodos distintos (Figura 277B), observou-se que o OECL-NC-5 na concentração de 0,10% (v/v) foi eficaz em retardar a taxa de deterioração nas bagas, sem progressão estatisticamente significativa da infecção ao longo do período avaliado. A avaliação visual das bagas de uva mostrada na Figura 277C corrobora os dados quantitativos. Os grupos controle e os tratados com OECL não encapsulado apresentaram frutos com sintomas severos, incluindo escurecimento generalizado, crescimento micelial e colapso do tecido. Em contraste, as uvas tratadas com OECL-NC exibiram apenas pequenas lesões superficiais, e a integridade geral do tecido foi preservada, especialmente no tratamento com concentração de 0,10% (v/v).

Figura 27. Tratamento *in vivo* preventivo pós-colheita contra *B. cinerea* em uvas tratadas com OECL não encapsulado e encapsulado. A) Diâmetro das lesões em bagas de uva inoculadas com conídios de *B. cinerea*, medido em três tempos de armazenamento para seis diferentes tratamentos. Para cada tempo de armazenamento, letras iguais indicam ausência de diferenças estatísticas entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). B) Gráfico de barras mostrando a progressão da infecção no mesmo grupo de tratamento ao longo dos períodos de armazenamento. Para cada tratamento, letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre os tempos, conforme o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). C) Imagens de três uvas representativas do grupo médio de tratamento após 168 horas de incubação.



Fonte: o autor (2026).

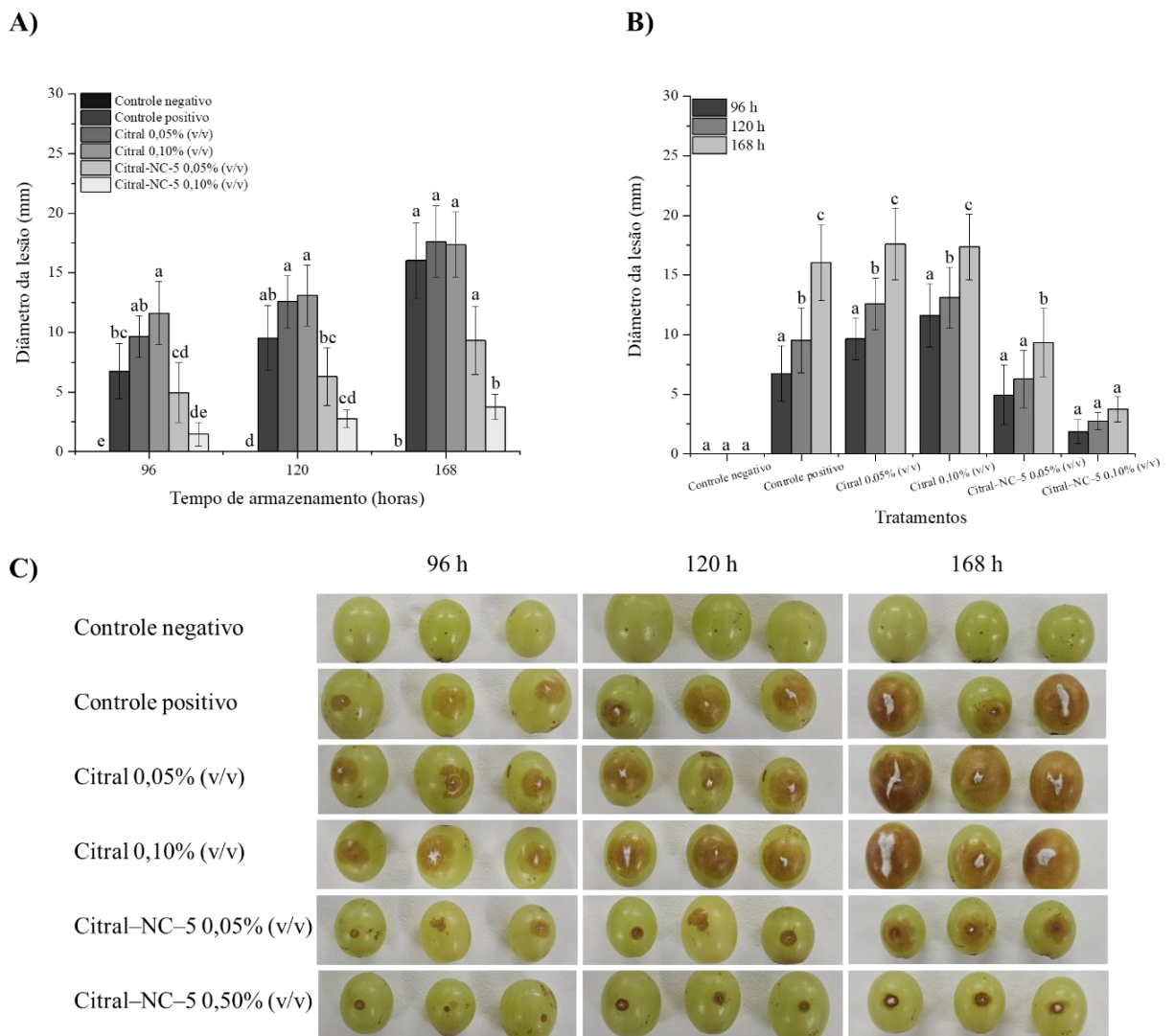
A avaliação *in vivo* utilizando Citral e Citral-NC-5 apresentou resultados semelhantes aos observados nos experimentos com OECL e OECL-NC-5. No entanto, durante as primeiras 96 horas, observou-se que as uvas tratadas com citral não encapsulado apresentaram lesões maiores do que as do grupo controle positivo. Esse padrão se manteve nas medições subsequentes, conforme mostrado na Figura 288. A fitotoxicidade acentuada, em comparação

ao OECL, pode ser explicada pelo fato de o citral ser composto apenas por geranial e neral. Embora o citral possua reconhecida atividade antimicrobiana, ele também pode causar fitotoxicidade, resultando em efeitos adversos sobre frutos ou plantas (Abd-Elgawad et al., 2021). Lesões de tamanho semelhante ou superior às do grupo controle positivo, quando se utiliza óleo essencial não encapsulado, já foram observadas em estudos anteriores (Antonioli et al., 2020).

Por outro lado, as uvas tratadas com citral encapsulado apresentaram uma redução significativa nas lesões causadas pela doença. Na primeira medição, após 96 horas, as uvas tratadas com a suspensão coloidal de Citral-NC-5 na concentração de 0,05% (v/v) apresentaram lesões 27% menos severas do que as do grupo controle positivo. Um maior controle biológico foi observado quando as uvas foram tratadas com Citral-NC-5 a 0,10%. O diâmetro médio das lesões foi de $1,87 \pm 1,0$ mm, o que representa uma redução de 72% em relação ao diâmetro das lesões do grupo controle, que foi de $6,75 \pm 2,3$ mm. Além disso, ao comparar o diâmetro médio das lesões entre os tratamentos com citral não encapsulado e encapsulado na concentração de 0,10%, o efeito da encapsulação do composto bioativo ficou evidente. Além de inibir o aumento das lesões, a formulação também impediu a formação de micélio na superfície.

De forma semelhante às uvas tratadas com OECL-NC-5 a 0,10% (v/v), aquelas tratadas com Citral-NC-5 na mesma concentração apresentaram uma progressão mais lenta da infecção ao longo do período de avaliação.

Figura 28. Tratamento preventivo *in vivo* pós-colheita contra *B. cinerea* em uvas tratadas com citral encapsulado e não encapsulado. A) Diâmetro das lesões em bagas de uva inoculadas com conídios de *B. cinerea*, medido em três tempos de armazenamento para seis diferentes tratamentos. Para cada tempo de armazenamento, letras iguais indicam ausência de diferenças estatísticas entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). B) Gráfico de barras mostrando a progressão da infecção no mesmo grupo de tratamento ao longo dos períodos de armazenamento. Para cada tratamento, letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre os tempos, conforme o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). C) Imagens de três uvas representativas do grupo médio de tratamento após 168 horas de incubação.

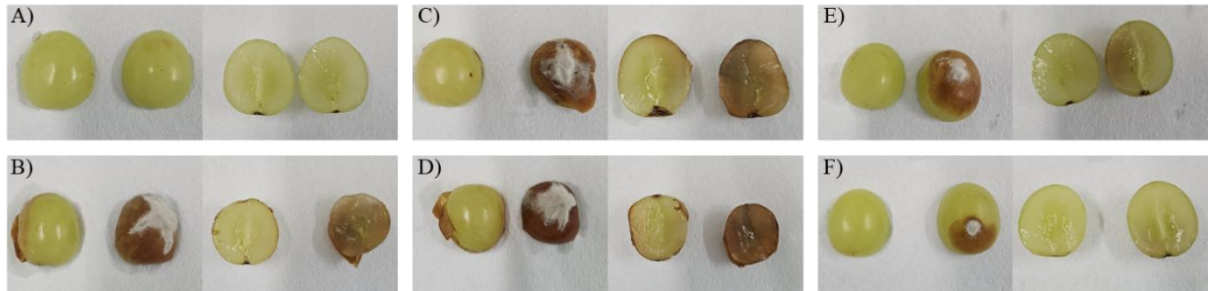


Fonte: o autor (2026).

Após 168 horas, as uvas foram cortadas para avaliar a integridade interna dos frutos (Figura 299 e Figura 3030). Diferenças perceptíveis de coloração foram observadas no interior das bagas. As bagas tratadas com OECL ou citral não encapsulados apresentaram deterioração interna semelhante à observada nas bagas do grupo controle positivo.

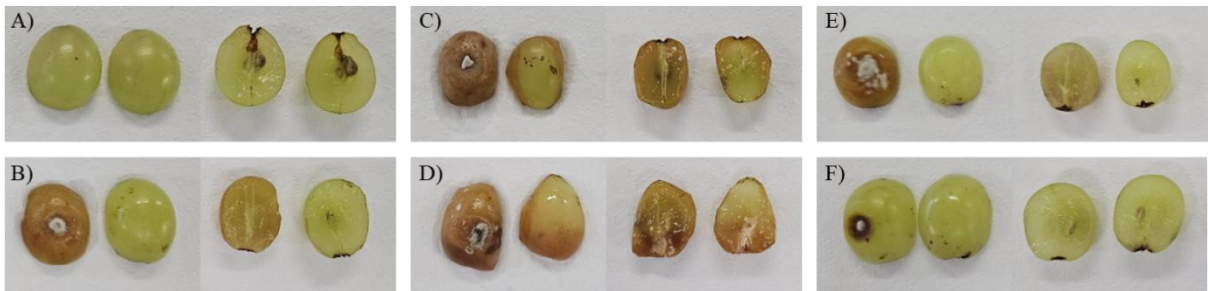
Em contraste, a estrutura interna das bagas tratadas com OECL ou citral encapsulados não apresentou sinais de deterioração fúngica. A parte interna dessas bagas assemelhava-se à do controle negativo, independentemente da concentração avaliada.

Figura 29. Uvas cortadas selecionadas de cada grupo de tratamento *in vivo* após 168 h. Cada imagem mostra a mesma baga: a casca à esquerda e o interior à direita. A) Controle negativo; B) Controle positivo; C) OECL 0,05% (v/v); D) OECL 0,10% (v/v); E) OECL-NC-5 0,05% (v/v); e F) OECL-NC-5 0,10% (v/v).



Fonte: o autor (2026).

Figura 30. Uvas cortadas selecionadas de cada grupo de tratamento *in vivo* após 168 h. Cada imagem mostra a mesma baga: a casca à esquerda e o interior à direita. A) Controle negativo; B) Controle positivo; C) Citral 0,05% (v/v); D) Citral 0,10% (v/v); E) Citral-NC-5 0,05% (v/v); F) Citral-NC-5 0,10% (v/v).



Fonte: o autor (2026).

4.5.2 Nanocápsulas poliméricas de Eudragit® S100 utilizando óleo essencial orégano

4.5.2.1 Ensaio de germinação

Para avaliar e comparar o potencial de atividade do OEOV-NC-5 em relação ao OEOV não encapsulado, foram utilizados os mesmos patógenos empregados no ensaio de germinação com o óleo essencial, e as escalas utilizadas foram as mesmas descritas na seção 2.3.

Conforme apresentado na Tabela 17, até a concentração de 0,025% (v/v), tanto o OEOV quanto o OEOV-NC-5 promoveram inibição completa (escala III) da germinação de conídios de *B. cinerea* e *C. fructicola* após 48 h de avaliação. No entanto, na concentração de 0,0125% (v/v), o OEOV-NC-5 apresentou eficácia superior na inibição da germinação conidial em

comparação ao OEOV não encapsulado.

Para *B. cinerea*, o tratamento com OEOV resultou na observação de conídios com emissão de tubo germinativo após 48 h (escala II), enquanto a inibição completa da germinação foi alcançada com o OEOV-NC-5. No caso de *C. fructicola*, o tratamento com o óleo não encapsulado promoveu a inibição completa da germinação conidial nas primeiras 24 h. Contudo, após 48 h, foram observados conídios com crescimento hifal, indicando redução da atividade antifúngica do óleo essencial ao longo do tempo. Em contraste, o OEOV-NC-5 foi capaz de impedir a germinação conidial durante todo o período de avaliação de 48 h.

Na menor concentração avaliada (0,00625% (v/v)), o OEOV não apresentou eficácia na inibição da germinação de conídios, resultando em resposta equivalente à do experimento controle (escala I). Ainda assim, foi observada uma inibição fraca da germinação conidial para o OEOV-NC-5 no caso de *C. fructicola*.

Tabela 17. Atividade antifúngica *in vitro* do OEOV e do OEOV-NC-5 frente a *B. cinerea* e *C. fructicola* após 24 h e 48 h

Concentração do tratamento %(v/v) ^a	Escala de germinação dos conídios ^b							
	<i>B. cinerea</i>				<i>C. fructicola</i>			
	OEOV		OEOV-NC-5		OEOV		OEOV-NC-5	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
0,4	III	III	III	III	III	III	III	III
0,2	III	III	III	III	III	III	III	III
0,1	III	III	III	III	III	III	III	III
0,05	III	III	III	III	III	III	III	III
0,025	III	III	III	III	III	III	III	III
0,0125	III	II	III	III	III	I	III	III
0,00625	I	I	I	I	II	I	II	II
Controle	I	I	I	I	I	I	I	I

^aA concentração final da suspensão de OEOV-NC-5 foi preparada da formulação OEOV-NC-5 com concentração de 0,81% (v/v). ^b(I) conídios com crescimento de hifas, (II) conídios com emergência do tubo germinativo e (III) conídios sem emergência de hifas observável.

Nos ensaios envolvendo conídios de *C. gloeosporioides* e *P. digitatum* (Tabela 18), a menor concentração eficaz foi de 0,025% (v/v) tanto para os tratamentos com OEOV quanto com OEOV-NC-5. Nos tratamentos com OEOV não encapsulado, foram observados conídios com emissão de tubo germinativo após 48 h, evidenciando a germinação dos patógenos. Em contraste, nos tratamentos com OEOV-NC-5, não foi observada emissão de hifas mesmo após 48 h de avaliação.

Esse resultado corrobora a hipótese de que as nanocápsulas atuam como um sistema de liberação controlada, promovendo a liberação gradual dos compostos ativos, ao mesmo tempo

em que os protegem contra volatilização e degradação (Fakhariha et al., 2025).

Nas concentrações de 0,0125% e 0,00625% (v/v), não foi observada atividade inibitória para nenhum dos tratamentos (OEOV ou OEOV-NC-5). Em todas as condições experimentais, verificou-se a germinação dos conídios com emissão de hifas, comportamento semelhante ao observado no experimento controle.

Tabela 18. Atividade antifúngica *in vitro* do OEOV e do OEOV-NC-5 frente a *C. gloeosporioides* e *P. digitatum* após 24 h e 48 h

Concentração do tratamento %(v/v) ^a	Escala de germinação dos conídios ^b							
	<i>C. gloeosporioides</i>				<i>P. digitatum</i>			
	OEOV		OEOV-NC-5		OEOV		OEOV-NC-5	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
0,4	III	III	III	III	III	III	III	III
0,2	III	III	III	III	III	III	III	III
0,1	III	III	III	III	III	III	III	III
0,05	III	III	III	III	III	III	III	III
0,025	III	II	III	III	III	II	III	III
0,0125	I	I	I	I	I	I	I	I
0,00625	I	I	I	I	I	I	I	I
Controle	I	I	I	I	I	I	I	I

^aA concentração final da suspensão de OEOV-NC-5 foi preparada da formulação OEOV-NC-5 com concentração de 0,81% (v/v). ^b(I) conídios com crescimento de hifas, (II) conídios com emergência do tubo germinativo e (III) conídios sem emergência de hifas observável.

4.5.2.2 Ensaio *in vivo* para o controle do fungo *C. gloeosporioides* em maçãs

Para a avaliação do potencial antifúngico das nanocápsulas OEOV-NC-5 foram utilizadas as maçãs e o fungo *C. gloeosporioides* devido à importância agrônômica da antracnose, doença causada por esse fungo, e responsável pela redução da qualidade e do rendimento de frutos no período pós-colheita. Além disso, a progressão da necrose causada pelo fungo pode ser facilmente medida devido aos sintomas visíveis na superfície da fruta.

O OEOV, encapsulado e não encapsulado, foi selecionado nas concentrações de 0,025% (v/v) e 0,050% (v/v) com base em estudos *in vitro*, e os diâmetros das lesões foram avaliados após 7, 14 e 21 dias.

O ensaio antifúngico *in vivo* demonstrou diferenças claras entre os tratamentos quanto ao desenvolvimento dos sintomas de antracnose em maçãs inoculadas *C. gloeosporioides* (Figura 311). Como esperado, o controle positivo (inoculado e não tratado) apresentou a infecção mais severa, caracterizada por extensas lesões necróticas escuras, maceração do tecido e crescimento

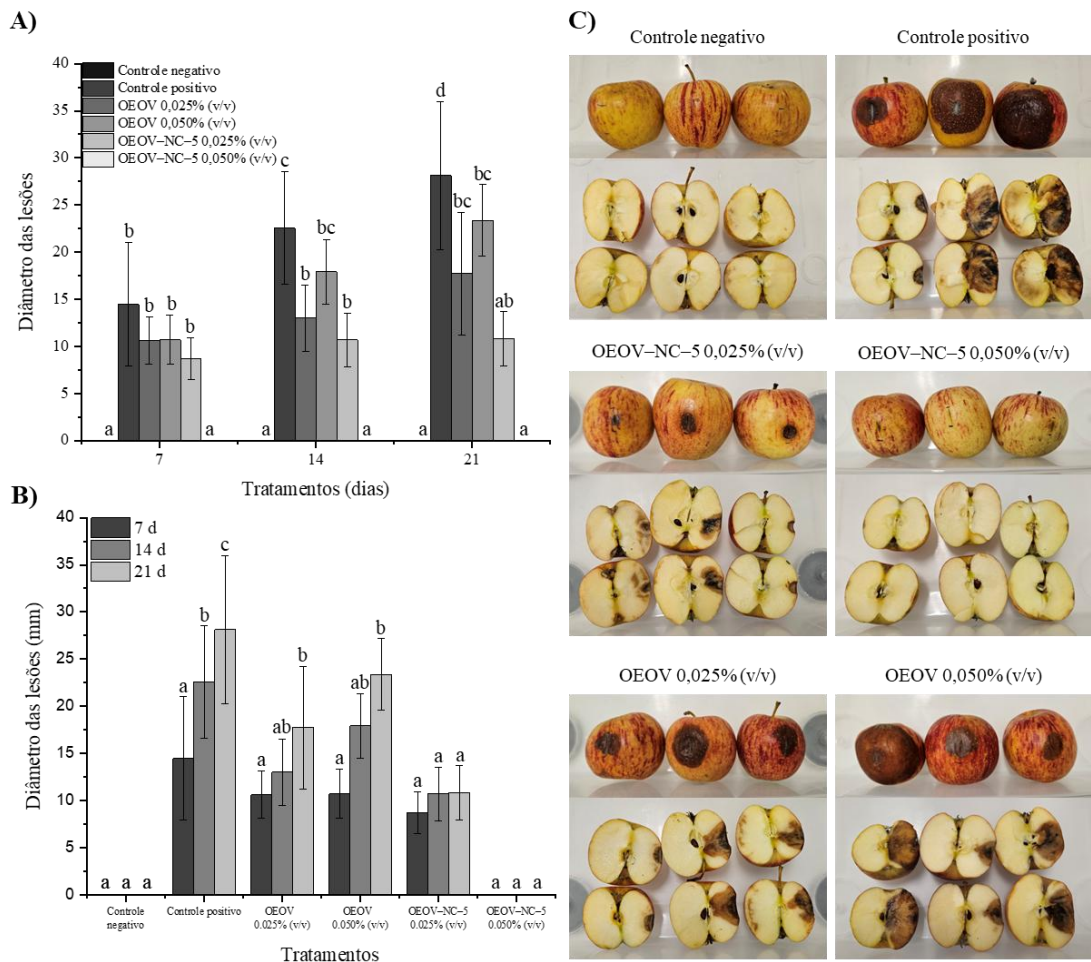
fúngico visível, correspondendo aos maiores diâmetros de lesão observados na análise quantitativa. Em contraste, o controle negativo (não inoculado e não tratado) não apresentou danos visíveis, confirmando a ausência de contaminação natural e validando a confiabilidade do procedimento experimental.

Os tratamentos com OE OV não encapsulado não mostraram redução significativa na severidade das lesões em comparação com o controle positivo. No entanto, observou-se uma tendência à fitotoxicidade do OE OV, já que, no tratamento com concentração de 0,025% (v/v), verificou-se uma lesão menor em comparação ao tratamento com 0,050% (v/v). Em concentrações elevadas, compostos fenólicos, como o carvacrol, podem induzir fitotoxicidade localizada ou estresse oxidativo nos tecidos do hospedeiro, resultando em danos celulares e aumento da permeabilidade das membranas. Essas respostas de estresse podem comprometer a integridade dos tecidos dos frutos, potencialmente facilitando a colonização por patógenos e a progressão da doença (Pei et al., 2020a).

Embora o OE OV e seu composto majoritário sejam amplamente reconhecidos na literatura por sua atividade antifúngica, sua aplicação direta em tecidos de frutos pode causar efeito fitotóxico. Ao testar a aplicação direta de OE OV em frutas para controlar *B. cinerea* e *M. laxa*, Lopez-Reyes e colaboradores (2013) observaram danos teciduais manifestados como manchas na superfície das nectarinas, atribuídos à ação fitotóxica desses compostos. De forma semelhante, Kontaxakis e colaboradores (2020) também relataram que óleos essenciais contendo carvacrol ou timol como constituintes majoritários causaram danos teciduais em uvas.

A encapsulação do OE OV em nanocápsulas de Eudragit[®] S100 (OE OV–NC–5) aumentou ainda mais o desempenho antifúngico. Ambas as concentrações, 0,025% (v/v) e 0,050% (v/v), de OE OV–NC–5 resultaram em lesões visivelmente menores e menos intensas do que os tratamentos com o óleo livre correspondente, conforme mostrado pelos menores diâmetros médios das lesões nos gráficos de barras. Para o tratamento com OE OV–NC–5 a 0,025% (v/v), foi possível reduzir em 62% o diâmetro das lesões em comparação ao controle positivo, e, com o tratamento OE OV–NC–5 a 0,050% (v/v), foi possível inibir completamente os sintomas da doença causada pelo fungo. Em ambos os tratamentos encapsulados, a atividade antifúngica foi mantida por um período prolongado, sugerindo que a matriz polimérica proporcionou liberação controlada e proteção dos compostos ativos contra evaporação e degradação. A maior estabilidade e liberação sustentada do OE OV a partir das nanocápsulas provavelmente prolongaram seu tempo de contato com o patógeno, intensificando o efeito inibitório.

Figura 31. Tratamento *in vivo* preventivo pós-colheita contra *C. gloeosporioides* em maçãs tratadas com OEOV não encapsulado e encapsulado. A) Diâmetro das lesões em maçãs inoculadas com conídios de *C. gloeosporioides*, medido em três tempos de armazenamento para os seis diferentes tratamentos. Para cada tempo de armazenamento, letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). B) Gráfico de barras mostrando a progressão da infecção no mesmo grupo de tratamento ao longo dos períodos de armazenamento. Para cada tratamento, letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre os tratamentos, conforme o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). C) Imagens de três maçãs que representam o grupo de tratamento médio após 21 d de incubação.



Fonte: o autor (2026).

Do ponto de vista visual, os frutos tratados com OEOV-NC-5 apresentaram apenas escurecimento leve ou ausente ao redor do ponto de inoculação, mantendo a integridade saudável do tecido, especialmente na maior concentração (Figura 311C). Esses resultados

corroboram os dados quantitativos e reforçam a vantagem das formulações baseadas em nanocarreadores para o controle de doenças pós-colheita.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram o potencial dos óleos essenciais como agentes antifúngicos naturais no controle de fitopatógenos de relevância pós-colheita. Inicialmente, as análises cromatográficas por GC–MS e GC–FID permitiram a identificação e quantificação dos sete óleos essenciais avaliados.

A avaliação antifúngica frente aos fungos *B. cinerea*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides* e *P. digitatum* evidenciou diferenças significativas entre os compostos testados, destacando-se os óleos essenciais de capim-limão e de orégano como os mais efetivos na inibição do desenvolvimento fúngico.

A partir desses resultados e dos testes de intumescimento, foram desenvolvidas formulações nanoestruturadas visando superar limitações intrínsecas aos óleos essenciais, como volatilidade, instabilidade química e baixa persistência no ambiente. Nanocápsulas poliméricas de PLA contendo óleo essencial de capim-limão ou citral, bem como nanocápsulas de Eudragit® S100 contendo óleo essencial de orégano, foram produzidas com sucesso por nanoprecipitação de polímero pré-formado. As formulações apresentaram elevada eficiência de encapsulação, superior a 87%, e potencial zeta médio de aproximadamente -26 mV, indicando adequada estabilidade coloidal e eficiência na incorporação dos compostos bioativos.

Os ensaios biológicos demonstraram que o processo de encapsulação não comprometeu a atividade antifúngica dos compostos. O citral e o óleo essencial de capim-limão mantiveram sua capacidade de inibição sobre conídios de *B. cinerea*, apresentando desempenho comparável aos compostos não encapsulados. Adicionalmente, análises por citometria de fluxo revelaram que tanto as formas livres quanto encapsuladas desses compostos promoveram perda de integridade da membrana celular dos conídios, indicando que o mecanismo de ação antifúngico foi preservado nas formulações nanoestruturadas.

Quando empregado o óleo essencial de orégano foi possível observar que frente aos fungos fitopatogênicos *B. cinerea*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides* e *P. digitatum* as nanocápsulas promoveram um efeito mais duradouro após 48 horas em comparação a sua formulação não encapsulada no controle da germinação de conídios.

Nos ensaios em sistemas biológicos, as formulações apresentaram resultados expressivos no controle de doenças pós-colheita. Em uvas, as nanocápsulas de PLA contendo citral e óleo essencial de capim-limão reduziram o diâmetro das lesões causadas por *B. cinerea* em até 72% durante sete dias de armazenamento. Em maçãs, as nanocápsulas de Eudragit® S100 contendo

óleo essencial de orégano foram capazes de controlar completamente o desenvolvimento das lesões causadas por *C. gloeosporioides* por até 21 dias, evidenciando o elevado potencial dessas formulações no manejo de patógenos em frutas armazenadas.

De forma integrada, os resultados obtidos demonstram que a nanoencapsulação polimérica representa uma estratégia tecnológica robusta para viabilizar o uso de óleos essenciais no manejo fitossanitário. A proteção conferida pela matriz polimérica contribui para a estabilização dos compostos voláteis e ampliando sua eficácia biológica em condições reais de aplicação. Dessa forma, esta abordagem não apenas preserva o potencial antifúngico dos compostos naturais, mas também amplia sua aplicabilidade em sistemas agrícolas.

Assim, este trabalho contribui para o avanço do conhecimento na área de formulação de compostos naturais nanoestruturados e reforça o potencial da nanotecnologia como ferramenta estratégica para o desenvolvimento de insumos agrícolas mais seguros e sustentáveis. As evidências obtidas indicam que sistemas nanoencapsulados de óleos essenciais podem representar uma alternativa promissora aos fungicidas sintéticos convencionais, especialmente no controle de doenças pós-colheita.

6 PRODUÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS

6.1 ARTIGO PUBLICADO

- **Molon, V.B.**, Onzi, M.P., Scariot, F.J., Delamare, A.P.L., Camassola, M., Barcellos, T., 2026. *Enhanced antifungal activity of Origanum vulgare L. essential oil through Eudragit® S100-based nanoencapsulation*. **Postharvest Biol. Technol.** 235, 114191. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2026.114191>.

6.2 ARTIGOS EM REVISÃO

- **Molon, V.B.**, Onzi, M.P., Vieira, B.S., Scariot, F.J., Delamare, A.P.L., Barcellos, T. *Poly(lactic acid) nanocapsules loaded with citral and lemongrass essential oil: scaleup and in vivo postharvest control of gray mold*.
- Loreno, K.P., de Col, T.M., Duda, K., Onzi, M.P., Abenante, L., **Molon, V.B.**, Barcellos, T. *Laccase-TEMPO system for green oxidation of glycerol carbonate to glyceric acid carbonate*.

6.3 ARTIGO EM REDAÇÃO

- de Col, T.M., Abenante, L., Onzi, M.P., **Molon, V.B.**, Barcellos, T. *Orange peel ashes as a catalyst for the synthesis of glycerol carbonate*.

6.4 APRESENTAÇÃO EM EVENTOS

- **Molon, V.B.**, Onzi, M.P., Scariot, F.J., Delamare, A.P.L., Camassola, M., Barcellos, T. *Postharvest Disease Management Using Sustainable Lemongrass Oil-Polylactic acid Nanocapsules Against Botrytis cinerea*. 8th Brazilian Biotechnology Congress – Natal 2025

6.5 PRÊMIOS

- Prêmio de melhor apresentação de pôster de pós-graduação na área de nanotecnologia com o trabalho *Postharvest Disease Management Using Sustainable Lemongrass Oil–Polylactic acid Nanocapsules Against Botrytis cinerea* no 8th Brazilian Biotechnology Congress – Natal 2025

6.6 BANCA AVALIADORA EM TRABALHOS DE CONCLUSÃO DE CURSO

- **Molon , V. B.;** Schwanz, M. participação em banca de Júlia Vieira Mota. Development of soy lecithin–chitosan-based nanoformulations incorporating CBD-enriched oil for sustained oral administration. 2025. trabalho de conclusão de curso (graduação em farmácia) - Universidade de Caxias do Sul.
- **Molon , V. B.;** Santos, M. C. participação em banca de Jaqueline Grizon Borba. Controle da *anticarsia gemmatalis* e compatibilidade do *metarhizium rileyi* com óleo essencial de *mentha* sp. 2023. trabalho de conclusão de curso (graduação em agronomia) - Universidade de Caxias do Sul.
- **Molon, V. B.;** Panata, P. Participação em banca de Giovana Sgarabotto Longhi. Determinação do teor de cafeína em cápsulas termogênicas por ressonância magnética nuclear de 1H modo quantitativo (RMNq). 2022 - Universidade de Caxias do Sul.
- **Molon, V. B.;** Schwambach, J. Participação em banca de Robson da Silva Carvalho. Compatibilidade de óleos essenciais a *beauveria bassiana* (balls.) vuill. 2022. trabalho de conclusão de curso (graduação em agronomia) - Universidade de Caxias do Sul.

6.7 BANCA JULGADORA EM EVENTOS

- **Avaliador** do XXXII Encontro de Jovens pesquisadores e XIV Mostra Acadêmica de Inovação e Tecnologia. Universidade de Caxias do Sul, 2024, Caxias do Sul – Brasil
- **Avaliador** do XXX Encontro de Jovens pesquisadores e XII Mostra Acadêmica de Inovação e Tecnologia. Universidade de Caxias do Sul, 2022, Caxias do Sul – Brasil.

REFERÊNCIAS

- Abd-Elgawad, A.M., El Gendy, A.E.N.G., Assaeed, A.M., Al-Rowaily, S.L., Alharthi, A.S., Mohamed, T.A., Nassar, M.I., Dewir, Y.H., Elshamy, A.I., 2021. Phytotoxic effects of plant essential oils: A systematic review and structure-activity relationship based on chemometric analyses. *Plants* 10, 1–16. <https://doi.org/10.3390/plants10010036>
- Agrios, N.G., 2024. *Plant pathology*, 6th ed, Elsevier. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822429-8.00018-2>
- Agudo-Jurado, F.J., Reveglia, P., Rubiales, D., Evidente, A., Barilli, E., 2023. Status of Phytotoxins Isolated from Necrotrophic Fungi Causing Diseases on Grain Legumes. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 5116. <https://doi.org/10.3390/ijms24065116>
- Ait-Ouazzou, A., Cherrat, L., Espina, L., Lorán, S., Rota, C., Pagán, R., 2011. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 12, 320–329. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.04.004>
- Albuquerque Sousa, T.C. de, Cunha, W.M. da, Rosas, A.L.G., Oppelt, C.Q., Gandra, E.Á., Rombaldi, C.V., Meinhart, A.D., 2024. Essential oils as natural sources for the control of *Botrytis cinerea*: Chemical composition and antifungal effect. *Food Biosci.* 62, 105516. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105516>
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M., 1996. *Introductory Mycology*, 4th ed. John Wiley & Sons.
- Alhantoobi, W.A., Alkatheri, A.H., Parusheva, T., Lai, K.S., Thomas, W., Lim, S.-H.E., 2025. Antimicrobial Activity of Essential Oils and Their Mechanism of Action Against Bacterial and Fungal Infections. *Saudi J. Biomed. Res.* 10, 168–186. <https://doi.org/10.36348/sjbr.2025.v10i06.003>
- Antonioli, G., Fontanella, G., Echeverrigaray, S., Longaray Delamare, A.P., Fernandes Pauletti, G., Barcellos, T., 2020. Poly(lactic acid) nanocapsules containing lemongrass essential oil for postharvest decay control: In vitro and in vivo evaluation against phytopathogenic fungi. *Food Chem.* 326, 126997. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126997>
- Arora, B., Yoon, A., Sriram, M., Singha, P., Rizvi, S.S.H., 2020. Reactive extrusion: A review of the physicochemical changes in food systems. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 64, 102429. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102429>
- Auras, R., Harte, B., Selke, S., 2004. An overview of polylactides as packaging materials.

- Macromol. Biosci. 4, 835–864. <https://doi.org/10.1002/mabi.200400043>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008a. Biological effects of essential oils - A review. Food Chem. Toxicol. 46, 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008b. Biological effects of essential oils - A review. Food Chem. Toxicol. 46, 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bamidele, O.P., Emmambux, M.N., 2021. Encapsulation of bioactive compounds by “extrusion” technologies: a review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 61, 3100–3118. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1793724>
- Bassolé, I.H.N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Tirogo, S., Franz, C., Novak, J., Nebié, R.C., Dicko, M.H., 2010. Composition and Antimicrobial Activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. Essential Oils and Their Major Monoterpene Alcohols Alone and in Combination. Molecules 15, 7825–7839. <https://doi.org/10.3390/molecules15117825>
- Beloqui, A., Solinís, M.Á., Rodríguez-Gascón, A., Almeida, A.J., Préat, V., 2016. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. 12, 143–161. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.09.004>
- Bennett, R.J., Turgeon, B.G., 2017. Fungal Sex: The Ascomycota, in: The Fungal Kingdom. ASM Press, Washington, DC, USA, pp. 115–145. <https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch6>
- Bhatta, U.K., 2022. Alternative Management Approaches of Citrus Diseases Caused by *Penicillium digitatum* (Green Mold) and *Penicillium italicum* (Blue Mold). Front. Plant Sci. 12, 1–26. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.833328>
- Bodmeier, R., Chen, H., 1989. Preparation and characterization of microspheres containing the anti-inflammatory agents, indomethacin, ibuprofen, and ketoprofen. J. Control. Release 10, 167–175. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(89\)90059-X](https://doi.org/10.1016/0168-3659(89)90059-X)
- Bragard, C., Dehnen-Schmutz, K., Di Serio, F., Gonthier, P., Jacques, M.A., Jaques Miret, J.A., Justesen, A.F., MacLeod, A., Magnusson, C.S., Milonas, P., Navas-Cortes, J.A., Parnell, S., Potting, R., Thulke, H.H., Van der Werf, W., Civera, A.V., Yuen, J., Zappalà, L., Migheli, Q., Vloutoglou, I., Campese, C., Maiorano, A., Streissl, F., Reignault, P.L., 2021. Pest categorisation of *Colletotrichum fructicola*. EFSA J. 19.

- <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6803>
- Burt, S.A., Reinders, R.D., 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 36, 162–167. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01285.x>
- Buseti, S., Pace, N., 2022. Food loss and waste policy: From theory to practice. *Food Loss Waste Policy From Theory to Pract.* 1–271. <https://doi.org/10.4324/9781003226932>
- Cai, L., Hyde, K.D., Taylor, P., Weir, B.S., Waller, J.M., Abang, M.M., Zhang, J.Z., Yang, Y.L., Phoulivong, S., Liu, Z.Y., Prihastuti, H., Shivas, R.G., Mckenzie, E., Johnston, P.R., 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Divers.* 39, 183–204.
- Campos, E.V.R., de Oliveira, J.L., Fraceto, L.F., Singh, B., 2015. Polysaccharides as safer release systems for agrochemicals. *Agron. Sustain. Dev.* 35, 47–66. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0263-0>
- Cannon, P.F., Damm, U., Johnston, P.R., Weir, B.S., 2012. *Colletotrichum* - current status and future directions. *Stud. Mycol.* 73, 181–213. <https://doi.org/10.3114/sim0014>
- Chavda, V.P., Balar, P.C., Bezbaruah, R., Vaghela, D.A., Rynjah, D., Bhattacharjee, B., Sugandhi, V. V., Paiva-Santos, A.C., 2024. Nanoemulsions: summary of a decade of research and recent advances. *Nanomedicine* 19, 519–536. <https://doi.org/10.2217/nmm-2023-0199>
- Chew, S.C., Nyam, K.L., 2016. Microencapsulation of kenaf seed oil by co-extrusion technology. *J. Food Eng.* 175, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.12.002>
- Corrêa, A.N.R., Clerici, N.J., de Paula, N.O., Brandelli, A., 2024. Inhibition of Food Spoilage Fungi, *Botrytis cinerea* and *Rhizopus* sp., by Nanoparticles Loaded with *Baccharis dracunculifolia* Essential Oil and Nerolidol. *Foods* 13, 3403. <https://doi.org/10.3390/foods13213403>
- Cortaga, C.Q., Cordez, B.W.P., Dacones, L.S., Balendres, M.A.O., Dela Cueva, F.M., 2023. Mutations associated with fungicide resistance in *Colletotrichum* species: A Review. *Phytoparasitica* 51, 569–592. <https://doi.org/10.1007/s12600-023-01063-0>
- Cortes-Torres, A.G., López-Castillo, G.N., Marín-Torres, J.L., Portillo-Reyes, R., Luna, F., Baca, B.E., Sandoval-Ramírez, J., Carrasco-Carballo, A., 2023. *Cymbopogon citratus* Essential Oil: Extraction, GC–MS, Phytochemical Analysis, Antioxidant Activity, and In Silico Molecular Docking for Protein Targets Related to CNS. *Curr. Issues Mol. Biol.* 45, 5164–5179. <https://doi.org/10.3390/cimb45060328>
- Cui, G., Wang, J., Wang, X., Li, W., Zhang, X., 2018. Preparation and Properties of Narrowly

- Dispersed Polyurethane Nanocapsules Containing Essential Oil via Phase Inversion Emulsification. *J. Agric. Food Chem.* 66, 10799–10807. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02406>
- De Angelis, G., Simonetti, G., Chronopoulou, L., Orekhova, A., Badiali, C., Petruccelli, V., Portoghesi, F., D'Angeli, S., Brasili, E., Pasqua, G., Palocci, C., 2022. A novel approach to control *Botrytis cinerea* fungal infections: uptake and biological activity of antifungals encapsulated in nanoparticle based vectors. *Sci. Rep.* 12, 7989. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11533-w>
- de Oliveira, T.S., Costa, A.M.M., Cabral, L.M.C., Freitas-Silva, O., Rosenthal, A., Tonon, R.V., 2023. Anthracnose Controlled by Essential Oils: Are Nanoemulsion-Based Films and Coatings a Viable and Efficient Technology for Tropical Fruit Preservation? *Foods* 12. <https://doi.org/10.3390/foods12020279>
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Ditta, A., Arshad, M., 2016. Applications and perspectives of using nanomaterials for sustainable plant nutrition. *Nanotechnol. Rev.* 5, 209–229. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2015-0060>
- Dong, Z., Ma, Y., Hayat, K., Jia, C., Xia, S., Zhang, X., 2011. Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation. *J. Food Eng.* 104, 455–460. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.01.011>
- Dong, Z.J., Xia, S.Q., Hua, S., Hayat, K., Zhang, X.M., Xu, S.Y., 2008. Optimization of cross-linking parameters during production of transglutaminase-hardened spherical multinuclear microcapsules by complex coacervation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 63, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.11.007>
- Drumright, R.E., Gruber, P.R., Henton, D.E., 2000. Polylactic Acid Technology. *Adv. Mater.* 12, 1841–1846. [https://doi.org/10.1002/1521-4095\(200012\)12:23<1841::AID-ADMA1841>3.3.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-4095(200012)12:23<1841::AID-ADMA1841>3.3.CO;2-5)
- Duan, X., Jing, G., Fan, F., Tao, N., 2016. Control of postharvest green and blue molds of citrus fruit by application of sodium dehydroacetate. *Postharvest Biol. Technol.* 113, 17–19. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.10.015>
- Eghbal, N., Choudhary, R., 2018. Complex coacervation: Encapsulation and controlled release

- of active agents in food systems. *Lwt* 90, 254–264. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.036>
- España, M.D., Arboleda, J.W., Ribeiro, J.A., Abdelnur, P. V., Guzman, J.D., 2017. Eucalyptus leaf byproduct inhibits the anthracnose-causing fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Ind. Crops Prod.* 108, 793–797. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.002>
- Fakhariha, M., Rafati, A.A., Garmakhany, A.D., Asl, A.Z., 2025. Nanoencapsulation enhances stability, release behavior, and antimicrobial properties of Sage and Thyme essential oils. *Sci. Rep.* 15, 18373. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-00022-5>
- FAO, 2021a. Faostat Analytical Brief 60 Agricultural production statistics Agricultural production statistics 2000-2021 Faostat Analytical Brief 60 Faostat Crops and Livestock Production Introduction. Fao 1–17.
- FAO, 2021b. Fruit and vegetables. FAO, CIRAD. <https://doi.org/10.4060/cb4173en>
- FAO, F. and A.O. of the U.N., IFAD, I.F. for A.D., UNICEF, U.N.C.F., WFP, W.F.P., WHO, W.H.O., 2024. The State of Food Security and Nutrition in the World 2024 – Financing to end hunger, food insecurity and malnutrition in all its forms., Rome.
- Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., Bryson, P.K., Amiri, A., Peres, N.A., Schnabel, G., 2014. Fungicide resistance profiles in *Botrytis cinerea* from strawberry fields of seven Southern U.S. States. *Plant Dis.* 98, 825–833. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-13-0970-RE>
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N., Benita, S., 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 55, 1–4. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0)
- Flores, M., Poveda, J., 2025. Effective control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in postharvest tomato under different storage temperatures using essential oils from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) and lemongrass (*Cymbopogon citratus*). *Food Biosci.* 69, 106993. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.106993>
- Fontana, D.C., Neto, D.D., Pretto, M.M., Mariotto, A.B., Caron, B.O., Kulczynski, S.M., Schmidt, D., 2021. Using essential oils to control diseases in strawberries and peaches. *Int. J. Food Microbiol.* 338, 108980. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108980>
- Fortunati, E., Peltzer, M., Armentano, I., Torre, L., Jiménez, A., Kenny, J.M., 2012. Effects of modified cellulose nanocrystals on the barrier and migration properties of PLA nanobiocomposites. *Carbohydr. Polym.* 90, 948–956. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.025>
- Gao, T., Zhou, H., Zhou, W., Hu, L., Chen, J., Shi, Z., 2016. The fungicidal activity of thymol

- against *Fusarium graminearum* via inducing lipid peroxidation and disrupting ergosterol biosynthesis. *Molecules* 21, 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules21060770>
- García-Custodio, M. del C., Márquez-García, F., García-Alonso, D., Brieva-Trejo, C.D., Vázquez Pardo, F.M., 2025. Antioxidant and Antifungal Effects of Six Plant Essential Oils Against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Microorganisms* 13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13092042>
- Ghaderi-Ghahfarokhi, M., Barzegar, M., Sahari, M.A., Ahmadi Gavlighi, H., Gardini, F., 2017. Chitosan-cinnamon essential oil nano-formulation: Application as a novel additive for controlled release and shelf life extension of beef patties. *Int. J. Biol. Macromol.* 102, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.002>
- Gharzouli, M., Aouf, A., Mahmoud, E., Ali, H., Alsulami, T., Badr, A.N., Ban, Z., Farouk, A., 2024. Antifungal effect of Algerian essential oil nanoemulsions to control *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum* in Thomson Navel oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Front. Plant Sci.* 15, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1491491>
- Gliessman, S.R., 2016. *Agroecology and Sustainable Food Systems*, Agroecology and Sustainable Food Systems.
- Grillo, R., Rosa, A.H., Fraceto, L.F., 2015. Engineered nanoparticles and organic matter: A review of the state-of-the-art. *Chemosphere* 119, 608–619. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.049>
- Guterres, S.S., Weiss, V., De Lucca Freitas, L., Pohlmann, A.R., 2000. Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. *Drug Deliv. J. Deliv. Target. Ther. Agents* 7, 195–199. <https://doi.org/10.1080/107175400455119>
- Gutiérrez-Pacheco, M.M., Torres-Moreno, H., Flores-Lopez, M.L., Velázquez Guadarrama, N., Ayala-Zavala, J.F., Ortega-Ramírez, L.A., López-Romero, J.C., 2023. Mechanisms and Applications of Citral's Antimicrobial Properties in Food Preservation and Pharmaceuticals Formulations. *Antibiotics* 12, 1608. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12111608>
- Horst, M.V., Santos, L.A., Knob, A., Silva, E.M.M., Faria, C.M.D.R., 2025. Essential oils from Lamiaceae plants effectively control *Colletotrichum gloeosporioides*, *Elsinoë ampelina* and *Phytophthora infestans*. *Brazilian J. Microbiol.* 56, 975–989. <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01607-4>
- Jokarshourijeh, F., Ma'mani, L., Ahmadpanah, F., Save-Shemshaki, N., Soleimanpour, L.,

2025. Encapsulated citrus peel essential oil in pegylated mesoporous silica nanoparticles for postharvest control of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Sci. Rep.* 15, 40099. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-23911-1>
- Juliani Hector, R., Simon, J.E., Roland Ramboatiana, M.M., Behra, O., Garvey, A.S., Raskin, I., 2004. Malagasy aromatic plants: Essential oils, antioxidant and antimicrobial activities. *Acta Hortic.* 629, 77–81. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2004.629.9>
- Kah, M., Tufenkji, N., White, J.C., 2019. Nano-enabled strategies to enhance crop nutrition and protection. *Nat. Nanotechnol.* 14, 532–540. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0439-5>
- Kehili, S., Boukhatem, M.N., Belkadi, A., Ferhat, M.A., Setzer, W.N., 2020. Peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil as a potent anti-inflammatory, wound healing and anti-nociceptive drug. *Eur. J. Biol. Res. Res. Artic. Eur. J. Biol. Res.* 10, 132–149.
- Kontaxakis, E., Filippidi, E., Stavropoulou, A., Daferera, D., Tarantilis, P.A., Lydakis, D., 2020. Evaluation of eight essential oils for postharvest control of *Aspergillus carbonarius* in grapes. *J. Food Prot.* 83, 1632–1640. <https://doi.org/10.4315/JFP-19-582>
- Kück, U., Pöggeler, S., 2009. Cryptic sex in fungi. *Fungal Biol. Rev.* 23, 86–90. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2009.10.004>
- Kumar, S., Nehra, M., Dilbaghi, N., Marrazza, G., Hassan, A.A., Kim, K.H., 2019. Nano-based smart pesticide formulations: Emerging opportunities for agriculture. *J. Control. Release* 294, 131–153. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.012>
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91, 453–462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
- Law, C.X., Hashim, N., Ismail, S.I., Jahari, M., Al Riza, D.F., 2025. A review on anthracnose disease caused by *Colletotrichum* spp. in fruits and advances in control strategies. *Int. J. Food Microbiol.* 442, 111397. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111397>
- Leiva-Mora, M., Bustillos, D., Arteaga, C., Hidalgo, K., Guevara-Freire, D., López-Hernández, O., Saa, L.R., Padilla, P.S., Bustillos, A., 2025. Antifungal Mechanisms of Plant Essential Oils: A Comprehensive Literature Review for Biofungicide Development. *Agriculture* 15, 2303. <https://doi.org/10.3390/agriculture15212303>
- Lemetter, C.Y.G., Meeuse, F.M., Zuidam, N.J., 2009. Control of the Morphology and the Size of Complex COacervate Microcapsules During Scale-Up. *AIChE J.* 55, 1487–1496. <https://doi.org/10.1002/aic>
- Lipinski, B., Hanson, C., Lomax, J., Kitinoja, L., Waite, R., Searchinger, T., 2016. Toward a

- sustainable food system Reducing food loss and waste. *World Resour. Inst.* 1–40.
- López-Bermúdez, L.S., Quintana-Obregón, E.A., Rosas-Burgos, E.C., Gálvez-Iriqui, A.C., Gutiérrez-Martínez, P., Lizardi-Mendoza, J., Plascencia-Jatomea, M., 2024. Acute Phytotoxicity and Antifungal Effect of Nanochitosan Particles on *Colletotrichum fructicola* with Low Susceptibility to Chitosan. *Curr. Microbiol.* 81, 445. <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03909-0>
- Lopez-Reyes, J.G., Spadaro, D., Prella, A., Garibaldi, A., Gullino, M.L., 2013. Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rots caused by fungi on different stone fruits in vivo. *J. Food Prot.* 76, 631–639. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-342>
- Luciano-Rosario, D., Keller, N.P., Jurick, W.M., 2020. *Penicillium expansum*: biology, omics, and management tools for a global postharvest pathogen causing blue mould of pome fruit. *Mol. Plant Pathol.* 21, 1391–1404. <https://doi.org/10.1111/mpp.12990>
- Macwan, S.R., Dabhi, B.K., Aparnathi, K.D., Prajapati, J.B., 2016. Essential Oils of Herbs and Spices: Their Antimicrobial Activity and Application in Preservation of Food. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 5, 885–901. <https://doi.org/10.20546/ijemas.2016.505.092>
- Maggi, M., Gende, L., Russo, K., Fritz, R., Eguaras, M., 2011. Bioactivity of *Rosmarinus officinalis* essential oils against *Apis mellifera*, *Varroa destructor* and *Paenibacillus* larvae related to the drying treatment of the plant material. *Nat. Prod. Res.* 25, 397–406. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.481261>
- Martínez Rivas, C.J., Tarhini, M., Badri, W., Miladi, K., Greige-Gerges, H., Nazari, Q.A., Galindo Rodríguez, S.A., Román, R.Á., Fessi, H., Elaissari, A., 2017. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *Int. J. Pharm.* 532, 66–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.064>
- Masango, P., 2005. Cleaner production of essential oils by steam distillation. *J. Clean. Prod.* 13, 833–839. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2004.02.039>
- Mora-Huertas, C.E., Fessi, H., Elaissari, A., 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 385, 113–142. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>
- Moraes, S.R.G., Tanaka, F.A.O., Massola, N.S., 2013. Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). *Rev. Bras. Frutic.* 35, 657–664. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000200039>
- Napiórkowska, A., Khaneghah, A.M., Kurek, M.A., 2024. Essential Oil Nanoemulsions—A New Strategy to Extend the Shelf Life of Smoothies. *Foods* 13, 1–18. <https://doi.org/10.3390/foods13121854>

- Oliver, R.P., Ipcho, S.V.S., 2004. Arabidopsis pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens. *Mol. Plant Pathol.* 5, 347–352. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00228.x>
- Öztürk, K., Kaplan, M., Çalış, S., 2024. Effects of nanoparticle size, shape, and zeta potential on drug delivery. *Int. J. Pharm.* 666. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124799>
- Pansera, M.R., Silvestre, W.P., Sartori, V.C., 2023. Bioactivity of *Cupressus sempervirens* and *Cupressus lusitanica* leaf essential oils on *Colletotrichum fructicola*. *J. Essent. Oil Res.* 35, 51–59. <https://doi.org/10.1080/10412905.2022.2104393>
- Pedroso-Santana, S., Fleitas-Salazar, N., 2020. Ionotropic gelation method in the synthesis of nanoparticles/microparticles for biomedical purposes. *Polym. Int.* 69, 443–447. <https://doi.org/10.1002/pi.5970>
- Pei, S., Liu, R., Gao, H., Chen, H., Wu, W., Fang, X., Han, Y., 2020a. Inhibitory effect and possible mechanism of carvacrol against *Colletotrichum fructicola*. *Postharvest Biol. Technol.* 163, 111126. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111126>
- Pei, S., Liu, R., Gao, H., Chen, H., Wu, W., Fang, X., Han, Y., 2020b. Inhibitory effect and possible mechanism of carvacrol against *Colletotrichum fructicola*. *Postharvest Biol. Technol.* 163, 111126. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111126>
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S., 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement. Altern. Med.* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-39>
- Racoviță, Ș., Vasiliu, S., Popa, M., Luca, C., 2009. Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. *Rev. Roum. Chim.* 54, 709–718.
- Rahman, M.U., Liu, X., Wang, X., Fan, B., 2024. Grapevine gray mold disease: infection, defense and management. *Hortic. Res.* 11. <https://doi.org/10.1093/hr/uhae182>
- Raut, J.S., Karuppayil, S.M., 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind. Crops Prod.* 62, 250–264. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>
- Rodrigues, K.A.D.F., Dias, C.N., Do Amaral, F.M.M., Moraes, D.F.C., Mouchrek Filho, V.E., Andrade, E.H.A., Maia, J.G.S., 2013. Molluscicidal and larvicidal activities and essential oil composition of *Cymbopogon winterianus*. *Pharm. Biol.* 51, 1293–1297. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.789536>
- Rowe, R., Sheskey, P., Quinn, M., 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6th ed, Nutrition: Science, Issues, and Applications: Volume 1-2. Pharmaceutical Press e

American Pharmacist Association, Londres.

- Sánchez-González, L., Cháfer, M., Hernández, M., Chiralt, A., González-Martínez, C., 2011. Antimicrobial activity of polysaccharide films containing essential oils. *Food Control* 22, 1302–1310. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.02.004>
- Sarenqimuge, S., Koopmann, B., von Tiedemann, A., 2025. Long-term survival of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia and *Verticillium longisporum* microsclerotia in soil and the effects of soil depth, soil temperature, and a biocontrol agent. *Appl. Soil Ecol.* 210, 106101. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2025.106101>
- Saty, P., Murray, B.L., McFeeters, R.L., Setzer, W.N., 2016. Essential oil characterization of *thymus vulgaris* from various geographical locations. *Foods* 5, 1–12. <https://doi.org/10.3390/foods5040070>
- Scariot, F.J., Foresti, L., Delamare, A.P.L., Echeverrigaray, A.P.L.S., 2020. Activity of monoterpenoids on the in vitro growth of two *Colletotrichum* species and the mode of action on *C. acutatum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 170, 104698. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104698>
- Senanayake, I.C., Pem, D., Rathnayaka, A.R., Wijesinghe, S.N., Tibpromma, S., Wanasinghe, D.N., Phookamsak, R., Kularathnage, N.D., Gomdola, D., Harishchandra, D., Dissanayake, L.S., Xiang, M. mei, Ekanayaka, A.H., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D., Zhang, H. xing, Xie, N., 2022. Predicting global numbers of teleomorphic ascomycetes. *Fungal Divers.* 114, 237–278. <https://doi.org/10.1007/s13225-022-00498-w>
- Shang, Y., Hasan, M.K., Ahammed, G.J., Li, M., Yin, H., Zhou, J., 2019. Applications of Nanotechnology in Plant Growth and Crop Protection: A Review. *Molecules* 24, 2558. <https://doi.org/10.3390/molecules24142558>
- Shiwakoti, S., Zheljzkov, V.D., Schlegel, V., Cantrell, C.L., 2016. Growing spearmint, thyme, oregano, and rosemary in Northern Wyoming using plastic tunnels. *Ind. Crops Prod.* 94, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.036>
- Siepmann, J., Siepmann, F., 2012. Modeling of diffusion controlled drug delivery. *J. Control. Release* 161, 351–362. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.10.006>
- Silvestre, A.J.D., Cavaleiro, J.A.S., Delmond, B., Filliatre, C., Bourgeois, G., 1997. Analysis of the variation of the essential oil composition of *Eucalyptus globulus* Labill. from Portugal using multivariate statistical analysis. *Ind. Crops Prod.* 6, 27–33. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(96\)00200-2](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(96)00200-2)
- Souza, A.C., Goto, G.E.O., Mainardi, J.A., Coelho, A.C.V., Tadini, C.C., 2013. Cassava starch

- composite films incorporated with cinnamon essential oil: Antimicrobial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. *LWT - Food Sci. Technol.* 54, 346–352. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.017>
- Tópor, A., Veras, F.F., Cacciatore, F.A., Silveira, R.D., da Silva Malheiros, P., Welke, J.E., 2024. Carvacrol nanocapsules as a new antifungal strategy: Characterization and evaluation against fungi important for grape quality and to control the synthesis of ochratoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 416, 110659. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110659>
- Twoorkoski, T., 2002. Herbicide effects of essential oils. *Weed Sci.* 50, 425–431. [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2002\)050\[0425:heoeo\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2002)050[0425:heoeo]2.0.co;2)
- UNEP, 2021. Food Waste Index Report 2021, Unep Food Waste Index Report 2021.
- USDA, 2024. United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service Turkey's Mandarin Production and Exports to Rebound 1–12.
- Venzon, M., Rosado, M.C., Fadini, M.A.M., Ciociola, A.I., Pallini, A., 2005. The potential of NeemAzal for the control of coffee leaf pests. *Crop Prot.* 24, 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2004.07.008>
- Venzon, M., Rosado, M.C., Molina-Rugama, A.J., Duarte, V.S., Dias, R., Pallini, A., 2008. Acaricidal efficacy of neem against *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (Acari: Tarsonemidae). *Crop Prot.* 27, 869–872. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.10.001>
- Vicenço, C.B., Silvestre, W.P., Lima, T.S., Pauletti, G.F., 2021. Insecticidal activity of *Cinnamomum camphora* Ness and Eberm var. *linaloolifera* Fujita leaf essential oil and linalool against *Anticarsia gemmatalis*. *J. Essent. Oil Res.* 33, 601–609. <https://doi.org/10.1080/10412905.2021.1937353>
- Wang, Y., Ye, A., Hou, Y., Jin, Y., Xu, X., Han, J., Liu, W., 2022. Microcapsule delivery systems of functional ingredients in infant formulae: Research progress, technology, and feasible application of liposomes. *Trends Food Sci. Technol.* 119, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.016>
- Weir, B.S., Johnston, P.R., Damm, U., 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud. Mycol.* 73, 115–180. <https://doi.org/10.3114/sim0011>
- Weisany, W., Yousefi, S., Tahir, N.A., Golestanehzadeh, N., McClements, D.J., Adhikari, B., Ghasemlou, M., 2022. Targeted delivery and controlled released of essential oils using nanoencapsulation: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* 303, 102655. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102655>

- Wijayawardene, N., 2020. Outline of Fungi and fungus-like taxa. *Mycosphere* 11, 1060–1456. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/11/1/8>
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Van Kan, J.A.L., 2007. *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.* 8, 561–580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
- 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>
- Yuan, T., Hua, Y., Zhang, D., Yang, C., Lai, Y., Li, M., Ding, S., Li, S., Chen, Y., 2024. Efficacy and Antifungal Mechanism of Rosemary Essential Oil against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Forests* 15. <https://doi.org/10.3390/f15020377>