

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

**GABRIELA ANTONIOLI**

**Desenvolvimento de nanocápsulas de poli(ácido láctico) contendo óleo essencial de  
capim-limão e avaliação contra fungos fitopatogênicos**

**CAXIAS DO SUL**

**2019**

**GABRIELA ANTONIOLI**

**Desenvolvimento de nanocápsulas de poli(ácido lático) contendo óleo essencial de capim-limão e avaliação contra fungos fitopatogênicos**

Dissertação 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 Mestre em Biotecnologia, sob orientação do Professor Dr. Thiago Barcellos da Silva e coorientação do Professor Dr. Gabriel Fernandes Pauletti.

**CAXIAS DO SUL**

**2019**

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

A635d Antonioli, Gabriela

Desenvolvimento de nanocápsulas de poli(ácido láctico) contendo  
óleo essencial de capim-limão e avaliação contra fungos fitopatogênicos  
/ Gabriela Antonioli. – 2019.

80 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa  
de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.

Orientação: Thiago Barcellos da Silva.

Coorientação: Gabriel Fernandes Pauletti.

1. Fungos fitopatogênicos. 2. Maça. 3. Fitopatologia. I. Silva, Thiago  
Barcellos da, orient. II. Pauletti, Gabriel Fernandes, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 632.4

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

**GABRIELA ANTONIOLI**

**Desenvolvimento de nanocápsulas de poli(ácido láctico) contendo óleo essencial de capim-limão e avaliação contra fungos fitopatogênicos**

Dissertação 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 Mestre em Biotecnologia, sob orientação do Professor Dr. Thiago Barcellos da Silva e coorientação do Professor Dr. Gabriel Fernandes Pauletti.

Dissertação aprovada em 01 de novembro de 2019.

---

Prof. Dr. Thiago Barcellos da Silva (Orientador)

---

Prof. Dr. Gabriel Fernandes Pauletti (Coorientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Joséli Schwambach (Banca Examinadora)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Raffin Pohlmann (Banca Examinadora)

---

Dr<sup>a</sup>. Maria Beatriz da Rocha Veleirinho (Banca Examinadora)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Universidade de Caxias do Sul, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia por possibilitarem a realização dessa pesquisa e, também, a CAPES, pela concessão de minha bolsa de mestrado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço também meu orientador, Professor Thiago Barcellos, por todas as oportunidades e pelo conhecimento que compartilhou comigo. Agradeço também pela confiança que depositou em mim para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Gostaria de agradecer ao meu coorientador Professor Gabriel Pauletti e aos Professores Sérgio Echeverrigaray e Joséli Schwambach, os quais participaram da banca de acompanhamento e cujo auxílio foi indispensável para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço, ainda, a todos os colegas do Laboratório de Biotecnologia de Produtos Naturais e Sintéticos pelo auxílio e apoio diários, bem como os alunos de estágio que auxiliaram o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço também, os demais colegas da Universidade de Caxias do Sul que colaboraram para a realização dos ensaios necessários para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Agradeço a empresa Cargill pelo fornecimento do poli(ácido lático) empregado na síntese das nanocápsulas obtidas no presente estudo.

Por fim, gostaria de agradecer minha família, em especial meus pais, Lorena e Sabino, por me incentivarem e possibilitarem meu estudo e, também, minha irmã Daiane pelo apoio e parceria. Agradeço ainda, ao Felipe pelo amor, incentivo e paciência.

## RESUMO

A produção agrícola brasileira atingiu 226,5 milhões de toneladas em 2018, sendo Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul os estados responsáveis pela maior parte da produção do país. Dentre os desafios da produção agrícola está o controle de doenças causadas por fitopatógenos como, por exemplo, o *Colletotrichum gloeosporioides* e o *Colletotrichum acutatum*. Esses fungos são os causadores das doenças conhecidas como podridão da uva madura e antracnose, as quais são geralmente controladas com fungicidas contendo piraclostrobin, metiram e tetraconazol. No entanto, alimentos livres de agroquímicos são uma demanda crescente da sociedade mundial. Isso passa a exigir, principalmente da comunidade científica, ações para um controle eficiente e seguro das fitopatologias. Os óleos essenciais, os quais são produtos do metabolismo secundário de plantas, apresentam propriedades antifúngicas e são vistos como uma alternativa aos fungicidas comerciais. Porém, os óleos essenciais são altamente voláteis e fotodegradáveis, o que inibe a sua ação a longo prazo. Assim, esse trabalho objetivou o desenvolvimento de nanocápsulas de PLA contendo óleo essencial de capim-limão (NCs-PLA-OECL), com o propósito de liberação gradual do óleo. O óleo essencial foi caracterizado por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) e índice de refração antes do desenvolvimento das nanocápsulas, empregando a técnica de nanoprecipitação de polímero pré-formado. Os efeitos da concentração de surfactantes (Tween 80 e Span 60) e do óleo essencial foram avaliados utilizando um planejamento fatorial  $2^3$ , sendo o diâmetro médio (MD), o potencial zeta (ZP) e a eficiência de encapsulação (EE) os fatores de resposta. Após determinar a melhor condição de síntese, as nanocápsulas foram adicionalmente caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura, análise termogravimétrica e infravermelho com transformada de Fourier. A ação fungicida das nanocápsulas foi avaliada frente a ensaio de germinação dos conídios dos fungos *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* e, na modalidade *in vivo*, em maçãs na presença de *C. gloeosporioides*. A metodologia otimizada levou a EE de 99,8%, com MD de 96,4 nm e ZP de -25,2 mV. A concentração inibitória mínima (MIC) para as duas espécies avaliadas na presença de óleo essencial encapsulado foi de 0,1% v/v. O ensaio pós-colheita com maçãs mostrou que o óleo essencial encapsulado apresentava diâmetros de lesão até três vezes menores do que as maçãs tratadas com óleo essencial não-encapsulado e do controle (inoculado).

**Palavras-chave:** *Colletotrichum gloeosporioides*, maçãs, controle alternativo, doenças pós-colheita.

## ABSTRACT

Brazilian agricultural production reached 226.5 million tons in 2018, being Mato Grosso, Paraná and Rio Grande do Sul the states responsible for the major amount of the country's production. Among the challenges of agricultural production is the control of diseases caused by phytopathogens, such as, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum*. These fungi are responsible for the diseases known as ripe rot on grapes and anthracnose, usually controlled with fungicides containing pyraclostrobin + metiram and tetraconazole. Nevertheless pesticides-free foods are a growing demand of population. That requires, especially from the scientific community, actions for an efficient and safe control of the phytopathologies. Essential oils, which are products from plants secondary metabolism, show antifungal properties and are seen as an alternative for commercial fungicides. However, essential oils are volatile and photodegradable, inhibiting their activity in long-term. Thus, this work aimed to develop PLA nanocapsules with a lemongrass essential oil core (LG-PLA-NCs), with the purpose of gradual essential oil liberation. The essential oil was characterized by gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) and refraction index before the development of nanocapsules by nanoprecipitation of preformed polymer. The effects of the amount of the surfactants (Tween 80 and Span 60) and essential oil were evaluated using a 2<sup>3</sup> factorial design and the mean diameter (MD), zeta potential (ZP) and encapsulation efficiency (EE) as responses. After determining the best synthesis condition, the nanocapsules were additionally characterized by scanning electron microscopy, thermogravimetric analysis and Fourier-transform infrared spectroscopy. The nanocapsules antifungal activity was evaluated based on a spore germination assay for *C. gloeosporioides* and *C. acutatum*. It was also performed an assay, *in vivo*, in apples for *C. gloeosporioides*. The optimized methodology led to 99.8% EE, with a MD of 96.4 nm and ZP of -25.2 mV. The minimum inhibitory concentration (MIC) for both evaluated species in presence of the encapsulated essential oil was 0.1% v/v. The postharvest assay with apples displayed that encapsulated essential oil presented lesion diameters up to three times smaller than apples treated with non-encapsulated essential oil.

**Key – words:** *Colletotrichum gloeosporioides*, apples, alternative control, postharvest diseases.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem de uma planta de capim-limão ( <i>Cymbopogon citratus</i> ).....	19
Figura 2 – Estrutura química do citral: isômeros neral e geranial.....	19
Figura 3 - Síntese química do citral a partir do formaldeído.....	20
Figura 4 – Morfologias possíveis para as cápsulas: A) mononuclear, B) polinuclear e C) matriz.....	22
Figura 5 – Obtenção do poli(ácido lático) (PLA) a partir do ácido lático.....	25
Figura 6 – Representação do ciclo vital (fase assexual e fase sexual) de um fungo ascomiceto. .....	29
Figura 7 – Lesões causadas por <i>C. acutatum</i> na cultura do morango. ....	31
Figura 8 – Lesões causadas por <i>C. gloeosporioides</i> em diferentes frutos e folhas. ....	32
Figura 9 - Representação da metodologia empregada para a obtenção das nanocápsulas. ....	37
Figura 10 – Perfil cromatográfico do óleo essencial de capim-limão obtido por cromatografia à gás (GC-MS).....	44
Figura 11 – Espectro de massas de baixa resolução para o neral. ....	45
Figura 12 – Espectro de massas de baixa resolução para o geranial. ....	46
Figura 13 - Compostos identificados no óleo essencial de capim-limão. ....	48
Figura 14 – Variação mássica durante o teste de inchamento do poli(ácido lático) em presença de óleo essencial de capim-limão. ....	49
Figura 15 - 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) F1, B) F2, C) F3, D) F4, E) F5, F) F6, G) F7 e H) F8. ....	51
Figura 16 – Valores de Potencial Zeta para as diferentes formulações de nanocápsulas.....	52
Figura 17 – Curva analítica obtida através de HPLC que relaciona concentração de citral com absorbância e seus respectivos cromatogramas.....	53
Figura 18 - Gráficos pareto relacionando os efeitos dos fatores (Span 60, Tween 80, OE) nas variáveis dependentes: A) diâmetro médio (nm), B) potencial zeta (mV) e eficiência de encapsulação (%). ....	56
Figura 19 – Imagens das nanocápsulas de poli(ácido lático) contendo óleo essencial de capim-limão, com magnificação de 20.000 vezes, obtidas por meio de: A) Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo. B) Microscopia eletrônica de transmissão de varredura.....	58

Figura 20 – Espectro de FTIR das nanocápsulas de poliácido láctico contendo óleo essencial de capim-limão (NCs-PLA-OECL), do óleo essencial de capim-limão (OECL) e do poli(ácido láctico) (PLA).....	60
Figura 21 – Análise termogravimétrica (TGA) para: A) Análise termogravimétrica (TGA). B) Derivada dos dados de TGA (DTG).....	61
Figura 22 - Ensaio de estabilidade das nanocápsulas. A) Distribuição dos diâmetros após 0, 30, 60 e 90 dias. B) Imagem das nanocápsulas obtida por MEV-FEG (com magnificação de 50.000 vezes) após aproximadamente seis meses de armazenamento. ....	62
Figura 23 - Atividade antifúngica <i>in vitro</i> por teste de germinação de conídios para o óleo essencial de capim-limão encapsulado com poli(ácido láctico) e não-encapsulado contra: A) <i>Colletotrichum acutatum</i> e B) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . ....	63
Figura 24 - Tratamento pós-colheita preventivo <i>in vivo</i> contra <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em maçãs tratadas com óleo essencial de capim-limão encapsulado e não-encapsulado. A) Dados do diâmetro da lesão para maçãs da variedade Gala inoculadas com conídios de <i>C. gloeosporioides</i> . B) Imagens obtidas para maçãs utilizadas para os testes <i>in vivo</i> após dez dias de incubação.....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Planejamento fatorial $2^3$ para a formulação das nanocápsulas de PLA contendo óleo essencial de capim-limão. ....	37
Tabela 2 - Compostos identificados no óleo essencial de capim-limão através de cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas e posterior cálculo do índice de retenção linear. ....	47
Tabela 3 - Planejamento fatorial $2^3$ para a formulação de nanocápsulas contendo óleo essencial de capim-limão (OE) e os resultados obtidos para diâmetro médio (MD), potencial zeta (ZP) e eficiência de encapsulação (EE). ....	54
Tabela 4 - Efeitos estimados e valores de p para as variáveis dependentes estudadas (diâmetro médio, potencial zeta e eficiência de encapsulação). ....	55

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Metodologias para formulação de nanocápsulas.....	23
Quadro 2 - Referências bibliográficas que sintetizam nanocápsulas de diferentes materiais encapsulantes e núcleos a partir de métodos de encapsulação distintos e suas características.....	27

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1	OBJETIVO GERAL .....	13
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
2.1	PERSPECTIVAS PARA A AGRICULTURA: AGRICULTURA SUSTENTÁVEL .....	15
<b>2.1.1</b>	<b>Defensivos agrícolas de origem natural</b> .....	<b>16</b>
2.1.1.1	Óleos essenciais e o óleo essencial de capim-limão .....	17
2.2	NANOCÁPSULAS E TÉCNICAS DE ENCAPSULAÇÃO .....	20
<b>2.2.1</b>	<b>Nanoprecipitação</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Poli(ácido láctico) (PLA)</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Nanocápsulas na agricultura</b> .....	<b>26</b>
2.3	FUNGOS FITOPATOGÊNICOS .....	28
<b>2.3.1</b>	<b><i>Colletotrichum sp.</i></b> .....	<b>30</b>
2.3.1.1	<i>Colletotrichum acutatum</i> .....	30
2.3.1.2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	32
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
3.1	MATERIAIS .....	34
3.2	MÉTODOS .....	34
<b>3.2.1</b>	<b>Obtenção e caracterização do óleo essencial de capim-limão</b> .....	<b>34</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Teste de inchamento</b> .....	<b>36</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Otimização da síntese das nanocápsulas de PLA contendo óleo essencial de capim-limão</b> .....	<b>36</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Metodologia otimizada para síntese das nanocápsulas</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo e microscopia eletrônica de transmissão de varredura</b> .....	<b>40</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) ....</b>	<b>40</b>
<b>3.2.7</b>	<b>Análise termogravimétrica (TGA)</b> .....	<b>41</b>
<b>3.2.8</b>	<b>Ensaio de estabilidade das nanocápsulas</b> .....	<b>41</b>
<b>3.2.9</b>	<b>Avaliação da atividade antifúngica</b> .....	<b>42</b>
3.2.9.1	Identificação dos isolados fúngicos e obtenção de conídios .....	42
3.2.9.2	Ensaio antifúngico <i>in vitro</i> : avaliação de germinação de conídios .....	42
3.2.9.3	Ensaio antifúngico <i>in vivo</i> : atividade em maçãs .....	43
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>44</b>

4.1	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO .....	44
4.2	TESTE DE INCHAMENTO .....	48
4.3	OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE NANOCÁPSULAS DE POLIÁCIDO LÁCTICO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO .....	50
4.4	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS OBTIDAS A PARTIR DA METODOLOGIA OTIMIZADA .....	57
4.4.1	<b>Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo e microscopia eletrônica de transmissão.....</b>	<b>57</b>
4.4.2	<b>Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....</b>	<b>59</b>
4.4.3	<b>Estabilidade térmica das nanocápsulas .....</b>	<b>60</b>
4.4.4	<b>Ensaio de estabilidade das nanocápsulas armazenadas .....</b>	<b>61</b>
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA .....	63
4.5.1	<b>Teste de germinação de conídios para <i>Colletotrichum acutatum</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....</b>	<b>63</b>
4.5.2	<b>Avaliação da atividade <i>in vivo</i> em maçãs.....</b>	<b>64</b>
5	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os fungos fitopatogênicos são um grupo de microrganismos que causam perdas significativas na agricultura, podendo atingir todas as partes da planta e até sobreviver no solo. Além das doenças causadas na planta viva, os fungos fitopatogênicos causam um enorme impacto econômico, considerando a deterioração pós-colheita de frutas e legumes. A deterioração dos tecidos, a infecção e a propagação de fungos reduzem o prazo de validade, a qualidade e o valor de mercado das frutas (MARI; BAUTISTA-BAÑOS; SIVAKUMAR, 2016; GONZÁLEZ-ESTRADA *et al.*, 2017).

O controle desses fitopatógenos requer o uso de produtos químicos, os quais estão principalmente associados a danos ambientais e à saúde (BARROS, 2016). Por outro lado, seu controle é necessário para garantir a sanidade das plantas e dos alimentos.

Estimativas mostram que as perdas causadas por pragas de plantas podem atingir até 40% da produção global de alimentos e representar um prejuízo econômico superior a 220 bilhões de dólares por ano. Por esse motivo, as Nações Unidas proclamaram 2020 como o Ano Internacional da Fitossanidade (UNITED NATIONS, 2018). Associados a essa ideia, os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável das Nações Unidas entre 2015 e 2030 incluem a erradicação da fome e o consumo e produção responsáveis (UNITED NATIONS, 2015).

Dessa forma, métodos alternativos de controle de fitopatógenos estão sendo considerados. Entre eles, o uso de óleos essenciais está crescendo por serem produtos naturais, biodegradáveis, ecológicos, econômicos e seguros (SIVAKUMAR; BAUTISTA-BAÑOS, 2014).

Apesar de uma variedade de óleos essenciais já terem demonstrado propriedades contra fitopatógenos, o desafio é garantir a viabilidade econômica desses produtos. O capim-limão é uma planta que apresenta boa adaptabilidade de solo e clima, especialmente em locais com solos bem drenados e alta exposição à luz solar (TAJIDIN *et al.*, 2012). Também pode ser colhido entre 4 a 6 meses após o cultivo e, após, em intervalos de 2-3 meses, mostrando ainda bom rendimento de óleo essencial, 1-2% de massa seca (CARLSON *et al.*, 2001; JOY *et al.*, 2006).

Associado a essas características, o óleo essencial de capim-limão e outros óleos essenciais ricos em citral são conhecidos por suas características que permitem seu uso como pesticidas naturais, incluindo ação antifúngica já identificada para vários microrganismos (SILVA *et al.*, 2008; MOHAN *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2012; TOMAZONI *et al.*, 2017).

No entanto, os óleos essenciais são formados por compostos voláteis, uma característica que dificulta sua aplicação e viabilidade econômica.

Assim, a encapsulação desses produtos naturais visa promover sua persistência por tempo suficiente para causar a morte ou o controle de pragas (FORIM *et al.*, 2013). A técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado é utilizada para obter cápsulas em escala nanométrica, que apresentam maior atividade contra fitopatógenos, sendo nanocápsulas partículas poliméricas vesiculares menores que 1  $\mu\text{m}$  (um micrômetro) compostas por um núcleo oleoso recoberto por uma parede fina de polímero, geralmente estabilizada por surfactantes ou agentes estéricos (BECK; GUTERRES; POHLMANN, 2011).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de nanocápsulas de poli(ácido láctico) (PLA) contendo óleo essencial de capim-limão, sua caracterização e também a avaliação de sua atividade *in vitro* contra os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* e avaliação da atividade *in vivo* pós-colheita contra *C. gloeosporioides* em maçãs.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de nanocápsulas de poli(ácido láctico) (PLA) contendo óleo essencial de capim-limão e avaliação no controle de fitopatógenos.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desse trabalho serão:

- a) Identificar e quantificar os compostos presentes no óleo essencial de capim-limão por meio de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia a gás com detector por ionização de chama (GC-FID);
- b) Determinar a melhor metodologia para obtenção das nanocápsulas de poli(ácido láctico), contendo óleo essencial de capim-limão, por meio da técnica de nanoprecipitação do polímero pré-formado;
- c) Identificar os valores de diâmetro médio das nanocápsulas por espalhamento de luz dinâmico (DLS), potencial zeta (ZP) e a eficiência de encapsulação (EE) por cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC);

- d) Caracterizar as nanocápsulas, obtidas por meio da metodologia otimizada, por microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo (MEV-FEG), microscopia eletrônica de varredura por transmissão (STEM), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (TGA);
- e) Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* das nanocápsulas sintetizadas no combate a fungos fitopatogênicos por meio do ensaio de germinação de conídios e *in vivo*, pós-colheita, por meio da avaliação do diâmetro de lesão causado pelo crescimento do fungo em maçãs frente aos diferentes tratamentos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Com o intuito de desenvolver nanocápsulas de poli(ácido lático) contendo óleo essencial de capim-limão e realizar sua avaliação no controle de fitopatógenos, se torna necessária revisão bibliográfica sobre os conceitos de agricultura sustentável, nanocápsulas, técnicas de encapsulação e fungos fitopatogênicos. Ainda, serão revistas definições e trabalhos anteriores presentes na literatura referentes a óleos essenciais, poli(ácido lático) e a aplicação de nanocápsulas na agricultura.

### 2.1 PERSPECTIVAS PARA A AGRICULTURA: AGRICULTURA SUSTENTÁVEL

A agricultura enfrenta o desafio de aumentar sua capacidade produtiva em 70% para suprir a demanda de alimentos e biocombustíveis que o crescimento populacional acarretará até 2050 (FAO, 2009). Nesse cenário, o Brasil é classificado como superpotência agropecuária, pois o agronegócio, direta e indiretamente, representa quase um quarto do produto interno bruto (PIB) brasileiro. Apesar dos dados parecerem animadores, 33% da extensão territorial brasileira é ocupada pelo agronegócio e, em 2016, o setor agropecuário foi responsável por 74% das emissões de gases poluentes do país (RAJÃO; RITTL, 2018).

Na área da fruticultura, o Brasil é o terceiro maior produtor de frutas no mundo, atrás apenas de China e Índia, e estima-se que sejam produzidas 45 milhões de toneladas ao ano, sendo que 65% são consumidas pelo mercado interno e 35% destinadas ao mercado externo, valores que devem aumentar devido à maior demanda de frutas pela população em geral (EMBRAPA, 2018; GLOBO RURAL, 2018).

Associado ao aumento da demanda por alimentos, a população tem exigido cada vez mais práticas produtivas sustentáveis. Assim, algumas ações são necessárias para garantir que a prática agrícola seja produtiva, de baixo impacto ambiental, economicamente viável e que gere bem-estar social. Como alternativa, a agricultura sustentável é capaz de entregar alimentos de igual ou superior carga nutricional com o benefício de apresentar baixos níveis, ou até inexistentes, de resíduos de pesticidas e causando menor impacto ambiental (REGANOLD; WACHTER, 2016).

Nesse contexto, insumos químicos, tais como fertilizantes e pesticidas, apesar de serem, geralmente, vantajosos em termos de aumento de rendimento da produção e combate a pragas, acabam gerando consequências indesejáveis à saúde humana e ao meio ambiente. Pesticidas e

fertilizantes certificados como orgânicos já existem no mercado, mas ainda apresentam desvantagens, como elevado custo, eficiência reduzida e a necessidade de ações adicionais (UC DIVISION OF AGRICULTURE AND NATURAL RESOURCES, 2017).

### **2.1.1 Defensivos agrícolas de origem natural**

A legislação brasileira classifica produtos registrados que possuem em sua composição apenas insumos permitidos pela legislação de orgânicos como “produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica”. Para esses produtos é previsto um processo de registro simplificado a fim de agilizar o procedimento e disponibilizar o produto ao mercado em menor período de tempo (MAPA, 2016).

A Instrução Normativa N° 17, de 18 de junho de 2014, traz a relação de substâncias e práticas permitidas para manejo, controle de pragas e doenças nos vegetais e tratamentos pós-colheita nos sistemas orgânicos de produção (MAPA, 2014). Dentre os produtos relacionados, pode-se destacar a presença de óleos essenciais e ácidos naturais.

O uso de produtos naturais como pesticidas apresenta diversas vantagens, incluindo tempo de meia-vida reduzido, por serem moléculas encontradas na natureza e de fácil degradação, uso de extratos que diminuem o risco de desenvolvimento de resistência em comparação a princípios ativos isolados e moléculas com pouca/inexistente presença de halogênios, o que reduz o impacto ambiental (DUKE *et al.*, 2002; EMBRAPA, 2016).

Como metodologias alternativas ao uso de agroquímicos, o controle biológico ainda é o mais empregado no combate às pragas e doenças. Entretanto, alguns produtos já estão sendo desenvolvidos utilizando produtos naturais com o intuito de combater, principalmente, fungos e insetos.

Dentre os produtos naturais mais empregados, os óleos costumam ser utilizados como fungicidas, caso do óleo de nim (Triology™) e dos óleos essenciais de alecrim (Sporan™) e tomilho (Promax™) (EMBRAPA, 2016).

Óleos essenciais também estão sendo utilizados para o desenvolvimento de formulações que visam o combate do crescimento de plantas daninhas, ou seja, atuando como herbicidas. Dentre os produtos disponíveis comercialmente estão o GreenMatch EX™, que possui 50% de óleo essencial de capim-limão, o Matran II™ com 46% de óleo essencial de cravo-da-índia, e o Weed Zap™ com 30% de óleo essencial de cravo-da-índia/canela (DAYAN; CANTRELL; DUKE, 2009). No entanto, esses produtos ainda não são

comercializados no Brasil.

Ainda, óleos essenciais como o de alecrim, tomilho e cravo-da-índia são utilizados como inseticidas, assim como a capsaicina, oriunda de pimentas vermelhas. Um exemplo de produto comercial é o Ecotrol® CE que atua como inseticida/acaricida e possui óleo essencial de alecrim e de hortelã-pimenta em sua composição (EMBRAPA, 2016).

Um estudo avaliou o produto Ecotrol®, com 10% de óleo essencial de alecrim, utilizando a dose recomendada pelo fabricante (7,5 ml/L) em tomateiros sob casa de vegetação. O estudo concluiu que a aplicação do pesticida resultou em supressão de  $52 \pm 16\%$  da população de ácaros rajados (*Tetranychus urticae*). No entanto, os autores discutem que as condições ambientais, como temperatura e luz, podem acelerar a degradação e a volatilização do óleo essencial (MIRESMAILLI; ISMAN, 2006).

Outro produto natural utilizado como fungicida é o aldeído cinâmico, o qual pode ser extraído da casca da caneleira ou das sementes de *Senna obtusifolia*, uma leguminosa daninha. O aldeído cinâmico atua inibindo a síntese de quitina nas células dos fungos, o que o torna um potencial fungicida, visto que a quitina é um dos componentes majoritários da parede celular dos fungos. Nesse caso, a concentração do aldeído cinâmico que induz metade do efeito máximo ( $IC_{50}$ ) foi definida como 1,44 mmol/L (BANG *et al.*, 2000; EMBRAPA, 2016).

Um trabalho também relatou a utilização de taninos provenientes de acácia-negra no combate a fusariose (*Fusarium subglutinans*). Em testes *in vitro*, os autores do trabalho observaram a redução do crescimento micelial do fungo com 5% de taninos de acácia-negra adicionados ao meio de cultura. Após, os autores realizaram testes *in vivo* e relataram a redução da ocorrência de fusariose do abacaxizeiro de 25,77% do tratamento testemunha para 8,62% para o tratamento com taninos (CARVALHO *et al.*, 2002).

Assim, é possível observar que diversos produtos naturais são utilizados no combate a fungos, insetos e plantas daninhas, demonstrando inclusive o potencial de melhoria das ações para eles descritas, tais como proteção contra fotodegradação e volatilização.

#### 2.1.1.1 Óleos essenciais e o óleo essencial de capim-limão

Óleos essenciais são produtos ou misturas de produtos, que são formados no citoplasma e estão, normalmente, presentes na forma de pequenas gotas entre as células. Além disso, eles são voláteis e compostos de misturas de substâncias com fragrâncias ou, ainda, algumas

inodoras (TUREK; STINTZING, 2013; RÍOS, 2016).

Os óleos essenciais normalmente são formados como metabólitos secundários. Eles podem ser formados em todas as partes da planta, incluindo partes aéreas (flores, folhas e pedúnculos), casca, frutos, sementes e, também, em suas raízes e rizomas. O papel dos óleos essenciais na planta varia, podendo ser utilizados para polinização, como mecanismo de defesa, repelente ou irritante. Outras possibilidades são seu papel antioxidante (doam hidrogênio em reações de oxidação) ou, ainda, antifúngicos e antibacterianos, protegendo as plantas de fitopatógenos (EVANS, 2009; RÍOS, 2016).

Diversos óleos essenciais já demonstraram atividade antimicrobiana como, por exemplo, aqueles provenientes de alho, canela, tomilho, orégano, cravo, manjeriço, eucaliptos, pimentas, entre outros (SOLIMAN *et al.*, 2013). As propriedades antimicrobianas desses óleos essenciais são devidas à presença de alguns compostos, como: terpenos alifáticos, éteres e hidrocarbonetos de terpenos aromáticos (MOREIRA, 2014).

No entanto, apesar de a temperatura de ebulição dos compostos presentes em óleos essenciais ser geralmente elevada, podendo chegar a 300 °C, eles possuem pressão de vapor elevada. Então, apesar das altas temperaturas de ebulição, a elevada pressão de vapor faz com que os óleos essenciais sejam voláteis (LUCIA *et al.*, 2009).

A encapsulação dos óleos essenciais permite evitar a instabilidade química criada pelo ar, luz, altas temperaturas e umidade, sendo esses os fatores responsáveis pela rápida degradação e evaporação dos princípios ativos (MOREIRA, 2014).

De acordo com Azambuja (2009), o óleo essencial de diversas plantas como, por exemplo, capim-limão (*Cymbopogon citratus*) é rico em citral (Figura 1). O capim-limão é uma planta aromática perene que possui boa adaptação em diferentes solos e condições climáticas (TAJIDIN *et al.*, 2012). A primeira colheita de material vegetal normalmente é realizada entre quatro e seis meses após o plantio e as colheitas subsequentes em intervalos de dois a três meses (JOY *et al.*, 2006). Devido a esses fatores de boa adaptação climática e facilidade de cultivo, aliado ao bom rendimento em óleo essencial, entre 1 e 2% em base seca, o capim-limão é comumente utilizado para a obtenção de óleo essencial rico em citral (CARLSON *et al.*, 2001).

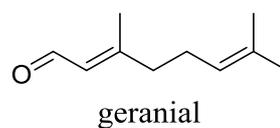
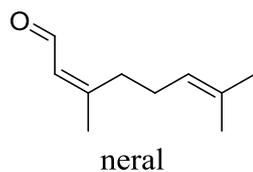
Figura 1 – Imagem de uma planta de capim-limão (*Cymbopogon citratus*).



Fonte: a autora (2019).

O termo citral refere-se à mistura dos estereoisômeros neral e geranial (Figura 2), e estes aldeídos são os constituintes majoritários do óleo essencial de capim-limão, chegando a representar 70% do total dos constituintes presentes no óleo. O citral é um conhecido agente fungitóxico, ligando-se ao ergosterol (um componente da membrana celular dos fungos), causando a desestabilização e morte desses microrganismos (AZAMBUJA, 2009). Porém, outros compostos foram relatados por possuir atividade inibitória como, por exemplo, o ácido gerânico (MASUDA *et al.*, 2008). Outros compostos comumente relatados na literatura como principais constituintes são o mirceno (monoterpeno) e o geraniol (álcool terpênico) que reforçam seu potencial agrícola e farmacêutico (NEGRELLE; GOMES, 2007).

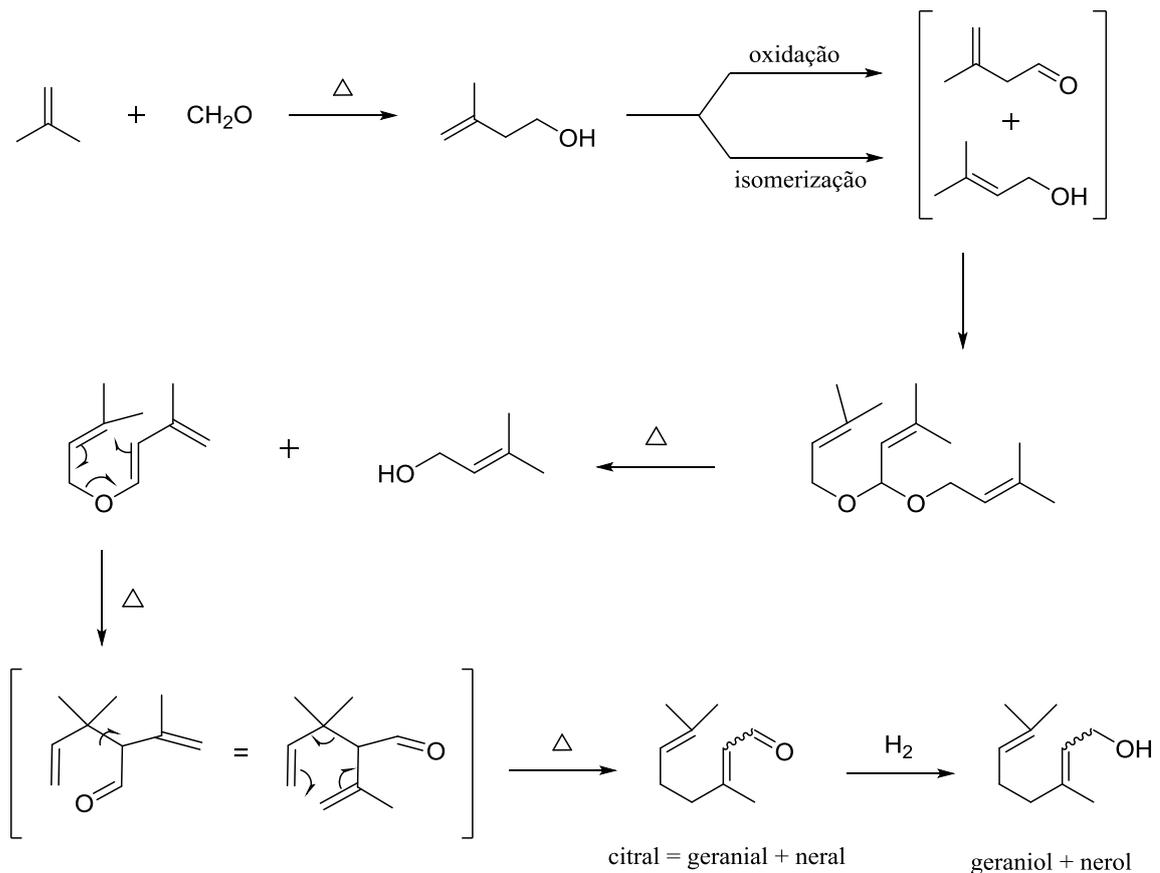
Figura 2 – Estrutura química do citral: isômeros neral e geranial.



Fonte: a autora (2019).

O citral, além de sua ocorrência natural, é obtido industrialmente a partir da reação do isobuteno com o formaldeído, conforme representado na Figura 3. No entanto, nesse caso, o citral é geralmente empregado como um bloco de construção para a síntese da Vitamina A (PARKER; SMITH; BAXENDALE, 2016).

Figura 3 - Síntese química do citral a partir do formaldeído.



Fonte: adaptado de Azambuja (2009).

## 2.2 NANOCÁPSULAS E TÉCNICAS DE ENCAPSULAÇÃO

Com o intuito de sanar os problemas enfrentados a campo com a utilização de produtos naturais (degradação e volatilização), a técnica de encapsulação é vista como uma alternativa. Além de proteger compostos voláteis e fotodegradáveis, a encapsulação também permite o aumento da absorção do princípio ativo (RANJAN; DASGUPTA; LICHTFOUSE, 2016).

A encapsulação é uma técnica biomimética, ou seja, desenvolvida a partir da

observação da natureza. Exemplos de encapsulação naturais que se apresentam na escala macroscópica são os ovos das aves e as sementes de plantas. Já na escala microscópica, temos as células e seus constituintes (GHOSH, 2006). Em escala nanométrica, os capsídeos virais são recipientes nanométricos que encapsulam o genoma de um hospedeiro, transportando-o e liberando-o na célula de outro hospedeiro (ROOS *et al.*, 2007).

A encapsulação é considerada o processo de envolvimento de um sólido, líquido ou gás em uma membrana inerte, normalmente de material polimérico (MOREIRA, 2014). Essa técnica é utilizada com o intuito de proteção, controle de liberação e compatibilidade do produto envolvido, sendo que a membrana inerte é responsável por isolar e proteger o princípio ativo do ambiente externo (GHOSH, 2006).

A principal vantagem observada a partir da micro e nanoencapsulação é a elevada área superficial, a qual é decorrente da obtenção das cápsulas em escala reduzida, facilitando os processos de adsorção e dessorção, reações químicas, dispersão de luz, entre outros (DUBEY; SHAMI; BHASKER RAO, 2009).

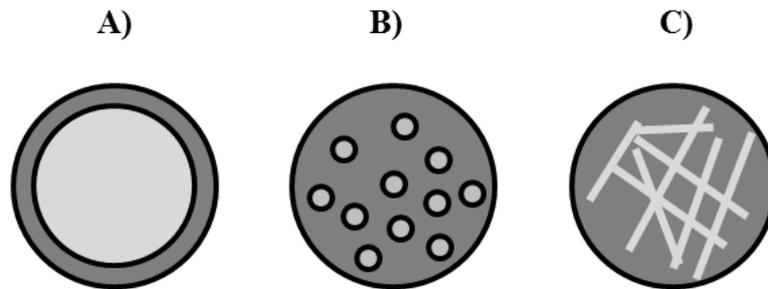
Entretanto, Dubey, Shami e Bhasker Rao (2009), ainda elencam outras razões para realizar a encapsulação, tais como:

- a) Separação de compostos incompatíveis;
- b) A estabilidade do princípio ativo encapsulado, promovendo a proteção deste contra a luz, umidade e calor;
- c) A diminuição da volatilidade, limitando a perda do princípio ativo;
- d) Liberação controlada do princípio ativo contido no interior da cápsula;
- e) Eliminação de sabor, odor ou cor indesejados do princípio ativo.

As nanocápsulas podem ter diâmetro de até 1000 nm, porém normalmente são obtidas na faixa compreendida entre 100 e 500 nm (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Elas podem ser definidas como sistemas vesiculares que possuem um núcleo, lipofílico ou hidrofóbico, recoberto por uma membrana polimérica (MARCATO; DURÁN, 2008; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Usualmente, o princípio ativo está dissolvido no núcleo da cápsula, mas também pode estar adsorvida a membrana (KHOEE; YAGHOUBIAN, 2009). No caso de uma cápsula mononuclear, ela possui apenas um núcleo que está envolvido pela membrana, uma cápsula polinuclear possui vários núcleos de tamanhos distintos envoltos pela mesma membrana e uma cápsula matriz possui o princípio ativo integrado na matriz do material de parede (DUBEY; SHAMI; BHASKER RAO, 2009). A representação da morfologia dos diferentes tipos de cápsulas pode ser vista na Figura 4.

Figura 4 – Morfologias possíveis para as cápsulas: A) mononuclear, B) polinuclear e C) matriz.



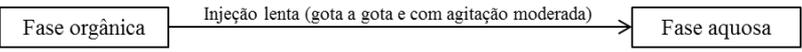
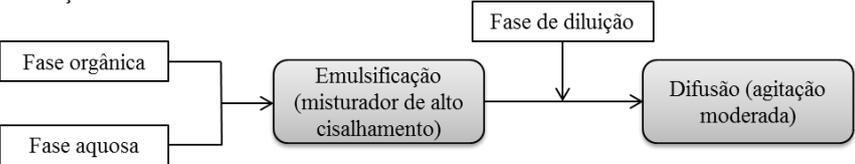
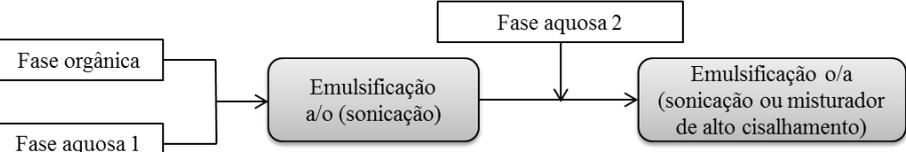
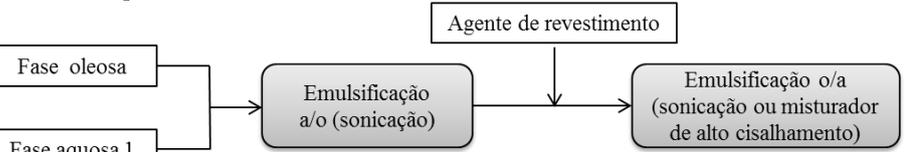
Fonte: adaptado de Moreira (2014).

A morfologia das nanocápsulas pode ser influenciada pela metodologia de síntese empregada. A seleção do método de encapsulação depende das propriedades físico-químicas tanto da substância ativa a ser encapsulada quanto do material utilizado como encapsulante, além da aplicação das cápsulas, o mecanismo de liberação e o tamanho desejados (BRASILEIRO, 2011).

Entre as técnicas de nanoencapsulação mais utilizadas estão: deslocamento de solvente, emulsificação-difusão, emulsificação-coacervação, dupla emulsificação e revestimento de polímero. Uma representação de cada uma das metodologias citada pode ser vista no Quadro 1.

Dentre as metodologias, a nanoprecipitação tem se mostrado bastante promissora em diversos trabalhos. Ainda, a utilização de poliésteres, como o poli(ácido lático), é vantajosa devido às propriedades de biocompatibilidade e biodegradação.

Quadro 1 - Metodologias para formulação de nanocápsulas.

Formulação das Nanocápsulas	Concentração, purificação e estabilização das nanocápsulas
<p><b>Nanoprecipitação</b></p> 	
<p><b>Emulsificação – difusão</b></p> 	<p>Eliminação de solventes (agitação magnética moderada, evaporação a vácuo, ultrafiltração tangencial).</p>
<p><b>Emulsificação – coacervação</b></p> 	<p>Purificação (lavagem com água, filtração 0,45 µm, filtração em gel)</p>
<p><b>Dupla emulsificação</b></p> 	<p>Recuperação (ultracentrifugação)</p>
<p><b>Revestimento de polímero</b></p> 	<p>Estabilização (<i>Spray-drying</i>, liofilização)</p>

Fonte: adaptado de Mora-Huertas; Fessi; Elaissari (2010).

### 2.2.1 Nanoprecipitação

A nanoprecipitação, também conhecida como técnica por deslocamento de solvente ou deposição interfacial de polímero pré-formado é amplamente empregada para a obtenção de nanocápsulas poliméricas, sobretudo contendo princípios ativos utilizados como fármacos (GUTERRES *et al.*, 2000; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Essa metodologia de obtenção consiste na preparação de duas fases, uma chamada de solúvel e outra chamada não-solúvel (solubilidade em relação ao material encapsulante). A

fase solúvel é formada por um solvente ou mistura de solventes, um material encapsulante (normalmente polimérico), o princípio ativo de interesse e um tensoativo lipofílico. Já a fase não-solúvel é constituída por um solvente ou mistura de solventes em que o material encapsulante não é solúvel e um surfactante (FESSI; PUISIEUX; DEVISSAGUET, 1988).

Frequentemente a fase solúvel é descrita como fase orgânica e a fase não-solúvel como fase aquosa. Entretanto, Mora-Huertas, Fessi e Elaissari (2010) destacaram que apesar de essa ser a tendência, existem casos em que ambas as fases podem ser constituídas por solventes orgânicos, ou ainda, ambas serem fases aquosas, dependendo apenas da solubilidade do princípio ativo e do material encapsulante.

Essa metodologia permite a obtenção instantânea de nanocápsulas monodispersas, é reprodutível e pode ser facilmente adaptada à escala industrial (MILADI *et al.*, 2014).

A técnica de nanoprecipitação envolve duas etapas: dissolução do polímero em um solvente, e a posterior adição dessa fase em um não-solvente que seja miscível com o solvente previamente empregado. Essa segunda etapa leva à formação espontânea das nanopartículas (nanoesferas ou nanocápsulas).

Um sistema monodisperso, determinado pela distribuição do tamanho das partículas obtidas, é influenciado por um processo complexo que inclui as taxas de nucleação das partículas, crescimento molecular e agregação (LINCE; MARCHISIO; BARRESI, 2008). Essas taxas são diretamente influenciadas pelo polímero utilizado e dentre os mais utilizados estão os poliésteres biodegradáveis, como poli(caprolactona) (PCL), poli(ácido láctico) (PLA) e poli(ácido láctico)-*co*-glicólico (PLGA) (RAO; GECKELER, 2011).

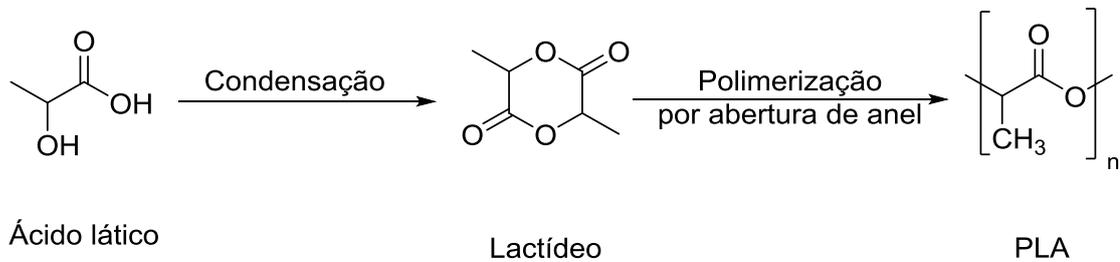
### **2.2.2 Poli(ácido láctico) (PLA)**

Para a escolha do material encapsulante, um importante critério é a compatibilidade com o núcleo. Ele não deve reagir com o princípio ativo, sendo capaz de formar uma membrana ao seu redor. A abundância de polímeros, de origem natural ou sintética, aliada às suas características de permeabilidade (permeáveis, semipermeáveis ou impermeáveis) fazem deles importantes candidatos a materiais para as membranas de cápsulas (MARTINS, 2012; MOREIRA, 2014).

Os poliésteres são usualmente utilizados para a formulação das nanocápsulas por serem biocompatíveis e biodegradáveis. Neste contexto, o poli(ácido láctico) (PLA) de baixa massa molecular é particularmente interessante, devido a sua biodegradação mais rápida

(HIRSJÄRVI *et al.*, 2006). O PLA é um poliéster alifático sintético obtido por meio da polimerização por abertura do anel do lactídeo, utilizando octoato de estanho como catalisador e na presença de calor (Figura 5) (GUPTA; KUMAR, 2007; MARTINS, 2012).

Figura 5 – Obtenção do poli(ácido láctico) (PLA) a partir do ácido láctico.



Fonte: a autora (2019).

O PLA, além de possuir elevada capacidade de liberação controlada, também apresenta-se como um material utilizado em embalagens de alimentos (TAWAKKAL *et al.*, 2014), o que reforça a ideia de ser um bom candidato como material de parede para a encapsulação de óleos essenciais e fármacos.

Na literatura, alguns trabalhos relatam a aplicação do PLA como material de parede em nanocápsulas, especialmente com aplicação farmacêutica, como é o caso do estudo de Guterres *et al.* (2000) que obteve nanocápsulas de PLA contendo indometacina, um importante fármaco utilizado como anti-inflamatório. Entretanto, essa síntese utilizou *spray-dryer* para a obtenção das nanocápsulas e a natureza do princípio ativo fez necessário o uso de uma base oleosa (benzoato de benzila) para que a encapsulação ocorresse.

Chang, Yu e Powanda (2003) revelaram a síntese de nanocápsulas de poli(ácido láctico), a fim de encapsular agentes terapêuticos, incluindo macromoléculas. O procedimento apresentado demonstra algumas desvantagens, como a necessidade de banho de ultrassom e etanol para o preparo da fase orgânica e a necessidade de resfriar a 4 °C a solução resultante da união da fase orgânica e fase aquosa. Além disso, o documento não prevê a aplicação das nanocápsulas obtidas para o controle de fitopatógenos.

Liakos *et al.* (2016) relata a síntese de nanocápsulas de PLA contendo óleo essencial de capim-limão. Apesar da síntese descrita não necessitar do uso de tensoativos, é necessário submeter as cápsulas a um fluxo de nitrogênio por duas horas e o diâmetro médio obtido com a metodologia relatada é de 300 nm. O estudo descreve apenas as propriedades antimicrobianas das nanocápsulas obtidas contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25324, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 10231, não reportando sua aplicação contra fungos fitopatogênicos.

### 2.2.3 Nanocápsulas na agricultura

A utilização de nanocápsulas para a produção agrícola tem crescido junto à tendência de substituir produtos químicos por naturais. Isso ocorre porque os produtos naturais, apesar de possuírem atividade contra pragas, normalmente são sensíveis à luz, umidade, temperaturas elevadas e meios com valores de pH extremos. Assim, a encapsulação desses produtos naturais visa promover a persistência deles por tempo suficiente para que causem a morte ou controle da praga (FORIM *et al.*, 2013). O Quadro 2 apresenta um comparativo entre publicações da área em relação aos materiais utilizados e resultados obtidos.

Oliveira *et al.* (2018b) sintetizaram nanocápsulas de zeína, uma proteína encontrada no milho, contendo geraniol e citronelal, empregando o método de precipitação antisolvente, e sua atividade repelente foi avaliada contra o ácaro-rajado (*Tetranychus urticae*). Neste estudo, os autores reportaram que a encapsulação dos princípios ativos reduziu sua toxicidade e que as nanopartículas apresentaram elevada atividade repelente, sendo uma alternativa para proteger o princípio ativo da degradação prematura sem prejuízo a sua eficácia no controle da praga. Nesse trabalho, apenas a atividade inseticida das nanocápsulas foi avaliada.

Em outro estudo, Oliveira *et al.* (2018a) sintetizaram nanocápsulas de quitosana-goma arábica contendo geraniol e avaliaram o efeito biológico em moscas brancas (*Bemisia tabaci*). A encapsulação foi capaz de proteger o geraniol da degradação pela radiação UV e o princípio ativo foi capaz de atrair a praga em questão. No entanto, a síntese empregada descreve o uso de rotor-estator cisalhante a 10.000 rpm (com o auxílio de UltraTurrax). Além de relatar, novamente, a atuação dessas nanocápsulas apenas como inseticida, no combate à mosca branca.

Outro estudo utilizou o óleo essencial de alho (todos os compostos nele presentes) e o encapsulou com polietileno glicol (PEG), empregando o método de dispersão por fusão. Após, testaram sua atividade no controle de *Tribolium castaneum* (besouro castanho) e comprovaram que, após cinco meses, as nanocápsulas apresentaram eficiência de 80% no controle da praga, contra apenas 11% do óleo não-encapsulado (YANG *et al.*, 2009). Apesar do bom resultado no controle da praga, esse estudo também relatou apenas sua atividade inseticida. Além disso, o óleo essencial de alho possui baixo rendimento de extração, o que

poderia inviabilizar a utilização das cápsulas desenvolvidas comercialmente.

Quadro 2 - Referências bibliográficas que sintetizam nanocápsulas de diferentes materiais encapsulantes e núcleos a partir de métodos de encapsulação distintos e suas características.

#	Material encapsulante	Princípio ativo	Método de encapsulação	Diâmetro médio (nm)
1	Zeína	Geraniol/citronelal	Precipitação antisolvente	150 - 200 nm
2	Quitosana-goma arábica	Geraniol	-	140 - 750 nm
3	Policaprolactona	Extrato de nim (Azadirachta indica)	Spray-dryer	177 - 245 nm
4	Polietileno glicol	Óleo essencial de alho	Dispersão por fusão	< 240 nm
5	Sílica	Fipronil	Emulsão e biomimética de modelo duplo	8 - 44 nm

#	Potencial zeta (mV)	Eficiência de encapsulação (%)	Atividade biológica	Referência
1	-12,8 a -20,2 mV	> 90 %	Ácaros ( <i>Tetranychus urticae</i> )	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2018b)
2	-22 a 36 mV	> 90%	Moscas brancas ( <i>Bemisia tabaci</i> )	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2018a)
3	-25,2 a -36,8 mV	> 98%	Traças ( <i>Plutella xylostella</i> )	(FORIM <i>et al.</i> , 2013)
4	-	80%	Besouro castanho ( <i>Tribolium castaneum</i> )	(YANG <i>et al.</i> , 2009)
5	-	73%	Cupins (i.e., <i>Coptotermes acinaciformis</i> )	(WIBOWO <i>et al.</i> , 2014)

Fonte: a autora (2019).

Em contrapartida, Wibowo *et al.* (2014) encapsularam um inseticida químico de amplo espectro já conhecido, o fipronil, utilizando sílica como material encapsulante. Esse estudo comprovou que as nanocápsulas de sílica contendo fipronil foram capazes de manter sua eficácia causando a morte de 100% dos cupins por seis dias, contra três dias do produto

comercial Termidor®. Nesse caso, o fipronil é um inseticida que não se enquadra nos princípios desejados para a agricultura sustentável.

Forim *et al.* (2013) obtiveram nanocápsulas de poli(caprolactona) contendo extrato de nim (*Azadirachta indica*) e avaliaram sua atividade no combate a traças (*Plutella xylostella*) obtendo 100% da morte das larvas com sua melhor formulação. Nesse caso, as nanocápsulas foram obtidas por *spray-dryer*, um equipamento de maior custo e a aplicação demonstrada, também, foi inseticida.

Dessa forma, é possível observar que produtos naturais são mais comumente nanoencapsulados e que os métodos mais empregados são químicos em detrimento dos físicos. As nanocápsulas, em sua grande maioria, são empregadas no controle de insetos, havendo poucos relatos para outros tipos de pragas.

Também, é possível verificar que para nanocápsulas de materiais encapsulantes orgânicos o potencial zeta, em média, ficou próximo de -20 mV e a eficiência de encapsulação apresentou valores elevados, sempre acima de 70% (Quadro 2).

### 2.3 FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Os fungos são microrganismos de elevada importância ecológica e econômica, porém também são o maior e o mais diverso grupo de organismos fitopatogênicos (KRUGNER; BACCHI, 1995; MORANDI *et al.*, 2009).

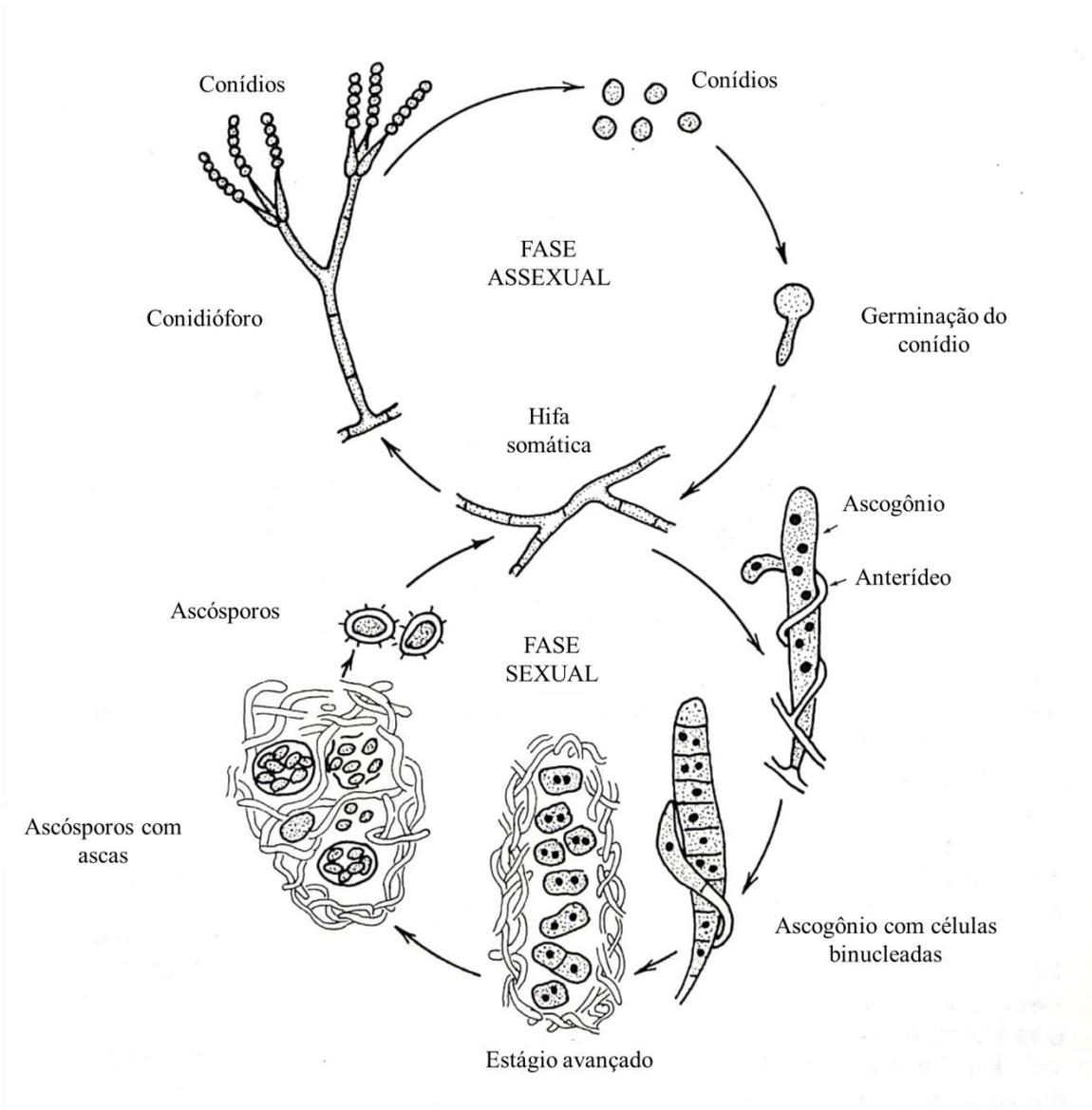
Ainda de acordo com Krugner e Bacchi (1995), fungos possuem como características que os diferenciam dos demais seres vivos serem eucarióticos, heterotróficos, a absorção de nutrientes e a formação de esporos. A presença de núcleo (células eucarióticas) os diferencia das bactérias. O heterotrofismo os diferencia das plantas, pois os fungos necessitam de carbono para sua nutrição. Os fungos absorvem nutrientes e água, normalmente, do substrato em que se encontram através de suas hifas. E os fungos, em sua grande maioria, se reproduzem através de esporos.

Dentre as classes de fungos, os ascomicetos são os mais numerosos e causam diversos tipos de doenças em plantas. Esses fungos são caracterizados pela produção de esporos sexuais de formação endógena (CARDOSO, 1978).

Os ascomicetos possuem estruturas na forma de saco, denominadas de asco no qual são formados os ascósporos após meiose. Os ascósporos são haploides e dão origem às hifas que formam o micélio do fungo (ALEXOPOULOS; MINS; BLACKWELL, 1996).

O ciclo sexual dos ascomicetos se inicia com a plasmogamia. Ocorre a formação de órgãos sexuais distintos sendo o feminino denominado de ascogônio e o masculino denominado de anterídio. Porém, muitos ascomicetos não formam estruturas sexuais e, nesse caso, a plasmogamia ocorre pela fusão de hifas somáticas compatíveis (KRUGNER; BACCHI, 1995).

Figura 6 – Representação do ciclo vital (fase assexual e fase sexual) de um fungo ascomiceto.



Fonte: adaptado de Krugner e Bacchi (1995).

Normalmente, os ascósporos são liberados e se depositam na superfície do hospedeiro, onde germinam e penetram. Após a colonização do hospedeiro, os fungos se reproduzem de forma assexuada, produzindo conídios que serão responsáveis pelos ciclos secundários das doenças causadas. Após diversos ciclos assexuais, ocorre a reprodução sexuada,

normalmente, ocasionada por condições ambientais desfavoráveis ao fungo (KRUGNER; BACCHI, 1995). Os ciclos sexual e assexual estão representados na Figura 6.

### 2.3.1 *Colletotrichum sp.*

A ampla disseminação dos fungos filamentosos do gênero *Colletotrichum*, e seu teleomorfo *Glomerella*, tornam-os importantes objetos de estudo com o intuito de controlar as fitopatologias que causam, dentre elas a antracnose. Esses fungos crescem, especialmente, em regiões tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil (MENEZES, 2006).

Embora a maioria das espécies de *Colletotrichum* compartilhe um comportamento similar, cada espécie tem interações microrganismo-hospedeiro específicas. Além disso, as espécies de *Colletotrichum* podem ser mais ou menos patogênicas, agressivas ou resistentes a fungicidas, o que implica diferenças nas práticas agrícolas e sistemas de controle (ECHEVERRIGARAY et al., 2019).

Nesse contexto, as espécies *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* são de suma importância por sua disseminação e pelos impactos produtivos e, conseqüentemente, econômicos que causam.

#### 2.3.1.1 *Colletotrichum acutatum*

O *Colletotrichum acutatum* é o fungo causador da flor preta em culturas como morango, maçã e citrus. A doença também é conhecida como antracnose e, por ser uma doença de difícil controle, pode causar limitações às culturas acometidas em anos com condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do fungo. Esse fitopatógeno é, usualmente, combatido com agroquímicos a base de carbendazim, tebuconazol, piraclostrobina e mancozebe (AGROLINK, 2019a).

Essa doença acomete diversas partes das plantas, incluindo flores, frutos, pedúnculos, folhas, meristemas apicais e rizoma. Após a infecção, observa-se a necrose dos tecidos acometidos, chegando a necrosar frutos jovens por completo. Normalmente, as lesões amarronzadas incidem na superfície dos frutos e, com presença de alta umidade, podem ser observadas manchas rosadas referentes aos esporos do fitopatógeno. As lesões foliares são de coloração marrom e apresentam aspecto seco, aparecendo nas bordas e expandindo-se para o centro ou, em casos severos, as folhas acometidas apresentam rasgaduras, podendo ser

confundidas com lesões causadas por deficiência de cálcio. A Figura 7 apresenta lesões causadas por *C. acutatum* na cultura do morango (AGROLINK, 2019a).

Alguns trabalhos já reportaram a utilização de produtos naturais no controle de *C. acutatum*. Duduk *et al.* (2015), reportaram a utilização de óleos essenciais no combate à antracnose do morangueiro. Os óleos de tomilho, casca de canela e cravo apresentaram efeito fungistático na concentração de 667  $\mu\text{L/L}$  de meio. Os compostos voláteis preveniram completamente a germinação de conídios do fungo em concentrações de 1,53, 15,3 e 76,5  $\mu\text{L/L}$  de ar para óleo essencial de casca de canela, tomilho e cravo, respectivamente. No entanto, essa volatilização pode indicar que, em uma aplicação a campo, o tratamento seria rapidamente consumido, deixando a planta desprotegida.

Em outro estudo, Almeida, Camargo e Panizzi (2009) descreveram a utilização de extratos de plantas no controle de *C. acutatum*. Avaliando os extratos em frutos do morangueiro, os autores perceberam que aqueles obtidos de plantas de arnica e nim não apresentaram diferença significativa em relação à testemunha. Por outro lado, os extratos de losna e alho apresentaram controle superior a 90%, em relação à incidência do fitopatógeno.

Esses trabalhos demonstraram a possibilidade de substituir os fungicidas químicos por outros à base de produtos naturais, porém ainda é necessário solucionar algumas questões, como a rápida volatilidade dos compostos de óleos essenciais.

Figura 7 – Lesões causadas por *C. acutatum* na cultura do morango.



Fonte: AGROLINK (2019).

### 2.3.1.2 *Colletotrichum gloeosporioides*

O *Colletotrichum gloeosporioides* é o fungo causador da antracnose em culturas como abacate, alho, caju, caqui, figo, goiaba, mamão, manga, maracujá, melancia, pêssigo e tomate (AGROLINK, 2019b).

A antracnose acomete os frutos ainda na planta ou após a colheita e é mais comum em regiões de verão quente e chuvoso. O início da doença é caracterizado por manchas marrom-avermelhadas nos frutos. Após, pontos escuros e salientes são formados e, por fim, os frutos ficam enrugados e caem (AGROLINK, 2019b). A Figura 8 apresenta a doença em diferentes culturas.

Usualmente, a antracnose causada por *C. gloeosporioides* é tratada com a aplicação de agroquímicos a base de azoxistrobina, mancozebe, tebuconazol e carbendazim (AGROLINK, 2019b).

Alguns trabalhos reportaram o combate ao fungo *C. gloeosporioides* utilizando óleos essenciais. Sefu, Satheesh e Berecha (2015) relataram a utilização dos óleos essenciais de gengibre e canela no combate à antracnose na cultura da manga. Os autores reportaram que em 25 dias as amostras controle apresentaram 100% de incidência da doença enquanto que as tratadas com 0,45% de óleo essencial de gengibre e 0,075% de óleo essencial de canela apresentaram 38,1 e 26,67%, respectivamente.

Figura 8 – Lesões causadas por *C. gloeosporioides* em diferentes frutos e folhas.



Fonte: AGROLINK (2019b).

Siqueira Júnior *et al.* (2012) descreveram a utilização de óleo essencial de mamona

(*Ricinus communis*) no controle de *C. gloeosporioides* e, também, da bactéria *Pseudomonas caricapapayae* na cultura do mamão. No entanto, o óleo essencial de mamona não se mostrou efetivo para o controle de *P. caricapapayae* e, para o controle de *C. gloeosporioides*, a concentração de 1% de óleo também não foi efetiva, sendo necessária a aplicação de uma solução com, no mínimo, 5%. Esse valor é considerado alto para que haja viabilidade na utilização de óleos essenciais no combate às pragas agrícolas. Sellamuthu *et al.* (2013) avaliaram o uso do óleo de citronela e hortelã-pimenta e de tomilho no controle da antracnose na cultura do abacate. Os autores obtiveram redução de 100% de incidência de antracnose no controle para 8,3% após 4 dias e 13,9% após 6 dias utilizando uma concentração de 66,7 µL/L. Apesar de o percentual de óleo utilizado ser baixo, o período comprovado de proteção contra a doença foi muito curto.

Dessa forma, apesar de haver estudos sobre o controle do fungo causador da antracnose utilizando óleos essenciais, ainda existem pontos de melhoria para o desenvolvimento de tratamentos futuros.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Com o intuito de obter nanocápsulas de poli(ácido lático) contendo óleo essencial de capim-limão, que possam ser empregadas no controle de fitopatógenos, é necessário o uso de materiais e métodos para a síntese. Os insumos empregados para a produção das nanocápsulas (núcleo e parede) e os procedimentos experimentais para a síntese e caracterização estão listados a seguir. Ainda, os procedimentos empregados para avaliar o desempenho das nanocápsulas no controle *in vitro* e *in vivo* de fungos fitopatogênicos são relatados nessa seção.

#### 3.1 MATERIAIS

Os reagentes obtidos comercialmente foram utilizados sem prévia purificação. A acetona P.A. foi adquirida da empresa Dinâmica, o polisorbato 80 (Tween 80) da empresa InLab, o monoestearato de sorbitano (Span 60) da Sigma-Aldrich e a acetonitrila foi utilizada em grau HPLC adquirida da Merck.

O poli(ácido lático) (PLA) utilizado foi o Ingeo Biopolymer 4060D da NatureWorks, lote FA1328B131, fabricado em 24 de fevereiro de 2017 e fornecido para o projeto pela empresa Cargill.

#### 3.2 MÉTODOS

##### 3.2.1 Obtenção e caracterização do óleo essencial de capim-limão

O óleo essencial de capim-limão foi extraído no Laboratório de Estudos do Sistema Solo, Planta, Atmosfera e Metabolismo Vegetal (LESSPA), da Universidade de Caxias do Sul. A extração foi realizada por arraste a vapor a partir de material vegetal seco proveniente de plantas cultivadas na Área Experimental de Fazenda Souza da Universidade de Caxias do Sul (29°08'28.9"S 50°59'29.3"W).

O óleo essencial foi caracterizado na Central de Análises do Instituto de Biotecnologia (CAIB) da Universidade de Caxias do Sul por cromatografia a gás com detector por ionização de chama (GC-FID), cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS),

índice de refração (RI) e densidade relativa.

As análises por GC-FID foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu 2010 Plus, utilizando-se de uma coluna HP-Innowax (30 m x 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 a 3 °C/min, 180-230 °C a 20 °C/min, 230 °C (10 min); temperatura de injetor 250 °C; split ratio 1:50, detector de ionização de chama com temperatura de 250 °C; gás de arraste H<sub>2</sub> (34 kPa), volume injetado 1 µL diluído em hexano (1:10) (SANTOS *et al.*, 2009).

As análises por GC-MS foram realizadas em um cromatógrafo Hewlett Packard 6890, equipado com um detector seletivo de massas Hewlett Packard 6890/MSD5973, equipado com software HP Chemstation e espectroteca Wiley 275. Foi utilizada uma coluna capilar HP-Innowax (30 m x 250 µm), 0,50 µm espessura de filme (Hewlett Packard, Palo Alto, USA). O programa de temperatura utilizado foi o mesmo usado no GC-FID: interface 280 °C; split ratio 1:100; gás de arraste He (56 kPa); razão de fluxo: 1,0 mL/min.; energia de ionização 70 eV; volume injetado 1 µL diluído em hexano (1:10) (SANTOS *et al.*, 2009).

A identificação química dos constituintes do óleo essencial foi obtida pela comparação dos respectivos espectros de massa com aqueles da biblioteca Willey (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 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).

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

Sendo:

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

t<sub>R(x)</sub> - tempo de retenção do composto desconhecido (x);

t<sub>R(n)</sub> - tempo de retenção do alcano linear menos retido pela fase estacionária do que o composto x;

t<sub>R(n+1)</sub> - 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.

Como análises complementares para a caracterização do óleo essencial de capim-limão, a densidade relativa foi medida diretamente em um densímetro portátil, modelo DMA-35n da marca Anton Paar, utilizando o óleo essencial puro a 20 °C. E a leitura do índice de refração foi feita em um refratômetro digital ABBE, modelo Quartz da marca CETI, também utilizando o óleo puro a 20 °C.

### 3.2.2 Teste de inchamento

Inicialmente, um filme de PLA foi obtido por meio de prensagem em uma prensa hidráulica da marca Shulz, modelo PHS 15t pertencente ao Laboratório de Polímeros da Universidade de Caxias do Sul, mantendo os *pellets* entre duas placas a 100 °C, com 5 toneladas de força de fechamento, 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.

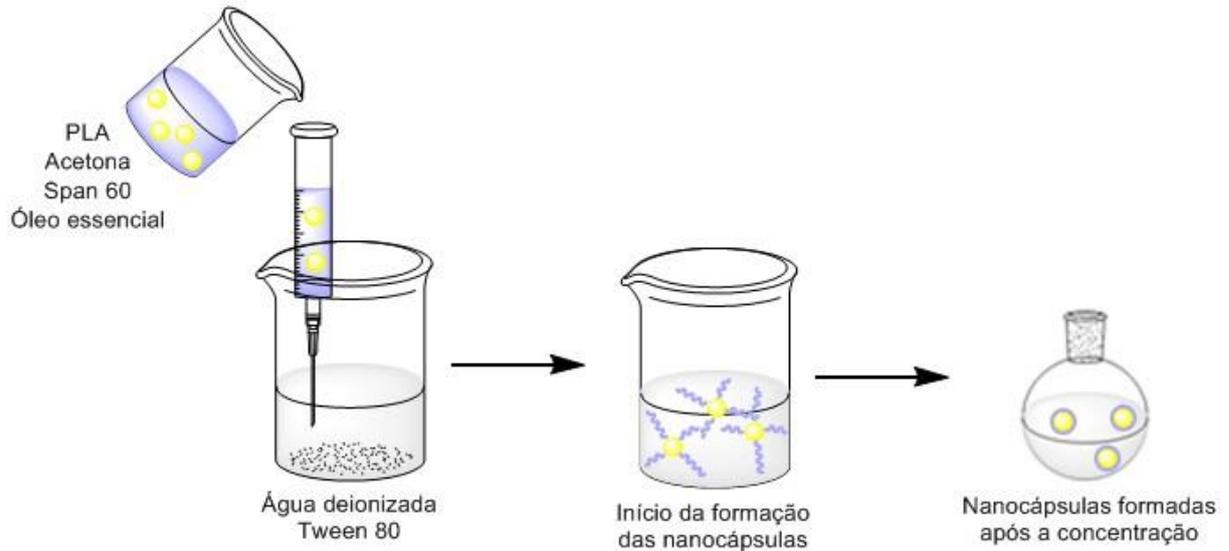
Do filme obtido, foram retiradas pequenas placas com dimensões de 10 mm x 5 mm. Cada uma dessas placas teve a massa previamente determinada e disposta em frasco âmbar junto ao óleo essencial de capim-limão, em quantia suficiente para manter as placas submersas, e mantidos a temperatura ambiente. Em intervalos de tempo pré-determinados (3, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 dias) as placas foram retiradas do óleo essencial, secas com papel absorvente e, então, a massa foi novamente determinada (GUTERRES *et al.*, 2000).

### 3.2.3 Otimização da síntese das nanocápsulas de PLA contendo óleo essencial de capim-limão

A encapsulação do óleo essencial de capim-limão foi realizada por meio da deposição interfacial do polímero pré-formado, adaptando a metodologia previamente descrita por Jäger *et al.* (2009) e Venturini *et al.* (2011). O poli(ácido láctico) (100 mg) e o monoestearato de sorbitano (77 ou 154 mg) foram dissolvidos em acetona (27 mL) a 40 °C e mantidos sob agitação por uma hora. Após, a temperatura foi reduzida, entre 30 e 35 °C, e o óleo essencial de capim-limão foi adicionado, mantendo a mistura resultante sob agitação por mais dez minutos. Essa fase orgânica foi injetada em uma fase aquosa, que havia sido previamente agitada por uma hora a temperatura ambiente, contendo polisorbato 80 (77 ou 154 mg) diluído em água deionizada (53 mL). Após manter mais dez minutos sob agitação, a acetona foi

evaporada e a suspensão foi concentrada sob pressão reduzida em rotaevaporador da marca Buchi, modelo R-210, até que o volume de 10 mL. A representação da obtenção das nanocápsulas pode ser observada na Figura 9.

Figura 9 - Representação da metodologia empregada para a obtenção das nanocápsulas.



Fonte: a autora (2019).

Para otimizar a metodologia foi realizado um planejamento fatorial  $2^3$  (*design of experiments*) com o auxílio do software Minitab 16. Os fatores foram avaliados em dois níveis e os experimentos determinados através do software podem ser observados na Tabela 1, tendo sido realizados em triplicata e de forma aleatória. As variáveis utilizadas como resposta foram o diâmetro médio das cápsulas (MD), potencial zeta (ZP) e a eficiência de encapsulação (EE).

Tabela 1 – Planejamento fatorial  $2^3$  para a formulação das nanocápsulas de PLA contendo óleo essencial de capim-limão.

Formulação	Óleo essencial <sup>1</sup>	Span 60 <sup>2</sup>	Tween 80 <sup>3</sup>
F1	-1	-1	-1
F2	-1	+1	+1
F3	-1	+1	-1
F4	-1	-1	+1
F5	+1	-1	-1
F6	+1	+1	+1
F7	+1	+1	-1
F8	+1	-1	+1

<sup>1</sup>Óleo essencial: -1 = 100 µL; +1 = 200 µL. <sup>2</sup>Span 60: -1 = 77 mg; +1 = 154 mg. <sup>3</sup>Tween 80: -1 = 77 mg; +1 = 154 mg.

Fonte: a autora (2018).

A eficiência de encapsulação foi determinada por HPLC, na CAIB da Universidade de Caxias do Sul, seguindo metodologia adaptada de Oliveira *et al.* (2018), em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (HPLC) da marca HP modelo 1100, equipado com detector UV a 240 nm e sistema quaternário de bombas. A coluna Lichrospher RP<sub>18</sub> (5µm) foi mantida a 30 °C. A análise em fase reversa foi constituída de: solvente A – água Milli-Q e solvente B – Acetonitrila. O sistema de bombeamento da fase móvel foi isocrático com 40% do solvente A e 60% do solvente B durante os 25 minutos de análise e o fluxo padrão foi mantido a 0,5 mL/min. O volume de injeção foi de 5 µL e as amostras foram previamente filtradas em membranas de Nylon de 0,20 µm de diâmetro de poro.

A linearidade foi determinada por meio da curva analítica (gráfico de calibração), a qual foi obtida a partir de um padrão de citral (Sigma-Aldrich, 95%), utilizando concentrações de citral variando de 0,0020 a 0,0625% v/v. A análise de cada ponto da curva foi realizada em triplicata.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados com base no desvio padrão do intercepto com o eixo y ( $\sigma$ ) e da inclinação da curva analítica (S), sendo  $LD = 3,3.\sigma/S$  e  $LQ = 10.\sigma/S$  (ICH, 2005). Ainda, a precisão foi avaliada pelo desvio padrão relativo (RSD) da análise de precisão intermediária, sendo que a precisão intermediária foi obtida a partir da avaliação de três diferentes concentrações injetadas em triplicata em três dias consecutivos (ICH, 2005).

A eficiência de encapsulação foi estimada centrifugando as soluções de cápsulas obtidas a 5.000 rpm por 10 minutos em centrífuga da marca Eppendorf, modelo 5804R. O sobrenadante foi coletado e analisado, em triplicata, sem diluição prévia utilizando a mesma metodologia empregada para a realização da curva de calibração.

O cálculo da eficiência de encapsulação considerou a soma das áreas dos picos do neral e geranial, resultando na área de citral e relacionando essa área total com a curva de calibração. Dessa forma, o percentual de óleo essencial que não foi encapsulado foi determinado, e a eficiência de encapsulação pode ser calculada pela diferença em relação à concentração inicial (equação 2) (ZHANG *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2018b).

$$EE (\%) = \frac{c_i - c_f}{c_i} \cdot 100 \quad (2)$$

Sendo:

$C_i$  – Concentração inicial de óleo essencial na formulação de nanocápsulas;

$C_f$  – Concentração final de óleo essencial que não foi encapsulado durante a síntese das nanocápsulas.

As análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foram realizadas no Laboratório de Polímeros (LPOL) da Universidade de Caxias do Sul, em um equipamento Nanoflex<sup>®</sup> - 180° DLS Size, da marca Particle Metrix. As soluções de cápsulas foram previamente diluídas em água deionizada (1:10) e o diâmetro médio das nanocápsulas e distribuição de tamanhos foram determinados com base na intensidade da luz espalhada. Foram utilizados como parâmetros o índice de refração de 1,465 (MEREDITH; AMIS, 2000; POLYMER PROPERTIES DATABASE, 2015), geometria esférica e 90 segundos de tempo de análise, sendo, previamente, realizada a leitura do branco (água deionizada). Os dados obtidos durante o ensaio foram adquiridos no software Microtrac Flex v.11.0.0.4.

Os ensaios para determinar o potencial zeta (ZP) das nanocápsulas, também, foram realizados no LPOL, em um equipamento STABINO<sup>®</sup> - Particle Mapping, modelo PMX400, da marca Particle Metrix. As soluções de nanocápsulas foram previamente diluídas em água deionizada (1:10) e cada amostra foi analisada durante 100 segundos. Os dados obtidos durante o ensaio foram adquiridos no software Stabino Control v. 2.00.27.02.

### **3.2.4 Metodologia otimizada para síntese das nanocápsulas**

A síntese das nanocápsulas empregadas nos estudos subsequentes, e preparadas seguindo as condições otimizadas de acordo com a formulação F1 (Tabela 1), foi realizada dissolvendo 100 mg de poli(ácido láctico) e 77 mg de monoestearato de sorbitano em 27 mL de acetona a 40 °C e mantidos sob agitação por uma hora. Após, a temperatura foi reduzida, entre 30 e 35 °C, e 100 µL do óleo essencial de capim-limão foram adicionados, mantendo a mistura resultante sob agitação por mais dez minutos. Essa fase orgânica foi injetada em uma fase aquosa, que havia sido previamente agitada por uma hora à temperatura ambiente, contendo 77 mg de polisorbato 80 diluído em 53 mL de água deionizada. Após manter mais dez minutos sob agitação, a acetona foi evaporada e a suspensão foi concentrada sob pressão reduzida até que o conteúdo final de óleo na suspensão de cápsulas fosse de 1% v/v (10 mL). As cápsulas obtidas por meio dessa metodologia foram empregadas para realizar os demais testes de caracterização das nanocápsulas e, também, os testes biológicos.

### 3.2.5 Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo e microscopia eletrônica de transmissão de varredura

A morfologia das nanocápsulas foi avaliada por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo (FEG-SEM) e, também, por microscopia eletrônica de transmissão de varredura (STEM). Ambas as análises foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Prof. Israel Baumvol, da Universidade de Caxias do Sul, utilizando um equipamento MEV-FEG de alta performance com um emissor Schottky de alto brilho da Marca Tescan, modelo MIRA3.

Para as imagens obtidas por MEV-FEG, as amostras foram previamente preparadas a partir da centrifugação da suspensão de nanocápsulas a 5.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e, com a massa de nanocápsulas resultante, foi realizado um esfregão sob uma pequena lamínula de vidro que foi presa ao *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.

Já as imagens obtidas por STEM foram preparadas de acordo com metodologias previamente descritas por Jäger *et al.* (2009) e Grillo *et al.* (2012) com algumas modificações. Utilizou-se uma grade com filme de carbono sobre 400 *mesh* quadrados de cobre, da marca EMS-Electron Microscopy Sciences, modelo CF400-CU. A suspensão de nanocápsulas foi diluída em água deionizada em uma proporção de 1:50. Em seguida, cerca de 10 µL dessa suspensão foram gotejados sobre a grade, esperou-se cerca de 2 minutos e o excesso foi absorvido utilizando papel filtro. Após, adicionou-se cerca de 10 µL de uma solução aquosa de acetato de uranila a 2% e, após mais dois minutos, o excesso foi novamente absorvido. Após, a grade foi disposta em dessecador por 24 horas antes de realizar a análise. As imagens obtidas através de STEM utilizaram magnificações entre 20.000 e 50.000 vezes.

### 3.2.6 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O PLA, o óleo essencial de capim-limão e as nanocápsulas de PLA contendo óleo essencial de capim-limão foram analisados por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). O óleo essencial foi analisado sem prévia preparação, o polímero foi analisado utilizando parte do filme obtido para o teste de inchamento. Por sua vez, as nanocápsulas foram previamente centrifugadas a 5.000 rpm, por 10 minutos, e o

material resultante foi deixado secar protegido da luz antes de ser submetido ao ensaio de FTIR.

Os ensaios foram conduzidos em um equipamento da marca Perkin Elmer, modelo Spectrum 400, equipado com um detector de refletância total atenuada (ATR) da Pike Technologies GladiATR. Os dados foram coletados no software Spectrum V.6.3.5.0176.

O espectro de *background* (branco) foi obtido com o cristal de diamante limpo e vazio, com 64 *scans*. Os espectros das amostras, por sua vez, foram obtidos com 32 *scans*. Todos os espectros foram obtidos utilizando resolução de  $0,5 \text{ cm}^{-1}$  na faixa entre  $4.000$  e  $400 \text{ cm}^{-1}$  (GRILLO *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2018a).

### **3.2.7 Análise termogravimétrica (TGA)**

O óleo essencial de capim-limão, o poli(ácido lático) e as nanocápsulas de PLA contendo óleo essencial de capim-limão foram analisados em um equipamento da marca Shimadzu, modelo TGA-50, no Laboratório de Polímeros (LPOL) da Universidade de Caxias do Sul.

As amostras foram aquecidas de 10 a  $810 \text{ }^\circ\text{C}$ , com uma taxa de aquecimento de  $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  com fluxo de  $50 \text{ mL}/\text{min}$  de nitrogênio ( $\text{N}_2$ ), de acordo com a metodologia empregada por Brambilla (2013).

### **3.2.8 Ensaio de estabilidade das nanocápsulas**

As nanocápsulas de poli(ácido lático) contendo óleo essencial de capim-limão foram armazenadas a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ , protegidas da luz em tubos fechados. A distribuição do tamanho das nanocápsulas foi determinada logo após a síntese e, também, após 30, 60 e 90 dias de armazenamento por DLS, utilizando a mesma metodologia descrita na seção 3.2.3.

Após aproximadamente 6 meses de armazenamento, a morfologia das nanocápsulas também foi verificada por MEV-FEG, empregando uma magnificação de 50.000 vezes.

### 3.2.9 Avaliação da atividade antifúngica

#### 3.2.9.1 Identificação dos isolados fúngicos e obtenção de conídios

Para a identificação de isolados fúngicos de *Colletotrichum acutatum* (44/17) e *Colletotrichum gloeosporioides* (A21/17), foi realizada extração de DNA, onde um fragmento da região ITS foi amplificado por PCR, posteriormente sequenciado e comparado com sequências depositadas no GenBank (ECHEVERRIGARAY *et al.*, 2019).

Para obter os conídios de fungos utilizados nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, placas de BDA (batata dextrose ágar) inoculadas com *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* foram mantidas a 28 °C durante 7 dias com fotoperíodo de 12 horas. Após 7 dias, as placas foram lavadas com água destilada esterilizada e o conteúdo resultante foi filtrado para separar os conídios dos micélios fúngicos. Os conídios fúngicos foram quantificados na câmara de Neubauer.

#### 3.2.9.2 Ensaio antifúngico *in vitro*: avaliação de germinação de conídios

O efeito de sete concentrações de óleo essencial de capim-limão encapsulado e não-encapsulado (0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,013 e 0,006% v/v) no controle de *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* foi avaliado por meio de teste em placa de 96 orifícios, conduzido em duplicata e contendo como controle uma solução aquosa 0,4% m/v de Tween 80. Foram adicionados 90 µL de cada diluição aos poços de teste mais 10 µL de uma suspensão de conídios fúngicos ( $1 \times 10^5$  conídios/mL). Um grupo controle usando os mesmos tratamentos, mas na ausência da adição de conídios fúngicos, também foi realizado em duplicata. A placa foi incubada a 28 °C por 48 horas, com fotoperíodo de 12 horas, para posterior avaliação da germinação dos conídios.

A absorbância foi lida a 620 nm, utilizando um leitor de microplacas, para determinar a porcentagem de germinação de conídios. Essa porcentagem foi determinada com base na diferença entre os valores médios obtidos para cada tratamento com e sem a adição de conídios fúngicos.

Ainda, a germinação de conídios foi verificada microscopicamente para confirmar os dados espectrofotométricos.

### 3.2.9.3 Ensaio antifúngico *in vivo*: atividade em maçãs

A atividade antifúngica do óleo essencial de capim-limão encapsulado e não-encapsulado foi avaliada em maçãs como tratamento preventivo contra *C. gloeosporioides*. Utilizou-se a MIC e outra concentração correspondente a duas vezes a MIC, mais um controle negativo de solução aquosa de Tween 80 a 0,4% m/v e um controle positivo (apenas conídios fúngicos).

Maçãs da variedade gala foram adquiridas em supermercado local, higienizadas com soluções de etanol 70% e hipoclorito de sódio 0,5% v/v e, finalmente, lavadas com água esterilizada. Para cada tratamento foram utilizadas dez maçãs. Lesões com aproximadamente 2 mm de comprimento e 1 mm de profundidade foram feitas usando um bisturi e 10 µL do tratamento foram aplicados em cada lesão (exceto para controle positivo) com o auxílio de micropipeta, seguidos por 10 µL de uma suspensão de conídios fúngicos  $1 \times 10^6$  conídios/mL (exceto para controle negativo).

As maçãs foram colocadas em caixas plásticas e mantidas a 24 °C com 95% de umidade relativa por 10 dias. Após 5, 7 e 10 dias, os diâmetros das lesões foram determinados (duas avaliações perpendiculares).

Os dados foram analisados por ANOVA e as médias foram separadas pelo teste de Tukey. O limiar para significância estatística foi estabelecido em  $p < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas no software SPSS versão 22.0 para Windows.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

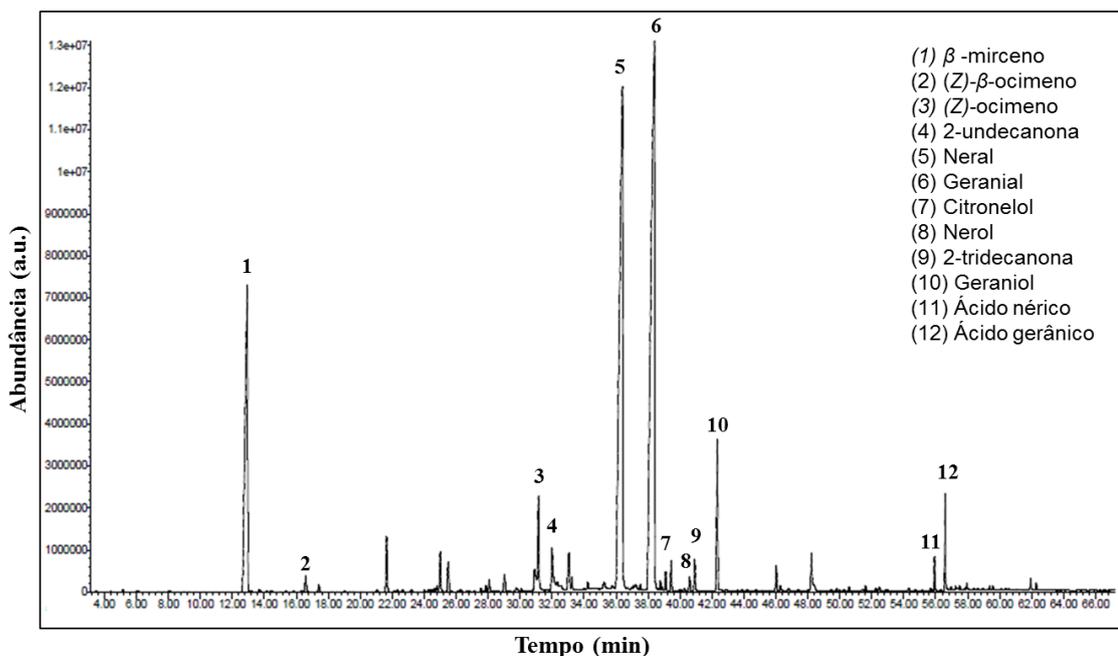
Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados obtidos para a síntese e caracterização das nanocápsulas de poli(ácido lático) contendo óleo essencial de capim-limão e seu desempenho no controle, *in vitro* e *in vivo*, de fungos fitopatogênicos.

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO

Para assegurar a qualidade e a identidade química do óleo essencial obtido a partir do capim-limão, foi inicialmente realizada uma análise por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas, a qual é a técnica mais usual na caracterização de óleos essenciais.

Para a análise foi empregada uma coluna capilar com característica altamente polar do tipo Wax, na qual a fase estacionária é constituída de uma estrutura reticulada polietilenoglicol (*crosslinked* PEG) e é preferencialmente empregada na separação e caracterização dos óleos essenciais (VERNIN *et al.*, 2001; MORRISON *et al.*, 2010).

Figura 10 – Perfil cromatográfico do óleo essencial de capim-limão obtido por cromatografia à gás (GC-MS).



Fonte: a autora (2019).

O cromatograma obtido para o óleo essencial de capim-limão por GC-MS pode ser

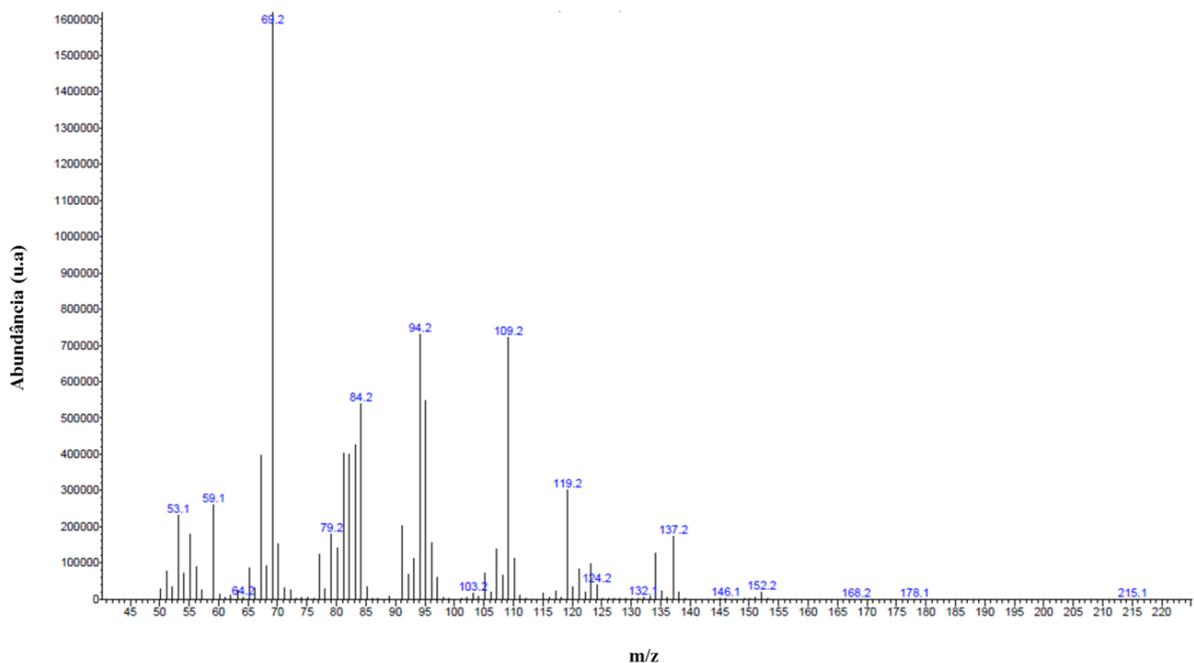
visto na Figura 10. É possível observar a presença de diferentes compostos com tempos de retenção distintos. A caracterização dos compostos constituintes foi inicialmente realizada pelo padrão de fragmentação do íon molecular, a qual foi auxiliada pela comparação entre o espectro de massas obtido com aqueles da biblioteca.

Como observado no cromatograma mostrado na Figura 10, os dois picos mais intensos foram atribuídos aos compostos majoritários neral (**5**) e geranial (**6**).

Os espectros de massas de baixa resolução para o neral e o geranial são apresentados na Figura 11 e Figura 12, respectivamente, e foram obtidos utilizando condições idênticas no sistema de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas.

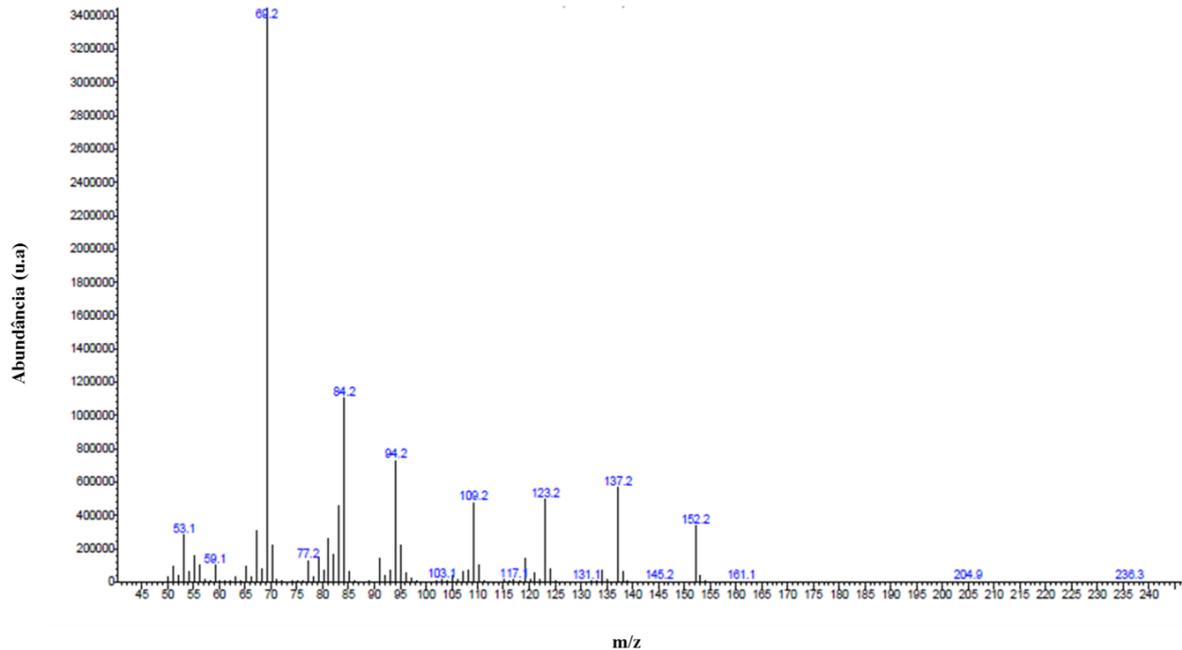
No espectro de massas para o geranial (Figura 12), observamos em  $m/z$  152 o pico correspondente ao íon molecular  $[M]^+$ , o qual se apresenta com uma baixa intensidade. O pico observado em  $m/z$  137 é atribuído ao fragmento  $[M-CH_3]^+$ , o qual é gerado pela perda de um radical metila. O fragmento com  $m/z$  123 é observado devido à segmentação  $\alpha$  do íon molecular, gerando o íon  $[M-CHO]^+$ . O fragmento com  $m/z$  109 decorre da perda de um grupo isopropila e da ressonância da ligação dupla. Decorrente da clivagem bialflica no centro da molécula do neral, observam-se os fragmentos com  $m/z$  84 e  $m/z$  69, que é o pico base. No espectro de massas do neral (Figura 11), os mesmos picos são identificados, com variações em suas intensidades.

Figura 11 – Espectro de massas de baixa resolução para o neral.



Fonte: a autora (2019).

Figura 12 – Espectro de massas de baixa resolução para o geranial.



Fonte: a autora (2019).

No entanto, para assegurar a identificação adequada dos demais picos observados no cromatograma, em associação à análise comparativa do espectro de massas, foi realizada a 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 é importante, visto que é uma ferramenta utilizada para possibilitar a identificação dos compostos mesmo quando existem diferenças nos métodos utilizados para análise, como diferentes fases estacionárias, fluxo de gás de arraste e rampas de temperatura. O princípio do LRI é relacionar o tempo de retenção dos compostos analisados com aqueles de uma sequência de alcanos lineares (padrão de alcanos), utilizando equações que variam de acordo com o aquecimento realizado durante a análise por cromatografia a gás (isotérmico, rampa de temperatura, programa de temperatura personalizado) (DOOL; KRATZ, 1963; ZELLNER *et al.*, 2008; NIST, 2018).

Com isso, foi possível identificar doze compostos, que totalizaram 94,1% da composição do óleo essencial de capim-limão (Tabela 2, Figura 13). Deste total, neral e geranial representam 25,6 e 41,8%, respectivamente. Dessa forma, é possível afirmar que o citral (neral + geranial) é o composto majoritário para o óleo essencial de capim-limão, representando 67,4% da sua composição.

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

#	Composto identificado	LRI calculado <sup>1</sup>	LRI literatura	Percentual relativo <sup>2</sup> (%)
1	$\beta$ -mirceno	1166	1161	18,1
2	(Z)- $\beta$ -ocimeno	1232	1235	0,2
3	Linalol	1545	1543	2,3
4	2-undecanona	1592	1598	1,0
5	Neral	1678	1679	25,6
6	Geranial	1731	1725	41,8
7	Citronelol	1760	1764	0,4
8	Nerol	1791	1795	0,2
9	2-tridecanona	1800	1808	0,4
10	Geraniol	1841	1839	2,7
11	Ácido nérico	2288	2294	0,3
12	Ácido gerânico	2333	2347	1,0
<b>Total identificado</b>				<b>94,1</b>

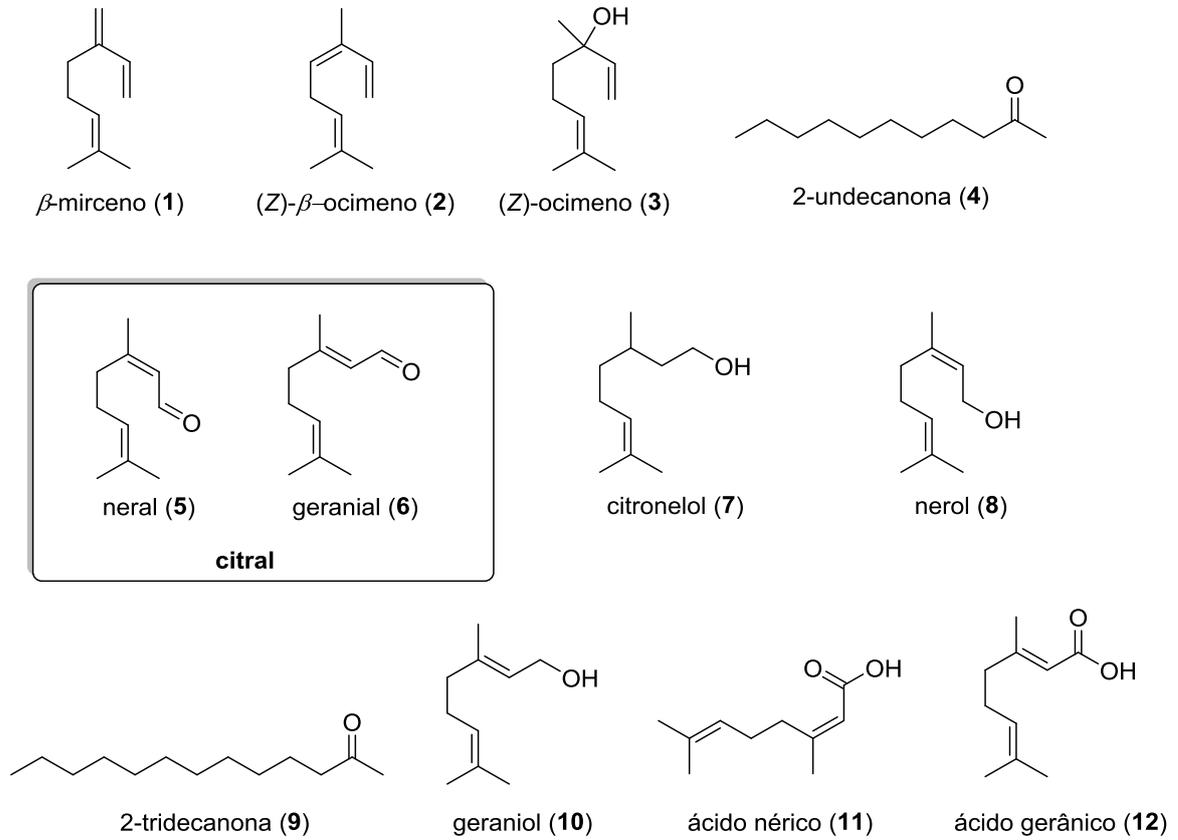
<sup>1</sup>Calculado com base no espectro de GC-MS. <sup>2</sup>Calculado com base no espectro de GC-FID.

Fonte: a autora (2019).

Esses valores estão de acordo com aqueles identificados por outros pesquisadores para o óleo essencial de capim-limão cultivado no Brasil. Andrade, Zoghbi e Lima (2009) reportaram que a extração de óleo essencial a partir das folhas de *Cymbopogon citratus*, cultivado no estado do Pará, resultou em 30,1% de neral e 39,9% de geranial. Já o estudo de Barbosa *et al.* (2008) avaliou onze amostras de óleo essencial de *Cymbopogon citratus* comercializadas no Brasil e constatou percentual de citral entre 40,7 e 75,4%.

Negrelle e Gomes (2007) reportaram, também, que independente da origem do capim-limão, o óleo essencial possui de 30 a 93,74% de citral, tendo, geralmente, predominância do geranial.

Figura 13 - Compostos identificados no óleo essencial de capim-limão.



Fonte: a autora (2019).

Com o intuito de verificar a pureza do óleo essencial obtido, foi realizada a determinação do índice de refração da amostra. De acordo com a Farmacopeia Brasileira, o “índice de refração (n) de uma substância é a relação entre a velocidade da luz no vácuo e sua velocidade na substância” (ANVISA, 2010).

O índice de refração foi determinado como  $1,4873 \pm 0,0003$ , que está de acordo com valores reportados na literatura para o óleo essencial de capim-limão. De acordo com a (ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANDARDIZATION, 1974), o valor do índice de refração para o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* deve estar entre 1,4830 e 1,4890.

Ainda visando verificar a pureza do óleo, a densidade relativa foi determinada em  $0,909 \pm 0,001$ . O valor encontrado está um pouco acima do relatado pela ISO (1974), que descreve valores entre 0,872 e 0,897.

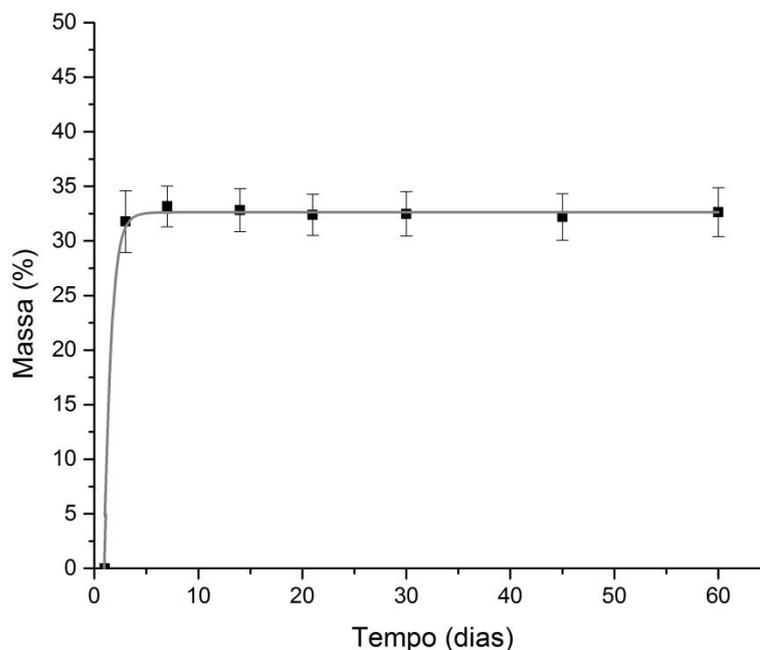
#### 4.2 TESTE DE INCHAMENTO

O teste de inchamento é realizado com o intuito de verificar se o material de parede e a

substância a ser contida no núcleo das nanocápsulas são compatíveis (insolúveis, pouco solúveis ou interação fracamente) para o processo de encapsulação. Se a substância do núcleo solubilizar o material de parede é um indicativo de que as formulações com esses materiais serão nanoemulsão em vez de nanocápsulas (BECK; GUTERRES; POHLMANN, 2011).

Os resultados obtidos com o teste de inchamento para o PLA na presença do óleo essencial de capim-limão comprovaram que esse polímero é indicado para a preparação de nanocápsulas contendo esse óleo essencial. O aumento de massa inicial da placa de PLA ficou entre 30 e 35% e, após, a variação mássica inicial permaneceu estável durante os 60 dias do experimento (Figura 14), comprovando que o polímero é insolúvel no óleo essencial de capim-limão durante o período observado. O inchamento inicial é comum e indica que ocorre interação entre as moléculas do líquido e a rede polimérica, sendo importante um inchamento limitado do polímero para assegurar a liberação controlada do material encapsulado (STANGARLIN, 2014; SIENKIEWICZ *et al.*, 2017).

Figura 14 – Variação mássica durante o teste de inchamento do poli(ácido láctico) em presença de óleo essencial de capim-limão.



Fonte: a autora (2019).

Guterres *et al.* (2000) reportaram que benzoato de benzila é capaz de solubilizar o poli(ácido láctico) e, também, a poli(caprolactona), ambos polímeros bastante empregados na

obtenção de nanocápsulas. Nesse caso, a escolha dos materiais deve ser repensada ou o resultado final será de nanoemulsão.

Assim, comprovado que o PLA é insolúvel no óleo essencial de capim-limão durante o período de avaliação, esse polímero foi escolhido para a obtenção das formulações de nanocápsulas.

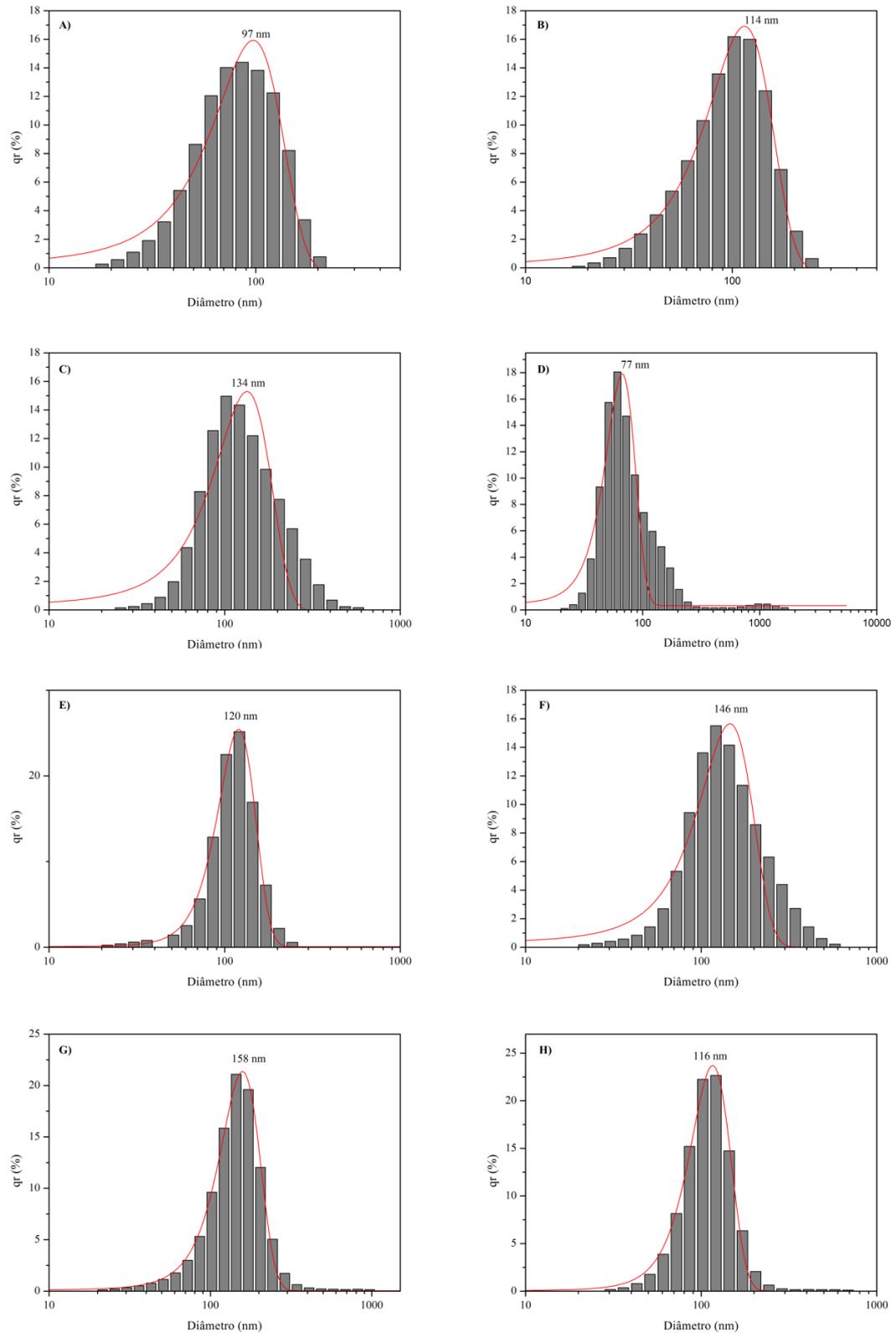
#### 4.3 OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE NANOCÁPSULAS DE POLIÁCIDO LÁCTICO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO

Com o intuito de obter cápsulas na escala nanométrica, com maior uniformidade possível, estáveis, e, principalmente, alta eficiência de encapsulação, foram realizados diferentes experimentos com base no planejamento fatorial  $2^3$ . Após alguns testes iniciais e baseado em valores reportados na literatura, foi possível estabelecer a melhor massa do polímero (100 mg) e dos solventes utilizados (27 mL de acetona e 53 mL de água deionizada). Entretanto, a quantidade dos surfactantes (Tween 80 e Span 60) e do próprio óleo essencial foram avaliadas por meio de um planejamento fatorial em que os fatores resposta diâmetro médio das nanocápsulas, potencial zeta e eficiência de encapsulação foram determinantes na busca pela melhor metodologia de síntese, identificando a influência de cada um dos fatores.

O planejamento experimental possibilitou determinar em um menor número de experimentos, a otimização da metodologia empregada para a síntese das nanocápsulas de PLA contendo óleo essencial de capim-limão. As análises de DLS e ZP são técnicas complementares que foram realizadas com o intuito de obter informações sobre o tamanho médio das nanocápsulas e a concentração das formulações (OLIVEIRA *et al.*, 2018a). As análises por DLS possibilitaram o cálculo do diâmetro médio das nanocápsulas, baseando-se em triplicata. Os resultados foram obtidos com base na intensidade da luz espalhada, visto que o princípio da técnica de DLS é baseado na determinação dessa intensidade (BHATTACHARJEE, 2016).

A Figura 15 apresenta a distribuição de diâmetro para uma amostra de cada uma das formulações de nanocápsulas, os dados foram obtidos por espalhamento de luz dinâmico.

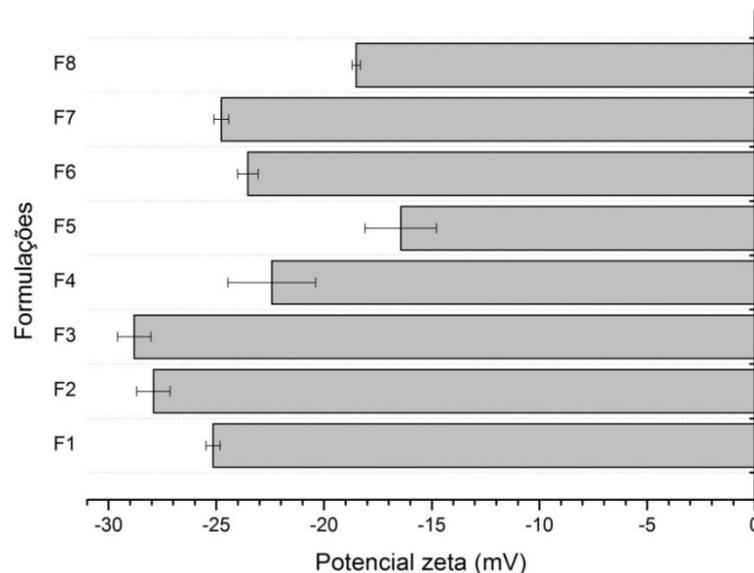
Figura 15 - Distribuição por intensidade do diâmetro das nanocápsulas obtidas por espalhamento de luz dinâmico e cálculo do diâmetro médio obtido por uma aproximação gaussiana para as formulações: A) F1, B) F2, C) F3, D) F4, E) F5, F) F6, G) F7 e H) F8.



Fonte: a autora (2019).

Os valores obtidos para o potencial zeta podem ser observados na Figura 16. O potencial zeta é amplamente empregado na avaliação da carga superficial de nanopartículas. Os valores, positivos ou negativos, de potencial zeta são determinados pela identificação da direção de qual eletrodo as partículas se movem durante a eletroforese. Portanto, apenas a magnitude do potencial zeta é relevante (BHATTACHARJEE, 2016).

Figura 16 – Valores de Potencial Zeta para as diferentes formulações de nanocápsulas.



Fonte: a autora (2019).

Em relação ao cálculo da eficiência de encapsulação, o citral foi escolhido por ter sido previamente identificado por GC-MS como composto majoritário do óleo essencial de capim-limão, tendo 67,4% do percentual relativo quando somados os valores para seus isômeros neral e geranial.

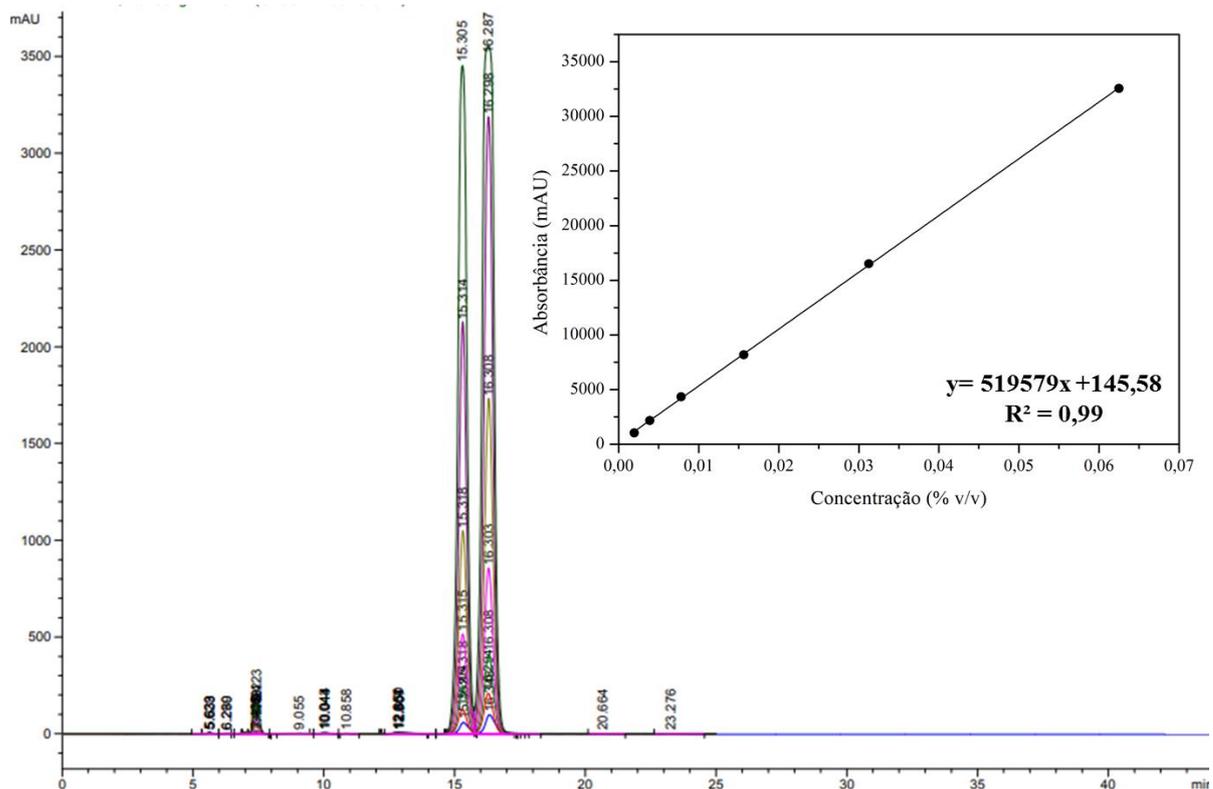
A equação de regressão linear  $y = ax + b$ , que relaciona as variáveis  $x$  e  $y$  e gera os coeficientes de regressão  $a$  (inclinação da curva) e  $b$  (intersecção da curva com o eixo  $y$ ), foi determinada com base nos valores obtidos por HPLC (INMETRO, 2011). O eixo  $x$  representou as concentrações de citral e o eixo  $y$  a soma das áreas dos picos de neral e geranial, os isômeros conhecidos como citral. Foi calculado o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), a fim de garantir a qualidade da curva analítica realizada, desejando-se um valor de  $R^2 \geq 0,99$  (MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2011a).

A curva analítica de concentração de citral por absorvância obtida através de UV-HPLC

está representada na Figura 17, junto aos cromatogramas das amostras da curva sobrepostos. Foi obtido um valor de  $R^2 = 0,99$  e, a partir dessa curva, a equação que relaciona a concentração de citral com a absorbância foi estabelecida como:  $y = 519579x + 145,58$ .

Os valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram determinados para esse método como 0,0004 e 0,0013% v/v, respectivamente. A precisão foi determinada utilizando as concentrações de 0,0020, 0,0078 e 0,0625% v/v e os valores calculados de desvio padrão relativo (RSD) foram 5,96, 5,45 e 3,42%, respectivamente. Esses valores estão de acordo com os coeficientes máximos admitidos, pelas normas utilizadas nesse trabalho para essas concentrações do analito (MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2011b).

Figura 17 – Curva analítica obtida através de HPLC que relaciona concentração de citral com absorbância e seus respectivos cromatogramas.



Fonte: a autora (2019).

Com base nessa equação e no percentual de citral no óleo essencial de capim-limão (67,4%), a eficiência de encapsulação para os diferentes testes pode ser calculada utilizando, também, essa equação. Ainda, o percentual de óleo essencial de capim-limão que sofreu arraste durante o processo de evaporação do solvente foi quantificado como sendo 1,2% do total de óleo essencial previamente adicionado. Assim, por se tratar de um percentual baixo,

foi desconsiderado para o cálculo da eficiência de encapsulação.

Os resultados estão apresentados na Tabela 3. A Tabela 3 apresenta, também, os resultados obtidos como a média de três repetições para o planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.

A análise estatística do planejamento fatorial realizada posteriormente permitiu gerar os gráficos pareto e a tabela contendo o efeito estimado para cada uma das variáveis. Os gráficos pareto (Figura 18) foram utilizados para identificar os fatores que influenciam significativamente ( $p < 0,05$ ) as variáveis dependentes, bem como para avaliar as interações. A Tabela 4 apresenta os valores do efeito estimado para cada uma das variáveis dependentes, bem como os valores de p. Se o valor do efeito estimado é positivo, isso significa que existe uma relação direta entre o fator e a variável. Entretanto, se o valor do efeito estimado é negativo, isso indica uma relação inversa entre o fator e a variável (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Tabela 3 - Planejamento fatorial 2<sup>3</sup> para a formulação de nanocápsulas contendo óleo essencial de capim-limão (OE) e os resultados obtidos para diâmetro médio (MD), potencial zeta (ZP) e eficiência de encapsulação (EE).

Formulação	OE ( $\mu\text{L}$ )	Span 60 (g)	Tween 80 (g)	MD (nm)	ZP (mV)	EE (%)
F1	100	0,077	0,077	96,4 $\pm$ 2,5	-25,2 $\pm$ 0,3	99,77 $\pm$ 0,00
F2	100	0,154	0,154	118,4 $\pm$ 10,1	-27,9 $\pm$ 0,8	99,29 $\pm$ 0,01
F3	100	0,154	0,077	150,5 $\pm$ 2,7	-28,8 $\pm$ 0,8	99,14 $\pm$ 0,01
F4	100	0,077	0,154	92,3 $\pm$ 15,1	-22,4 $\pm$ 2,0	99,01 $\pm$ 0,01
F5	200	0,077	0,077	124,8 $\pm$ 1,7	-16,4 $\pm$ 1,7	99,48 $\pm$ 0,01
F6	200	0,154	0,154	162,3 $\pm$ 5,9	-23,5 $\pm$ 0,5	99,46 $\pm$ 0,01
F7	200	0,154	0,077	173,3 $\pm$ 9,6	-24,8 $\pm$ 0,3	99,45 $\pm$ 0,02
F8	200	0,077	0,154	126,1 $\pm$ 1,2	-18,5 $\pm$ 0,2	99,51 $\pm$ 0,01

Fonte: a autora (2019).

Observando a Figura 18, é possível concluir que o fator que mais influencia o diâmetro médio das nanocápsulas é a concentração de Span 60 utilizada nas formulações e, de acordo com o valor de efeito encontrado na Tabela 4, sabe-se que quanto maior a massa de Span 60, maior o diâmetro médio das nanocápsulas. Assim, como se deseja um MD menor, uma concentração menor de Span 60 é indicada.

Observando a Tabela 3, observa-se que as formulações F1 e F4 (ambas com menor concentração de Span 60) levaram a valores de MD abaixo de 100 nm, porém a formulação F4 apresentou um desvio padrão bastante elevado.

Ainda, o estudo realizado por Venturini *et al.* (2011) demonstrou que, para obter unicamente nanocápsulas de núcleo lipídico sem a formação de emulsão externa à camada de

polímero, foi necessária a utilização de uma concentração inferior de Span 60.

Na Figura 18, observa-se que, em seguida, o MD é influenciado diretamente pelo volume de OE utilizado. E, por fim, é inversamente influenciado pela massa de Tween 80 da formulação.

A redução de tamanho das cápsulas na presença de Tween 80 era esperada, pois já foi reportado na literatura que a adição desse surfactante gera nanopartículas de menor tamanho em comparação com outros surfactantes (EPHREM *et al.*, 2014). Esse comportamento pode ser explicado, pois uma quantidade maior desse surfactante possibilita a obtenção de nanocápsulas mais estáveis com menor coalescência e, conseqüentemente, menor diâmetro médio (KHAYATA *et al.*, 2012).

Tabela 4 - Efeitos estimados e valores de p para as variáveis dependentes estudadas (diâmetro médio, potencial zeta e eficiência de encapsulação).

Fatores	Variáveis dependentes					
	Diâmetro médio		Potencial zeta		Eficiência de encapsulação	
	Efeito estimado	p	Efeito estimado	p	Efeito estimado	p
OE	32,208	<b>0,000*</b>	5,300	<b>0,000*</b>	-0,444	<b>0,000*</b>
Span 60	41,183	<b>0,000*</b>	-5,590	<b>0,000*</b>	-0,271	<b>0,000*</b>
Tween 80	-11,483	<b>0,004*</b>	0,730	0,149	-0,165	<b>0,000*</b>

Fonte: a autora (2019).

Em relação ao potencial zeta, observando a Figura 18 e , é possível afirmar que a massa de Span 60 é o fator que mais o influencia, sendo que quanto maior a massa de Span 60, menor o valor do potencial zeta das nanocápsulas.

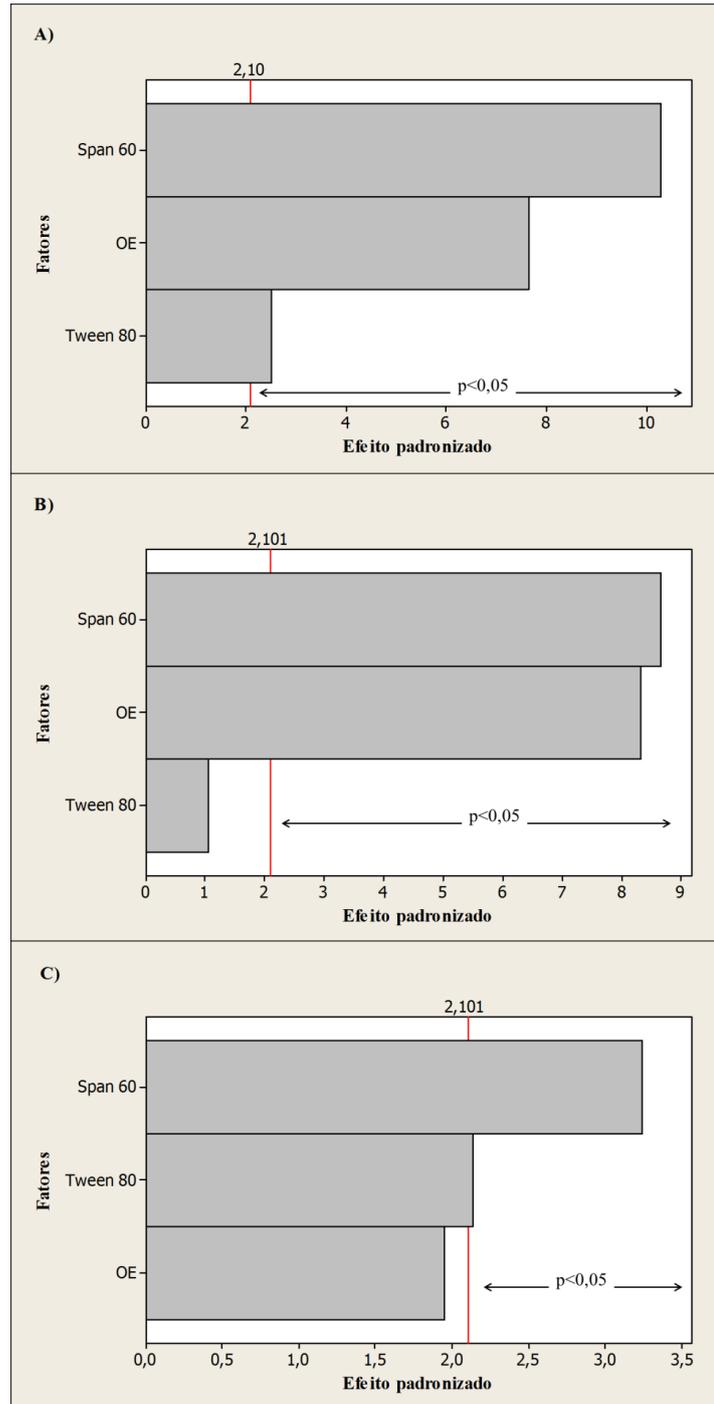
Em seguida, observa-se que o volume de OE influencia diretamente o potencial zeta e que a massa de Tween 80 utilizada nas formulações não apresenta influência significativa sobre essa variável dependente.

De forma geral, a literatura reporta que valores de potencial zeta entre 0 - |10| mV, |10| - |20| mV, |20| - |30| mV e |30| mV indicam, respectivamente, soluções altamente instáveis, relativamente estáveis, moderadamente estáveis e altamente estáveis para mecanismos de repulsão eletrostática (BHATTACHARJEE, 2016). E relatam ainda que um valor mínimo de potencial zeta de  $\pm 20$  mV é necessário para atingir estabilidade estérica (PATEL; AGRAWAL, 2011).

Dessa forma, observa-se na Tabela 3 que as formulações F1, F2, F3, F4, F6 e F7 apresentaram valores de potencial zeta entre -20 e -30 mV e, conseqüentemente, uma boa

estabilidade para soluções de nanocápsulas em comparação com outros trabalhos encontrados na literatura (EPHREM *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2018b).

Figura 18 - Gráficos pareto relacionando os efeitos dos fatores (Span 60, Tween 80, OE) nas variáveis dependentes: A) diâmetro médio (nm), B) potencial zeta (mV) e eficiência de encapsulação (%).



Fonte: a autora (2019).

Ainda, é possível concluir que todos os fatores possuem influência significativa sobre a eficiência de encapsulação e que todos possuem uma relação inversa com a resposta EE. Porém, ao observar a Tabela 3 é possível concluir que a diferença para a eficiência de encapsulação entre as formulações é desprezível, uma vez que todos os valores são superiores a 99%.

Dessa forma, por almejar cápsulas em escala nanométrica, soluções com boa estabilidade e alta eficiência de encapsulação do óleo essencial, a formulação F1 foi escolhida para o prosseguimento do estudo.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS OBTIDAS A PARTIR DA METODOLOGIA OTIMIZADA

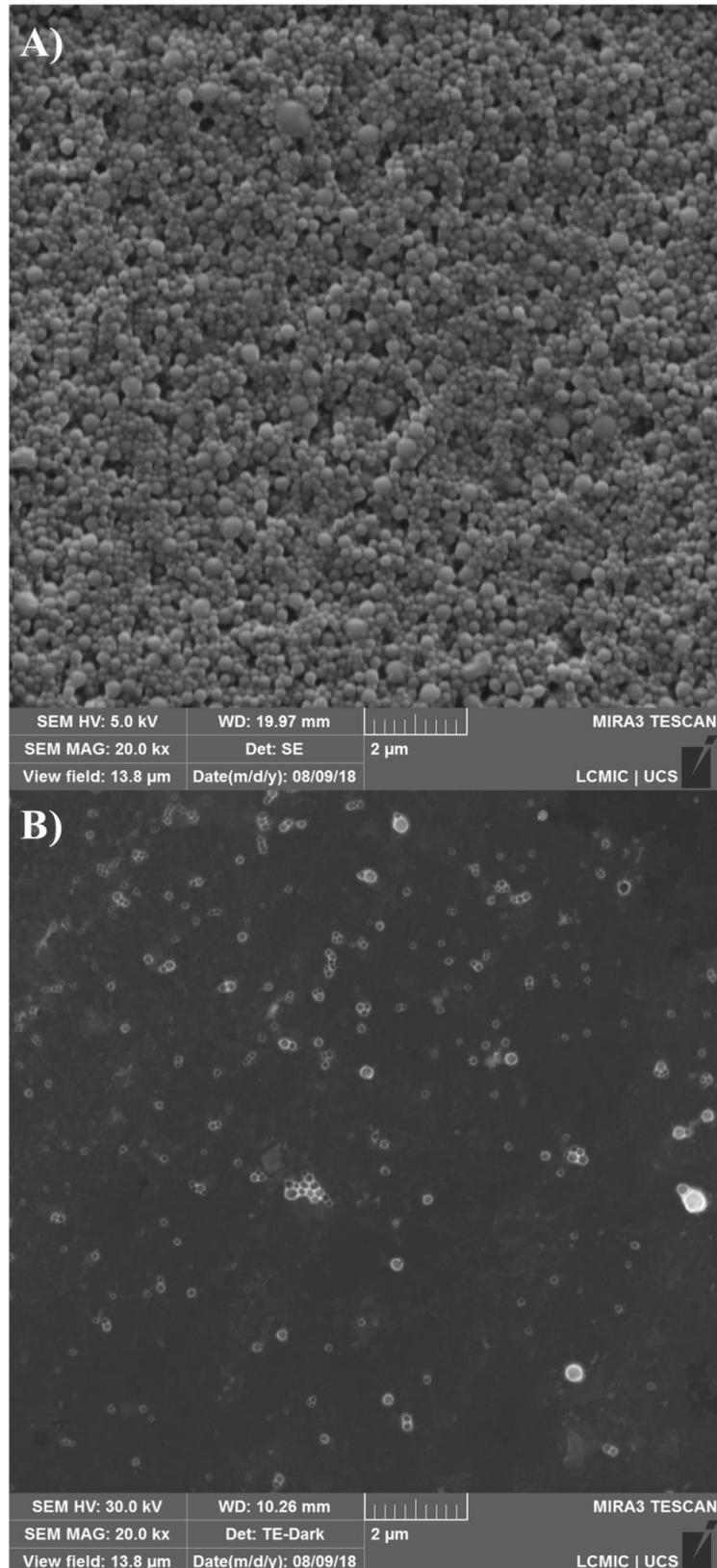
Após a otimização da síntese utilizada para o preparo de nanocápsulas, o próximo passo foi a caracterização morfológica e da estabilidade térmica delas. Essas caracterizações objetivaram comprovar a encapsulação do óleo essencial, a característica esférica das nanocápsulas, sua escala nanométrica e capacidade de melhorar a estabilidade térmica do óleo essencial de capim-limão.

##### 4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo e microscopia eletrônica de transmissão de varredura

As imagens obtidas empregando microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo e microscopia eletrônica de transmissão de varredura que demonstram a formação das nanocápsulas podem ser observadas na Figura 19. Por meio da imagem de MEV-FEG (Figura 19, A), é possível verificar a característica esférica das nanopartículas obtidas, porém não possibilita determinar se são nanoesferas ou nanocápsulas. Todavia, a imagem de STEM (Figura 19, B) sugere a existência de um núcleo envolto por uma membrana de material mais denso.

A morfologia esférica para nanocápsulas de PLA,  $\epsilon$ -poli(caprolactona) e quitosana-goma arábica também foi descrita por Guterres *et al.* (2008) e Oliveira *et al.* (2018a). Essa geometria pode estar relacionada à formação prévia de gotículas de óleo essencial associadas à etapa de emulsão no processo de nanoprecipitação.

Figura 19 – Imagens das nanocápsulas de poli(ácido lático) contendo óleo essencial de capim-limão, com magnificação de 20.000 vezes, obtidas por meio de: A) Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo. B) Microscopia eletrônica de transmissão de varredura.



Fonte: a autora (2019).

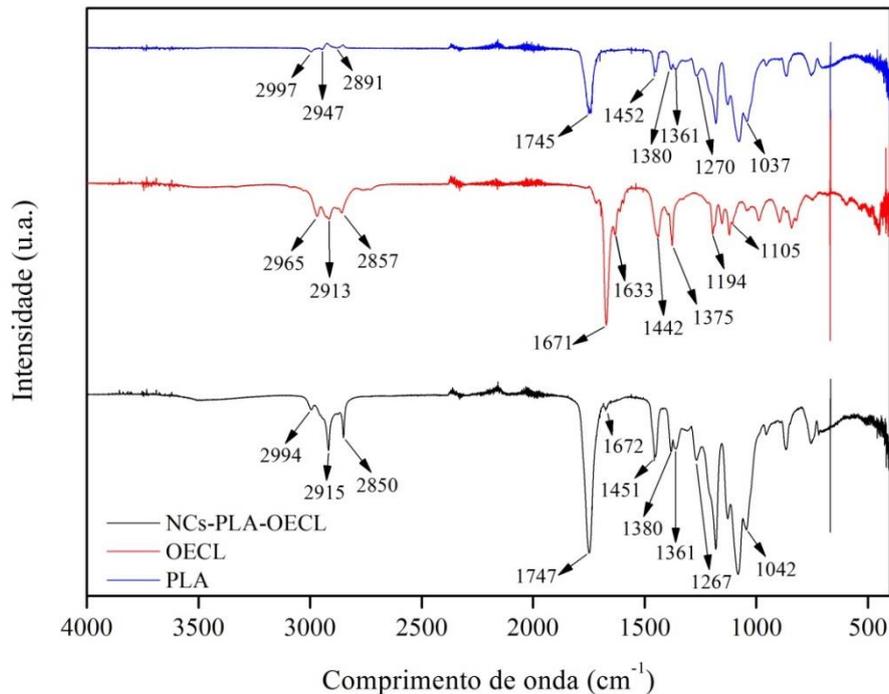
#### 4.4.2 Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR do óleo essencial, do PLA e das nanocápsulas estão apresentados na Figura 20. O óleo essencial é predominantemente constituído por neral, geranial e  $\beta$ -mirceno que possuem como grupos característicos aldeídos e alcenos. As três bandas observadas em 2965, 2913 e 2857  $\text{cm}^{-1}$  são características das vibrações de deformação axial da ligação C–H em moléculas alifáticas. A banda com absorção observada em 1671  $\text{cm}^{-1}$  é característica da vibração de deformação axial da ligação C=O de aldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados, o que corresponde à estrutura conjugada presente no neral e no geranial. A banda em 1633  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à ligação C=C. As bandas de média intensidade em 1442 e 1375  $\text{cm}^{-1}$  equivalem às ligações  $-\text{CH}_3$ . As bandas entre 1194 e 1105  $\text{cm}^{-1}$  correspondem às ligações C–O de álcoois e ácidos carboxílicos pertencentes a alguns dos compostos minoritários presentes no óleo essencial de capim-limão (linalol, citronelol, nerol, geraniol, ácido nérico e ácido gerânico).

O poli(ácido láctico) (PLA) possui como grupo funcional característico o grupamento éster. O espectro de PLA apresenta bandas em 2997, 2947 e 2891  $\text{cm}^{-1}$  decorrentes das vibrações de deformação axial da ligação C–H. A banda intensa em 1745  $\text{cm}^{-1}$  é característica das vibrações de deformação axial da ligação C=O do grupo éster. As bandas em 1452, 1380 e 1361  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas às vibrações de deformação angular do grupo  $\text{CH}_3$ . As bandas em 1270 e 1037  $\text{cm}^{-1}$  correspondem às vibrações de deformação axial da ligação C–O no grupamento éster.

O espectro das nanocápsulas demonstra que o polímero encapsulou o óleo essencial de capim-limão, apresentando as bandas características do PLA junto à banda próxima a 1672  $\text{cm}^{-1}$  característica dos aldeídos, confirmando a interação com os compostos presentes no óleo essencial. Esse comportamento foi reportado também por Cui *et al.* (2018) e Oliveira *et al.* (2018a) para nanocápsulas.

Figura 20 – Espectro de FTIR das nanocápsulas de poliácido láctico contendo óleo essencial de capim-limão (NCs-PLA-OECL), do óleo essencial de capim-limão (OECL) e do poli(ácido láctico) (PLA).



Fonte: a autora (2019).

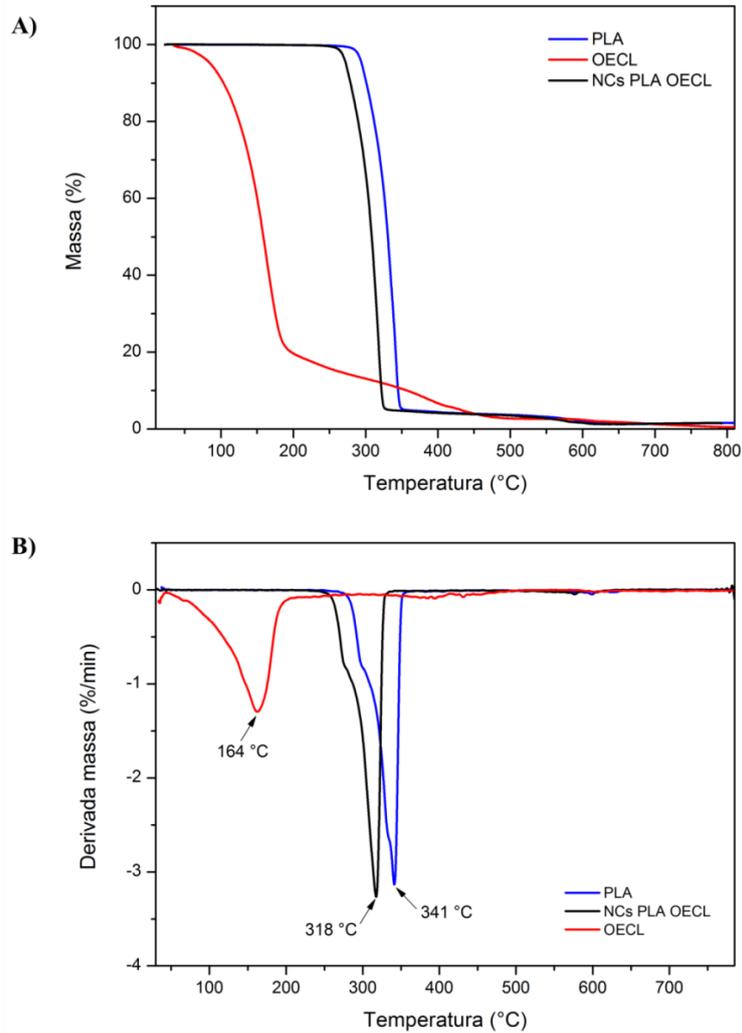
#### 4.4.3 Estabilidade térmica das nanocápsulas

A estabilidade térmica das nanocápsulas foi avaliada por meio da análise termogravimétrica. As curvas de TGA e DTG para o óleo essencial, o polímero e as nanocápsulas estão apresentadas na Figura 21. A perda de massa da maior parcela do óleo essencial acontece antes de 200 °C, ocorrendo um rápido declínio entre 100 e 200 °C. A decomposição térmica do PLA apresenta um único evento conciso de perda de massa com temperatura máxima de degradação de 341 °C. Esses dados estão de acordo com os reportados na literatura que identificaram todos os eventos de perda de massa no óleo essencial de lavanda abaixo de 240 °C e temperatura máxima de degradação do PLA em 356 °C (CALABRIA *et al.*, 2009; CUI *et al.*, 2018).

A perda de massa registrada para as nanocápsulas entre 220 e 350 °C incluem a decomposição do óleo essencial de capim-limão e a perda de massa relacionada ao PLA. Nesse caso, a temperatura de início de degradação é superior à temperatura de término da

degradação para o óleo essencial não-encapsulado, o que comprova que o processo de encapsulação do óleo essencial melhora sua estabilidade térmica. Esse comportamento também foi identificado por Cui *et al.* (2018).

Figura 21 – Análise termogravimétrica (TGA) para: A) Análise termogravimétrica (TGA).  
B) Derivada dos dados de TGA (DTG).



Fonte: a autora (2019).

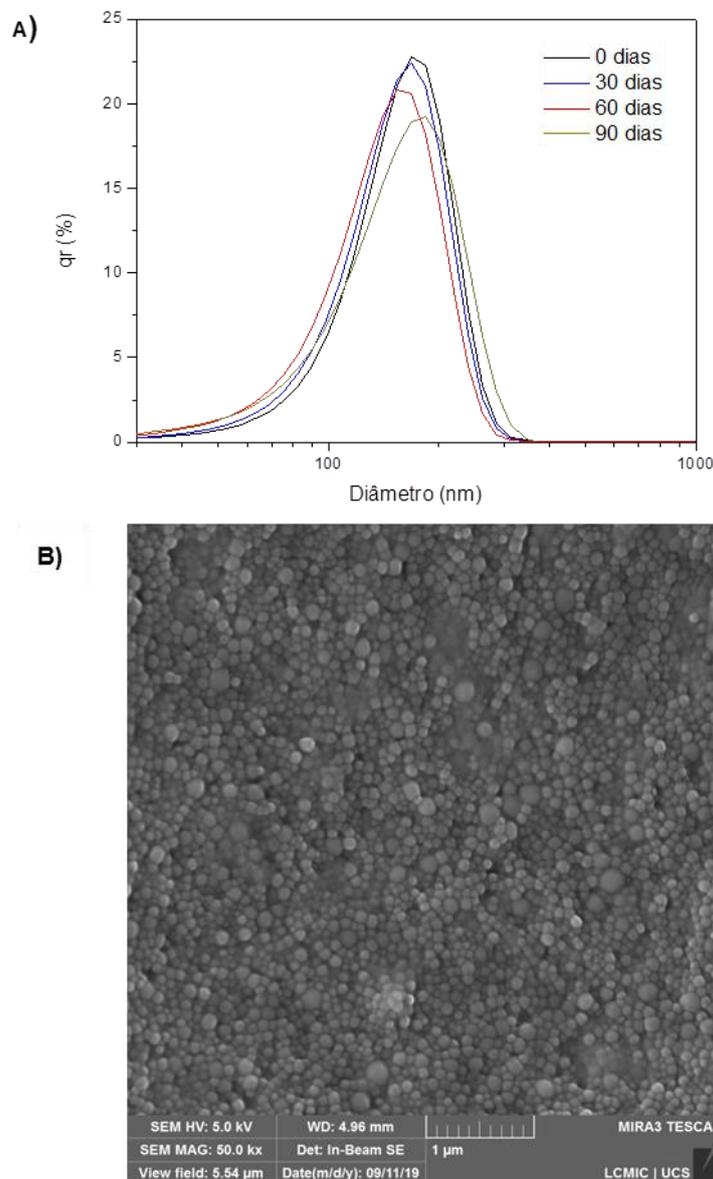
#### 4.4.4 Ensaio de estabilidade das nanocápsulas armazenadas

Com o intuito de verificar a estabilidade das nanocápsulas durante o período de armazenamento, realizaram-se as determinações do diâmetro médio das cápsulas em suspensão e análise da morfologia das cápsulas após seis meses de armazenamento.

As curvas de distribuição de tamanho obtidas a partir da suspensão das nanocápsulas, assim que preparadas e após 30, 60 e 90 dias de armazenamento, apresentam boa sobreposição (Figura 22, A), possibilitando concluir que o tempo de armazenamento não afeta o diâmetro das nanocápsulas. Esses resultados indicam a estabilidade e a robustez do sistema transportador (GRANATA *et al.*, 2018).

Após 6 meses de armazenamento, observou-se também que a morfologia permaneceu esférica (Figura 22, B), indicando que as nanocápsulas não foram rompidas.

Figura 22 - Ensaio de estabilidade das nanocápsulas. A) Distribuição dos diâmetros após 0, 30, 60 e 90 dias. B) Imagem das nanocápsulas obtida por MEV-FEG (com magnificação de 50.000 vezes) após aproximadamente seis meses de armazenamento.



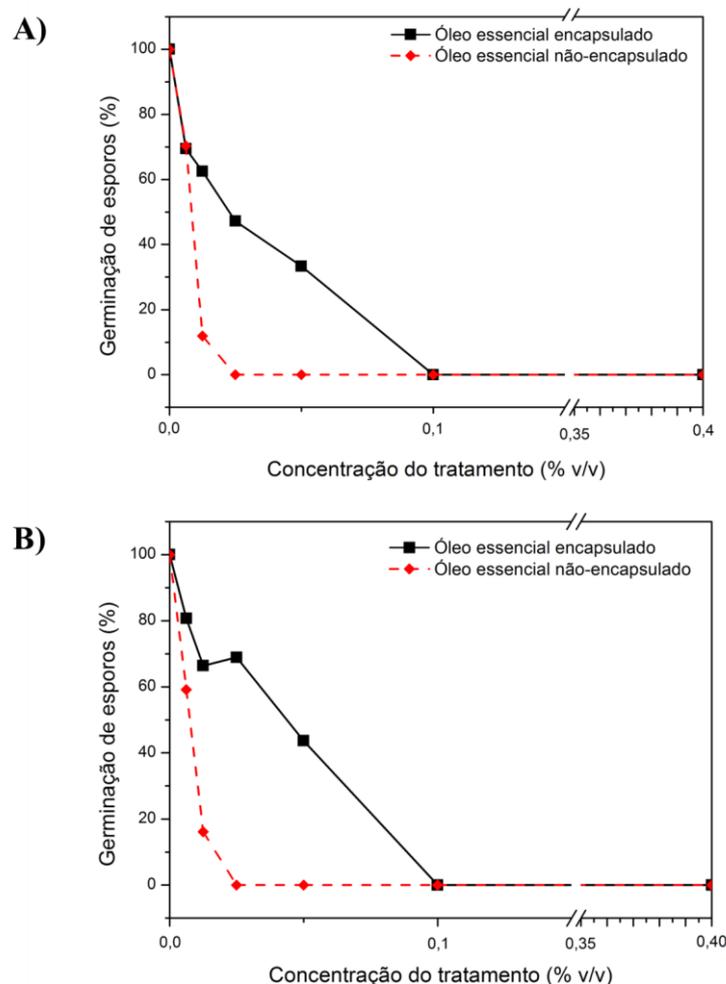
Fonte: a autora (2019).

## 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

### 4.5.1 Teste de germinação de conídios para *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides*

A inibição completa do crescimento micelial (MIC) de ambos os fungos, *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, foi observada no tratamento com óleo essencial encapsulado em concentração de 0,1% v/v e no tratamento com óleo essencial não-encapsulado a 0,025% v/v (Figura 23). As concentrações inibitórias encontradas no ensaio corroboram com resultados encontrados no uso de óleo essencial para controle de *Colletotrichum*, como descrito por Barrera-Necha *et al.* (2008).

Figura 23 - Atividade antifúngica *in vitro* por teste de germinação de conídios para o óleo essencial de capim-limão encapsulado com poli(ácido lático) e não-encapsulado contra: A) *Colletotrichum acutatum* e B) *Colletotrichum gloeosporioides*.



Fonte: a autora (2019).

Provavelmente, a atividade biológica observada está relacionada aos compostos que contêm oxigênio presentes no óleo essencial, como o citral (ECHEVERRIGARAY *et al.*, 2008; TOMAZONI *et al.*, 2019). Conforme descrito anteriormente na literatura, os aldeídos alifáticos, incluindo o citral, são capazes de formar um complexo de transferência de carga com um doador de elétrons das células fúngicas (KURITA *et al.*, 1981; SILVA *et al.*, 2008).

A diferença de atividade entre o óleo essencial encapsulado e não-encapsulado pode ser atribuída ao fato de o óleo essencial já estar em contato com os conídios do fungo no início do ensaio, enquanto o óleo essencial encapsulado penetra lentamente a membrana polimérica em direção ao meio externo. Essa característica pode ser benéfica por reduzir o efeito necrótico de terpenóides em células de plantas, e pode manter o efeito inibitório por períodos mais longos.

#### 4.5.2 Avaliação da atividade *in vivo* em maçãs

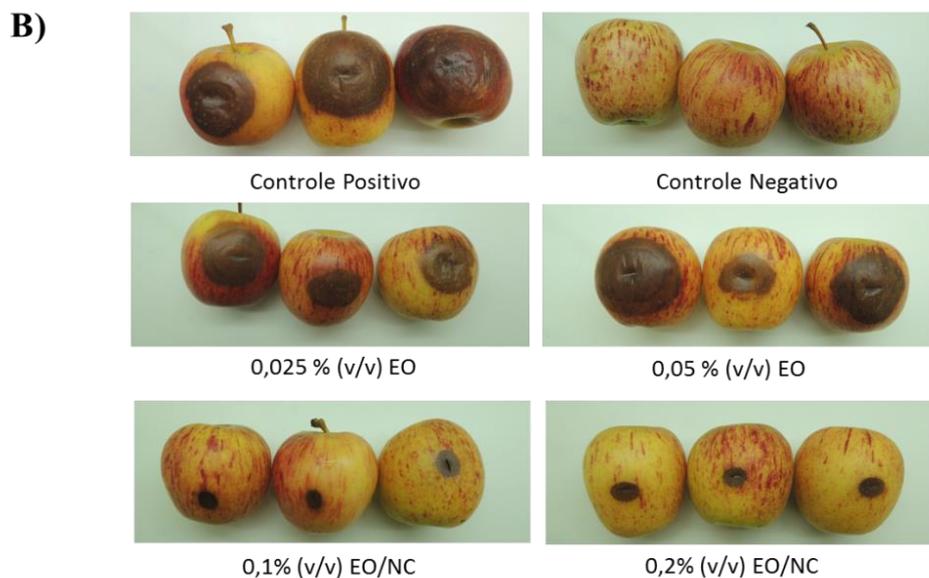
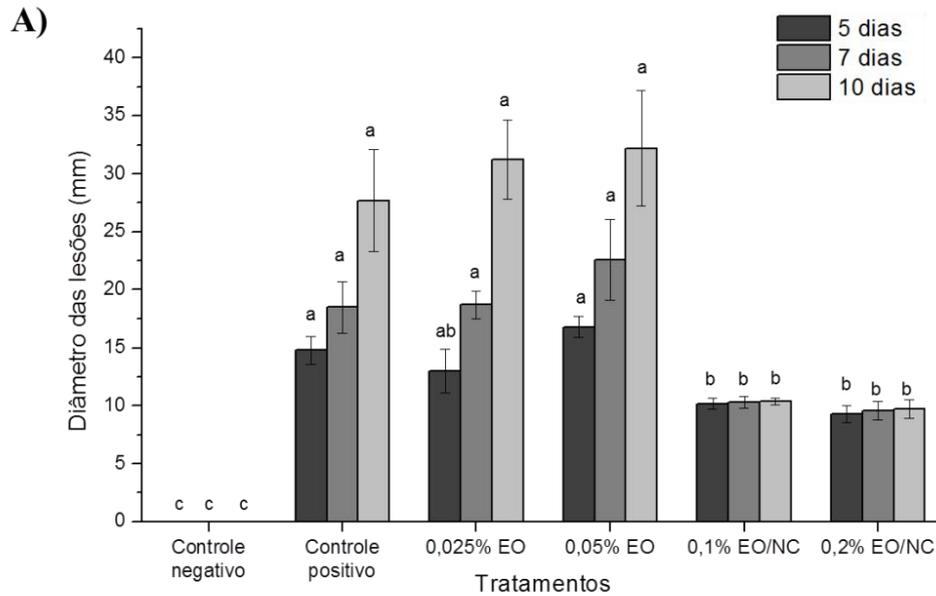
Para a realização dos testes *in vivo*, *C. gloeosporioides* foi escolhido em detrimento de *C. acutatum* devido à sua importância agrônômica como fitopatógeno causador da podridão amarga da macieira. A partir dos testes *in vitro*, foram escolhidas concentrações de 0,1 e 0,2% v/v de óleo essencial de capim-limão encapsulado e 0,025 e 0,05% v/v de óleo essencial não-encapsulado para os testes *in vivo* em maçãs pós-colheita. Os resultados mostraram claramente que maçãs tratadas com óleo essencial encapsulado apresentaram melhores resultados no controle de *C. gloeosporioides* do que aquelas tratadas com óleo essencial não-encapsulado (Figura 24, B).

Nos 7º e 10º dias, o comportamento foi o mesmo, não mostrando diferença significativa entre o controle positivo e as maçãs tratadas com óleo essencial não-encapsulado, enquanto as maçãs tratadas com óleo essencial encapsulado apresentaram lesões de menor diâmetro (Figura 24, A). A ocorrência de lesões maiores nas maçãs tratadas com óleo essencial não-encapsulado podem estar relacionados ao efeito fitotóxico do óleo essencial de capim-limão que pode causar necrose local, facilitando o progresso dos fungos através do fruto (POONPAIBOONPIPAT *et al.*, 2013).

Também foi possível notar que as maçãs tratadas com óleo essencial não-encapsulado mostraram variação no tamanho da lesão entre o quinto e o décimo dia, provavelmente devido à volatilidade do óleo essencial (Figura 24, A). Por outro lado, as lesões de maçãs tratadas com óleo essencial encapsulado mantiveram o mesmo diâmetro entre o quinto e o décimo dia,

comprovando a capacidade de um tratamento de longo prazo.

Figura 24 - Tratamento pós-colheita preventivo *in vivo* contra *Colletotrichum gloeosporioides* em maçãs tratadas com óleo essencial de capim-limão encapsulado e não-encapsulado. A) Dados do diâmetro da lesão para maçãs da variedade Gala inoculadas com conídios de *C. gloeosporioides*. B) Imagens obtidas para maçãs utilizadas para os testes *in vivo* após dez dias de incubação.



As médias seguidas por letras diferentes no mesmo dia são estatisticamente diferentes  $p \leq 0,05$  (teste de Tukey).

Fonte: a autora (2019).

Esse comportamento já foi descrito para nanopartículas de quitosana encapsuladas

com óleo essencial de *Cymbopogon martinii*, que é volátil e degradável. Essas características corroboram que o óleo essencial encapsulado em quitosana é menos suscetível à degradação e tem maior probabilidade de liberar os compostos bioativos de maneira controlada do que o óleo essencial não-encapsulado (KALAGATUR *et al.*, 2018).

## 5 CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi desenvolvido com êxito nanocápsulas de PLA contendo óleo essencial de capim-limão por meio da técnica de nanoprecipitação de polímero pré-formado. A metodologia demonstrou reprodutibilidade e as nanocápsulas obtidas apresentaram atividade contra os fungos fitopatogênicos testados, alcançando, assim, o objetivo principal deste projeto.

O óleo essencial de capim-limão utilizado nas formulações teve doze compostos identificados, totalizando 94,1% da composição. Deste total, neral e geranial representam 25,6 e 41,8%, respectivamente. Dessa forma, foi possível afirmar que o citral (neral + geranial) é o composto majoritário para o óleo essencial de capim-limão, representando 67,4% da sua composição.

O planejamento fatorial empregado auxiliou para que a metodologia otimizada fosse definida com um número reduzido de experimentos. A partir dessa otimização, foram obtidas nanocápsulas com diâmetro realmente nanométrico, estáveis e com elevada eficiência de encapsulação do óleo essencial de capim-limão.

Observou-se, também, que a morfologia das nanocápsulas é esférica e que realmente ocorreu a formação de nanocápsulas e não de nanoesferas. A análise de FTIR demonstrou que o polímero encapsulou o óleo essencial de capim-limão e a análise termogravimétrica comprovou que essa encapsulação melhora a estabilidade térmica do óleo essencial em questão. Ainda, foi possível observar que as nanocápsulas apresentaram estabilidade de diâmetro e morfologia durante 90 dias e seis meses, respectivamente.

Ainda, as nanocápsulas apresentaram concentração inibitória mínima para a germinação de conídios de *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* em concentração de 0,1% v/v. Nos testes *in vivo* pós-colheita realizados em maçãs, observou-se que os frutos tratados com óleo essencial encapsulado apresentaram menores diâmetros de lesão do que aqueles tratados com óleo essencial não-encapsulado. O tratamento também se mostrou eficaz durante os dez dias do experimento.

Assim, demonstrou-se que as nanocápsulas de PLA contendo óleo essencial de capim-limão são uma boa alternativa para a substituição de fungicidas químicos usualmente empregados em produções agrícolas, especialmente em tratamentos pós-colheita na área da fruticultura.

## REFERÊNCIAS

- AGROLINK. **Flor preta**. Disponível em: <[https://www.agrolink.com.br/problemas/flor-preta\\_2773.html](https://www.agrolink.com.br/problemas/flor-preta_2773.html)>. Acesso em: 14 mar. 2019a.
- AGROLINK. **Antracnose**. Disponível em: <[https://www.agrolink.com.br/problemas/antracnose\\_1510.html](https://www.agrolink.com.br/problemas/antracnose_1510.html)>. Acesso em: 14 mar. 2019b.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MINS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. New York: John Wiley and Sons, 1996.
- ALMEIDA, T. F.; CAMARGO, M.; PANIZZI, R. D. C. Efeito de extratos de plantas medicinais no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro. **Summa Phytopathol**, v. 35, p. 196–201, 2009.
- ANDRADE, E. H.; ZOGHBI, M. G.; LIMA, M. P. Chemical Composition of the Essential Oils of *Cymbopogon citratus* ( DC .) Stapf Cultivated in North of Brazil. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 12, p. 41–45, 2009.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia brasileira**. 5. ed. Brasília: Fundação Oswaldo Cruz, 2010.
- AZAMBUJA, W. **Citral**. Disponível em: <<http://www.oleosessenciais.org/citral/>>. Acesso em: 10 jul. 2017.
- BABUSHOK, V. I.; LINSTROM, P. J.; ZENKEVICH, I. G. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. **J. Phys. Chem.**, v. 40, p. 4310101–4310147, 2011.
- BANG, K.-H.; LEE, D.-W.; PARK, H.-M.; RHEE, Y.-H. Inhibition of Fungal Cell Wall Synthesizing Enzymes by trans-Cinnamaldehyde. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 64, p. 1061–1063, 2000.
- BARBOSA, L. C. A.; PEREIRA, U. A.; MARTINAZZO, A. P.; MALTHA, C. R. A.; TEIXEIRA, R. R.; MELO, E. C. Evaluation of the Chemical Composition of Brazilian Commercial *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf Samples. **Molecules**, v. 13, p. 1864–1874, 2008.
- BARRERA-NECHA, L. L.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; FLORES-MOCTEZUMA, H. E.;

ESTUDILLO, A. R. Efficacy of Essential Oils on the Conidial Germination, Growth of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Saac and Control of Postharvest Diseases in Papaya (*Carica papaya* L.). **Plant Pathology Journal**, v. 7, p. 174–178, 2008.

BARROS, A. P. O. de. **Detecção e caracterização molecular e biológica de vírus associados a fungos fitopatogênicos**. 2016. 71 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Viçosa, 2016.

BECK, R.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. **Nanocosmetics and nanomedicines**. Berlin: Springer, 2011.

BHATTACHARJEE, S. Review article DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.

BRAMBILLA, V. C. **Avaliação das propriedades mecânicas, térmicas, morfológicas e degradação de compósitos de poli(ácido láctico)/buriti**. 2013. 55 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos e Tecnologias) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, Caxias do Sul, 2013.

BRASILEIRO, J. S. L. **Microencapsulação de compostos bioactivos : inovação em diferentes áreas**. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Fernando Pessoa, 2011.

CALABRIA, L.; BANDEIRA, A. L.; GIACOMELLI, C.; SCHMIDT, V. Morfologia e propriedades térmicas de blendas biodegradáveis a base de SPI e PLA. In: CBPol, 10, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Associação Brasileira de Polímeros, 2009.

CARDOSO, C. O. N. Fungos. In: **Manual de Fitopatologia**. 2. ed. São Paulo: Ceres, 1978. p. 58–123.

CARLSON, L. H. C.; MACHADO, A. F.; SPRICIGO, C. B.; PEREIRA, L. K.; BOLZAN, A. Extraction of lemongrass essential oil with dense carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 21, p. 33–39, 2001.

CUI, G.; WANG, J.; WANG, X.; LI, W.; ZHANG, X. Preparation and Properties of Narrowly Dispersed Polyurethane Nanocapsules Containing Essential Oil via Phase Inversion Emulsification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 10799–10807, 2018.

DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 4022–4034, 2009.

DOOL, H. van den; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. II, p. 463–471, 1963.

DUBEY, R.; SHAMI, T. C.; BHASKER RAO, K. U. Microencapsulation technology and applications. **Defence Science Journal**, v. 59, p. 82–95, 2009.

DUDUK, N.; MARKOVIC, T.; VASIC, M.; DUDUK, B.; VICO, I.; OBRADOVIC, A. Antifungal Activity of Three Essential Oils against *Colletotrichum acutatum*, the Causal Agent of Strawberry Anthracnose. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 3, p. 529–537, 2015.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; RIMANDO, A. M.; SCHRADER, K. K.; ALIOTTA, G.; OLIVA, A.; ROMAGNI, J. G. Chemicals from nature for weed management. **Weed Science**, v. 50, p. 138–151, 2002.

ECHEVERRIGARAY, S.; DELAMARE, A. P. L.; FONTANELLA, G.; FAVARON, F.; STELLA, L.; SCARIOT, F. J. *Colletotrichum* species associated to ripe rot disease of grapes in the “Serra Gaucha” region of Southern Brazil. **BIO WEB OF CONFERENCES**, v. 12, p. 01008, 2019.

ECHEVERRIGARAY, S.; MICHELIM, L.; DELAMARE, A. P. L.; ANDRADE, C. P.; COSTA, S. O. P.; ZACARIA, J. The Effect of Monoterpenes on Swarming Differentiation and Haemolysin Activity in *Proteus mirabilis*. **Molecules**, v. 13, p. 3107–3116, 2008.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas**. Brasília: Embrapa, 2016.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Ciência que transforma**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/grandes-contribuicoes-para-a-agricultura-brasileira/frutas-e-hortalicas>>. Acesso em: 2 set. 2019.

EPHREM, E.; GREIGE-GERGES, H.; FESSI, H.; CHARCOSSET, C. Optimisation of rosemary oil encapsulation in polycaprolactone and scale-up of the process. **Journal of Microencapsulation**, v. 31, p. 746–753, 2014.

EVANS, W. C. **Pharmacognosy**. Edinburgh: Elsevier, 2009.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.

**2050: A third more mouths to feed.** Disponível em:

<<http://www.fao.org/news/story/en/item/35571/icode/>>. Acesso em: 14 mar. 2019.

FORIM, M. R.; COSTA, E. S.; SILVA, M. F. das G. F. da; FERNANDES, J. B.; MONDEGO, J. M.; JUNIOR, A. L. B. Development of a New Method To Prepare Nano-/microparticles Loaded with Extracts of *Azadirachta indica*, Their Characterization and Use in Controlling *Plutella xylostella*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 9131–9139, 2013.

GHOSH, S. K. **Functional coatings**. 2. ed. Weinheim: WILEY-VCH, 2006.

GLOBO RURAL. **Brasil quer dobrar a produção de frutas em dois anos e melhorar exportações.** Disponível em:

<<https://revistagloborural.globo.com/Noticias/Agricultura/Hortifruti/noticia/2018/01/brasil-quer-dobrar-producao-de-frutas-em-dois-anos-e-melhorar-exportacoes.html>>. Acesso em: 2 set. 2019.

GONZÁLEZ-ESTRADA, R. R.; CHALIER, P.; RAGAZZO-SÁNCHEZ, J. A.; KONUK, D.; CALDERÓN-SANTOYO, M. Postharvest Biology and Technology Antimicrobial soy protein based coatings: Application to Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka) for protection and preservation. **Postharvest Biology and Technology**, v. 132, p. 138–144, 2017.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.06.005>>.

GRANATA, G.; STRACQUADANIO, S.; LEONARDI, M.; NAPOLI, E.; CONSOLI, G. M. L.; CAFISO, V.; STEFANI, S.; GERACI, C. Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation. **Food Chemistry**, v. 269, p. 286–292, 2018.

GRILLO, R.; ZOCAL, N.; RODRIGUES, C.; HENRIQUE, A.; LIMA, R. De; FERNANDES, L. Poly caprolactone nanocapsules as carrier systems for herbicides : Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 231–232, p. 1–9, 2012.

GUPTA, A. P.; KUMAR, V. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – Polylactide: A critique. **European Polymer Journal**, v. 43, p. 4053–4074, 2007.

GUTERRES, S. S.; WEISS, V.; FREITAS, L. D. L.; POHLMANN, A. R. Influence of Benzyl Benzoate as Oil Core on the Physicochemical Properties of Spray-Dried Powders

from Polymeric Nanocapsules Containing Indomethacin. **Drug Delivery**, v. 7, p. 195–199, 2000.

HIRSJÄRVI, S.; PELTONEN, L.; KAINU, L.; HIRVONEN, J. Freeze-Drying of Low Molecular Weight Poly (L-lactic acid) Nanoparticles: Effect of Cryo- and Lyoprotectants. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, p. 3110–3117, 2006.

ICH. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)**, 2005. .

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**, 2011. .

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANDARDIZATION. **Oil of Lemongrass (*Cymbopogon citratus*)**. Disponível em:

<<https://www.iso.org/standard/8421.html>>. Acesso em: 16 abr. 2019.

JÄGER, E.; VENTURINI, C. G.; POLETTO, F. S.; COLOMÉ, L. M.; POHLMANN, J. P. U.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMAN, A. R. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 130–140, 2009.

JOY, P. P.; SKARIA, B. P.; MATHEW, S.; MATHEW, G.; JOSEPH, A. Lemongrass: the fame of Cochin. **Indian J. Arecanut, Spices and Medicinal Plants**, v. 8, p. 55–64, 2006.

KALAGATUR, N. K.; GHOSH, O. S. N.; SUNDARARAJ, N.; MUDILI, V. Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles Encapsulated With *Cymbopogon martinii* Essential Oil on Plant Pathogenic Fungi *Fusarium graminearum*. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1–13, 2018.

KHAYATA, N.; ABDELWAHED, W.; CHEHNA, M. F.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method : From laboratory scale to large scale using a membrane contactor. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, p. 419–427, 2012.

KHOEE, S.; YAGHOUBIAN, M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 2392–2399, 2009.

KRUGNER, T. L.; BACCHI, L. M. A. Fungos. In: FILHO, A. B.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. p. 46–96.

KURITA, N.; MIYAJI, M.; KURANE, R.; TAKAHARA, Y. Antifungal Activity of Components of Essential Oils. **Agric. Biol. Chem.**, v. 45, p. 945–952, 1981.

LIAKOS, I. L.; GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M.; FLORIN, I.; AUTILIA, F. D.; CARZINO, R.; BIANCHINI, P.; ATHANASSIOU, A. Polylactic Acid — Lemongrass Essential Oil Nanocapsules with Antimicrobial Properties. **Pharmaceuticals**, v. 9, p. 1–13, 2016.

LINCE, F.; MARCHISIO, D. L.; BARRESI, A. A. Strategies to control the particle size distribution of poly- $\epsilon$ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 322, p. 505–515, 2008.

LUCIA, A.; LICASTRO, S.; ZERBA, E.; AUDINO, P. G.; MASUH, H. Bioresource Technology Sensitivity of *Aedes aegypti* adults (Diptera: Culicidae) to the vapors of Eucalyptus essential oils. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6083–6087, 2009.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Manual de garantia da qualidade analítica**. Brasília: Brasil, 2011a.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica**, 2011b. .

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/produtos-fitossanitarios/produtos-fitossanitarios>>. Acesso em: 21 mar. 2019.

MARCATO, P. D.; DURÁN, N. New Aspects of Nanopharmaceutical Delivery Systems. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, p. 1–14, 2008.

MARI, M.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; SIVAKUMAR, D. Postharvest Biology and Technology Decay control in the postharvest system : Role of microbial and plant volatile organic compounds. **Postharvest Biology and Technology**, v. 122, p. 70–81, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.014>>.

MARTINS, I. M. D. **Microencapsulation of thyme oil by coacervation: production, characterization and release evaluation**. 2012. 204 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Universidade do Porto, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e Biológica, Porto, 2012.

- MASUDA, T.; ODAKA, Y.; OGAWA, N.; NAKAMOTO, K.; KUNINAGA, H. Identification of Geranic Acid , a Tyrosinase Inhibitor in Lemongrass (*Cymbopogon citratus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 597–601, 2008.
- MENEZES, M. **ASPECTOS BIOLÓGICOS E TAXONÔMICOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Colletotrichum*** Recife, 2006. .
- MEREDITH, J. C.; AMIS, E. J. LCST phase separation in biodegradable polymer blends: poly (D, L-lactide) and poly (ε-caprolactone). **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 739, p. 733–739, 2000.
- MILADI, K.; IBRAHEEM, D.; IQBAL, M.; SFAR, S.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Particles from preformed polymers as carriers for drug delivery. **EXCLI Journal**, v. 13, p. 28–57, 2014.
- MIRESMAILLI, S.; ISMAN, M. B. Efficacy and Persistence of Rosemary Oil as an Acaricide Against Twospotted Spider Mite ( Acari : Tetranychidae ) on Greenhouse. **Journal of Economic Entomology**, n. 6, p. 2015–2023, 2006.
- MOHAN, M.; HAIDER, S. Z.; ANDOLA, H. C.; PUROHIT, V. K. Essential Oils as Green Pesticides : For Sustainable Agriculture. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 2, p. 100–106, 2011.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113–142, 2010.
- MORANDI, M. A. B.; JÚNIOR, T. J. de P.; BETTIOL, W.; TEIXEIRA, H. Controle biológico de fungos fitopatogênicos. **Informe agropecuário**, v. 30, p. 73–82, 2009.
- MOREIRA, A. C. G. **Microencapsulação de óleos essenciais**. 2014. 48 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Química) - Universidade do Porto, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Porto, 2014.
- MORRISON, P. D.; SHELLIE, R. A.; POYNTER, S. D. H.; MARIOTT, P. Selection of Columns for GCxGC Analysis of Essential Oils. **LGCG Europe**, v. 2, p. 76–80, 2010.
- NEGRELLE, R. R. B.; GOMES, E. C. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: chemical composition and biological activities. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, p. 80–92, 2007.

NIST. **Livro de Química na Web**. Disponível em: <<https://webbook.nist.gov/>>. Acesso em: 19 mar. 2019.

OLIVEIRA, J. L.; CAMPOS, E. V. R.; PEREIRA, A. E. S.; NUNES, L. E. S.; SILVA, C. C. L.; PASQUOTO, T.; LIMA, R.; SMANIOTTO, G.; POLANCZYK, R. A.; FRACETO, L. F. Geraniol Encapsulated in Chitosan/Gum Arabic Nanoparticles: Promising System for Pest Management in Sustainable Agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 5325–5334, 2018a.

OLIVEIRA, J. L.; CAMPOS, E. V. R.; PEREIRA, A. E. S.; PASQUOTO, T.; LIMA, R.; GRILLO, R.; ANDRADE, D. J.; SANTOS, F. A.; FRACETO, L. F. Zein nanoparticles as eco-friendly carrier systems for botanical repellents aiming sustainable agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 1330–1340, 2018b.

PARKER, G. L.; SMITH, L. K.; BAXENDALE, I. R. Development of the industrial synthesis of vitamin A. **Tetrahedron**, v. 72, p. 1645–1652, 2016.

PATEL, V. R.; AGRAWAL, Y. K. Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, p. 81–88, 2011.

PEREIRA, R. B.; LUCAS, G. C.; PERINA, F. J.; ALVES, E. Essential oils for rust control on coffee plants. **Ciênc. agrotec.**, v. 36, p. 16–24, 2012.

POLYMER PROPERTIES DATABASE. **REFRACTIVE INDEX OF AMORPHOUS POLYMERS**. Disponível em: <<https://polymerdatabase.com/polymer physics/Ref Index Table .html>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

POONPAIBOONPIPAT, T.; PANGNAKORN, U.; SUVUNNAMEK, U.; TEERARAK, M.; CHAROENYING, P.; LAOSINWATTANA, C. Phytotoxic effects of essential oil from *Cymbopogon citratus* and its physiological mechanisms on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). **Industrial Crops & Products**, v. 41, p. 403–407, 2013.

RAJÃO, R.; RITTL, C. **Combate às alterações climáticas**. Disponível em: <<http://envolverde.cartacapital.com.br/o-agronegocio-brasileiro-e-uma-potencia-mas-se-tornou-uma-ameaca-diz-artigo/>>.

RANJAN, S.; DASGUPTA, N.; LICHTFOUSE, E. **Nanoscience in food and agriculture**. Dijon: Springer, 2016.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 887–913, 2011.

REGANOLD, J. P.; WACHTER, J. M. Organic agriculture in the twenty-first century. **Nature Plants**, v. 2, p. 1–8, 2016.

RÍOS, J. L. Essential oils: what they are and how the terms are used and defined. In: **Essential oils in food preservation, flavor and safety**. San Diego: Academic Press - Elsevier, 2016. p. 3–10.

ROOS, W. H.; IVANOVSKA, I. L.; EVILEVITCH, A.; WUITE, G. J. L. Viral capsids: Mechanical characteristics, genome packaging and delivery mechanisms. **Celular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 1484–1497, 2007.

SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; AGOSTINI, F.; SERAFINI, L. A.; SANTOS, P. L.; MOLON, R.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Chemical composition of the essential oils from leaves and fruits of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi from southern Brazil. **J.Essent.Oil Bearing Plants**, v. 12, p. 7–15, 2009.

SEFU, G.; SATHEESH, N.; BERECHA, G. Effect of Essential Oils Treatment on Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) Disease Development, Quality and Shelf Life of Mango Fruits (*Mangifera indica* L). **J. Agric. & Environ. Sci.**, v. 15, p. 2160–2169, 2015.

SELLAMUTHU, P. S.; SIVAKUMAR, D.; SOUNDY, P.; KORSTEN, L. Postharvest Biology and Technology Essential oil vapours suppress the development of anthracnose and enhance defence related and antioxidant enzyme activities in avocado fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 81, p. 66–72, 2013.

SIENKIEWICZ, A.; KRASUCKA, P.; CHARMAS, B.; STEFANIAK, W.; GOWOREK, J. Swelling effects in cross-linked polymers by thermogravimetry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 130, p. 85–93, 2017.

SILVA, C. de B. da; GUTERRES, S. S.; WEISHEIMER, V.; SCHAPOVAL, E. E. S. Antifungal Activity of the Lemongrass Oil and Citral Against *Candida* spp. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 63–66, 2008.

SIQUEIRA JÚNIOR, C. L.; FREIRE, M. das G. M.; MOREIRA, A. S. N.; MACEDO, M. L. R. Control of Papaya Fruits Anthracnose by Essential Oil of *Ricinus communis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, p. 75–80, 2012.

SIVAKUMAR, D.; BAUTISTA-BAÑOS, S. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. **Crop Protection**, v. 64, p. 27–37, 2014.

SOLIMAN, E. A.; EL-MOGHAZY, A. Y.; EL-DIN, M. S. M.; MASSOUD, M. A. Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and in Vitro Evaluation of Antifungal Activity. **Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences**, v. 03, p. 48–55, 2013.

STANGARLIN, M. F. L. **Avaliação da influência do óleo e do polímero sobre as características físico-químicas e estabilidade de sistemas nanoestruturados contendo ubiquinona**. 2014. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Santa Maria, 2014.

TAJIDIN, N. E.; AHMAD, S. H.; ROSENANI, A. B.; AZIMAH, H.; MUNIRAH, M. Chemical composition and citral content in lemongrass ( *Cymbopogon citratus* ) essential oil at three maturity stages. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 2685–2693, 2012.

TAWAKKAL, I. S. M. A.; CRAN, M. J.; MILTZ, J.; BIGGER, S. W. A Review of Poly (Lactic Acid)-Based Materials for Antimicrobial Packaging. **Journal of Food Science**, v. 79, p. 1477–1490, 2014.

TOMAZONI, E. Z.; PAULETTI, G. F.; RIBEIRO, R. T. S.; MOURA, S.; SCHWAMBACH, J. In vitro and in vivo activity of essential oils extracted from *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus globulus* and *Cinnamomum camphora* against *Alternaria solani* Sorauer causing early blight in tomato. **Scientia Horticulturae**, v. 223, p. 72–77, 2017.

TOMAZONI, E. Z.; RIBEIRO, R. T. S.; PAULETTI, G. F.; SOARES, G. L. G.; SCHWAMBACH, J. Inhibition of *Alternaria* stem canker on tomato by essential oils from *Baccharis* species. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, p. 1–9, 2019.

TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of Essential Oils : A Review. **Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, p. 40–53, 2013.

UC DIVISION OF AGRICULTURE AND NATURAL RESOURCES. “**Organic Farmig**” **What is Sustainable Agriculture?** Disponível em: <<http://asi.ucdavis.edu/programs/ucsarep/what-is-sustainable-agriculture/practices/organic-farming>>. Acesso em: 11 fev. 2019.

UNITED NATIONS. **Sustainable Development Goals**. Disponível em:

<<https://www.un.org/sustainabledevelopment/sustainable-development-goals/>>. Acesso em: 28 ago. 2019.

UNITED NATIONS. **A year to celebrate plants: UN proclaims 2020 the International Year of Plant Health**. Disponível em:

<<https://www.ippc.int/en/news/a-year-to-celebrate-plants-un-proclaims-2020-the-international-year-of-plant-health/>>. Acesso em: 28 ago. 2019.

VENTURINI, C. G.; JÄGER, E.; OLIVEIRA, C. P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, p. 200–208, 2011.

VERNIN, G.; LAGEOT, C.; GAYDOU, E. M.; PARKANYI, C. Analysis of the essential oil of *Lippia graveolens* HBK from El Salvador. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, n. 219–226, p. 219–226, 2001.

WIBOWO, D.; ZHAO, C.; PETERS, B. C.; MIDDELBERG, A. P. J. Sustained Release of Fipronil Insecticide in Vitro and in Vivo from Biocompatible Silica Nanocapsules. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 12504–12511, 2014.

YANG, F.-L.; LI, X.-G.; ZHU, F.; LEI, C.-L. Structural Characterization of Nanoparticles Loaded with Garlic Essential Oil and Their Insecticidal Activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 10156–10162, 2009.

ZELLNER, B. A.; BICCH, C.; DUGO, P.; RUBIOLO, P.; DUGO, G.; MONDELLO, L. Linear retention indices in gas chromatographic analysis: a review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 297–314, 2008.

ZHANG, Y.; NIU, Y.; LUO, Y.; GE, M.; YANG, T.; LUCY, L.; WANG, Q. Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate – chitosan hydrochloride double layers. **Food Chemistry**, v. 142, p. 269–275, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.058>>.

**APÊNDICE A – VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO  
DE ALTA EFICIÊNCIA**

<b>Concentração (% v/v)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Área calculada (média ± desvio padrão)</b>	<b>Precisão (RSD %)</b>
0,002	1	610,0 ± 44,0	5,96
	2	872,8 ± 45,0	
	3	1482,9 ± 87,8	
0,0078	1	2002,3 ± 123,1	5,45
	2	2878,7 ± 145,4	
	3	4881,0 ± 263,2	
0,0625	1	12392,0 ± 549,4	3,42
	2	17732 ± 500,9	
	3	30124 ± 1010,7	

**APÊNDICE B – PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>3</sup>**

StdOrder	RunOrder	OE (µL)	Span 60 (g)	Tween 80 (g)	Diâmetro médio (nm)	Potencial Zeta (mV)	EE (%)
17	1	100	0,077	0,077	94,8	-25,2195	99,7709081
4	2	200	0,154	0,077	167,4	-24,373	99,4366630
11	3	100	0,154	0,077	151,4	-29,6714	99,1503029
24	4	200	0,154	0,154	166,4	-23,7914	99,5025514
21	5	100	0,077	0,154	109,7	-20,3431	99,3007483
12	6	200	0,154	0,077	168	-24,9569	99,4793647
13	7	100	0,077	0,154	82,4	-22,5143	99,3099157
8	8	200	0,154	0,154	-	-23,8347	99,5272998
14	9	200	0,077	0,154	125,7	-18,284	99,4603981
22	10	200	0,077	0,154	127,5	-18,5935	99,4790190
9	11	100	0,077	0,077	95,1	-25,4409	99,7780489
19	12	100	0,154	0,077	147,5	-28,5728	99,1644295
3	13	100	0,154	0,077	152,6	-28,1868	99,1769587
15	14	100	0,154	0,154	111,2	-27,1511	99,0283253
1	15	100	0,077	0,077	99,3	-24,7922	99,7766422
10	16	200	0,077	0,077	125	-14,5847	99,4939979
5	17	100	0,077	0,154	84,9	-24,416	99,3149345
20	18	200	0,154	0,077	184,4	-24,9719	99,4765692
18	19	200	0,077	0,077	125,8	-17,792	99,4824225
6	20	200	0,077	0,154	125,1	-18,6442	99,4862074
7	21	100	0,154	0,154	-	-27,9092	99,0420585
23	22	100	0,154	0,154	125,5	-28,6977	99,0470654
2	23	200	0,077	0,077	123,6	-16,9461	99,4928714
16	24	200	0,154	0,154	158,1	-22,9942	99,5276753