

**UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA REGENERATIVA E QUÍMICA
MEDICINAL**

Tatiane Zucchini de Souza

**SISTEMA POLIMÉRICO NANOESTRUTURADO BASEADO EM RECURSOS
NATURAIS PARA CARREAMENTO DE COMPONENTES ATIVOS COM
AÇÃO ANTIMICROBIANA**

Araraquara, SP
2025

Tatiane Zucchini de Souza

**SISTEMA POLIMÉRICO NANOESTRUTURADO BASEADO EM RECURSOS
NATURAIS PARA CARREAMENTO DE COMPONENTES ATIVOS COM
AÇÃO ANTIMICROBIANA**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Trovatti

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, SP
2025

FICHA CATALOGRÁFICA

S719s Souza, Tatiane Zucchini de

Sistema polimérico nanoestruturado baseado em recursos naturais para carreamento de componentes ativos com ação antimicrobiana/Tatiane Zucchini de Souza. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2025.
60f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal- Universidade de Araraquara-UNIARA

Orientador: Profa. Dra. Eliane Trovatti

1. Polímero vegetal. 2. Óleo essencial. 3. Nanoemulsão. 4. Drug delivery system. I. Título.

CDU 57.089

TATIANE ZUCCHINI DE SOUZA


Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 17 de fevereiro de 2025.


BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **ELIANE TROVATTI**
Data: 20/02/2025 13:48:24-0300
verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof^a Dr^a ELIANE TROVATTI (Orientadora)
Universidade de Araraquara – UNIARA

Documento assinado digitalmente
 **TAMIRES DE SOUZA NOSSA**
Data: 18/02/2025 18:30:06-0300
verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof^a Dr^a TAMIRES DE SOUZA NOSSA
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus de Itapetininga- IFSP

Documento assinado digitalmente
 **REGIANE DE FATIMA TRAVENSOLO**
Data: 20/02/2025 13:29:59-0300
verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr^a REGIANE DE FÁTIMA TRAVENSOLO
Agência de Inovação da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

*Dedico essa dissertação aos meus **pais**, Solange e Marco; por todo o carinho e apoio que me proporcionaram; permitindo que eu pudesse estudar e seguir os meus sonhos. Sem vocês, nada disso seria possível.
Obrigado por tanto.*

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial a minha orientadora, Profa. Dra. Eliane Trovatti, por todo o aprendizado, apoio e incentivo nesses últimos anos. Dedicada ao ensino, é uma docente e pesquisadora exemplar.

Agradecimento especial ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal - PPBG-MRQM, pelo incentivo empreendedor, que contribui e contribuirá com a minha futura jornada empreendedora.

Agradecimento ao coordenador do curso de Pós-graduação do programa PPBG-MRQM, Prof. Dr. André Capaldo do Amaral, por todo o apoio discente nesses últimos anos.

Agradecimento a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES), por permitir oportunidades de carreira acadêmica a diversos estudantes devido à contribuição do fomento à pesquisa.

Agradeço a Universidade Estadual Paulista - Câmpus Araraquara e Câmpus Jaboticabal, especialmente a Profa. Dra. Marita Vedovelli Cardozo, pela sua disponibilização e contribuição nos ensaios microbiológicos, e ao laboratório do Prof. Dr. Marlus Chorilli, pela disponibilização dos equipamentos para análises de caracterização físico-química das minhas amostras.

Agradeço a minha irmã, Camila, pelas conversas sobre pesquisa e por ser uma das biólogas que me traz grande incentivo.

Ao meu irmão Bruno, que também vive sua jornada acadêmica, e as nossas conversas sobre licenciatura e a vida no âmbito escolar.

Agradeço ao meu grande amor, João, por todo o carinho, grande apoio e compreensão por todos esses anos.

Agradeço a minha amiga, Isabela, por todas as conversas sobre pesquisa, e por passarmos juntas os desafios durante a pós-graduação.

RESUMO

Sistemas poliméricos nanoestruturados são utilizados para carrear e melhorar a estabilidade de componentes ativos como os dos óleos essenciais, visto que a conservação das propriedades biológicas desses óleos é desafiadora, por serem altamente instáveis na presença de agentes naturais oxidantes, que podem causar sua degradação. Esses sistemas podem ser aplicados no combate a agentes microbianos em diferentes áreas, como a área alimentícia, da saúde humana e animal, devido aos componentes ativos encapsulados, oferecendo novas opções no combate à resistência antimicrobiana. Neste estudo desenvolveu-se e caracterizou-se nanopartículas de amido contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. Cinco formulações de nanoemulsão foram preparadas utilizando dois sistemas líquidos, nomeadamente uma solução aquosa contendo surfactante e uma fase oleosa. As caracterizações físico-químicas do sistema como o tamanho médio da nanopartícula, potencial zeta e índice de polidispersão foram determinados por espalhamento dinâmico de luz, a eficiência de encapsulamento foi determinada por espectroscopia Uv-vis, o potencial antimicrobiano in vitro das amostras foi determinado por teste de difusão em ágar para três cepas bacterianas e uma fúngica e, por concentração inibitória mínima e concentração bacteriana mínima, ambos analisados contra cepas bacterianas e, como uma avaliação de controle microbiológico, foi realizado a contagem de colônias de microrganismos in vitro, analisando-se a proliferação de microrganismos nas amostras de nanoemulsão, após um período de dez meses. Foram também realizados testes de revestimento comestível para avaliação da proteção de alimentos in natura. Para este teste, os frutos de acerola e uva foram imersos, separadamente, na nanoemulsão e mantidas em temperatura ambiente para análise do tempo de prateleira. Os resultados obtidos para o tamanho médio das nanopartículas variaram entre 232-559 nm, o potencial zeta entre -22 - -4,25 mV, o índice de polidispersão entre 0,5-1,0, a eficiência de encapsulamento 46-15%, aproximadamente. As amostras preparadas com maiores concentrações de óleo essencial apresentaram potencial antibacteriano e potencial antifúngico, utilizando o teste de difusão em poços. Resultado semelhante foi obtido nos ensaios de inibição mínima inibitória e concentração bacteriana mínima. Em relação ao ensaio de controle microbiológico, as amostras AM1 e AM2 não apresentaram presença de colônias de microrganismos, evidenciando preservação a longo prazo do óleo nas nanopartículas. O teste de revestimento comestível proporcionou proteção antimicrobiana, aumentando o tempo de prateleira dos frutos em comparação a um grupo controle, que não recebeu tratamento com óleo. Conclui-se que o sistema nanoestruturado a base de óleo essencial, desenvolvido no projeto, apresentou potencial para aplicações contra agentes microbianos.

Palavras-chaves: polímero vegetal, óleo essencial, nanoemulsão, *drug delivery system*.

ABSTRACT

Nanostructured polymeric systems are used to carry and improve the stability of active components such as essential oils, since the conservation of the biological properties of these oils is challenging, as they are highly unstable in the presence of natural oxidizing agents, which can cause their degradation. These systems can be applied to combat microbial agents in different areas, such as food, human and animal health, due to the encapsulated active components, offering new options in the fight against antimicrobial resistance. In this study, starch nanoparticles containing *Melaleuca alternifolia* essential oil were developed and characterized. Five nanoemulsion formulations were prepared using two liquid systems: an aqueous solution containing surfactant and an oily phase. The physicochemical characterizations of the system such as the average nanoparticle size, zeta potential and polydispersity index were determined by dynamic light scattering, the encapsulation efficiency was determined by Uv-vis spectroscopy, the in vitro antimicrobial potential of the samples was determined by agar diffusion test for three bacterial strains and one fungal strain and, by minimum inhibitory concentration and minimum bacterial concentration, both analyzed against bacterial strains and, as a microbiological control evaluation, in vitro microorganism colony counts were carried out, analyzing the proliferation of microorganisms in the nanoemulsion samples after a period of ten months. Edible coating tests were also carried out to assess the protection of fresh foods. For this test, acerola and grapefruits were immersed separately in the nanoemulsion and kept at room temperature for shelf life analysis. The results obtained for the average size of the nanoparticles varied between 232-559 nm, the zeta potential between -22 - -4.25 mV, the polydispersity index between 0.5-1.0, and the encapsulation efficiency of approximately 46-15%. The samples prepared with higher concentrations of essential oil showed antibacterial and antifungal potential, using the well diffusion test. Similar results were obtained in the minimum inhibitory inhibition and minimum bacterial concentration tests. With regard to the microbiological control test, samples AM1 and AM2 showed no presence of microorganism colonies, showing long-term preservation of the oil in the nanoparticles. The edible coating test provided antimicrobial protection, increasing the shelf life of the fruit compared to a control group, which received no oil treatment. It is concluded that the essential oil-based nanostructured system developed in the project has potential for applications against microbial agents.

Keywords: vegetable polymer, essential oil, nanoemulsion, *drug delivery system*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Relação área superficial/volume | 12 |
| Figura 2: Exemplos de nanopartículas, com diferentes formas e propriedades. Dendrímeros (a), nanopartículas lipídicas sólidas (b), lipossoma (c), micelas (d) e nanoemulsão (e) | 14 |
| Figura 3: Estrutura química dos polissacarídeos..... | 17 |
| Figura 4: Processo de gelatinização do amido..... | 18 |
| Figura 5: Esquema da desestabilização da arquitetura celular bacteriana por nanopartículas..... | 22 |
| Figura 6: Esquema metodológico..... | 26 |
| Figura 7: Processo de imersão dos frutos em nanopartículas (a). Frutos imersos (b)..... | 31 |
| Figura 8: Inicial (I, II), parcial (III, IV) e final (V) das etapas do processo de desintegração dos grânulos de amido..... | 33 |
| Figura 9: Tamanho médio das nanopartículas | 34 |
| Figura 10: Tamanho médio dos grãos retrógrados da solução aquosa de amido | 36 |
| Figura 11: Valores do potencial zeta (mV) | 37 |
| Figura 12: Formulações das amostras | 38 |
| Figura 13: Representação da nanopartícula | 39 |
| Figura 14: <i>Escherichia coli</i> (a), <i>Staphylococcus aureus</i> (b), <i>Candida albicans</i> (c), Cepa de leite mastítico (d) Cepas de leite mastítico (e). | 41 |
| Figura 15: Resultado do ensaio microbiológico no teste controle..... | 44 |
| Figura 16: Resultado do revestimento com nanopartículas, espécie <i>Malpighia emarginata</i> (a). Espécie <i>Vitis vinifera L.</i> (b) | 46 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Composição das etapas e tratamentos | 26 |
| Tabela 2: Composição das amostras | 27 |
| Tabela 3: Composição e tamanho médio das nanopartículas (nm)..... | 34 |
| Tabela 4: Índice de polidispersão das amostras..... | 35 |
| Tabela 5: Valores do potencial zeta | 37 |
| Tabela 6: Valores da eficiência de encapsulamento | 39 |
| Tabela 7: Resultados da concentração inibitória mínima da nanoemulsão contra cepas bacterianas | 42 |
| Tabela 8: Resultados da concentração inibitória mínima bactericida da nanoemulsão..... | 42 |
| Tabela 9: Resultados CIM de nanopartículas com óleo essencial encapsulado | 43 |
| Tabela 10: Resultados CBM de nanopartículas com óleo essencial encapsulado..... | 43 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1. Materiais nanométricos | 12 |
| 1.2. Liberação controlada de componentes ativos | 13 |
| 1.2.1. Nanoemulsão | 14 |
| 1.3. Caracterizações físico-químicas de nanopartículas | 14 |
| 1.4. Seleção de materiais na escala nanométrica..... | 15 |
| 1.5. Componentes constituintes das nanopartículas baseadas em recursos naturais..... | 16 |
| 1.5.1. Amido de milho..... | 16 |
| 1.5.2. Nanopartículas de amido | 19 |
| 1.5.3. Óleos essenciais | 19 |
| 1.5.4. Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> | 20 |
| 1.5.5. Mecanismo de ação dos óleos essenciais em microrganismos..... | 20 |
| 1.5.6. Encapsulamento de óleo essencial em nanopartículas..... | 22 |
| 1.6. Aplicações de nanopartículas com ação antimicrobiana..... | 22 |
| 1.6.1. Nanopartículas aplicadas em revestimentos in natura..... | 22 |
| 2. OBJETIVOS | 24 |
| 2.1 Objetivo geral:..... | 24 |
| 2.2. Objetivos específicos: | 24 |
| 3. MATERIAIS | 25 |
| 4. METODOLOGIA..... | 26 |
| 4.1. Análise da quebra dos grânulos de amido de milho por microscopia óptica | 26 |
| 4.2. Preparo da nanoemulsão..... | 26 |
| 4.3. Caracterizações físico-químicas | 27 |

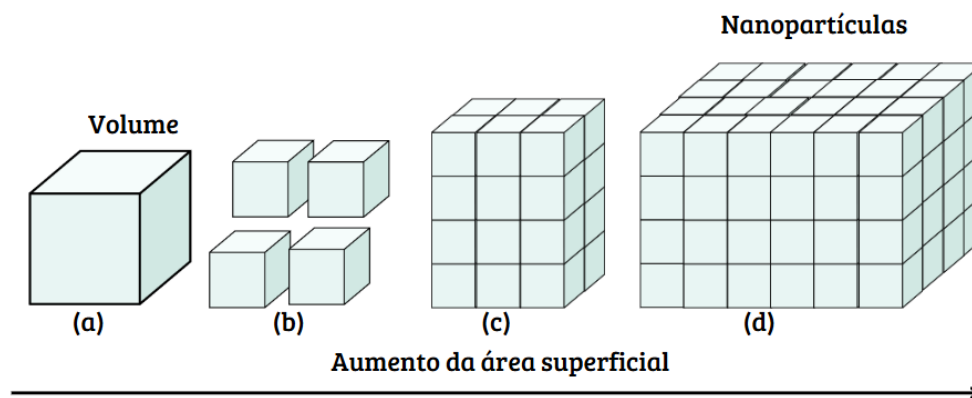
| | |
|---|----|
| 4.3.1. Tamanho médio das nanopartículas, índice de polidispersão e potencial zeta | 27 |
| 4.3.2. Eficiência do encapsulamento (EE%) | 28 |
| 4.4. Potencial antimicrobiano das amostras in vitro | 28 |
| 4.5. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) | 29 |
| 4.6. Controle microbiológico - análise de proliferação de microrganismos nas amostras de nanoemulsão..... | 30 |
| 4.7. Avaliação do efeito protetor de frutos pós-colheita | 30 |
| 5. Resultados e Discussões | 32 |
| 5.1. Desintegração dos grãos de amido de milho | 32 |
| 5.2. Caracterizações físico-químicas | 33 |
| 5.2.1. Tamanho médio da partícula e índice de polidispersão | 33 |
| 5.2.2. Potencial Zeta | 36 |
| 5.4. Eficiência de encapsulamento | 39 |
| 5.5. Potencial antimicrobiano | 40 |
| 5.6. Concentração inibitória mínima e bactericida mínima..... | 41 |
| 5.7. Controle microbiológico - análise da proliferação de bactérias e fungos na nanoemulsão in vitro..... | 44 |
| 6. Conclusões..... | 47 |
| 7. Referências bibliográficas..... | 48 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Materiais nanométricos

A nanociência permite a criação de materiais em escala nanométrica, enquanto a nanotecnologia refere-se ao emprego tecnológico destes materiais (SANFELICE, et al., 2022). Por definição, um material nanométrico apresenta tamanho na escala de 1 a 1000 nm, em pelo menos uma de suas dimensões (FILHO et al., 2024). Os materiais nanométricos possuem propriedades físicas e químicas diferentes quando comparados aos de mesma composição na escala micro/macrosscópica (SANFELICE, et al., 2022). Isso ocorre, devido às suas dimensões nanométricas, que resultam no aumento da razão da área de superfície do material em relação ao seu volume (Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2010), conforme representado na Fig. 1. Ao olhar o cubo inicial (a) tem-se um valor das arestas e de seu volume, ao quebrar esse cubo em pedaços pequenos tem-se uma maior quantidade de cubos, maior área superficial e o volume é mantido (b, c, d).

Figura 1: Relação área superficial/volume



Fonte: Sanfelice, et al., (2022), com modificações

Ao somar o volume dos cubos menores, ou dos cubos maiores, o volume permanecerá o mesmo, independe das subdivisões dos cubos, o que é potencializado é a área superficial, especialmente quando as dimensões do cubo se aproximam da escala nanométrica. Quando a razão área de superfície/volume é aumentada, ocorre um aumento na energia da superfície do material, tornando-o mais reativo (SANFELICE, et al., 2022; OTONI e AZEREVO, 2022; VERANTH,

et al., 2010). Devido a essa característica, os materiais nanométricos são amplamente utilizados para carreamento de componentes ativos, com aplicação para diversas áreas, como a da saúde humana, animal, agroindustrial, alimentícia, industrial, entre outras.

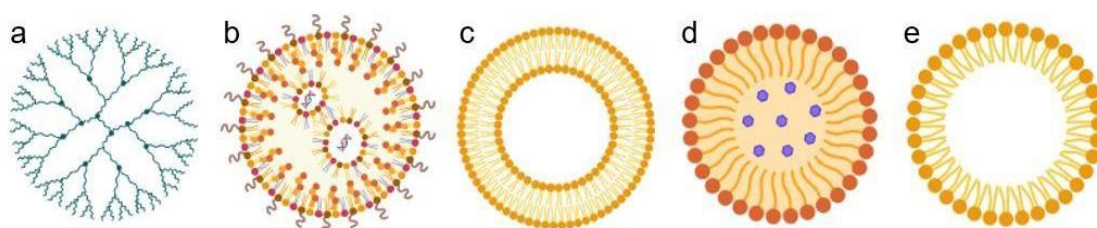
1.2. Liberação controlada de componentes ativos

Um sistema de administração de medicamentos pode ser descrito como um método ou processo que aplica princípios dos conhecimentos nas áreas de química, de engenharia e biologia para administrar componentes ativos (BORANDEH, et al., 2021). A administração de componentes ativos na forma de nanoestruturas, consiste em controlar suas dimensões, assim como de sua constituição química, físicas e biológicas, de modo a conseguir um transporte eficiente e liberação controlada do componente encapsulado (SILVA, 2013). O uso da nanotecnologia auxilia na resolução de problemas associados às substâncias ativas livres, como por exemplo, aumentando a biodisponibilidade da substância, diminuindo os possíveis efeitos secundários associados à forma livre. Como exemplo, as moléculas de óleos essenciais que são facilmente degradadas na presença de agentes naturais oxidantes, que tendem a desestabilizar sua estrutura. Este problema pode ser resolvido com a implementação dessas moléculas em um sistema nanométrico, que preserva suas propriedades biológicas funcionais, permitindo aplicações mais eficazes dos óleos essenciais (MOGHIMI, et al., 2016).

Exemplos de nanoestruturas usadas para administrar componentes ativos são lipossomas, dendrímeros, nanotubos, micelas poliméricas, nanoesferas, nanocápsulas, nanopartículas híbridas polímero-lipídicas, nanopartículas lipídicas sólidas, conjugados poliméricos, nanopartículas metálicas ou cerâmicas, nanosuspensões, nanocristais, nanoemulsões, entre outros, (AITA, 2021; CHORILLI, et al. 2013; YADAV, et al. 2022; DIMER, et al., 2013; SILVA, 2013; WAKASKAR, 2018; TOPAN, 2016; BATISTA et al., 2007; TORCHILIN, 2006). A seleção da nanoestrutura e dos materiais depende de muitos fatores, incluindo a dimensão requerida; propriedades intrínsecas dos componentes (solubilidade aquosa e estabilidade), características da superfície da nanoestrutura, como carga e permeabilidade; grau de biodegradabilidade,

biocompatibilidade e toxicidade; perfil de liberação do componente pretendido; e antigenicidade do produto final (MOHANRAJ e CHEN 2006). De acordo com o método de formulação usado na produção, podem obter-se sistemas de variadas formas (esférica, em forma de concha ou ramificada), dimensões, com diferentes propriedades químicas, físicas e biológicas. A Fig. 2 ilustra exemplos de nanopartículas, com diferentes estruturas e, conseqüentemente, diferentes propriedades (SILVA, 2013).

Figura 2: Exemplos de nanopartículas, com diferentes formas e propriedades. Dendrímeros (a), nanopartículas lipídicas sólidas (b), lipossoma (c), micelas (d) e nanoemulsão (e)



Fonte: Autora, (2024).

1.2.1. Nanoemulsão

Entre as nanoestruturas existentes, a nanoemulsão foi a tecnologia utilizada neste projeto de pesquisa.

A nanoemulsão é um sistema coloidal heterogêneo formado por fases oleosas e aquosas, podendo conter ou não surfactantes (KUMBHAR, et al., 2023) e sua estrutura é composta por nanopartículas. De acordo com a disposição espacial entre suas fases, podem ser classificadas como emulsões simples, óleo-em-água (O/A) ou água-em-óleo, e emulsões múltiplas [(A1/O/A2) e (O1/A/O2)] (OTONI e DE AZEREDO, et al., 2022). Esse sistema não pode ser formado espontaneamente, sendo necessário energia, a partir de dispositivos mecânicos de baixa energia e/ou de alta energia (ASSIS, et al., 2012).

A nanoemulsão é uma alternativa promissora para administrar e melhorar a biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos (KUMAR, et al., 2015) como o óleo essencial, utilizado neste estudo.

1.3. Caracterizações físico-químicas de nanopartículas

A criação de novos materiais com propriedades desejadas exige estudos detalhados e conhecimento das rotas utilizadas em seu desenvolvimento.

Materiais em uma escala nanométrica requerem informações sobre suas dimensões, estrutura química, suas formas e propriedades de superfície. Todas estas características influenciam fortemente seu desempenho final e estabilidade (SANFELICE, et al., 2022).

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) é amplamente utilizada para determinar o tamanho de partículas em suspensão. Para isso, um feixe de luz monocromático, como um laser, incide sobre a amostra, e o padrão de espalhamento gerado é analisado para correlacioná-lo com as dimensões das partículas dispersas na solução ou suspensão (NOMURA, et al., 2013). Além do DLS, técnicas de microscopia também são empregadas, sendo a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a de transmissão (MET) as mais comuns para a análise do tamanho e da morfologia das partículas.

Materiais dispersos em um meio líquido normalmente adquirem carga em sua superfície, o que afeta a estabilidade da dispersão e o estado de agregação das partículas. Partículas que apresentam alta carga superficial, positiva ou negativa, tendem a se repelir e formar uma dispersão coloidal estável. Partículas com baixa carga tendem a se aglomerar e precipitar. A carga pode ser determinada por medições do potencial zeta (SAGBANA, et al., 2023). A homogeneidade das partículas em suspensão pode ser avaliada através do índice de polidispersão (PDI) (MOREIRA, 2020). Este índice pode variar entre 0-1, onde os valores próximos de 0 são registrados para amostras com uma distribuição homogênea de tamanho enquanto amostras mais próximas de 1 tendem ser heterogêneas (LEMES, et al., 2017).

1.4. Seleção de materiais na escala nanométrica

O emprego de nanoestruturas e seu progresso, apresenta preocupações sobre os riscos de contato com organismos vivos e as dispersões em diferentes ambientes, ocasionando poluição. Por isso, é tão importante selecionar materiais que possam diminuir possibilidades de impactos ambientais. Nanoestruturas podem ser preparadas a partir de uma variedade de materiais de origem orgânica e/ou inorgânica (MOHANRAJ e CHEN, 2006; SILVA, 2013). Na literatura é possível encontrar estudos sobre a toxicidade de alguns componentes de nanopartículas contendo materiais inorgânicos. O rim, por

exemplo, é um dos órgãos mais suscetíveis à toxicidade e ao acúmulo de nanopartículas metálicas. Essas nanopartículas podem se depositar nos tecidos renais, causando inflamações e danos locais (THU, et al., 2023). Além disso, a exposição dessas partículas durante o manuseio em ambientes operacionais pode ocasionar problemas de saúde (Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2010). Impactos ao meio ambiente também podem ser provocados, pois as nanopartículas podem migrar para diferentes ecossistemas, interagir e se depositar (MARTÍNEZ, et al., 2020; YAMINI, et al., 2023).

O desenvolvimento de nanoestruturas a partir de matéria prima de origem natural, pode ser vantajoso por apresentar uma menor possibilidade de toxicidade. Os biopolímeros são produzidos por organismos vivos como plantas, animais e fungos, via processos metabólicos intracelulares complexos que envolvem reações catalisadas por enzimas e reações de polimerização (HABITZREUTER, et al., 2022).

1.5. Componentes constituintes das nanopartículas baseadas em recursos naturais

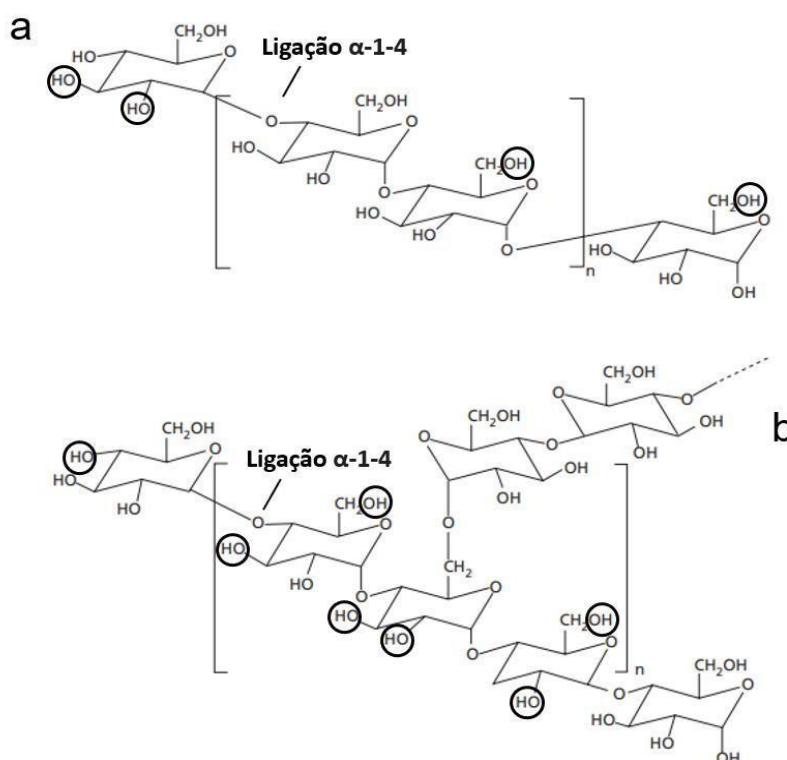
1.5.1. Amido de milho

A ampla variedade de polímeros naturais, como proteínas, polissacarídeos, peptídeos, colágeno, albumina, ácido poliático, ácido poliglicólico, entre outros, oferece múltiplas aplicabilidades em diferentes setores na área da saúde. A utilização desses polímeros está contribuindo para um futuro ecologicamente limpo (MATEI, et al. 2022; PANDE, 2015). Entre os exemplos citados, os polissacarídeos se destacam por suas amplas aplicações, devido às suas propriedades, como a hidrofiliabilidade e a capacidade de gelificação (IWATA, 2015).

O amido, componente escolhido para este estudo, é um polissacarídeo de fácil obtenção, baixo custo, biodegradável. É o carboidrato de reserva mais abundante em grãos, raízes, tubérculos, vegetais e frutos (VIÉGAS, 2016; MALI et al., 2010; WALTER, et al., 2005; CALDONAZO, 2022). É armazenado nas plantas na forma de grânulos, e as variações de tamanho, associações, composições (-glicosídeos, umidade, proteínas, lipídeos, proteínas e minerais) são dependentes de sua origem botânica (VALDEJÃO e JANSON, 1996;

TESTER e KARKALAS, 2001). Os grânulos de amido são compostos principalmente por dois tipos de polissacarídeos, a amilose e a amilopectina. A proporção entre elas é também variável em função da origem (CORRADINI, et al., 2007). O amido geralmente possui de 20-25% de amilose e 75-80% de amilopectina (JIMÉNEZ, et al., 2012). O amido de milho possui 28% de amilose e 72% de amilopectina. Os polissacarídeos presentes no amido possuem diferentes estruturas, propriedades e funções. A amilose é formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4, originando uma cadeia linear. A amilopectina é formada por unidades de glicose unidas em α -1,4 e α -1,6, formando uma estrutura ramificada (DENARDIN e DA SILVA, 2009). A estrutura química do amido pode ser visualizada na Fig. 3, abaixo.

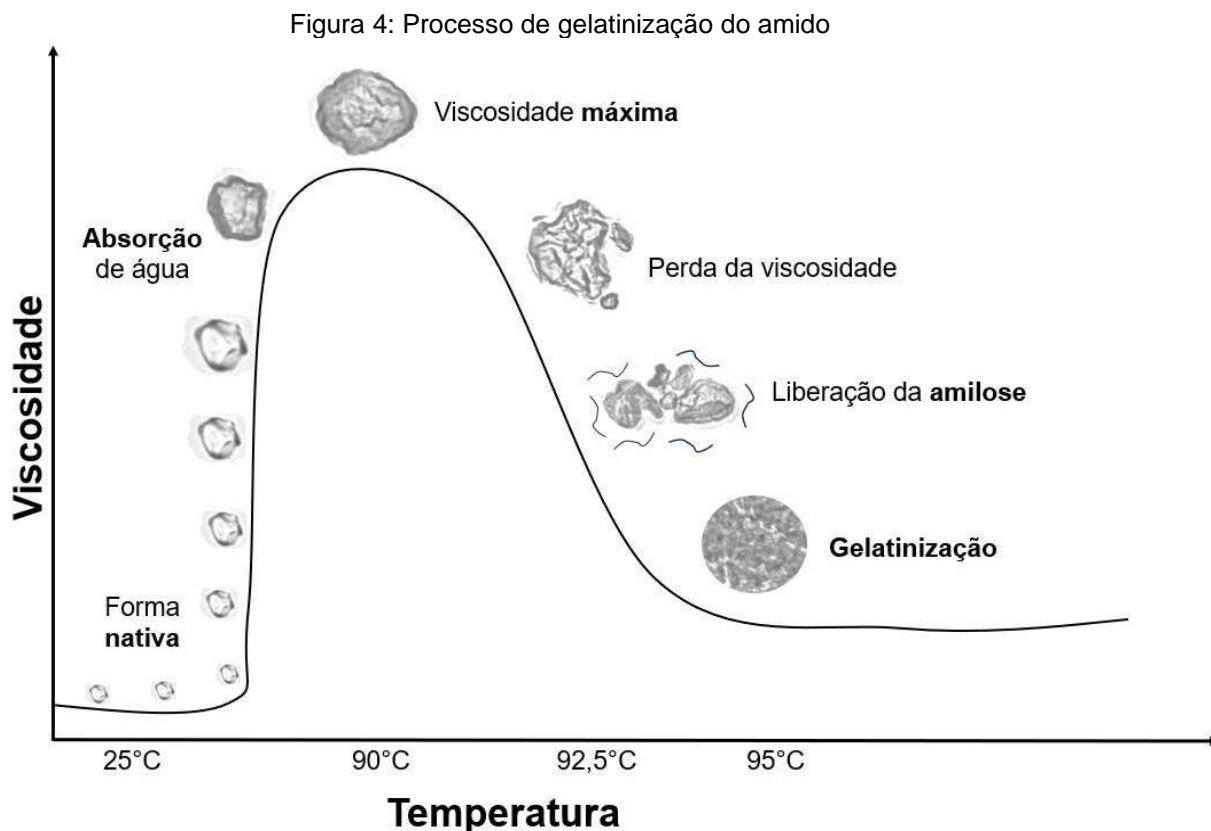
Figura 3: Estrutura química dos polissacarídeos



Fonte: Corradini, et al., (2007), com modificações. Amilose (a), amilopectina (b).

Entre essas duas frações, a amilopectina é, estrutural e funcionalmente, a mais importante, sendo suficiente para formar o grânulo, como ocorre em mutantes que são desprovidos de amilose (DENARDIN e DA SILVA, 2009). O teor de amilose influencia diversas características do amido, como a capacidade de gelificação, podendo gerar filmes resistentes, susceptíveis a hidrólises e ao

processo de retrogradação (PÉREZ e BERTOFT, 2010). Acredita-se que a amilose esteja localizada entre as cadeias da amilopectina e aleatoriamente entremeada entre as regiões amorfas e cristalinas (DENARDIN e DA SILVA, 2009). A alta hidrofiliabilidade do amido é atribuída à presença dos grupos hidroxilas, como apresentado na Fig. 3. A insolubilidade do grânulo em água fria resulta das fortes ligações de hidrogênio que mantêm as cadeias de amido unidas. No entanto, na presença de água e calor, a estrutura do grânulo absorve água, permitindo que componentes mais solúveis, como a amilose, se dissociem e se difundam para fora do grânulo (CORRADINI et al., 2007). Esse processo, conhecido como gelatinização, é representado na Fig. 4. A temperatura de ocorrência da gelatinização também conhecida por temperatura de gelatinização, a qual é também dependente da origem botânica do amido entre 60 °C a 75 °C (CORRADINI, et al., 2007). A gelatinização aumenta a viscosidade do meio à qual atinge o seu máximo na temperatura de gelatinização, os grânulos são quebrados e as regiões cristalinas desaparecem (COULTATE, 2002; PENG et al., 2007). Neste trabalho, o processo de gelatinização é empregado na preparação da matriz polimérica das nanopartículas.



Fonte: Autora, (2024).

1.5.2. Nanopartículas de amido

O amido, por ser de natureza atóxica, biodegradável, abundante e economicamente viável, tem atraído interesse em aplicações na área da nanotecnologia, sendo incorporado em diferentes sistemas nanoestruturados para administrar componentes bioativos (ANDRADE, 2018, KIM et al., 2015; AHMAD, et al., 2020; CALDONAZO, 2022; MARTA, et al., 2022).

Os métodos de preparação de nanopartículas de amido podem ser classificados em *top-down*, por hidrólise (ácida/enzimática) e/ou tratamentos físicos e *bottom-up*, como preparo de nanoemulsão, nanoprecipitação, recristalização, formação de complexos polieletrólitos, eletro-spray, eletrospinning, auto-montagem (SUN, 2018). No processo *top-down*, as nanopartículas podem ser produzidas a partir do refinamento da estrutura e do tamanho através da desintegração dos grânulos de amido. No processo *bottom-up*, as nanopartículas podem ser preparadas a partir de uma acumulação de moléculas de amido de uma forma controlada que é regulada por meios termodinâmicos como a auto-montagem (TAN, et al., 2009).

Neste trabalho o processo *top-down* é realizado para romper os grânulos de amido e permitir o preparo da suspensão, utilizada como matriz polimérica na composição das nanopartículas. O processo *bottom-up* é utilizado para a montagem da nanoemulsão a partir da suspensão de amido, óleo essencial e surfactante.

1.5.3. Óleos essenciais

Os óleos essenciais são encontrados em estruturas secretoras especiais localizadas nos tecidos ou na superfície das plantas (tricomas), como flores, brotos, sementes, cascas, folhas, ervas, madeiras, frutos e raízes (MARQUES, 2017). A extração de óleo essencial pode ser realizada por métodos como a destilação a vapor, hidrodestilação, percolação, extração por fluido supercrítico, extração assistida por ultrassom, entre outros (BELHACHAT, et al., 2018). Os óleos essenciais são substâncias não gordurosas, voláteis, produzidas pelo metabolismo secundário das plantas (NASCIMENTO et al., 2020). Estes metabolitos secundários são divididos em três grupos: compostos fenólicos, compostos nitrogenados e terpenos (TAIZ e ZEIGER, 2015). Os componentes

ativos destes óleos podem apresentar atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória, entre outras (HENSEL, et al., 2020).

1.5.4. Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*

A espécie *Melaleuca alternifolia* é nativa do Vale Bungawalbin em Nova Gales do Sul, leste da Austrália. Os povos do Vale Bungawalbin, são provavelmente os primeiros a utilizar as plantas medicinalmente. As histórias orais aborígenes relatam sobre “lagos curativos”, nas quais folhas da árvore caíam em sua superfície. Esses povos, utilizavam a planta como remédio herbal, inalando vapores e/ou substâncias voláteis das folhas esmagadas para tratamento de infecções respiratórias e infusões para tratamento de doenças de pele (CARSON, et al., 2006, apud ALTAMAN, 1988, p. 69). A indústria do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* nasceu após estudos das propriedades germicidas relatados em artigos científicos em 1920 (PENFOLD e GRANT, 1925; PENFOLD e MORRISON, 1946).

A principal atividade antimicrobiana deste óleo é atribuída principalmente ao terpinen-4-ol, um de seus principais componentes (CARSON, 2006). Representando aproximadamente 40% do óleo, é um álcool terciário com 10 carbonos em sua fórmula molecular, classificado como um monoterpene, sendo uma das maiores classes de substâncias naturais existentes (RODRIGUES, 2022). Sua hidrofobicidade auxilia na destruição da membrana celular bacteriana, com maior espectro de ação sobre bactérias Gram-negativas, devido à composição da mesma (LARANJEIRA, 2016).

1.5.5. Mecanismo de ação dos óleos essenciais em microrganismos

Os componentes dos óleos essenciais penetram e se acumulam na bicamada lipídica das membranas citoplasmáticas, desestabilizando a arquitetura celular (YAMMINE, et al., 2022; SWAMY, et al., 2016). Esta alteração causa danos às atividades metabólicas celulares, perda de componentes intracelulares essenciais, como proteínas e açúcares levando à morte celular (NAIR, et al., 2022; SWAMY, et al., 2016), entre outros modos de mecanismo.

Uma revisão detalhada sobre pesquisas utilizando diferentes tipos de óleos essenciais e moléculas ativas derivadas dos óleos, demonstrou que as

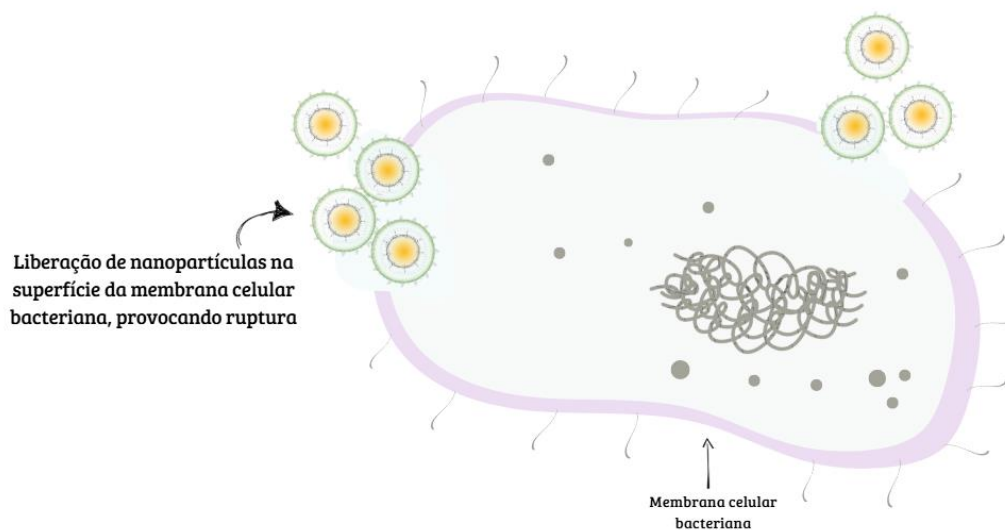
bactérias Gram-negativas são mais sensíveis do que as Gram-positivas (YAMMINE, et al., 2022). Dessa forma, ao se trabalhar com alvos microbianos específicos, é importante avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e seus derivados, como moléculas dele extraídas, contra diferentes tipos de cepas bacterianas e fúngicas.

Uma pesquisa mostrou que um sistema nanoestruturado na forma de nanoemulsão, contendo nanopartículas encapsuladas com o óleo essencial de *Thymus daenensis*, apresentou aumento significativo na atividade antibacteriana em comparação com o óleo na sua forma livre contra a bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli*) (MOGHIMI, et al., 2016). Concluíram que o óleo essencial não encapsulado não consegue interagir facilmente com as membranas celulares devido à sua baixa solubilidade em água. O mecanismo de ação desse sistema envolveu o carregamento e liberação das nanopartículas presentes na nanoemulsão na superfície da membrana celular. Isto permitiu que as moléculas hidrofóbicas do óleo conseguissem desestabilizar a membrana e, possivelmente, alterar a integridade da bicamada fosfolipídica, pois estão protegidas devido ao encapsulamento dos componentes do óleo na matriz polimérica. Dessa forma, a utilização da nanotecnologia, aumentou a possibilidade de inibição do microrganismo.

Pesquisas utilizando o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, indicaram que o terpinen-4-ol, levou cepas bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas e cepas fúngicas à morte. A desestabilização da arquitetura celular se deu pelo rompimento da membrana (CARSON, et al., 2006 e ZHANG, et al., 2018).

O mecanismo de ação do óleo para fungos é semelhante aos mecanismos citados anteriormente. O óleo essencial tem capacidade de penetrar e romper a parede celular fúngica e as membranas citoplasmáticas através de um processo de permeabilização, levando à desintegração das membranas mitocondriais (SWAMY, et al., 2016). A Fig. 5. Apresenta uma ilustração esquemática deste mecanismo.

Figura 5: Esquema da desestabilização da arquitetura celular bacteriana por nanopartículas



Fonte: Autora, (2024).

1.5.6. Encapsulamento de óleo essencial em nanopartículas

O encapsulamento é um processo de transporte de componentes em matrizes homogêneas ou heterogêneas. O encapsulamento de óleos essenciais em estruturas poliméricas naturais está avançando rapidamente, assim como a utilização dos polissacarídeos como matrizes carreadoras (RODRIGUES, 2022). O encapsulamento é realizado a fim de diminuir limitações como a instabilidade física, termodinâmica, bioatividade e volatilização de óleos essenciais (LARANJEIRA, 2016). Estes óleos são altamente instáveis na presença de oxigênio, luz, calor, umidade e metais, ocasionando diferentes reações de degradação. Assim, a manutenção de suas propriedades, portanto de sua eficiência, é um grande desafio (GUIMARÃES, et al., 2008).

1.6. Aplicações de nanopartículas com ação antimicrobiana

1.6.1. Nanopartículas aplicadas em revestimentos in natura

O crescimento da população mundial e a procura crescente por alimentos representam um desafio para a agricultura convencional. A agricultura precisa garantir o abastecimento da cadeia alimentar e, simultaneamente, superar os problemas que ameaçam a produção alimentar, incluindo as perspectivas de produção a longo prazo (MITTAL, et al., 2020). Um quarto da produção mundial de alimentos é desperdiçado após a colheita devido à contaminação microbiana,

o que resulta em perdas comerciais significativas (BONDI, et al., 2017). A atividade metabólica dos microrganismos compromete as propriedades físicas, químicas e sensoriais dos alimentos, reduzindo a sua qualidade e o prazo de validade. A contaminação dos alimentos conduz a perdas econômicas, bem como a riscos para a saúde pública (KHEZERLOU, et al., 2021). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2024), os alimentos contaminados causam doenças em cerca de 600 milhões de pessoas por ano em todo o mundo. Além disso, cerca de 420 mil dessas pessoas morrem em consequência da ingestão de alimentos inadequados. Este cenário mostra a importância de prevenir ou inibir a atividade microbiana na cadeia alimentar. Destaca também a necessidade do desenvolvimento de novos processos ou tecnologias neste setor produtivo, com o objetivo de reduzir ou eliminar as bactérias patogênicas e deteriorantes de origem alimentar (BONDI, et al., 2017).

O método mais comum utilizado para aumentar a vida útil de frutos e vegetais é o revestimento. Os produtos e processos de revestimento devem manter as características organolépticas e visuais dos produtos intactos, sem alterações. Devem ser atóxicos, isentos de sabor, cor ou qualquer outro elemento que possa alterar as propriedades do produto natural. Devem também ser comestíveis, atuar como barreiras à perda de água e à permeação de oxigênio, protegendo contra danos mecânicos, químicos e microbiológicos. Vários produtos são convencionalmente utilizados como revestimento para a conservação de alimentos, como o óleo mineral, a cera de parafina e componentes derivados de petróleo, com limites de quantidade para estes tipos de revestimentos (Canadian Produce Marketing Association, 2022). Para evitar os problemas de saúde causados pelo uso de produtos sintéticos, os recursos naturais e biotecnológicos estão a ganhar destaque e a incentivar o desenvolvimento e o aperfeiçoamento de tecnologias, incluindo os avanços da nanotecnologia (UNGUREANU, et al., 2023; SANTOS, et al., 2023).

O desenvolvimento de revestimentos comestíveis utilizando sistemas nanoestruturados baseados em recursos naturais tem sido utilizado para aumentar a vida útil dos alimentos devido ao encapsulamento de componentes ativos, apresentando aplicações emergentes na área de alimentos. Polímeros naturais como a quitosana, carboximetilcelulose, amido, alginato, entre outros, (KUMAR e NEERAJ, 2019; HASSAN, et al., 2018) são úteis como matriz

polimérica para incorporação de substâncias ativas (FALCÃO, et al., 2022). A natureza química dos polímeros naturais permite que muitos deles sejam solubilizados, processados e misturados com aditivos para desenvolver o sistema de revestimento. Entre as substâncias ativas de fontes naturais, os óleos essenciais têm sido destacados no domínio do revestimento de alimentos devido à sua atividade antimicrobiana contra vários microrganismos patogênicos alimentares (HASSOUN, et al., 2020). A formulação de sistemas de revestimento baseados em produtos naturais, incluindo o polímero natural para encapsulamento e a substância ativa também de fontes naturais, representa alternativas potenciais para os métodos convencionais de aplicação em alimentos. Estes sistemas podem ser úteis principalmente quando o revestimento está em contato direto com os alimentos, tais como frutos e vegetais frescos comestíveis.

Justificativa

A proposta desse estudo foi desenvolver um sistema nanoestruturado funcional e sustentável, oferecendo uma tecnologia alternativa, baseada em compostos naturais para aplicações com desejada ação antimicrobiana. Envolveu a formulação e caracterização de nanopartículas, associando as propriedades do amido, um polímero natural e biodegradável, com as propriedades antimicrobianas do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Desenvolvimento de um sistema nanoestruturado utilizando o amido de milho como matriz para carreamento do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* empregando a tecnologia de preparo de nanoemulsão para aplicações antimicrobianas.

2.2. Objetivos específicos:

- Estudo do rompimento dos grãos, entumescimento e gelatinização do amido de milho por tratamentos diferentes e análise por microscopia óptica.

- Caracterizações físico-químicas da nanoemulsão como tamanho médio das nanopartículas, índice de polidispersão e potencial zeta, determinados pela técnica de espelhamento dinâmico de luz.
- Determinação da quantidade de óleo essencial encapsulada nas nanopartículas, conhecido como eficiência de encapsulamento.
- Avaliação do potencial antimicrobiano da nanoemulsão em cepas bacterianas, *Escherichia coli* (ATCC 43895), *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), e uma fúngica, *Candida albicans* ATCC 10231, em ensaios microbiológicos in vitro utilizando a técnica de difusão em poços.
- Avaliação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima da nanoemulsão testada para as cepas bacterianas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).
- Avaliação da nanoemulsão como revestimento comestível para proteção de alimentos in natura (acerola e uva verde).
- Análise da proliferação de microrganismos (fungos e bactérias) nas amostras armazenadas durante dez meses consecutivos, determinado por ensaio microbiológico in vitro (contagem de colônias).

3. MATERIAIS

Amido de milho (TRISANTI - Brasil), Tensoativo não-iônico - Tween – 80 P.S (Dinâmica - Brasil, CAS: 9005–65– 6), Óleo essencial - *Melaleuca alternifolia* (Condire® - AGTTEC® - Brazil), Nutriente Agar-agar (Dinâmica - Brazil, CAS:9002-18-0), Sabouraud Dextrose Broth EP-USP (Kasvi - Espanha, CAS: K25-1205), Brain Heart Infusion Broth (Kasvi), Caldo Mueller Hinton (Oxoid), Nutrient Broth (Kasvi - Italia, REF: K25-610037), Tetracycline Hydrate 99% (Sigma-Aldrich - USA, CAS:60-54-8), *Escherichia coli* (ATCC 43895 e 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458 e 25923) e *Candida albicans* ATCC 10231.

4. METODOLOGIA

4.1. Análise da quebra dos grânulos de amido de milho por microscopia óptica

As imagens microscópicas de cada etapa das fases da gelatinização do amido foram avaliadas com um microscópio Leica MDI8, pelas técnicas de campo claro e contraste de fase. Foram preparadas em cinco etapas (I, II, III, IV, V) com tratamentos diferentes (tempo e calor) até a desintegração dos grãos, como mostra na Tabela 1.

Tabela 1: Composição das etapas e tratamentos

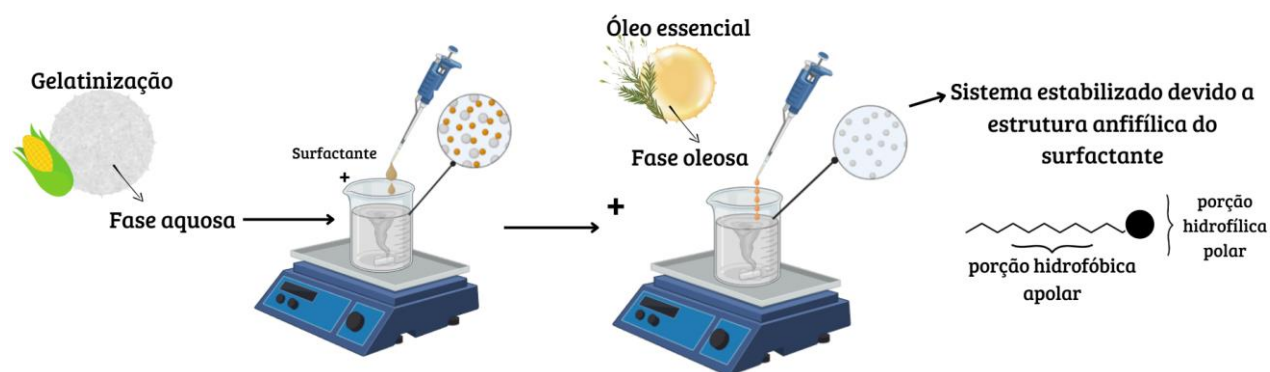
| Etapas | Amido (g) | Aquecimento | Tempo de aquecimento (min) | Temperatura ° C | Volume de água (mL) |
|--------|-----------|-------------|----------------------------|-----------------|---------------------|
| I | 0,5 | Não | - | 27 | 1,0 |
| II | 1,5 | Não | - | 27 | 100,0 |
| III | 1,5 | Sim | 2 | 90 | 100,0 |
| IV | 1,5 | Sim | 5 | 92,5 | 100,0 |
| V | 1,5 | Sim | 10 | 95 | 100,0 |

Fonte: Autora, (2024).

4.2. Preparo da nanoemulsão

As nanopartículas foram obtidas por meio da técnica de nanoemulsão, com base na literatura (SALVIA-TRUJILLO, et al. 2014), com adaptações. A influência do óleo essencial e do surfactante foi investigada, variando suas concentrações. O esquema metodológico do preparo está apresentado na Fig. 6.

Figura 6: Esquema metodológico



Fonte: Autora, (2024).

Foram utilizados dois sistemas líquidos diferentes para formular as nanopartículas, nomeadamente, a fase aquosa contendo o tensoativo não-iônico

e a fase oleosa. As concentrações do tensoativo não-iônico e da fase oleosa foram variadas e o volume da solução de polímero foi mantido constante para todas as formulações (0,3 g de polímero/20 mL de água = 0,015 g/mL), como apresentado na Tabela 2. A concentração do óleo e do surfactante foram calculadas uma em proporção à outra, 0,01:1 (AM5), 0,1:1 (AM3), 1:1 (AM4), 2:1 (AM2), 1:0,1 (AM1), 0,01:1 (AM6). A amostra (AM6) foi descartada após a preparação, devido ao alto índice de saponificação e instabilidade.

Para preparar a fase aquosa, foram pesados 3 g de amido de milho e dispersos em 200 mL de água destilada. A suspensão foi aquecida e mantida a 95 °C durante 10 minutos. Nesta temperatura, a matriz polimérica do amido desintegra-se, dando origem a uma suspensão homogênea, correspondendo à gelatinização do amido. A suspensão foi mantida à temperatura ambiente até atingir 25 °C. Após o resfriamento, a suspensão foi agitada a 600 rpm durante 30 minutos, seguindo-se a adição do tensoativo não-iônico (Tween-80), que permaneceu em agitação por mais 30 minutos. Em seguida, a fase oleosa foi adicionada lentamente por gotejamento. O sistema foi mantido sob agitação magnética durante mais 1 hora, o que levou à formação da nanoemulsão. As amostras foram armazenadas em refrigeração.

Tabela 2: Composição das amostras

| Amostra | Polímero (g) | Óleo Essencial (mL) | Surfactante (mL) | Volume de água (mL) |
|----------------|---------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|
| AM1 | 0,3 | 0,3 | 0,03 | 20,0 |
| AM2 | 0,3 | 0,6 | 0,3 | 20,0 |
| AM3 | 0,3 | 0,03 | 0,3 | 20,0 |
| AM4 | 0,3 | 0,9 | 0,9 | 20,0 |
| AM5 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 20,0 |
| AM6 | 0,3 | 0,03 | 0,9 | 20,0 |
| Controle | 0,3 | - | - | 100,0 |

Fonte: Autora (2024).

4.3. Caracterizações físico-químicas

4.3.1. Tamanho médio das nanopartículas, índice de polidispersão e potencial zeta

O tamanho médio das nanopartículas, o índice de polidispersão e o potencial zeta foram determinados pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), utilizando o equipamento Zetasizer (Nano-Zs Malvern Instruments), procedimento realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da

Universidade Estadual Paulista – Campus Araraquara. A leitura foi realizada com 20 µL de cada amostra diluída em 1 mL em água destilada.

Os dados das caracterizações físico-químicas adquiridos através do software do equipamento Zetasizer foram tratados utilizando o software OriginLab 6.0.

4.3.2. Eficiência do encapsulamento (EE%)

O teor de óleo essencial nas nanopartículas foi determinado por absorção, seguindo o método descrito na literatura (DANESHMAND, et al., 2018; KATHE, et al., 2014). O espectro de absorção do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* em etanol (5 µL de óleo em 950 uL de etanol) foi adquirido na faixa de 190 a 700 nm usando um espectrofotômetro Bel Photonics UV-M51, e os dados foram usados para construir a curva de calibração, com o valor (valor R = 0,99907; $y = -9,18,10^{-4} x + 6425,7548$), usando os valores de absorção mais elevados, que foram atingidos a 274 nm.

Para determinar a eficiência do encapsulamento, 20 µL de amostra foram diluídos em 980 µL de água destilada e centrifugado a 10.000 rpm durante 3 min, utilizando uma microcentrífuga KASVI K14-1215P. O sobrenadante (composto por óleo livre não encapsulado e água) foi descartado; 500 µL de etanol foram adicionados ao eppendorf no qual as nanopartículas foram depositadas no fundo, e a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm durante 3 min. Nesta fase, a nanopartícula rompe e o óleo é solubilizado no etanol para leitura da absorbância. A absorbância foi lida a 274 nm e o teor de óleo foi determinado utilizando a curva de calibração.

4.4. Potencial antimicrobiano das amostras in vitro

O potencial antimicrobiano das amostras de nanoemulsão foi avaliado utilizando o método de difusão em poços (OSTROSKY et al., 2008). O potencial antimicrobiano foi investigado contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 43895), a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), cepas de leite mastítico e a levedura *Candida albicans* (ATCC 10231). Os microrganismos foram cultivados durante 24 horas posterior ao teste em meio

de cultura Sabouraud ágar para a levedura e Nutriente ágar para a bactéria. Para o teste microbiológico, as placas de Petri foram nomeadas e preenchidas com meio de cultura, após a solidificação do ágar, foram feitos doze poços (6 mm de diâmetro) na superfície utilizando um bocal de vidro, e a levedura ou a bactéria foi inoculada espalhando-a com o auxílio da alça de inoculação na superfície do ágar. Foram testadas as cinco formulações da nanoemulsão e os testes foram efetuados em duplicata. Foram adicionados 100 µL de amostra em cada poço. O controle positivo foi o antibiótico tetraciclina (100 µL/poço, 2mg/mL), o óleo essencial (100 µL/poço) também foi testado. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C. Após este período de tempo, as amostras foram analisadas visualmente quanto a zona de inibição e fotografadas.

4.5. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foram determinados pela técnica de CIM. Para isso, os isolados testados foram recuperados em caldo Brain Heart Infusion Broth (BHI) a 36 °C por 18 horas antes do teste. Foram distribuídos 100 µL de caldo Caldo Muller Hinton (CMH) (concentração dupla) em todos os poços das 10 primeiras colunas de uma placa de Elisa. A 11ª e 12ª colunas, foram o controle negativo e positivo, respectivamente; sendo a primeira apenas caldo CMH e a segunda CMH e inóculo. Posteriormente, 100 µL da nanoemulsão foram adicionados à coluna 1, depois homogeneizados e a mesma quantidade aliquoteada e transferida à coluna 2 e, assim sucessivamente, até a coluna 10, obtendo-se então diferentes concentrações diluídas serialmente. Em seguida, foi adicionada uma alíquota de 100 µL do inóculo de cada estirpe bacteriana (a 5×10^5 UFC/mL). As placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C.

Para a técnica de CBM, após a determinação da CIM, aos ensaios que não foram notados crescimento bacteriano visível, através de semeadura por esgotamento, as amostras foram semeadas em placas de ágar BHI e incubadas a 37 °C por 24 horas. Os ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana foram realizados seguindo os padrões estabelecidos pelos guias do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2023a; 2023b). Procedimento realizado na

Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
- Câmpus Jaboticabal.

4.6. Controle microbiológico - análise de proliferação de microrganismos nas amostras de nanoemulsão

O número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de bactérias e fungos foi determinado por ensaio microbiológico. Um total de 100 µL de cada amostra (nanoemulsões e controle) foram dispersos individualmente em 900 µL de solução salina e diluídas serialmente até 10^{-3} . As amostras diluídas foram individualmente distribuídas com a alça de Drigasli em placa Petri, preenchidas com meio de cultura Nutriente ágar para as bactérias e Sabouraud ágar para os fungos. A contagem foi realizada 24 horas após incubação a 25 °C e as placas foram fotografadas.

4.7. Avaliação do efeito protetor de frutos pós-colheita

Foram selecionados dois frutos para o estudo do efeito protetor pós-colheita. As espécies *Malpighia emarginata* (acerola) e *Vitis vinifera L.* (uva) foram selecionadas porque são fáceis de apodrecer à temperatura ambiente em poucos dias. Os dois frutos foram adquiridos num mercado local na cidade de Araraquara, São Paulo, Brasil. Na seleção dos frutos de acerola para o estudo, a cor da casca foi analisada, sendo que a maioria apresentava apenas uma cor (tom inicial da maturação do fruto - laranja claro ou tons avermelhados) ou duas cores, mudando do estágio inicial (laranja claro-avermelhado) para o estágio maduro (laranja escuro-avermelhado). Relativamente às uvas, todos os frutos apresentavam uma cor inicial pós-colheita verde clara.

O método de revestimento está representado na Fig. 7 (a). Os frutos foram primeiro higienizados com água destilada (etapa 1) e colocados em papel toalha para secar (etapa 2). Foram utilizados seis exemplares de cada espécie, divididos em dois grupos (controle e amostral) para analisar o efeito protetor do revestimento. O grupo controle foi revestido com a suspensão aquosa da fase de amido (sem óleo e surfactante). Para a acerola, a amostra AM2 foi utilizada e para a uva, a amostra AM1, todas com 3 amostras (triplicata). Para o revestimento, os frutos foram imersos individualmente em um béquer de 30 mL

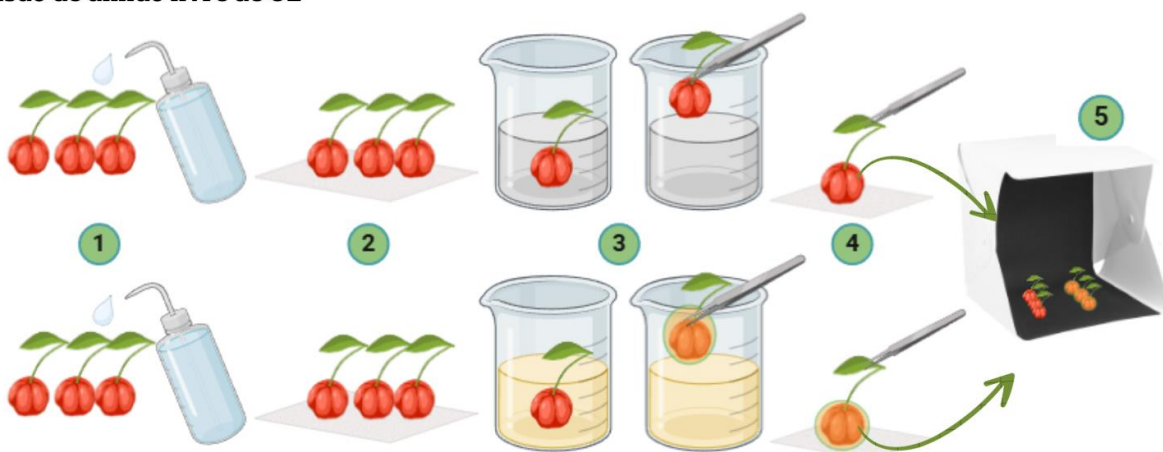
contendo a nanoemulsão (15 mL), conforme a Fig. 7 (b), e deixados em repouso na nanoemulsão por 1 minuto (etapa 3). Com o auxílio de uma pinça os frutos foram retirados do béquer. Em seguida, delicadamente colocados sobre a superfície de um papel toalha para secar (etapas 3-4). Após secagem, as amostras foram movidas delicadamente com o auxílio de uma pinça para um estúdio fotográfico (etapa 5), onde foram mantidas à temperatura ambiente (25°C) e observadas diariamente, fotografadas, por um total de 5 dias para a acerola e 6 dias para a uva.

Figura 7: Processo de imersão dos frutos em nanopartículas (a). Frutos imersos (b)

a

Grupo controle:

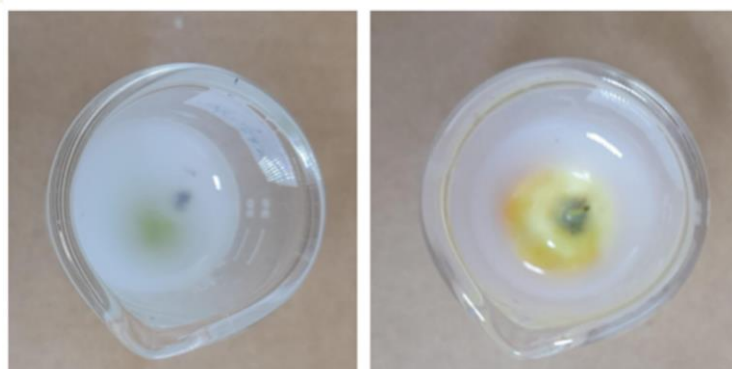
Supensão de amido livre de OE



Grupo amostral:

Nanopartículas com OE

b



Fonte: Autora, (2024).

5. Resultados e Discussões

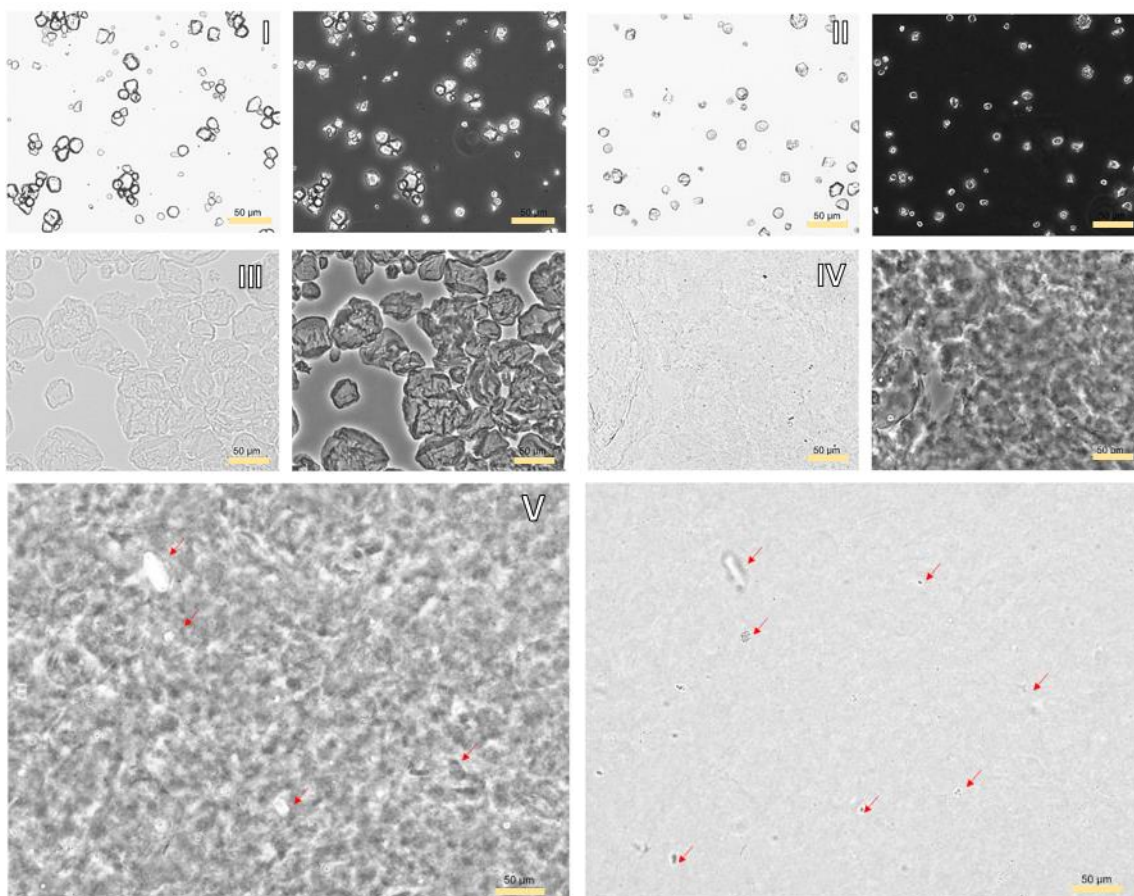
5.1. Desintegração dos grãos de amido de milho

Para visualizar as etapas desde o inchamento e quebra dos grânulos até a gelatinização dos grãos de amido, um conjunto de cinco imagens é apresentado na Fig. 8, (lado direito, técnica de contraste de fase e lado esquerdo campo claro).

Na etapa I, a imagem representa a suspensão imediatamente após seu preparo, sem aquecimento, a 25 °C. Esta suspensão foi prontamente analisada por microscopia mostrando os grânulos intactos com cerca de 10-25 µm de tamanho (Fig. 8 I). No passo II, os grânulos foram deixados em repouso durante 30 minutos em água a 25 °C e depois analisados. Os grânulos mantiveram a sua estrutura intacta e semelhante à observada na etapa I (Fig. 8 II). Na etapa III, o amido foi aquecido com água por 2 minutos a 90 °C, resultando no inchamento parcial de alguns grânulos (Fig. 8 III). Nesta etapa, o tamanho variou entre 50 e 150 µm, indicando seu alto inchamento. Na etapa IV, o amido foi aquecido a 92,5 °C em água por 5 minutos, levando à ruptura de grande parte dos grânulos, tornando-se mais difícil a medida do tamanho dos grãos devido à falta de delimitação dos mesmos. Na etapa V, o amido foi aquecido a 95 °C durante 10 minutos em água, resultando numa suspensão homogênea, praticamente sem grânulos. Poucos grãos quebrados em pequenos pedaços são indicados por setas, com tamanhos por volta ou menores que 10 µm.

A quebra e gelatinização do amido é um processo bem descrito na literatura. No processo descrito anteriormente, os grãos desintegram-se como esperado e as imagens registradas representam um incremento do registo do processo.

Figura 8: Inicial (I, II), parcial (III, IV) e final (V) das etapas do processo de desintegração dos grânulos de amido



Fonte: Autora, (2024).

5.2. Caracterizações físico-químicas

5.2.1. Tamanho médio da partícula e índice de polidispersão

O tamanho médio das nanopartículas foi determinado por DLS e os resultados são apresentados na Tabela 3. A amostra com o menor tamanho de partícula (232 nm) tem o maior teor de surfactante (AM4), e aquelas com concentração intermediária de surfactante (AM2, AM3 e AM5), apresentaram partículas de tamanho aproximadamente dobrado. Esses resultados mostraram que o tamanho da partícula é influenciado pela concentração do surfactante, em que quanto maior a quantidade de surfactante, menor o tamanho da partícula. O que está de acordo com as referências da literatura. O surfactante diminui a tensão interfacial, impactando na diminuição do tamanho de partícula e estabilização do sistema (SCHRAMM, 2014). Relativamente ao tamanho médio

das micropartículas-nanopartículas de amido de milho, a literatura mostra que pode variar entre cerca de 286,6 nm e 412-445 nm (BRAVO, et al., 2016; DANIEL, 2018).

Tabela 3: Composição e tamanho médio das nanopartículas (nm)

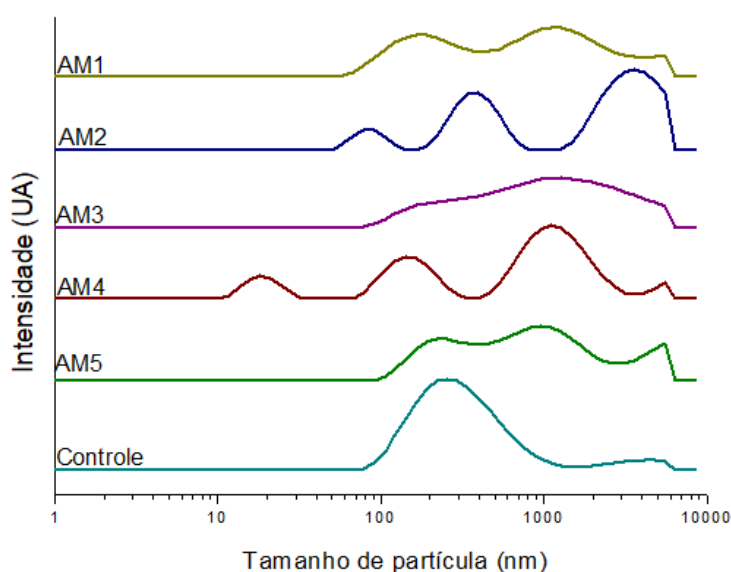
| Amostra | Polímero (g) | Óleo Essencial (mL) | Surfactante (mL) | Tamanho médio das partículas (nm) |
|----------|--------------|---------------------|------------------|-----------------------------------|
| AM1 | 0,3 | 0,3 | 0,03 | 404,3 |
| AM2 | 0,3 | 0,6 | 0,3 | 497,6 |
| AM3 | 0,3 | 0,03 | 0,3 | 559,1 |
| AM4 | 0,3 | 0,9 | 0,9 | 232,3 |
| AM5 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 500,4 |
| Controle | 0,3 | - | - | 230,6 |

Fonte: Autora, (2024).

Na Fig. 9 e na Tabela 4 encontram-se a distribuição do tamanho das partículas e o índice de polidispersividade médio, respectivamente.

Os valores do índice de polidispersão variaram entre 0,4 a 1,0, incluindo o controle e as amostras. Valores na faixa de 0,1 - 0,5 indicam distribuições adequadas e homogêneas, demonstrando boa qualidade na suspensão coloidal quando as nanopartículas são compostas por polímeros naturais. Valores próximos ou superiores a 0,7 sugerem partículas grandes ou agregados na suspensão (AVADI, et al., 2010). As amostras AM1 e AM5 apresentaram o PDI mais adequado, no que diz respeito à sua estabilidade física nas formulações. Os valores de PDI encontrados na literatura para micropartículas-nanopartículas de amido estão na faixa de 0,3-0,5 (AHMAD, et al., 2020).

Figura 9: Tamanho médio das nanopartículas



Fonte: Autora, (2024).

Tabela 4: Índice de polidispersão das amostras

| Amostra | Polímero | Óleo Essencial (mL) | Surfactante (mL) | Índice de polidispersividade |
|----------|----------|---------------------|------------------|------------------------------|
| AM1 | 0,3 | 0,3 | 0,03 | 0,5 |
| AM2 | 0,3 | 0,6 | 0,3 | 1,0 |
| AM3 | 0,3 | 0,03 | 0,3 | 0,6 |
| AM4 | 0,3 | 0,9 | 0,9 | 1,0 |
| AM5 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,5 |
| Controle | 0,3 | - | - | 0,4 |

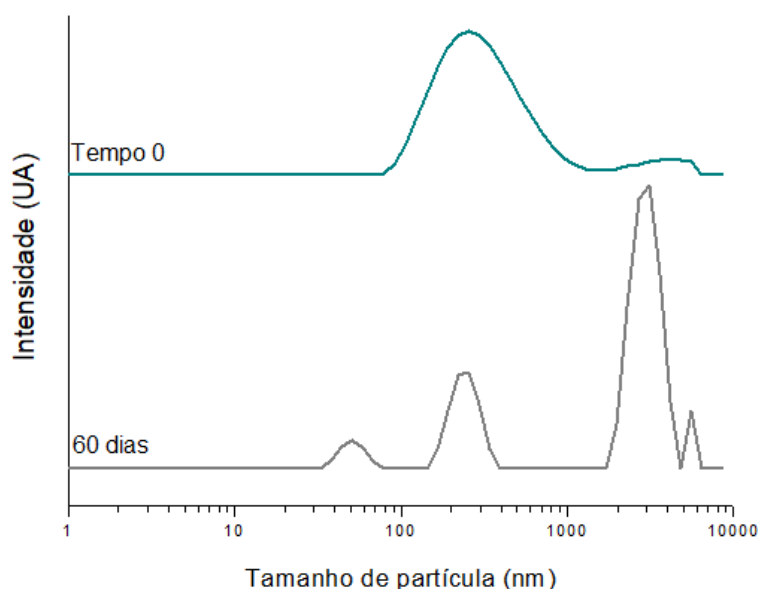
Fonte: Autora, (2024).

A suspensão utilizada para a nanoemulsão foi preparada através do tratamento térmico de grãos de amido, num processo *top-down*. Neste processo, os grãos inteiros são quebrados e depois utilizados para preparar a fase aquosa para a preparação da nanoemulsão, e é inerente ao amido, que se encontra na natureza em forma de grão. Esta abordagem é completamente diferente do processo de solubilização de polímeros, normalmente utilizado em nanoemulsões poliméricas. Assim, as propriedades e o comportamento das nanopartículas preparadas a partir do amido são únicos e não podem ser comparados com os das nanopartículas preparadas utilizando a abordagem de solubilização. A ruptura do grão e a separação das macromoléculas não são totais devido às interações químicas e à disposição da amilose e da amilopectina no interior do grão de amido na natureza. Após a ruptura do grão, forma-se uma suspensão com pequenos agregados, no entanto, bem distribuídos e altamente homogêneos. O índice de polidispersão e o tamanho das partículas podem ser influenciados pela retrogradação do amido, que leva à formação de estruturas esferulíticas preenchidas com subestruturas nanométricas (partículas primárias) (LU, et al., 2024). Além disso, a amilopectina e a amilose também podem ser reagrupadas para formar estruturas nanométricas durante o armazenamento (ZHANG, et al., 2020), influenciando o PDI e o tamanho das partículas.

Para verificar se ao longo do tempo poderíamos encontrar dimensões variadas em uma suspensão aquosa de amido, foi determinado o tamanho médio das partículas no tempo zero e após 60 dias de armazenamento. Os resultados estão apresentados na Fig. 10. Todo processo de quebra dos grânulos foi realizado até atingir a gelatinização. Esta suspensão foi analisada, logo após o seu preparo e apresentou um tamanho médio de 230 nm. Após 60 dias, apresentou 4 picos diferentes de tamanhos, com tamanho médio de 2.607 nm. E o maior tamanho foi de 3.091 nm, com uma representatividade de 18,7% do

total da amostra. Isto, possivelmente se justifica pela presença de partículas agregadas, provenientes da retrogradação do amido. A maneira em que esta suspensão foi armazenada (refrigeração) pode ter potencializado a retrogradação.

Figura 10: Tamanho médio dos grãos retrógrados da solução aquosa de amido



Fonte: Autora, (2024).

5.2.2. Potencial Zeta

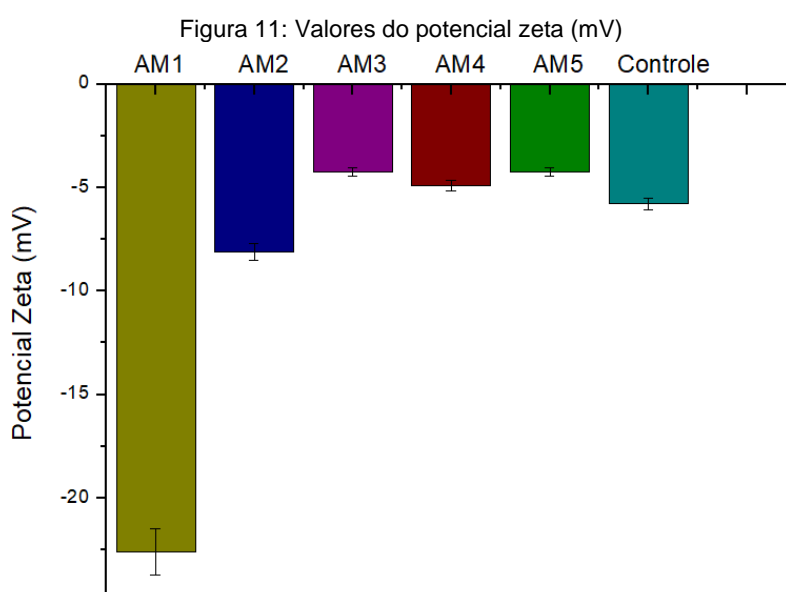
O valor do potencial zeta foi determinado por DLS e os resultados são apresentados na Fig. 11. e na Tabela 5. O potencial zeta indica a carga superficial das nanopartículas e é o principal indicador da estabilidade potencial do sistema coloidal. Os valores mais elevados (negativos ou positivos) do potencial zeta indicam uma maior repulsão entre as partículas, ou seja, uma maior resistência à agregação. Assim, quando a maioria das partículas em suspensão apresenta um grande potencial zeta, negativo ou positivo, as forças repulsivas são dominantes, levando as partículas a repelirem-se umas às outras, evitando a aglomeração. A amostra que apresentou maior estabilidade entre as formulações foi a AM1, com potencial zeta em torno de -22 mV, seguida pela AM2, com potencial zeta em torno de -8 mV, que tende a ser possivelmente estável. A literatura mostra valores que variam de cerca de -1,97 mV, -3,9 mV (HERNÁNDEZ-GIOTTONI, et al., 2024) a -12,2 mV, -20,25 mV (AHMAD, et al., 2020) para nanopartículas de amido ou sistemas baseados em nanopartículas

de amido. Normalmente, os valores numéricos para indicar a estabilidade do sistema são os mais próximos de 30 mV (+ ou -), no entanto, o potencial zeta depende da natureza do dispersante e da sua superfície, indicando assim que a composição da amostra deve ser levada em consideração. Considerando que a hidroxila do amido é pouco dissociável em pH fisiológico, e que eles representam o principal componente da camada externa das nanopartículas que dá origem ao potencial zeta, isso poderia explicar os baixos valores encontrados.

Tabela 5: Valores do potencial zeta

| Amostra | Polímero (g) | Óleo Essencial (mL) | Surfactante (mL) | Potencial Zeta (Mv) |
|----------|--------------|---------------------|------------------|---------------------|
| AM1 | 0,3 | 0,3 | 0,03 | -22,6 |
| AM2 | 0,3 | 0,6 | 0,3 | -8,09 |
| AM3 | 0,3 | 0,03 | 0,3 | -4,26 |
| AM4 | 0,3 | 0,9 | 0,9 | -4,91 |
| AM5 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | -4,25 |
| Controle | 0,3 | - | - | -5,78 |

Fonte: Autora, (2024).



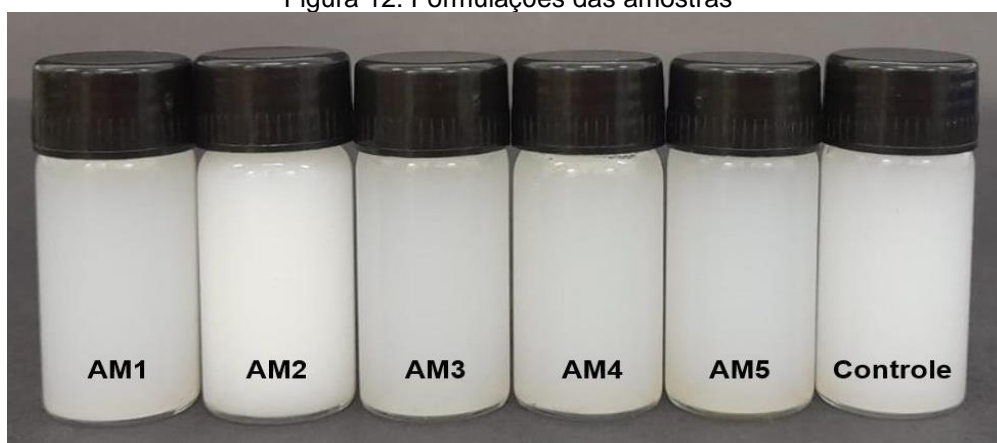
Fonte: Autora, (2024).

A camada superficial negativamente carregada das nanopartículas, indicada pelo potencial zeta, foi utilizada para confirmar a arquitetura química das nanopartículas, como será apresentado a seguir.

5.3. Arquitetura química das nanopartículas

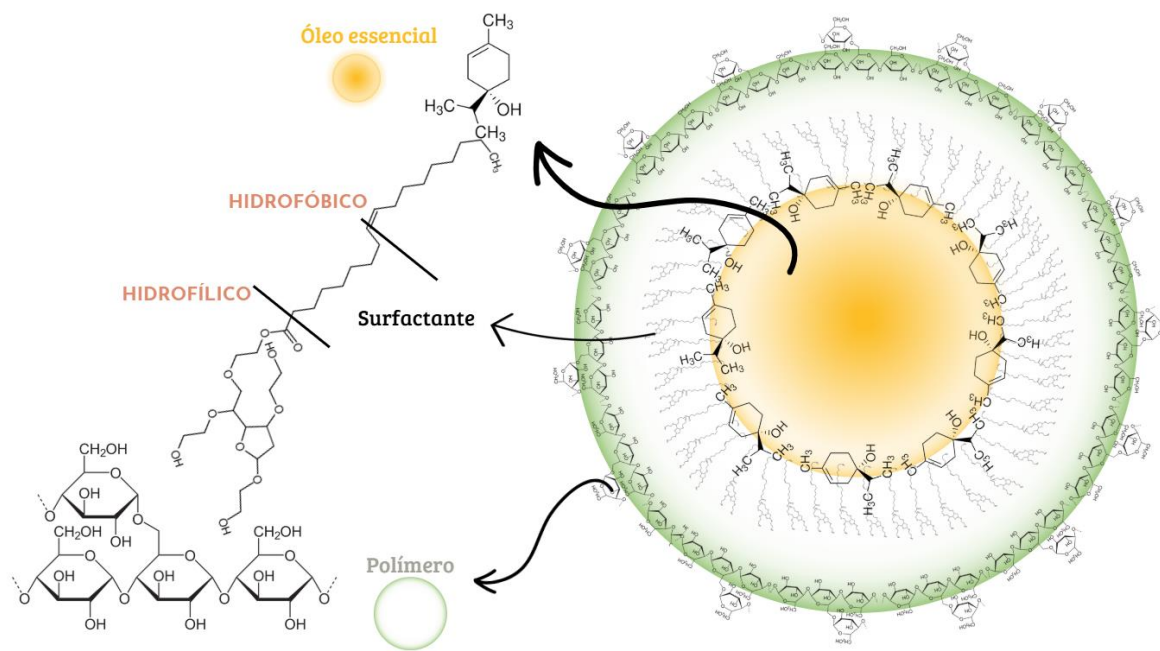
Os resultados do potencial zeta mostraram que a superfície da nanopartícula apresenta uma camada superficial carregada negativamente, indicando que é constituída por amido. A suspensão de amido corresponde ao maior volume do sistema, envolvendo assim o núcleo constituído pelo óleo essencial. Estas duas redes moleculares estão ligadas e estabilizadas pelo tensoativo não-iônico (Tween-80). A estabilidade do sistema é o resultado da estrutura química dos componentes do sistema, nomeadamente o tensoativo, que apresenta uma porção hidrofílica, com afinidade para a água, e uma cauda hidrofóbica com afinidade para o óleo, o óleo, predominantemente hidrofóbico e o amido, rico em grupos hidrofílicos. As forças dominantes que conduzem as interações hidrofílicas são as ligações de hidrogênio e, entre as contrapartes hidrofóbicas, estão as de dipolo-dipolo e as de Van der Waals. A parte hidrofílica do tensoativo interage com os grupos hidroxila do amido e a parte hidrofóbica interage com o núcleo oleoso, reduzindo a tensão superficial entre as fases e levando as moléculas a organizarem-se em forma de esferas formadas por pequenos grupos de moléculas. As cargas negativas fornecidas pelas moléculas de amido reunidas, expõem os seus grupos hidroxila na superfície da nanopartícula. Estas nanopartículas carregadas negativamente repelem-se umas às outras, mantendo a estabilidade da nanoemulsão (HIEMENZ e LODGE 2007; CARVALHO, et al., 2018). O aspecto visual das formulações pode ser visualizado na imagem da Fig. 12. A representação esquemática da arquitetura química das nanopartículas pode ser vista na Fig. 13.

Figura 12: Formulações das amostras



Fonte: Autora, (2024).

Figura 13: Representação da nanopartícula



Fonte: Autora, (2024).

5.4. Eficiência do encapsulamento

A eficiência do encapsulamento das amostras pode ser vista na Tabela 6. As nanopartículas com porcentagens elevadas de encapsulamento representam um bom sistema de carga e espera-se que conduzam a um melhor desempenho de liberação quando comparadas com as que têm porcentagens baixas.

As amostras AM1, AM5 (46,67%) e AM2 (23,33%) apresentaram maiores porcentagens de encapsulamento. Para a amostra AM3, não foi possível calcular a porcentagem de encapsulamento de óleo essencial para a AM3 devido ao baixo teor de óleo na composição.

Tabela 6: Valores da eficiência de encapsulamento

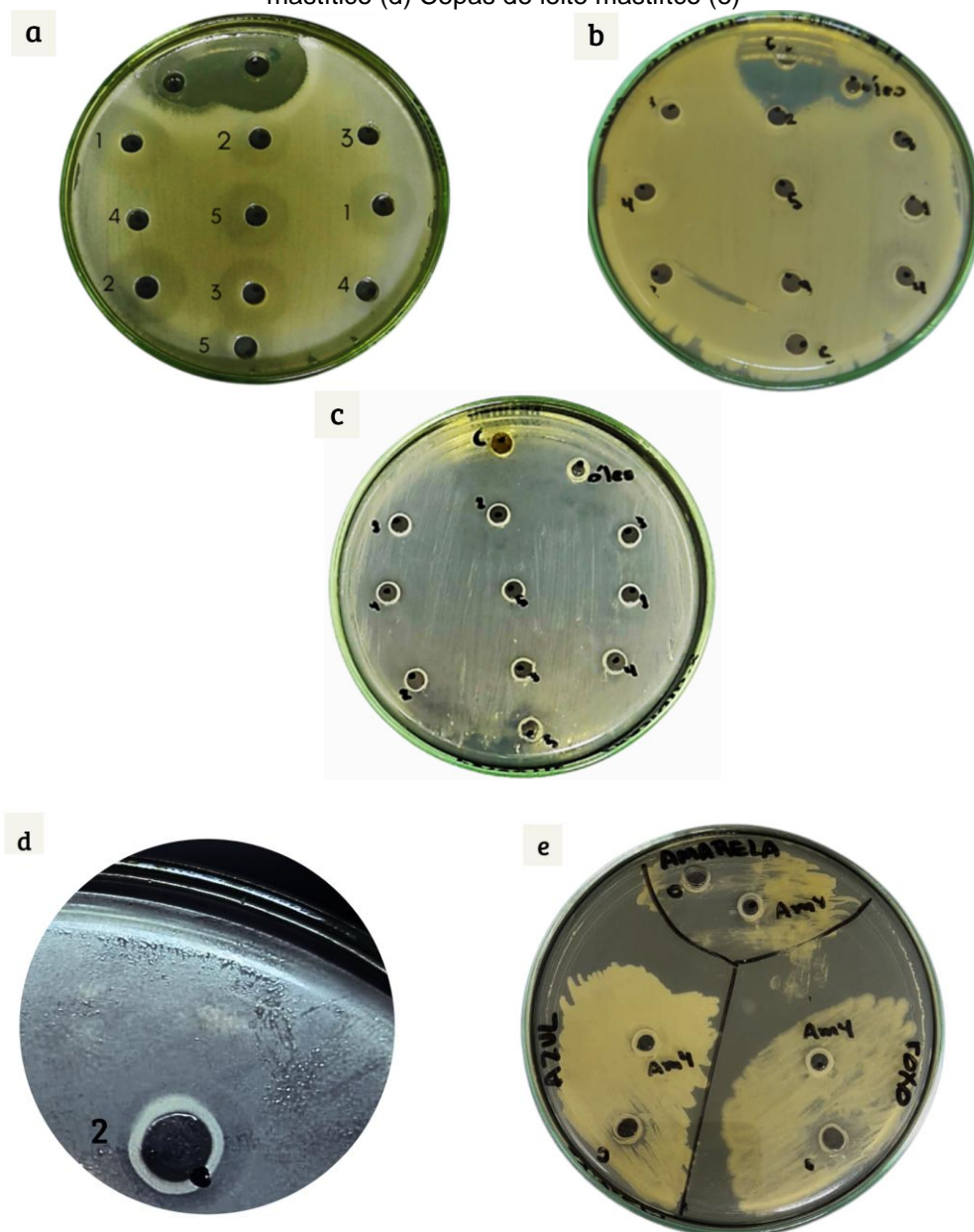
| Amostra | Polímero (g) | Óleo Essencial (mL) | Surfactante (mL) | Eficiência de encapsulação (%) |
|----------|--------------|---------------------|------------------|--------------------------------|
| AM1 | 0,3 | 0,3 | 0,03 | 46,67 |
| AM2 | 0,3 | 0,6 | 0,3 | 23,33 |
| AM3 | 0,3 | 0,03 | 0,3 | - |
| AM4 | 0,3 | 0,9 | 0,9 | 15,56 |
| AM5 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 46,67 |
| Controle | 0,3 | - | - | - |

Fonte: Autora, (2024).

5.5. Potencial antimicrobiano

A atividade antifúngica e antibacteriana das nanoemulsões foi avaliada pela técnica de ensaio de difusão em poços. As zonas de inibição das amostras são apresentadas na Fig. 14, para os seguintes microrganismos: (a) *Escherichia coli*, (b) *Staphylococcus aureus* (c) *Candida albicans* (d) Cepas de leite mastítico AM2 (e) Cepa de leite mastítico AM4. Foram utilizados dois poços como controle, um com o antibiótico e o outro com o óleo essencial; os outros poços foram preenchidos com as amostras de nanoemulsão. Em todos os ensaios, os dois controles apresentaram inibição, indicando que o teste estava funcionando adequadamente. Para a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* as amostras AM1, AM2 e AM5 apresentaram inibição. Para a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* as amostras não apresentaram inibição. Uma cepa de leite mastítico foi testada para a amostra AM2, pois essa amostra apresentou maior eficiência de encapsulamento e, apresentou efeito bactericida. A amostra AM4 também foi testada devido a maior composição do óleo nesta formulação. Esta amostra não apresentou efeito de inibição. Para a levedura *Candida albicans*, a amostra que mostrou a maior zona de inibição foi a amostra AM2 seguida pela amostra AM4. Em resumo, AM1, AM2 e AM5 inibiram *Escherichia coli*, porém nenhuma delas inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*; AM2 e AM4 inibiram o crescimento de *Candida albicans*, com maior efeito observado para AM4. Os testes realizados nesta etapa são testes qualitativos, onde é possível somente dizer se há ou não efeito inibitório do crescimento microbiano. A partir destes resultados foi possível planejar testes quantitativos com protocolos bem estabelecidos, conforme descritos no item 5.6, para a confirmação da atividade das amostras.

Figura 14: *Escherichia coli* (a), *Staphylococcus aureus* (b), *Candida albicans* (c), Cepa de leite mastítico (d) Cepas de leite mastítico (e)



Fonte: Autora, (2024).

Após estes resultados, as amostras foram analisadas em relação a sua concentração inibitória mínima e bactericida mínima para confirmar a eficácia.

5.6. Concentração inibitória mínima e bactericida mínima

A concentração inibitória mínima é definida como a concentração mais baixa de um agente antimicrobiano que impede o crescimento de mais de 99% de um microrganismo em diluição em meio sólido ou em caldo (Organização

Mundial da Saúde, 2018). A concentração bactericida mínima (CBM) é a concentração mínima de medicamento antimicrobiano que é bactericida (SYKES e RANKIN, 2014).

Para o teste de concentração inibitória mínima, algumas amostras apresentaram inibição para a cepa *Staphylococcus aureus* e para a *Escherichia coli*. As mesmas amostras, testadas para o potencial bactericida mínimo, apresentaram resultados semelhantes, exceto a AM4 para *Staphylococcus aureus*. Os resultados dos experimentos de CIM e CBM são apresentados na Tabela 7 e Tabela 8. Estes resultados representam o volume total de amostra/mL que inibiu o crescimento microbiano no ensaio de concentração inibitória mínima.

Tabela 7: Resultados da concentração inibitória mínima da nanoemulsão contra cepas bacterianas

| Microrganismo | AM1 | AM2 | AM3 | AM4 | AM5 | Controle | Óleo Essencial |
|------------------------------|-----------|-----------|-----|-----------|-----|----------|----------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 500 mg/mL | 250 mg/mL | * | 125 mg/mL | * | *** | ** |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | * | 500 mg/mL | * | 500 mg/mL | * | *** | ** |

(*) A nanoemulsão não apresentou potencial antimicrobiano às cepas testadas.

(**) Houve inibição das cepas testadas, mas não foi possível determinar o valor da MIC devido ao elevado potencial antimicrobiano nessa concentração do produto. Entretanto, como controle, o resultado foi satisfatório.

(***) Controle - Amido: o produto apresentou crescimento em todos os poços avaliados. Como controle, o resultado foi satisfatório.

Tabela 8: Resultados da concentração inibitória mínima bactericida da nanoemulsão

| Microrganismo | AM1 | AM2 | AM3 | AM4 | AM5 | Controle | Óleo Essencial |
|------------------------------|-----------|-----------|-----|-----------|-----|----------|----------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 500 mg/mL | 250 mg/mL | * | 125 mg/mL | * | * | 1,95 mg/mL |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | * | 500 mg/mL | * | * | * | * | 250 mg/mL |

(*): Devido à falta de potencial antimicrobiano no MIC, não foi realizado CBM.

As amostras AM1, AM2, AM3 e AM4, continham 0,3, 0,6, 0,03 e 0,9 mL de óleo essencial, respectivamente, em suas composições. Para os testes foram utilizados 100 uL de cada amostra, portanto, é necessário calcular quanto de óleo essencial teríamos em 100 uL de suspensão. Dividindo 0,3 mL de óleo essencial por 20 mL de suspensão aquosa de amido (AM1), e transformando esses valores em microlitros, temos, 300 uL de óleo em 20.000 uL de suspensão. Para definir a quantidade de óleo avaliada, uma regra de três foi utilizada:

$$\begin{array}{l} X? \text{ uL de óleo} \text{ ---- } 100 \text{ uL suspensão} \\ 300 \text{ uL de óleo} \text{ ---- } 20.000 \text{ uL de suspensão} \\ X = 1,5 \text{ uL de óleo} / 100 \text{ uL de suspensão} \end{array}$$

O resultado do cálculo indica que tem-se 1,5 uL de óleo em cada 100 uL de suspensão (amostra).

Esta conta foi feita para todas as amostras que apresentaram inibição de microrganismos. As Tabelas 9 e 10 representam os valores das Tabelas 7 e 8 convertidos em concentração de óleo essencial avaliado.

Tabela 9: Resultados CIM de nanopartículas com óleo essencial encapsulado

| Microrganismo | AM1 | AM2 | AM3 | AM4 | AM5 | Controle | Óleo Essencial |
|------------------------------|--------------|-------------|-----|--------------|-----|----------|----------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 0,0075 mg/mL | 0,015 mg/mL | * | 0,0225 mg/mL | * | *** | ** |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | * | 0,015 mg/mL | * | 0,0225 mg/mL | * | *** | ** |

(*) A nanoemulsão não apresentou potencial antimicrobiano às cepas testadas.

(**) Houve inibição das cepas testadas, mas não foi possível determinar o valor da MIC devido ao elevado potencial antimicrobiano nessa concentração do produto. Entretanto, como controle, o resultado foi satisfatório.

(***) Controle - Amido: o produto apresentou crescimento em todos os poços avaliados. Como controle, o resultado foi satisfatório.

Tabela 10: Resultados CBM de nanopartículas com óleo essencial encapsulado

| Microrganismo | AM1 | AM2 | AM3 | AM4 | AM5 | Controle | Óleo Essencial |
|------------------------------|-------------|-------------|-----|--------------|-----|----------|----------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 0,075 mg/mL | 0,015 mg/mL | * | 0,0225 mg/mL | * | * | 1,95 mg/mL |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | * | 0,015 mg/mL | * | * | * | * | 250 mg/mL |

(*): Devido à falta de potencial antimicrobiano no MIC, não foi realizado CBM.

A amostra controle, composta por óleo essencial, apresentou ação bactericida com a concentração de 1,95 mg/mL para a *Escherichia coli* e 250 mg/mL para *Staphylococcus aureus*. Este óleo se encontrava em sua forma livre, isto é, não encapsulado, portanto com uma concentração, conforme adquirido (não diluído). As amostras com óleo encapsulado, por sua vez, foram capazes de inibir o crescimento de microrganismos com concentrações muito inferiores, na ordem de aproximadamente 100 vezes menor para *Escherichia coli*, e 10.000 vezes menor para *Staphylococcus aureus* (Tab. 10). Esta diferença na eficácia das amostras pode ser atribuída ao processo de encapsulamento. Duas características podem ser consideradas para explicar este aumento na eficácia. A primeira, a distribuição do óleo em reservatórios de escala nanométrica, que possui como característica uma área de superfície aumentada, aumentando, portanto a possibilidade de contato com microrganismo, resultando numa maior disponibilidade para alcançar as membranas microbianas e aí exercer suas ação; o caráter hidrofílico das partículas permitem um alta dispersão destas no ambiente aquoso, também contribuindo para a maior eficácia do óleo, uma vez

que é melhor distribuído no meio onde encontram-se os microrganismos. Uma segunda possibilidade, é a melhor conservação das propriedades do óleo, que após encapsulado, pode apresentar uma maior estabilidade dos componentes antimicrobianos, possibilitando esta maior eficácia. Conclui-se por estes resultados, que o processo de encapsulamento gerou um material com eficácia aumentada em relação ao óleo em sua forma livre.

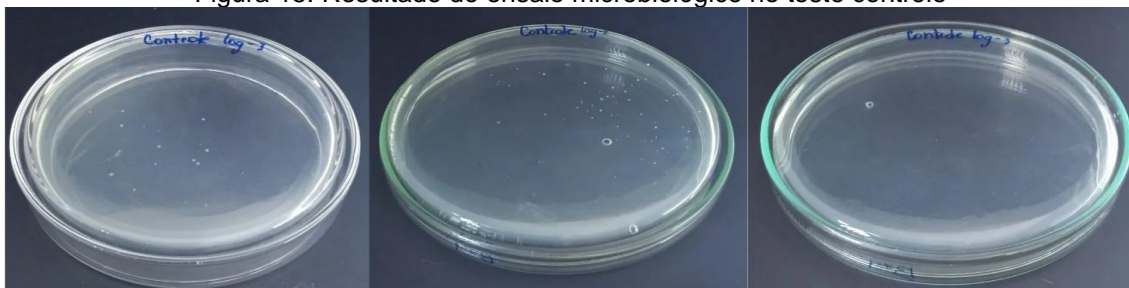
5.7. Controle microbiológico - análise da proliferação de bactérias e fungos na nanoemulsão in vitro

Após 10 meses de armazenamento das amostras de nanoemulsão, a proliferação de microrganismos foi analisada.

O controle (suspensão aquosa de amido sem adição de óleo essencial e surfactante) apresentou um número maior de colônias em comparação com as amostras, as quais praticamente não apresentaram proliferação microbiana. Na Fig. 15 podem ser visualizadas as colônias bacterianas no teste controle. O controle apresentou em torno de $4,1 \times 10^3$ UFC/mL. As amostras AM1, AM2 não apresentaram formação de colônias de bactérias e fungos, indicando ainda a ação do óleo nas amostras. As amostras AM3 e AM4 apresentaram 100 UFC/mL e a amostra AM5 apresentou 200 UFC/mL, que são considerados valores baixos de contaminação microbiana. As amostras AM1, AM2 apresentaram potencial de encapsulamento maior em comparação com as amostras AM3, AM4 e AM5, as quais apresentaram proliferação, indicando que ocorreu uma melhor eficácia das amostras com maior porcentagem de encapsulamento.

Para um sistema contendo nanopartículas com componentes naturais e sem conservantes, pode-se considerar uma opção ecológica e sustentável, adequada para ser aprimorada e expandida para outras aplicações e em largas escalas.

Figura 15: Resultado do ensaio microbiológico no teste controle



Fonte: Autora, (2024).

Este ensaio não foi realizado no tempo 0, pois não estava programado durante o desenvolvimento do projeto. Após 10 meses, observamos estabilidade das amostras durante o armazenamento e, assim foi realizado o ensaio microbiológico para verificar a eficácia das nanopartículas.

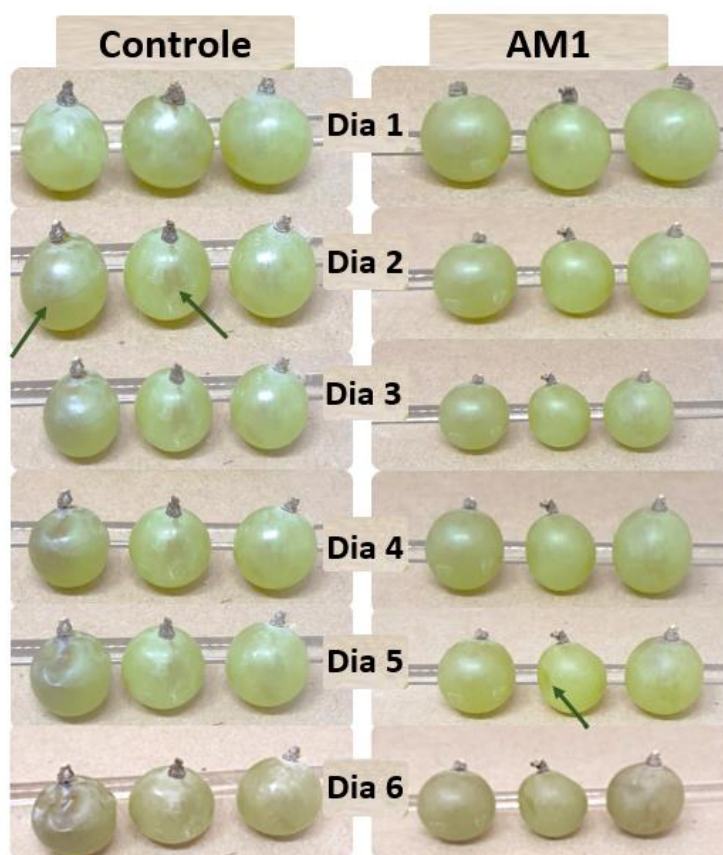
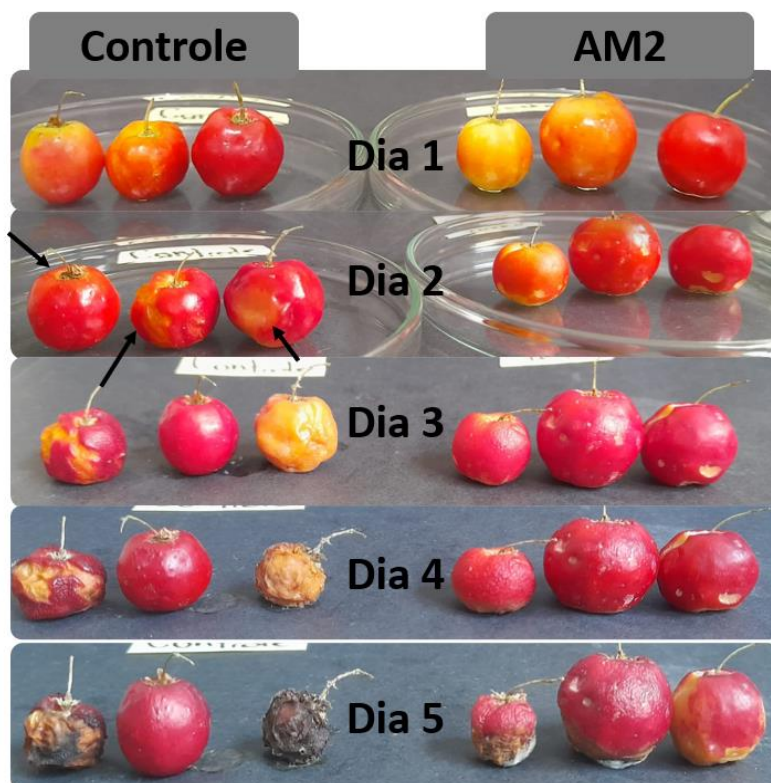
5.8. Revestimento de frutos in natura com nanopartículas

Os revestimentos comestíveis podem ser definidos como uma fina camada de material que pode ser ingerido e que tem como objetivo proteger o consumível, atuando como uma barreira à umidade, ao oxigênio e ao movimento de solutos entre o alimento e o ambiente (FORATO, et al., 2011), com o objetivo de prolongar o prazo de validade do alimento. Os nanocarreadores preparados a partir de componentes de origem natural são preferíveis para revestimentos alimentares, pois têm menor impacto ambiental e toxicidade quando comparados aos revestimentos convencionais, como os derivados do petróleo (MAQSOU DLOU, et al., 2020).

Os resultados do estudo do efeito de proteção dos frutos são apresentados na Fig. 16 (a) para a espécie *Malpighia emarginata*, totalizando 5 dias de teste e, na Fig. 16 (b), para a espécie *Vitis vinifera L.*, totalizando seis dias de teste. Os frutos foram revestidos por imersão na nanoemulsão. As amostras AM1 e AM2 foram escolhidas para este teste porque apresentaram a maior porcentagem de eficiência de encapsulamento do óleo essencial, como mostram os resultados no tópico 5.4.

Os resultados indicaram que o revestimento proporcionou uma proteção antimicrobiana, aumentando o tempo de vida dos frutos à temperatura ambiente. Para os dois tipos de teste realizados, observou-se que os frutos do grupo controle (fase aquosa sem óleo) apodreceram mais rapidamente do que os frutos do grupo de teste, indicando um bom resultado e eficiência na proteção dos mesmos, por um efeito possivelmente resultante da atividade antimicrobiana do óleo, diminuindo a velocidade de proliferação de microrganismos. Prolongar o prazo de validade de um produto alimentar, mesmo que por alguns dias, pode representar vantagens económicas consideráveis para as empresas do setor alimentar (HASSAN, et al., 2018).

Figura 16: Resultado do revestimento com nanopartículas, espécie *Malpighia emarginata* (a).
Espécie *Vitis vinifera* L. (b)



Fonte: Autora, (2024).

6. Conclusões

A proposta de desenvolver um sistema nanoestruturado funcional e sustentável foi bem sucedida, conforme indicado pelos resultados. A tecnologia escolhida para o estudo, a nanoemulsão, utilizando um polímero natural como matriz polimérica, foi eficiente para carrear componentes ativos como o dos óleos essenciais. Este sistema apresentou potencial de inibição microbiana, conforme demonstrado pelos testes de concentrações mínimas de inibitória para bactérias, concentração bactericida mínima e eficiência em aumentar o tempo de vida dos frutos in natura. As amostras AM1 e AM2, foram as que apresentaram maior estabilidade e maior eficiência de encapsulamento, variando entre aproximadamente 47 e 23%. Estas amostras também apresentaram um resultado interessante no ensaio microbiológico, após 10 meses de armazenamento, sem proliferação de bactérias e fungos em comparação ao controle, livre de óleo, pode-se considerar como um indicativo de tempo de conservação. Os resultados indicam que essas amostras podem ser usadas e/ou aprimoradas e posteriormente aplicadas na área desta proposta, e em outras áreas.

Por fim, é importante ressaltar que o desenvolvimento de um revestimento comestível desenvolvido com um polímero natural, como o amido, e as substâncias ativas e funcionais dos óleos essenciais, é uma escolha importante quando nos referimos aos problemas atuais em relação à liberação de toxinas e resíduos de materiais sintéticos no meio ambiente. Preservar o fruto e prolongar o seu prazo de validade reduz a taxa de descarte, além de garantir segurança e qualidade para o consumidor. Existe uma série de testes que demonstram a eficácia do revestimento, alguns dos quais, como análise de perda de massa, alterações de pH, testes sensoriais, entre outros, os quais não foram realizados no trabalho. Por este motivo é necessário continuar a caracterizar a nanoemulsão formulada, uma vez que esta apresentou bons resultados em relação ao teste de preservação.

7. Referências bibliográficas

Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI). Panorama de Nanotecnologia. Série Cadernos da Indústria ABDI. Volume XIX. Brasília; 2010.

Ahmad, M., Gani, A., Hassan, I., Huang, Q., & Shabbir, H. (2020). Production and characterization of starch nanoparticles by mild alkali hydrolysis and ultrasonication process. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60380-0>

Aita, C. 2021. 43 f. **Sistemas nanoestruturados de liberação de ingredientes ativos responsivos à radiação**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia-Bioquímica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2021.

Almeida, A. C. S., Franco, A. E. N., Peixoto, F. M., Pessanha, K. L., & Melo, N. R. (2015). Application of nanotechnology in food packaging. *Polímeros*, 25, 8997. <http://dx.doi.org/10.1590/0104-1428.2069>

Andrade, I. H. P. 2018. 86 f. **Nanopartículas de amido de fruta-pão (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg) produzidas por tratamento ultrassônico**. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal da Bahia. Bahia, 2018.

Assis, L. M. de, Zavareze, E. da R., Prentice-Hernández, C., & Souza-Soares, L. A. de. (2012). Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology*, 15(2), 99–109. <https://doi.org/10.1590/S1981-67232012005000004>

Avadi, M. R., Sadeghi, A. M. M., Mohammadpour, N., Abedin, S., Atyabi, F., Dinarvand, R., & Rafiee-Tehrani, M. (2010). Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(1), 58–63. <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2009.04.007>

Batista, C. M., de Carvalho, C. M. B., & Magalhães, N. S. S. (2007). Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43(2), 167–179. <https://doi.org/10.1590/S151693322007000200003>

Bel Haaj, S., Magnin, A., Pétrier, C., & Boufi, S. (2013). Starch nanoparticles formation via high power ultrasonication. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1625–1632. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2012.11.022>

Belhachat, D., Mekimene, L., Belhachat, M., Ferradji, A., & Aid, F. (2018). Application of response surface methodology to optimize the extraction of essential oil from ripe berries of *Pistacia lentiscus* using ultrasonic pretreatment. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 9, 132–140. <https://doi.org/10.1016/J.JARMAP.2018.04.003>

Blondeuau, J. M.; Borsos, S.; Blondeau, L. D.; Blondeau, B. J. In vitro killing of *Escherichia coli*, *Staphylococcus pseudintermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* by enrofloxacin in combination with its active metabolite ciprofloxacin using clinically relevant drug concentrations in the dog and cat. *Veterinary Microbiology*, [s. l.], v. 155, n. 2–4, p. 284–290, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.08.015>

Bondi, M., Lauková, A., de Niederhausern, S., Messi, P., & Papadopoulou, C. (2017). Natural Preservatives to Improve Food Quality and Safety. *Journal of Food Quality*, 2017(1), 1090932. <https://doi.org/10.1155/2017/1090932>

Borandeh, S., van Bochove, B., Teotia, A., & Seppälä, J. (2021). Polymeric drug delivery systems by additive manufacturing. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 173, 349–373. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2021.03.022>

Bravo, A. M. J., Silva, N. M. C. da, Albuquerque, E., & Fialho, R. L. (2016). Caracterização de nanopartículas de amido de mandioca e milho pela técnica de ultrassom. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, XXI, 2016, Fortaleza. Anais eletrônicos [...] Fortaleza, 2016. p. 2-5. Disponível em: <<https://proceedings.science/cobeq/cobeq-2016/trabalhos/caracterizacao-denoparticulas-de-amido-de-mandioca-e-de-milho-pela-tecnica-de?lang=pt-br>>. Acesso em: 05, abr. 2024.*

Brito, A. M., Brito, R. J., Arcuri, F. E., Lange, C. C., Silva, R. M., & De Souza, N, G. (2021). Mastite, **Agronegócio do Leite - Embrapa**. 08 de dez. de 2021. Disponível em: https://www.embrapa.br/agencia-de-informacaotecnologica/criacoes/gado_de_leite/pre-producao/qualidade-esequilíbrio/qualidade/mastite>. Acesso em: 05, abr. 2024.

Bunse, M., Daniels, R., Gründemann, C., Heilmann, J., Kammerer, D. R., Keusgen, M., Lindequist, U., Melzig, M. F., Morlock, G. E., Schulz, H., Schweiggert, R., Simon, M., Stintzing, F. C., & Wink, M. (2022). Essential Oils as Multicomponent Mixtures and Their Potential for Human Health and Well-Being. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.956541/FULL>

Caldonazo, A. 2022. 69 f. **Aplicações farmacêuticas de nanopartículas de amido: uma revisão de escopo**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná. Paraná, 2022.

Canadian Produce Marketing Association, 2022. Protective Coatings for Fruits and Vegetables. Fresh Facts for Industry: Protective Coatings. Disponível em: <https://cpma.ca/industry/regulations-and-policy/protective-coatings-for-fruits-and-vegetables>>. Acesso em: 05 de dez. 2024.

Carson, C. F., Hammer, K. A., & Riley, T. V. (2006). *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 50–62. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.5062.2006>

Carvalho, A. J. F., Trovatti, E., & Casale, C. A. (2018). Polystyrene/cellulose nanofibril composites: Fiber dispersion driven by nanoemulsion flocculation. *Journal of Molecular Liquids*, 272, 387–394. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2018.09.089>

Chorilli, M., Leonardi, G. R., Oliveira, A. G., & Scarpa, M. V. (2013). LIPOSSOMAS EM FORMULAÇÕES DERMOCOSMÉTICAS. *Infarma - Ciências Farmacêuticas*, 16(7/8), 75–79. <https://revistas.cff.org.br/?journal=infarma&page=article&op=view&path%5B%5D=317>

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals. 6th ed. CLSI standard VET01S. 6th ed. **Pennsylvania: Wayne**, 2023a.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 33th ed. CLSI Supplement M100. 33rd ed. **Pennsylvania: Wayne**, 2023b.

Corradini, E.; Teixeira, E. M.; Agnelli, J. A.; Mattoso, L. H. C. **Amido termoplástico**. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2007. 27 p. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Documentos, 30).

Coulter, T. P. Food: The chemistry of its components. 4th. London: Royal Society of Chemistry, 2002. p. 43-45.

Daneshmand, S., Golmohammadzadeh, S., Jaafari, M. R., Movaffagh, J., Rezaee, M., Sahebkar, A., & Malaekheh-Nikouei, B. (2018). Encapsulation challenges, the substantial issue in solid lipid nanoparticles characterization. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(6), 4251–4264. <https://doi.org/10.1002/JCB.26617>

Daniel, T. 2018. 81 f. **Obtenção, caracterização físico-química, oxidação e aplicação de nanocristais de amidos de *Phaseolus vulgaris* L. (Feijão), de *Manihot esculenta* Crantz (Mandioca) e de *Zea mays* L. (milho) em emulsões pickering**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Paraná, 2018.

De Paula Dias, B., de Castro Ribeiro, E. M., Gonçalves, R. L., Oliveira, D. S., Ferreira, T. H., & de Mello Silva, B. (2021). A NANOTECNOLOGIA NO BRASIL E O DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA. *Química Nova*, 44(8), 1084–1092. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170743>

Denardin, C. C., & da Silva, L. P. (2009). Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. *Ciência Rural*, 39(3), 945–954. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000003>

Dimer, F. A., Friedrich, R. B., Beck, R. C. R., Guterres, S. S., & Pohlmann, A. R. (2013). Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos.

Química Nova, 36(10), 1520–1526.
<https://doi.org/10.1590/S010040422013001000007>

Disner, G. R., & Cestari, M. M. (2016). NANOCIÊNCIA & NANOTECNOLOGIA. *Evidência*, 16(1), 71–76. <https://doi.org/10.18593/eba.v16i1.10660>

Falcão, L. de S., Coelho, D. B., Veggi, P. C., Campelo, P. H., Albuquerque, P. M., & de Moraes, M. A. (2022). Starch as a Matrix for Incorporation and Release of Bioactive Compounds: Fundamentals and Applications. *Polymers 2022*, Vol. 14, Page 2361, 14(12), 2361. <https://doi.org/10.3390/POLYM14122361>

Falcão, L. de S., Coelho, D. B., Veggi, P. C., Campelo, P. H., Albuquerque, P. M., & de Moraes, M. A. (2022). Starch as a Matrix for Incorporation and Release of Bioactive Compounds: Fundamentals and Applications. *Polymers 2022*, Vol. 14, Page 2361, 14(12), 2361. <https://doi.org/10.3390/POLYM14122361>

Filho, C. O. A., Lima, Q. A. J., Dos Santos, L. A., & Pereira, C. D. (2024). O uso de nanotecnologia na manufatura de biocósméticos na amazônia. *Revista ft*. 128.

Forato, L. A., Assis, O. B. G., Bernandes Filho, R. Revestimentos comestíveis protetores em frutas e hortaliças. In: Ferreira, D. M. *Tecnologias pós-colheita em frutas e hortaliças*. 1 ed. 2011, p. 210.

Guimarães, L. G. D. L., Cardoso, M. D. G., Zacaroni, L. M., de Lima, R. K., Pimentel, F. A., & de Moraes, A. R. (2008). Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). *Química Nova*, 31(6), 1476–1480. <https://doi.org/10.1590/S010040422008000600037>

Habitzreuter, F., Gabriel, G. A., Semensato, H. L., Dos Santos, M. D., Filho, C. P. S. Biopolímeros, processamentos e aplicações. In: Sanfelice, C. R., Pavinnato A., Corrêa S, D. *Nanotecnologia aplicada a polímeros*. São Paulo Blucher, 2022. 92 p.

Hassan, B., Chatha, S. A. S., Hussain, A. I., Zia, K. M., & Akhtar, N. (2018). Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 1095–1107. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.11.097>

Hassoun, A., Carpena, M., Prieto, M. A., Simal-Gandara, J., Özogul, F., Özogul, Y., Çoban, Ö. E., Guðjónsdóttir, M., Barba, F. J., Marti-Quijal, F. J., Jambrak, A. R., Maltar-Strmečki, N., Kljusurić, J. G., & Regenstein, J. M. (2020). Use of Spectroscopic Techniques to Monitor Changes in Food Quality during Application of Natural Preservatives: A Review. *Antioxidants 2020*, Vol. 9, Page 882, 9(9), 882. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9090882>

Helgason, T., Awad, T. S., Kristbergsson, K., McClements, D. J., & Weiss, J. (2009). Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). *Journal of Colloid and Interface Science*, 334(1), 75–81. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2009.03.012>

Hensel, A., Bauer, R., Heinrich, M., Spiegler, V., Kayser, O., Hempel, G., & Kraft, K. (2020). Challenges at the Time of COVID-19: Opportunities and Innovations in Antivirals from Nature. *Planta Medica*, 86(10), 659–664. <https://doi.org/10.1055/A-1177-4396>

Hiemenz, P. C., & Lodge, T. P. (2007). *Polymer Chemistry*. <https://doi.org/10.1201/9781420018271>

Iwata, T. (2015). Biodegradable and bio-based polymers: future prospects of ecofriendly plastics. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 54(11), 3210–3215. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201410770>

Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2012). Edible and Biodegradable Starch Films: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2058–2076. <https://doi.org/10.1007/S11947-012-0835-4>

Kathe, N., Henriksen, B., & Chauhan, H. (2014). Physicochemical characterization techniques for solid lipid nanoparticles: principles and limitations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 40(12), 1565–1575. <https://doi.org/10.3109/03639045.2014.909840>

Khezerlou, A., Tavassoli, M., Sani, M. A., Mohammadi, K., Ehsani, A., & McClements, D. J. (2021). Application of Nanotechnology to Improve the Performance of Biodegradable Biopolymer-Based Packaging Materials. *Polymers* 2021, Vol. 13, Page 4399, 13(24), 4399. <https://doi.org/10.3390/POLYM13244399>

Kim, H. Y., Park, S. S., & Lim, S. T. (2015). Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 126, 607–620. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2014.11.011>

Kumar, N., & Neeraj. (2019). Polysaccharide-based component and their relevance in edible film/coating: a review. *Nutrition and Food Science*, 49(5), 793–823. <https://doi.org/10.1108/NFS-10-2018-0294/FULL/PDF>

Kumar, S., Anselmo, A. C., Banerjee, A., Zakrewsky, M., & Mitragotri, S. (2015). Shape and size-dependent immune response to antigen-carrying nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 220, 141–148. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2015.09.069>

Kumbhar, P., Kaur, J., de Rubis, G., Paudel, K. R., Prasher, P., Patel, V. K., Corrie, L., Chellappan, D. K., Gupta, G., Singh, S. K., Patravale, V., Disouza, J., & Dua, K. (2023). Inhalation drug delivery in combating pulmonary infections: Advances and challenges. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 89, 105022. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2023.105022>

Lammari, N., Louaer, O., Meniai, A. H., & Elaissari, A. (2020). Encapsulation of Essential Oils via Nanoprecipitation Process: Overview, Progress, Challenges and Prospects. *Pharmaceutics*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS12050431>

Laranjeira, S. P. 2016. 67 f. **Nanoencapsulamento de Óleo Essencial de *Rosemarinus Officialis* com PEG Estudo do efeito das massas molares de PEG**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade da Beira Interior, Covilhã. Portugal, 2016.

Lemes, G. M., Castilho, M. L., & Raniero, L. Influência da concentração de citrato de sódio na formação de nanopartículas prata. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, XVII. 2017, São Paulo. Disponível em: https://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2017/anais/arquivos/0910_0557_01.pdf. Acesso em: 20 dez. de 2024.

Li, N., Cai, Z., Guo, Y., Xu, T., Qiao, D., Zhang, B., Zhao, S., Huang, Q., Niu, M., Jia, C., Lin, L., & Lin, Q. (2019). Hierarchical structure and slowly digestible features of rice starch following microwave cooking with storage. *Food Chemistry*, 295, 475–483. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.05.151>

Lu, H., Zhan, J., Shen, W., Ma, R., & Tian, Y. (2024). Assessing Starch Retrogradation from the Perspective of Particle Order. *Foods* 2024, Vol. 13, Page 911, 13(6), 911. <https://doi.org/10.3390/FOODS13060911>

Mali, S., Grossmann, M. V. E., & Yamashita, F. (2010). Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(1), 137–156. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2010v31n1p137>

Maqsoudlou, A., Assadpour, E., Mohebodini, H., & Jafari, S. M. (2020). Improving the efficiency of natural antioxidant compounds via different nanocarriers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 278, 102122. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2020.102122>

Marques, E. 2017. 62 f. **Nanoencapsulação de óleo essencial de cravo em matrizes lipídicas**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

Marta, H., Wijaya, C., Sukri, N., Cahyana, Y., & Mohammad, M. (2022). A Comprehensive Study on Starch Nanoparticle Potential as a Reinforcing Material in Bioplastic. *Polymers*, 14(22), 4875. <https://doi.org/10.3390/POLYM14224875>

Martínez, G., Merinero, M., Pérez-Aranda, M., Pérez-Soriano, E. M., Ortiz, T., Begines, B., & Alcludia, A. (2020). Environmental Impact of Nanoparticles' Application as an Emerging Technology: A Review. *Materials*, 14(1), 166. <https://doi.org/10.3390/MA14010166>

Matei, E., Predescu, A. M., Râpă, M., Țurcanu, A. A., Mateș, I., Constantin, N., & Predescu, C. (2022). Natural Polymers and Their Nanocomposites Used for Environmental Applications. *Nanomaterials* 2022, Vol. 12, Page 1707, 12(10), 1707. <https://doi.org/10.3390/NANO12101707>

Mittal, D., Kaur, G., Singh, P., Yadav, K., & Ali, S. A. (2020). Nanoparticle-Based Sustainable Agriculture and Food Science: Recent Advances and Future

Outlook. *Frontiers in Nanotechnology*, 2, 579954.
<https://doi.org/10.3389/FNANO.2020.579954/BIBTEX>

Moghimi, R., Ghaderi, L., Rafati, H., Aliahmadi, A., & McClements, D. J. (2016). Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food Chemistry*, 194, 410–415.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.07.139>

Mohanraj, V. J., & Chen, Y. (2006). Nanoparticles - A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1), 561–573.
<https://doi.org/10.4314/TJPR.V5I1.14634>

Moreira, P. M. 2020. 48 f. **Estudo da viabilidade da síntese de nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ em um sistema de fluxo contínuo**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Brasil, 2020.

Nair, A., Mallya, R., Suvarna, V., Khan, T. A., Momin, M., & Omri, A. (2022). Nanoparticles—Attractive Carriers of Antimicrobial Essential Oils. *Antibiotics*, 11(1), 108. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11010108>

Nascimento, A., Carla, A., & Prade, K. (2020). Aromaterapia: o poder das plantas e dos óleos essenciais. Observatório Nacional de Saberes e Práticas Tradicionais, Integrativas e Complementares em Saúde - Ministério da Saúde, Fio Cruz. Recife, 2020.

Nomura, D. A., Enoki, T. A., Silveira, N. P., Lamy, M. T. (2013). Discussing the use of light scattering in the characterization of polydisperse colloidal systems. Trabalho apresentado In: XLII REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE BIOFÍSICA, 2013, Carlos Paz, Córdoba, Argentina.

Ostertag, F., Weiss, J., & McClements, D. J. (2012). Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *Journal of Colloid and Interface Science*, 388(1), 95–102.
<https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2012.07.089>

Ostrosky, E. A., Mizumoto, M. K., Lima, M. E. L., Kaneko, T. M., Nishikawa, S. O., & Freitas, B. R. (2008). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2), 301–307.
<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200026>

Otoni G. C., De Azerevo, C, M, H. Nanoemulsões Poliméricas. In: Sanfelice, C. R., Pavinnato A., Corrêa S, D. *Nanotecnologia aplicada a polímeros*. São Paulo Blucher, 2022. 172-174 p.

Pande, V. (2015). Studies on the Characteristics of Zaltoprofen Loaded Gelatin Nanoparticles by Nanoprecipitation. *Inventi Rapid NDDS*, 3, 1–7.

Penfold, A. R., & F. R. Morrison. (1946). Bulletin no. 14. **Australian tea trees of economic value**, part 1, 3rd ed. Thomas Henry Tennant, Government Printer, Sydney, Australia.

Penfold, A. R., & R. Grant. (1925). **The germicidal values of some Australian essential oils and their pure constituents, together with those for some essential oil isolates, and synthetics**. Part III. J. R. Soc. New South Wales 59:346–349.

Peng, L., Zhongdong, L., & Kennedy, J. F. (2007). The study of starch nano-unit chains in the gelatinization process. *Carbohydrate Polymers*, 68(2), 360–366. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2006.11.021>

Pérez, S.; Bertoft, E. (2010). The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch-Stärke*, v. 62, n. 8, p. 389-420.

Rodrigues, S. R. 2022. 34 f. **Revisão bibliográfica e prospecção tecnológica da utilização de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* em complexos nanoestruturados**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade de Brasília. Distrito Federal, 2022.

Sagbana, P. I., Sarkodie, K., & Nkrumah, W. A. (2023). A critical review of carbonate reservoir wettability modification during low salinity waterflooding. *Petroleum*, 9(3), 317–330. <https://doi.org/10.1016/J.PETLM.2022.01.006>

Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2014). Impact of microfluidization or ultrasound processing on the antimicrobial activity against *Escherichia coli* of lemongrass oil-loaded nanoemulsions. *Food Control*, 37(1), 292–297. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2013.09.015>

Sanfelice, C. R., Pavinnato A., Corrêa S, D. Introdução à nanotecnologia. In: Sanfelice, C. R., Pavinnato A., Corrêa S, D. *Nanotecnologia aplicada a polímeros*. São Paulo Blucher, 2022. 28-30 p.

Santos, C., de Araújo Gonçalves, M., de Macedo, L. F., Torres, A. H. F., Marena, G. D., Chorilli, M., & Trovatti, E. (2023). Green nanotechnology for the development of nanoparticles based on alginate associated with essential and vegetable oils for application in fruits and seeds protection. *International Journal of Biological Macromolecules*, 232, 123351. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.123351>

Schaeffer, D. 2020. 64 f. **Obtenção e caracterização de biopolímeros a partir de fécula de mandioca e amido de milho**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Universidade do Vale do Taquari, Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul. 2020.

Schramm, L. L. *Emulsions, foams, suspensions and aerosols: Microscience and applications*. 2. ed. [S.l.]: Wiley, 2014. ISBN 9783527679478.

Silva, V. 2013. 111 f. **Micelas poliméricas e nanopartículas de lípidos sólidos, contendo paclitaxel, para terapêutica de cancro de mama.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Portugal, 2013.

Sun, Q. (2018). Starch Nanoparticles. *Starch in Food: Structure, Function and Applications*, 691–745. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100868-3.00018-4>

Sykes, J. E., & Rankin, S. C. (2014). Isolation and Identification of Aerobic and Anaerobic Bacteria. *Canine and Feline Infectious Diseases*, 17–28. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00003-X>

Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3012462>

Taiz, L. & Zeiger, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

Tan, Y., Xu, K., Li, L., Liu, C., Song, C., & Wang, P. (2009). Fabrication of sizecontrolled starch-based nanospheres by nanoprecipitation. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 1(4), 956–959. <https://doi.org/10.1021/AM900054F>

Tester, F. R., & Karkalas J. (2001). The effects of environmental conditions on the structural features and physico-chemical properties of starches. *Starch - Stärke*, 53 (10), 513-519. [https://doi.org/10.1002/1521-379X\(200110\)53:10<513::AID-STAR513>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-379X(200110)53:10<513::AID-STAR513>3.0.CO;2-5)

Thu, H. E., Haider, M. A., Khan, S., Sohail, M., & Hussain, Z. (2023). Nanotoxicity induced by nanomaterials: A review of factors affecting nanotoxicity and possible adaptations. *OpenNano*, 14, 100190. <https://doi.org/10.1016/J.ONANO.2023.100190>

Topan, J. F. 2016. f **Dendrímeros: uma estratégia para a veiculação de um fármaco anticâncer.** 2016. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo. São Paulo, 2016.

Torchilin, V. P. (2006). *Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives*. *Pharmaceutical Research*, 24(1), 1–16. doi:10.1007/s11095-006-9132-0

Ungureanu, C., Tihan, G., Zgârian, R., & Pandelea, G. (2023). Bio-Coatings for Preservation of Fresh Fruits and Vegetables. *Coatings 2023, Vol. 13, Page 1420*, 13(8), 1420. <https://doi.org/10.3390/COATINGS13081420>

Valdejão, R. G.; Janson, J. A. Propriedades dos amidos e suas aplicações básicas na indústria papeleira. *O Papel*, São Paulo, p. 50-61, Agosto, 1996.

Veranth, J. M., Ghandehari, H., & Grainger, D. W. (2010). Nanoparticles in the Lung. *Comprehensive Toxicology, Second Edition*, 8, 453–475. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00928-3>

Viégas, L. P. 2016. f 90. **Preparação e caracterização de filmes biodegradáveis a partir de amido com quitosana para aplicação em embalagens de alimentos**. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia dos Materiais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. 2016.

Vladár, A. E., & Hodoroaba, V. D. (2019). Characterization of nanoparticles by scanning electron microscopy. *Characterization of Nanoparticles: Measurement Processes for Nanoparticles*, 7–27. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-8141823.00002-X>

Wakaskar, R. R. (2018). General overview of lipid-polymer hybrid nanoparticles, dendrimers, micelles, liposomes, spongosomes and cubosomes. *Journal of Drug Targeting*, 26(4), 311–318. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2017.1367006>

Walter, M., Silva, L. P. da, & Emanuelli, T. (2005). Amido resistente: características físico-químicas, propriedades fisiológicas e metodologias de quantificação. *Ciência Rural*, 35(4), 974–980. <https://doi.org/10.1590/S010384782005000400041>

WHO 2018. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care. World Health Organization, 2018. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241514842>

WHO 2024. *Food safety*. Disponível: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Acesso em: 05 de dez. de 2024.

Yadav, M., Dwibedi, V., Sharma, S., & George, N. (2022). Biogenic silica nanoparticles from agro-waste: Properties, mechanism of extraction and applications in environmental sustainability. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(6), 108550. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2022.108550>

Yamini, V., Shanmugam, V., Rameshpathy, M., Venkatraman, G., Ramanathan, G., al Garalleh, H., Hashmi, A., Brindhadevi, K., & Devi Rajeswari, V. (2023). Environmental effects and interaction of nanoparticles on beneficial soil and aquatic microorganisms. *Environmental Research*, 236, 116776. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2023.116776>

Yamine, J., Chihib, N. E., Gharsallaoui, A., Dumas, E., Ismail, A., & Karam, L. (2022). Essential oils and their active components applied as: free, encapsulated and in hurdle technology to fight microbial contaminations. A review. *Heliyon*, 8(12). <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2022.E12472/ASSET/FC5221F2-9E3F-44BF-99E9-7C6A5F5A9F23/MAIN.ASSETS/GR2.JPG>

Zhang, L., Li, X., Janaswamy, S., Chen, L., & Chi, C. (2020). Further insights into the evolution of starch assembly during retrogradation using SAXS. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 521–527.

<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.03.135>

Zhang, Y., Feng, R., Li, L., Zhou, X., Li, Z., Jia, R., Song, X., Zou, Y., Yin, L., He, C., Liang, X., Zhou, W., Wei, Q., Du, Y., Yan, K., Wu, Z., & Yin, Z. (2018). The Antibacterial Mechanism of Terpinen-4-ol Against *Streptococcus agalactiae*. *Current Microbiology*, 75(9), 1214–1220. <https://doi.org/10.1007/S00284-018-1512-2>