

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

CAROLINA SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS PARA
CARREAMENTO DE ÓLEOS COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA AGRICULTURA**

**Araraquara, SP
2024**

CAROLINA SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS PARA
CARREAMENTO DE ÓLEOS COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA AGRICULTURA**

Tese de Doutorado 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 Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Trovatti

Araraquara, SP
2024

FICHA CATALOGRÁFICA

S234d Santos, Carolina

Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para carreamento de óleos com potencial na agricultura/Carolina Santos. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2024.

91f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal- Universidade de Araraquara-UNIARA

Orientador: Profa. Dra. Eliane Trovatti

1. Nanotecnologia. 2. Agricultura. 3. Nanopartículas lipídicas sólidas. 4. Nanocápsulas. 5. Óleo de goiaba. 6. Bioestimulantes. 7. Óleo de melaleuca. 8. Óleo de pepino. I. Título.

CDU 577.4

CAROLINA SANTOS

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

Araraquara, 06 de junho de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 ELIANE TROVATTI
Data: 12/06/2024 16:06:13-0300
verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª Drª ELIANE TROVATTI (Orientadora)
Universidade de Araraquara – UNIARA

Documento assinado digitalmente
 MARCOS DAVID FERREIRA
Data: 11/06/2024 11:24:35-0300
verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. MARCOS DAVID FERREIRA
EMBRAPA Instrumentação – São Carlos - SP

Martus
Chorilli:
21539386864
Assinado digitalmente por Martus Chorilli:
21539386864
DN: CN=Martus Chorilli, OU=EMBRAPA - Instrumentação, O=EMBRAPA - Instrumentação, C=BR
Razão: Este documento foi assinado digitalmente por Martus Chorilli.
Data: 2024.06.10 18:27:05-0300
Razão: Este documento foi assinado digitalmente por Martus Chorilli.

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP

Documento assinado digitalmente
 FERNANDA DE AVILA ABREU
Data: 10/06/2024 15:06:28-0300
verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª Drª FERNANDA DE AVILA ABREU

Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Dr. LUCAS HENRIQUE STAFFA

Departamento de Engenharia de Materiais – UFSCar – São Carlos - SP

Documento assinado digitalmente
 LUCAS HENRIQUE STAFFA
Data: 07/06/2024 18:03:44-0300
verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DEDICATÓRIA

*Ao meu amor, **Felipe**, que me ensina todos os dias o significado do amor e companheirismo.*

*Aos meus pais, **Juliana** e **Reginaldo**, que sempre me incentivaram a buscar mais.*

*Aos meus queridos irmãos, **Heloisa** e **Raul**, por me ensinarem que a família permanece, onde quer que estejamos.*

*À minha orientadora, **Eliane**, por acreditar em mim e me apresentar o mundo fantástico da Biotecnologia.*

*Aos meus queridos avós **Pedro** (in memoriam), **José**, **Benedita** e **Judith** que batalharam desde sempre pela felicidade da nossa família.*

*Aos meus sobrinhos **Sofia**, **Rafael** e **Beatriz**, que vieram para ressignificar minha vida e enchê-la de amor e alegria!*

Com todo meu amor e gratidão, dedico este trabalho a vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, meu porto seguro, por me dar coragem para persistir na busca pelos meus sonhos, por abençoar minha vida com pessoas e experiências singulares, por me proporcionar aprendizados únicos e acompanhar-me a cada passo.

Agradeço especialmente aos meus pais, **Juliana e Reginaldo**, que me ensinaram que nada é impossível quando existe força de vontade, que me incentivaram desde sempre a buscar conhecimento e muitas vezes renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse alcançar os meus! A vocês minha gratidão eterna!

Agradeço imensamente ao amor da minha vida, **Felipe**, por acreditar em mim quando eu mesma não acreditei, por me amparar nos momentos de dificuldade e vibrar comigo a cada conquista. Sem você eu não chegaria até aqui, para sempre te amarei!

Agradeço aos meus amados irmãos **Heloisa e Raul**, que motivaram a persistir e lutar pelos meus sonhos. Aos cunhados, **Valter e Tamires**, pelo apoio de sempre. Espero ser um exemplo para vocês sempre! Minha vida não existe sem vocês!

Agradeço aos meus filhos do coração **Tobby, Vilma e Lili**, que alegam a minha vida com o amor mais puro e verdadeiro!

Agradeço à minha segunda família: **Francisco, Paula, Franciele, Luiz, Gabriel e Livia**, que me acolheram com tanto carinho e me lembram sempre sobre a importância da família!

Agradeço aos meus **familiares e amigos** que de alguma forma contribuíram com esta conquista, principalmente com carinho e palavras de incentivo! Mesmo com as distâncias que a vida e escolhas nos impõe, saibam que permanecerão sempre no meu coração.

Agradeço às amigas de jornada **Bruna e Rauany**, com quem pude dividir aprendizados, alegrias e preocupações ao longo destes quatro anos. Agradeço também aos **colegas do Laboratório de Biomateriais e Biotecnologia**, vocês tornaram o percurso mais leve e animador!

Agradeço às amigas da vida **Laura, Jéssica e Daniela**, cada uma de vocês, em momentos distintos, trouxeram-me forças, conselhos e exemplos para que eu pudesse alcançar este objetivo.

Agradeço ao **time Nitro**, que me desafia diariamente a evoluir como profissional e pessoa, que abriu meus olhos para um grande propósito de vida: contribuir para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável, que impacta significativamente no futuro do planeta.

Agradeço imensamente a todos os **professores** que contribuíram para a minha formação, desde a pré-escola ao ensino superior, e me ensinaram que o conhecimento é engrandecedor e a educação muda vidas. Em especial, agradeço à minha eterna professora de Química do ensino médio, **Ana Rosa**, que despertou em mim o amor pela química e pela docência.

Agradeço a **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** – Código de financiamento 001, pelos 2 anos de bolsa concedida, e a todos os **docentes e funcionários** da **UNIARA**, pelo ensino de qualidade e excelência.

Por último, mas não menos importante, agradeço imensamente à minha orientadora, **Eliane**, por todos os ensinamentos, compartilhamento de experiências, incentivo, paciência, confiança e apoio. Agradeço por me permitir voar quando tive a chance e mesmo assim ajudar a manter-me firme neste propósito. Com certeza guardarei estes anos de aprendizado na memória com muito carinho!

*“Não fui eu que ordenei a você?
Seja forte e corajoso!
Não se apavore nem desanime,
Pois o Senhor, o seu Deus, estará
Com você por onde você andar”*

♥ Josué 1:9 ♥

RESUMO

Nos últimos anos, a busca por produtos verdes, de origem natural e biotecnológica vem crescendo devido aos benefícios promovidos à saúde humana e ao meio ambiente. A substituição de materiais sintéticos por naturais e biotecnológicos vêm impulsionando o desenvolvimento de novas tecnologias, como o desenvolvimento de sistemas nanoencapsulados. Atrelado a este propósito, setor agrícola vem buscando soluções que auxiliem no aumento da produtividade e redução de perdas, considerando o crescimento populacional, consequente diminuição dos territórios disponíveis para plantio e alterações climáticas resultantes das ações antrópicas. Nesse âmbito, visando destacar a valorização de resíduos agroindustriais com potencial aplicação como bioestimulante, este trabalho descreve a encapsulação do óleo de semente de goiaba em nanopartículas lipídicas sólidas, utilizando cera de abelha como matriz lipídica, sistema não relatado anteriormente. O sistema resultante apresentou tamanho médio de partícula de 280,59 nm, potencial zeta - 22,4 mV e EE% 86,52%. O óleo de semente de goiaba foi caracterizado quanto ao teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante. O sistema desempenhou um impacto positivo no desenvolvimento e estabelecimento inicial de sementes de feijão, contribuindo para a perspectiva de desenvolvimento da agricultura sustentável. Além disso, foi desenvolvido em paralelo, um sistema de nanocápsulas poliméricas à base de alginato, encapsulando uma mistura de óleo essencial de melaleuca e óleo vegetal de pepino, aplicado como revestimento de frutas e sementes, visando a proteção e aumento da conservação ao longo do tempo. Foi obtido um sistema estável, com distribuição de tamanho variando entre 200 e 400 nm e boa EE% 85,48 %, que possibilitou o aumento da preservação das frutas e sementes avaliadas. Os resultados alcançados neste trabalho demonstraram o potencial associado ao uso de óleos de origem vegetal como bioestimulantes e protetores na agricultura, a partir da encapsulação em sistemas verdes e sustentáveis, como prova de conceito. Além disso, foi destacado o uso de materiais com potencial para contribuir para o reaproveitamento de resíduos agroindustriais e diminuir a geração de resíduos tóxicos para o meio ambiente e para a saúde humana.

Palavras-chave: Nanotecnologia; Agricultura; Nanopartículas lipídicas sólidas; Nanocápsulas; Óleo de goiaba; Bioestimulantes; Óleo de melaleuca; Óleo de pepino.

ABSTRACT

In recent years, the search for green products of natural and biotechnological origin has been growing due the benefits promoted to human health and the environment. The replacement of synthetic materials with natural and biotechnological materials has been driving the development of new technologies, such as nanoencapsulated systems. Also, the agricultural sector has been seeking solutions that help increase productivity and reduce losses, considering growth population, consequent planting territories decrease and climate changes resulting from human actions. In this context, aiming to highlight the valorization of agroindustrial waste with potential application as bioestimulant, this work describes guava seed oil encapsulation in solid lipid nanoparticles, using beeswax as lipid matrix, system not previously reported. The chosen system presented 280.59 nm mean particle size, zeta potential -22.4 mV and EE% 86.52%. Guava seed oil was characterized as phenolic compounds content and antioxidant activity. The system was positively impacted the development and initial establishment of bean seeds, contribute to sustainable agriculture development perspective. Furthermore, a system of alginate-based polymeric nanocapsules was developed too, encapsulating a mixture of tea tree essential oil and cucumber vegetable oil, applied as a coating on fruits and seeds, aiming to protect and increase shelf life. A stable system was obtained, with size distribution varying between 200 and 400 nm and good encapsulation efficiency (85.48%), which enabled increased preservation of the fruits and seeds evaluated. The results achieved in this work demonstrated the potential associated with the use of oils of vegetable origin as biostimulants and protectors in agriculture, through encapsulation in green and sustainable systems, as concept proof. Furthermore, the use of materials with the potential to contribute to the reuse of agro-industrial waste and reduce the generation of toxic waste for the environment and human health was highlighted.

Keywords: Nanotechnology; Agriculture; Solid lipid nanoparticles; Nanocapsules; guava oil; Biostimulants; tea tree oil; Cucumber oil.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - TIPOS DE NANOPARTÍCULAS COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA AGRICULTURA E POSSIBILIDADES DE APLICAÇÃO	17
FIGURA 2 - IMPACTO DO POTENCIAL ZETA NAS INTERAÇÕES PARTÍCULA – PARTÍCULA.....	20
FIGURA 3 - ESTRUTURA GENÉRICA PARA NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS	30
FIGURA 4 - COMPOSIÇÃO DOS CONJUNTOS EXPERIMENTAIS 1, 2 E 3	34
FIGURA 5 - MÉTODO DE PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS	35
FIGURA 6 - EXEMPLO DE NOMENCLATURA	35
FIGURA 7 - MONTAGEM DO TESTE IN VIVO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOESTIMULANTE EM SEMENTES DE FEIJÃO	42
FIGURA 8 - CONJUNTO EXPERIMENTAL 1: MANUTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO TENSOATIVO (1,0 %), A) TENSOATIVO ANIÔNICO E B) TENSOATIVO NÃO-IÔNICO E VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CERA (1,0 E 5,0 %) E MÉTODO DE RESFRIAMENTO PARA AMBOS ...	43
FIGURA 9 - CONJUNTO EXPERIMENTAL 2: MANUTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO TENSOATIVO (5,0 %), A) TENSOATIVO ANIÔNICO E B) TENSOATIVO NÃO-IÔNICO E VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CERA (1,0 E 5,0 %) E MÉTODO DE RESFRIAMENTO PARA AMBOS ...	43
FIGURA 10 - CONJUNTO EXPERIMENTAL 3: COMBINAÇÕES DE DIFERENTES PROPORÇÕES DE TENSOATIVOS (ANIÔNICO E NÃO-IÔNICO), MANUTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CERA (1,0 %) E VARIAÇÃO DO MÉTODO DE RESFRIAMENTO PARA AMBOS	43
FIGURA 11 - ESTABILIDADE VISUAL DOS CONJUNTOS EXPERIMENTAIS 1, 2 E 3, APÓS 30 DIAS (OS ASTERISCOS VERMELHOS INDICAM A AUSÊNCIA DE SEPARAÇÃO DE FASES APÓS 30 DIAS)	45
FIGURA 12 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO DE GOIABA.....	50
FIGURA 13 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM FUNÇÃO DO PADRÃO ÁCIDO GÁLICO	51
FIGURA 14 - DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA DAS AMOSTRAS W1T1B E GSO ..	53
FIGURA 15 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. A) AMOSTRA W ₁ T ₁ B E B) SISTEMA GSO.....	53
FIGURA 16 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VIS DO ÓLEO DE GOIABA DISSOLVIDO EM ACETONA EM CONCENTRAÇÕES ARBITRÁRIAS	54
FIGURA 17 - MONITORAMENTO DA ABSORBÂNCIA EM FUNÇÃO DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE OG DISSOLVIDO EM ACETONA EM 330 NM.....	55

FIGURA 18 - MASSA MÉDIA DAS RAÍZES (A) E PARTE AÉREA (B) REFERENTES AO EXPERIMENTO 1. MÉDIAS QUE NÃO COMPARTILHAM UMA LETRA SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES.	57
FIGURA 19 - MASSAS MÉDIAS DAS RAÍZES (A) PARTE AÉREA (B) REFERENTES AO EXPERIMENTO 2. MÉDIAS QUE NÃO COMPARTILHAM UMA LETRA SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES	58
FIGURA 20 - DESENVOLVIMENTO DAS SEMENTES DE FEIJÃO TRATADAS COM O SISTEMA GSO, EM DIFERENTES DOSES, NOS EXPERIMENTOS 1 E 2.....	58
FIGURA 21- ESTRUTURA GENÉRICA PARA NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	64
FIGURA 22 - MÉTODO DE PREPARO PARA AS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	67
FIGURA 23 - ESTRUTURA FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS DE ALGINATO COM NÚCLEO OLEOSO	70
FIGURA 24 - AMOSTRAS APÓS 30 DIAS DE ARMAZENAMENTO À TEMPERATURA AMBIENTE... ..	70
FIGURA 25 - A) VARIAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TENSOATIVO B) POTENCIAL ZETA	72
FIGURA 26 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO DE PEPINO + ÓLEO DE MELALEUCA, ÓLEO DE PEPINO LIVRE E ÓLEO DE MELALEUCA LIVRE.....	74
FIGURA 27 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO. TO = ÓLEO DE MELALEUCA, CO = ÓLEO DE PEPINO	74
FIGURA 28 - EFEITO DO REVESTIMENTO DE MORANGOS, GOIABA E SEMENTES DE ABÓBORA APÓS 6, 8 E 18 DIAS, RESPECTIVAMENTE	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PROPOSIÇÃO DE CONJUNTOS EXPERIMENTAIS VISANDO A COMPREENSÃO DE FATORES NA FORMAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS	36
TABELA 2 - TRATAMENTO DAS SEMENTES DE FEIJÃO	41
TABELA 3 - TAMANHOS MÉDIOS DE PARTÍCULA REFERENTES AOS CONJUNTOS EXPERIMENTAIS 1, 2 E 3	44
TABELA 4 - VALORES MÉDIOS DE POTENCIAL ZETA CORRESPONDENTES AOS CONJUNTOS EXPERIMENTAIS 1, 2 E 3	47
TABELA 5 - VALOR MÉDIO E ESTATÍSTICA: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO DE GOIABA ..	50
TABELA 6 - DOSES DE GSO APLICADAS NO TRATAMENTO DE SEMENTES DE FEIJÃO	55
TABELA 7 - EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS APÓS 24, 48 E 72 HORAS.....	56
TABELA 8 - COMPOSIÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	67
TABELA 9 - TEORES DE POLÍMERO E TENSOATIVO E IMPACTO NO TAMANHO DE PARTÍCULA ..	72

SUMÁRIO

SUMÁRIO	13
INTRODUÇÃO GERAL	15
OBJETIVOS	22
CAPÍTULO 1 – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO ÓLEO DE SEMENTE DE GOIABA COM POTENCIAL BIOESTIMULANTE	23
1. INTRODUÇÃO	23
1.1. <i>Bioestimulantes</i>	23
1.2. <i>Resíduos agroindustriais com potencial bioestimulante</i>	25
1.3. <i>Nanopartículas lipídicas sólidas</i>	27
1.4. <i>Compostos antioxidantes no tratamento de sementes</i>	31
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
2.1. <i>Materiais</i>	33
2.2. <i>Métodos</i>	34
2.2.2. <i>Caracterização do óleo de goiaba</i>	38
2.2.2. <i>Encapsulação do óleo de goiaba</i>	39
2.2.3. <i>Caracterização físico-química das NLS</i>	39
2.2.5. <i>Testes in vivo</i>	40
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.1. <i>Parâmetros que influenciam na formação das NLS</i>	42
3.2. <i>Caracterização do óleo de goiaba</i>	48
3.3. <i>Encapsulação do óleo de goiaba</i>	52
3.4. <i>Validação do efeito bioestimulante in vivo do óleo de semente de goiaba encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas</i>	55
4. CONCLUSÃO.....	59
CAPÍTULO 2 – CO-ENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA E ÓLEO VEGETAL DE PEPINO EM NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS APLICADAS NO REVESTIMENTO DE FRUTAS COM POTENCIAL EFEITO PROTETOR	60
1. INTRODUÇÃO	60
1.1. <i>Biodefensivos</i>	60

1.2. Óleos naturais	62
1.3. Nanocápsulas poliméricas.....	63
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
2.1. Materiais.....	65
2.2. Métodos.....	66
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
3.1. Preparo das nanopartículas	69
3.2. Eficiência de encapsulação	73
3.3. Potenciais antioxidantes e antimicrobianos.....	73
3.4. Avaliação do efeito protetor <i>in vivo</i>	75
4. CONCLUSÃO	78
PRODUÇÃO CIENTÍFICA	79
REFERENCIAS.....	80

INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento acelerado da população mundial e consequente aumento da demanda por alimentos representam um desafio para a agricultura convencional, que precisa suprir a cadeia alimentar e ao mesmo tempo superar os problemas que ameaçam a produção, nos dias atuais e a longo prazo (MITTAL, SINGH, *et al.*, 2020). A Organização das Nações Unidas (ONU) estima que em 2050 existirão cerca de 9,7 bilhões de habitantes na Terra, 1,7 bilhões de pessoas a mais do que no ano de 2022, fato que motiva o desenvolvimento de novas tecnologias que possam contribuir para o aumento da produtividade das lavouras (SAATH e FACHINELLO, 2018).

De acordo com Mittal *et al.* (2020) cerca de um terço das lavouras do planeta estão comprometidas por pragas, desastres ambientais, baixa qualidade do solo e baixa disponibilidade de nutrientes, de modo que, os principais problemas associados aos fertilizantes e defensivos convencionais estão relacionados ao seu uso indiscriminado. O excesso de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) causa desequilíbrios bioquímicos no solo, diminui a microflora e afeta diversos organismos, além contribuir para a contaminação de corpos d'água adjacentes (MITTAL, SINGH, *et al.*, 2020). Defensivos permanecem no solo por longos períodos, podendo gerar subprodutos ainda mais nocivos, além de acidificar o solo junto aos fertilizantes. Estas alterações impactam na diminuição da população microbiana do solo, composta por microrganismos benéficos responsáveis, por exemplo, pela conversão do nitrogênio atmosférico em nitrato. Organismos não-alvo também podem sofrer com a pulverização de defensivos, como insetos e animais aquáticos essenciais para a manutenção da biodiversidade (BAWEJA, KUMAR e KUMAR, 2020). Além disso, a saúde humana e animal também pode ser prejudicada por meio da exposição indireta (água, contaminações, entre outros), por exemplo, o contato com certos defensivos que podem ocasionar danos ao sistema nervoso (BAWEJA, KUMAR e KUMAR, 2020), dentre muitos outros efeitos nocivos ao organismo animal. É importante ressaltar, que apesar dos problemas mencionados, o uso de fertilizantes e defensivos garantem a produção de alimentos em escala global, por isso não podem ser dispensados.

Neste contexto, diversas soluções têm sido propostas e aplicadas nas últimas décadas visando atender às demandas das culturas em crescimento, como os

avanços na biotecnologia, o desenvolvimento de novas tecnologias para liberação de nutrientes e produtos biológicos aplicados ao controle pragas. Os avanços nas tecnologias de entrega de nutrientes, produtos químicos e medicamentos estão se espalhando e ganhando uma posição econômica importante nas principais potências globais (JOGAIAH, SINGH, *et al.*, 2020). Atrelado a este propósito, nos últimos anos, a busca por produtos verdes e/ou de origem natural vem crescendo, devido aos benefícios promovidos à saúde humana e ao meio ambiente. A substituição de materiais sintéticos pelos naturais e biotecnológicos vêm ganhando atenção e impulsionando o desenvolvimento e melhoramento de tecnologias e processos de alto valor agregado, incluindo os avanços em nanotecnologia (SRIVASTAVA e BHARGAVA, 2020) (THAKUR, PRASAD, *et al.*, 2021).

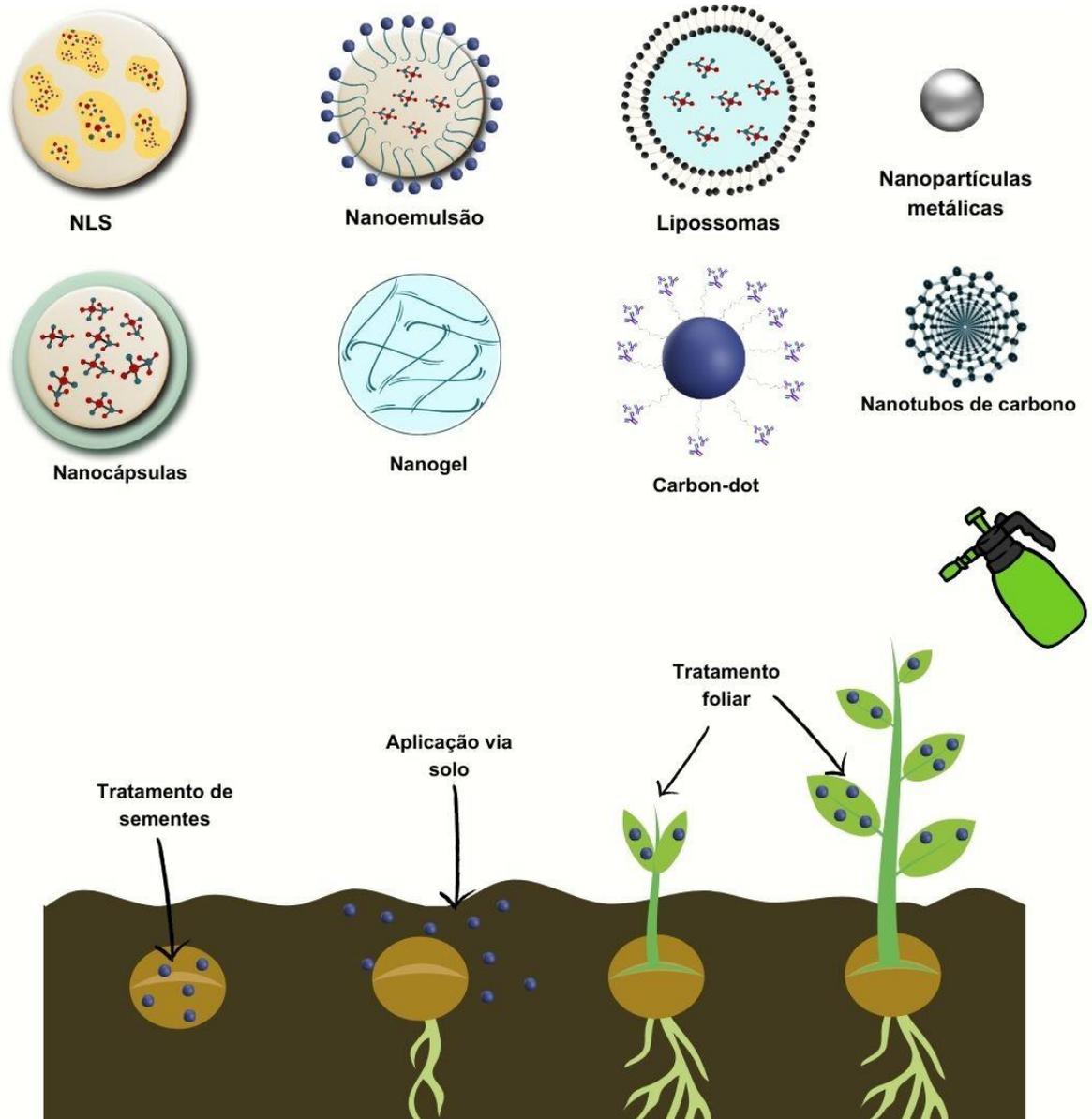
Mazrou (2019) relatou que materiais de origem natural, como óleos essenciais e vegetais, apresentam propriedades bioativas, como atividades antioxidante, antimicrobiana e composições complexas que podem desencadear efeitos bioestimulantes. No entanto, a aplicação destes insumos em produtos é dificultada devido a propriedades lipofílicas e instabilidades físicas e químicas associadas, nesse contexto, as tecnologias de nanoencapsulação surgem como alternativas ideais para a veiculação destes materiais (YEH, CHANG, *et al.*, 2011).

Durante anos, a aplicação da nanotecnologia na agricultura permaneceu teórica devido à dificuldade em estudar e mensurar a entrega de nanopartículas às células e tecidos vegetais. Atualmente sabe-se que o sucesso da aplicação de nanopartículas na planta depende tanto da adesão e permeação nas camadas externas das folhas, raízes, frutos ou sementes, como da sua locomoção até o sítio de liberação (ETXEBERRIA, GONZALEZ, *et al.*, 2016). Além disso, o conhecimento sobre o comportamento de nanopartículas no campo é bastante limitado, pois grande parte dos estudos relatados foram conduzidos sob condições controladas (USMAN, FAROOQ, *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, os estudos associados ao desenvolvimento e aplicação de nanotecnologias na agricultura focaram em nanofertilizantes e nanodefensivos, com o intuito de melhorar a saúde do solo, diminuir a geração de resíduos e as doses associadas aos fertilizantes convencionais, aumentar a produtividade e diminuir o uso de água (VIJAYAKUMAR, SURENDHAR, *et al.*, 2022). Estes estudos elucidam diferentes possibilidades de aplicação de classes distintas de nanopartículas (como

nanocápsulas, nanopartículas metálicas, carbon-dots e nanopartículas lipídicas) em momentos distintos do desenvolvimento das culturas, como mostra a figura 1.

Figura 1 - Tipos de nanopartículas com potencial aplicação na agricultura e possibilidades de aplicação



Fonte: Adaptado de Vijayakumar *et al.* (2022).

Nas últimas décadas a nanotecnologia vem se tornando um dos campos de pesquisa mais promissores (JAFARI, 2017). A possibilidade de modulação das propriedades químicas, físicas e biológicas impactam no aprimoramento do desempenho dos nanomateriais em relação aos seus equivalentes em massa (JEEVANANDAM, BARHOUM, *et al.*, 2018). De acordo com Kumar e Kumbhat (2016), a nanotecnologia engloba diferentes tipos de materiais, cujos tamanhos podem variar

de 1 a 1000 nm, abrangendo 4 classes principais: nanomateriais a base de carbono, nanomateriais de base inorgânica, nanomateriais baseados em compósitos e nanomateriais de base orgânica (objetos deste estudo). A nanoencapsulação contribui para a proteção de compostos princípios ativos contra fatores ambientais adversos, promovendo sua entrega segura até o alvo, favorecendo sua liberação controlada (ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014). Em outras palavras, o termo “nanoencapsular” refere-se ao empacotamento ou revestimento do princípio ativo em nanoescala, por meio da incorporação, dispersão ou absorção em matrizes adequadas, originando vesículas de tamanho nanométrico (TAYLOR, WEISS, *et al.*, 2007). Sistemas a base de polímeros biodegradáveis e lipídios são frequentemente utilizados como matrizes de encapsulação. Matrizes lipídicas são precursoras de nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas, carreadores lipídicos nanoestruturados e nanolipossomas. Enquanto polímeros podem ser aplicados na produção de nanocápsulas e nanoesferas, sistemas amplamente abordados pela literatura (ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014).

Os métodos associados a obtenção de sistemas nanoencapsulados baseiam-se nos conceitos de *top-down* e *bottom-up*, correlacionados com a energia empregada na diminuição do tamanho e modelagem da nanoestrutura, de modo que a primeira abordagem carece de alta energia, enquanto na segunda, os nanomateriais são originados pela automontagem das moléculas em solução (baixa energia), influenciados por fatores como pH, força iônica, concentração e temperatura (AUGUSTIN e SANGUANSRI, 2009) (ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014). Estas abordagens envolvem métodos de emulsificação e evaporação por emulsificação em solvente (*top-down*) e técnicas utilizando fluido supercrítico, nanoprecipitação, coacervação e complexação (*bottom-up*), que podem ser aplicadas na nanoencapsulação de compostos hidrofílicos e lipofílicos, a depender da matriz e demais constituintes do sistema (MISHRA, BPHARM e MPHARM, 2010).

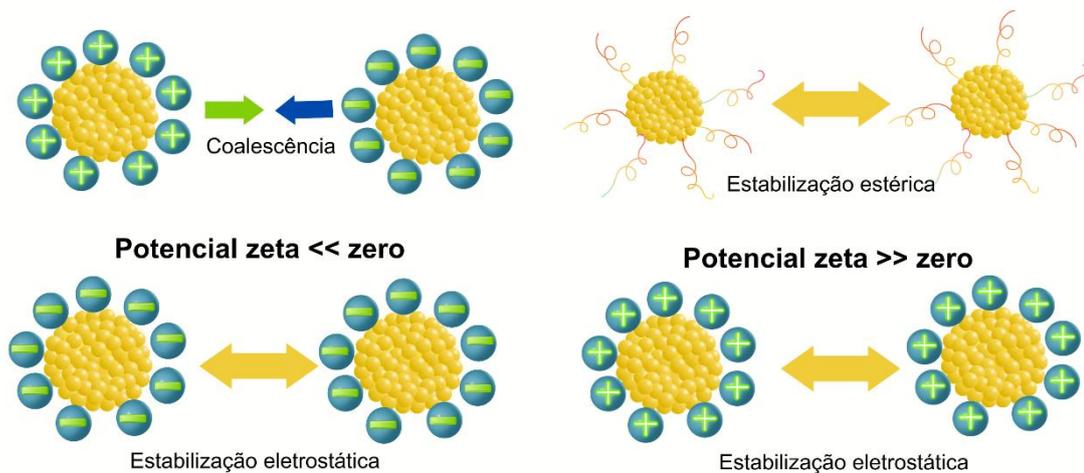
A nanoencapsulação de princípios ativos lipofílicos, abordados neste estudo, obedece aos princípios básicos associados a formação de emulsões, descritos por Tadros (2013), que abrangem sistemas coloidais dispersos que consistem em dois líquidos imiscíveis, estabilizados por agentes emulsificantes (tensoativos, polímeros, sólidos finamente divididos ou combinações), classificadas de acordo com a estrutura do sistema ou a natureza do emulsionante.

Tensoativos são classificados como moléculas anfifílicas, constituídas por uma fração hidrofílica e outra hidrofóbica, capazes de sofrer automontagem, originando agregados como micelas e vesículas, acima de sua concentração micelar crítica (KROLL, BENKE, *et al.*, 2022). São classificados, de acordo com a natureza da fração hidrofílica, em aniônicos, catiônicos, não-iônicos e anfotéricos (TADROS, 2013). O tensoativo diminui a tensão interfacial, impactando na diminuição do tamanho de partícula e estabilização do sistema (SCHRAMM, 2014). De modo que, a automontagem em solução depende da formação de micelas, nas quais a fração hidrofóbica do tensoativo interage com o princípio ativo hidrofóbico e a fração hidrofílica volta-se para o meio aquoso, como resultado da busca por ambientes energeticamente favoráveis (SCHRAMM, 2014). Portanto, fica evidente que a escolha do tensoativo, independente do nanossistema almejado, é essencial para o alcance da automontagem e eficiência do sistema.

A caracterização dos sistemas nanoencapsulados é fundamental para a compreensão das propriedades físico-químicas alcançadas, avaliação da estabilidade e estudo da dinâmica de aplicação. Diversas técnicas são aplicadas na caracterização de nanomateriais, considerando o tipo de nanopartícula e composição. Dentre as técnicas mais abrangentes, a determinação do tamanho de partícula, morfologia de superfície, potencial zeta e índice de polidispersão destacam-se (PRASAD, PRASAD, *et al.*, 2024). A distribuição de tamanho de partículas pode ser avaliada pelas técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e microscopias eletrônicas de varredura (MEV) ou transmissão (MET). A medida de DLS baseia-se no movimento browniano de nanopartículas em solução, que a partir da relação de Stokes-Einsten, possibilita a identificação gráfica da distribuição de tamanho e populações existentes (NOBBMANN, CONNAH, *et al.*, 2007). Na MEV, a imagem é gerada a partir de uma série de sinais oriundos da aplicação de um feixe de elétrons sobre a amostra que, após atingi-la, é difratado em diferentes regiões. Enquanto a MET é baseada no comprimento de onda de de Broglie, que direciona a resolução máxima decorrente da penetração de um feixe de elétrons na amostra. Comparativamente, a MEV varre a superfície da amostra, enquanto a MET gera a imagem a partir da penetração de elétrons através da amostra (ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014). O índice de polidispersão (PDI) é uma análise complementar ao DLS, que descreve o grau de não uniformidade da distribuição de tamanho de partículas, ou seja, infere a

heterogeneidade do sistema, de modo que valores menores que 0,05 descrevem sistemas altamente monodispersos (homogêneos), ao passo que valores maiores que 0,7 indicam sistemas heterogêneos, que podem ser associados a baixa eficiência do método de encapsulação empregado (DANAEI, DEGHANKHOLD, *et al.*, 2018). Segundo Mishra *et al.* (2018), o potencial zeta consiste em uma estimativa da carga de superfície que as nanopartículas adquirem na dispersão, de modo que o valor resultante depende da composição e, conseqüentemente, do meio no qual o sistema nanoparticulado está disperso. O potencial zeta é resultado das interações partícula-partícula, como mostrado pela figura 2, e impacta diretamente na estabilidade do sistema, além disso possui correlação direta com o tensoativo e a matriz (MISHRA, KULDEEP, *et al.*, 2018).

Figura 2 - Impacto do potencial zeta nas interações partícula – partícula



Fonte: Adaptado de Mishra *et al.* (2018).

Considerando que os trabalhos que envolvem a encapsulação de princípios ativos voltados para a agricultura limitam-se aos agroquímicos e fertilizantes, esta proposta abrange nanossistemas não relatados anteriormente, considerando a baixa exploração dos óleos vegetais e essenciais como bioestimulantes e biodefensivos. Ambos os sistemas foram gerados por métodos simples, verdes e sustentáveis, formados a partir da automontagem das moléculas em solução. Além disso, os sistemas desenvolvidos possibilitam a incorporação dos óleos em formulações aquosas, que é dificultada devido ao caráter lipofílico dos óleos.

O Capítulo 1 descreve a nanoencapsulação do óleo vegetal de goiaba em nanopartículas lipídicas sólidas, com potencial bioestimulante, destacando a oportunidade de exploração de resíduos agroindustriais. O Capítulo 2 aborda a nanoencapsulação da mistura de óleos de melaleuca e pepino em nanocápsulas poliméricas, com potencial aplicação na proteção de frutas e sementes.

Nesse âmbito, este trabalho visa corroborar com os estudos voltados para a compreensão, produção e aplicação de sistemas nanoestruturados na agricultura por meio do desenvolvimento de sistemas a base de polímeros e materiais de origem natural e biotecnológica, capazes de carrear substâncias ativas com efeito protetor e bioestimulante, pouco explorados pela literatura, com o intuito de contribuir para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas e garantir segurança alimentar. Além disso, este trabalho busca motivar o desenvolvimento de novos trabalhos que explorem aplicações agrícolas, a partir da apresentação de provas de conceito.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consistiu em desenvolver sistemas nanoestruturados a partir de matrizes naturais e biotecnológicas com foco na encapsulação de óleos de origem natural e demonstrar o potencial da aplicação destes sistemas na agricultura, a partir de provas de conceito.

Para alcançar o objetivo geral, foram propostas as seguintes metas:

- Compreender os parâmetros que influenciam na formação de nanopartículas lipídicas sólidas;
- Compreender os parâmetros que influenciam na formação de nanocápsulas poliméricas;
- Desenvolver e caracterizar um sistema estável de nanopartículas lipídicas sólidas capaz de encapsular o óleo vegetal de goiaba;
- Desenvolver e caracterizar um sistema estável de nanocápsulas poliméricas capaz de encapsular mistura de óleo essencial de melaleuca e óleo vegetal de pepino;
- Avaliar o potencial bioestimulante das nanopartículas lipídicas sólidas contendo óleo de goiaba no desenvolvimento de sementes de feijão (prova de conceito);
- Avaliar o potencial protetor das nanocápsulas poliméricas contendo óleo de melaleuca e óleo de pepino na proteção e aumento da conservação de frutas e sementes (prova de conceito).

CAPÍTULO 1 – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO ÓLEO DE SEMENTE DE GOIABA COM POTENCIAL BIOESTIMULANTE

1. Introdução

1.1. Bioestimulantes

Bioestimulantes são definidos como quaisquer substâncias ou microrganismos capazes de aumentar a eficiência nutricional, a tolerância ao estresse abiótico e a qualidade da cultura, independentemente de seu teor de nutrientes (CALVO, NELSON e KLOEPPER, 2014). Jardin (2015) descreveu a elucidação e aplicação de diferentes classes de bioestimulantes, como extratos de algas, substâncias húmicas, polímeros naturais e microrganismos benéficos. Devido a diversidade de insumos que se enquadram nessa classificação, a definição do termo ainda é alvo de discussões pela comunidade científica. O Conselho Europeu da Indústria de Bioestimulantes (EBIC), órgão de grande relevância neste mercado, define que:

Os bioestimulantes vegetais contêm substâncias e/ou microrganismos cuja função é estimular processos naturais que aumentem e/ou beneficiem a absorção de nutrientes, a eficiência de nutrientes, a tolerância ao estresse abiótico e a qualidade da cultura. Considerando que não possuem ação direta contra pragas, também não se enquadram nas regulamentações voltadas para pesticidas (CALVO, NELSON e KLOEPPER, 2014).

Pannacci *et al.* (2022) relataram que a maioria dos estudos sobre bioestimulantes focam no efeito sob o crescimento da planta, enquanto poucos estudos abordam os efeitos na germinação de sementes e no estabelecimento inicial. Este trabalho avaliou o potencial bioestimulante do extrato de artemísia (*Artemisia vulgaris L.*) na germinação e crescimento de diferentes vegetais (cenoura, tomate, cebola, alface, colza e couve-flor), aplicando doses entre 0,2 e 12,5 % m/v. Os resultados mostraram que o extrato de artemísia ocasionou incrementos de 70,0 % na germinação das sementes de cenoura e 11,0 % nas sementes de colza, entretanto não impactou na germinação das sementes de tomate, cebola e alface, além de

ocasionar a inibição da germinação da couve-flor. Também foi observado um aumento do hipocótilo em todas as culturas, com exceção de cebola e cenoura, e a inibição do crescimento das raízes, exceto em colza, cujas raízes apresentaram um crescimento 30,0 % superior ao controle. Desse modo, foi concluído que o extrato de artemísia foi benéfico para culturas e partes específicas da planta (PANNACCI, BARATTA, *et al.*, 2022).

Chrysargyris *et al.* (2020) testaram uma combinação de óleos essenciais de alecrim e eucalipto como bioestimulante na cultura do tomate a partir da avaliação de parâmetros fisiológicos, produtividade, qualidade e atividade enzimática. A aplicação única do produto, na dose de 2,0 %, aumentou 19 vezes a altura do tomateiro, a condutância estomática e o teor de clorofila em relação ao controle, além disso, houve uma redução de 27,3 % do índice de danos foliares em relação ao controle. Por outro lado, 3 aplicações subsequentes (a cada 20 dias) ocasionaram uma maior porcentagem de rachaduras nos frutos, em comparação ao controle (CHRYSARGYRIS, CHARALAMBOUS, *et al.*, 2020).

Taha *et al.* (2019) avaliaram a eficiência da aplicação foliar de 1,0 g/L de extrato de grão de pólen em manjeriço (*Ocimum basilicum L.*), considerando condições de irrigação normal e déficit hídrico. Foi constatado que a aplicação do extrato de grão de pólen nas plantas sob estresse aumentou o crescimento e os teores de óleos essenciais, pigmentos fotossintéticos presentes nas folhas, açúcares, prolina livre e ácido ascórbico. Também foi observado o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e do teor relativo de água. Estes resultados mostraram que o extrato de grão de pólen poderia ser empregado no cultivo de plantas sob condições normais ou de estresse hídrico, em substituição aos reguladores de crescimento sintéticos (TAHA, ALHARBY, *et al.*, 2019).

Donno *et al.* (2013) testaram o efeito bioestimulante de um extrato a base de sementes de colza, maçã e resíduos de casca de arroz na cultura do kiwi e observaram o aumento da massa dos frutos, devido ao considerável teor de giberelinas, citocininas e auxinas, presentes nas sementes de maçã. Os resíduos de arroz e colza contribuíram com seus elevados teores de proteínas, aminoácidos e minerais (DONNO, MELLANO, *et al.*, 2013).

Colla *et al.* (2014) avaliaram a ação bioestimulante de um hidrolisado proteico, derivado de resíduos de ervilha e tomate, na cultura do milho, por meio de testes

laboratoriais e em casa de vegetação mediante a avaliação da atividade hormonal, absorção de nitrogênio e estímulo do crescimento. Foi demonstrado que o extrato promoveu efeitos similares à aplicação exógena de auxina e giberelina, absorção de nitrogênio mais eficiente e melhor desempenho da cultura. A alta absorção de nitrogênio foi justificada pelo incremento do sistema radicular e otimização do processo de assimilação de N, por isso os autores concluíram que o extrato poderia auxiliar na redução do uso de fertilizantes nitrogenados (COLLA, ROUPHAEL, *et al.*, 2014).

Mazrou (2019) testou em folhas de coentro doses de 50,0; 100,0; 200,0; e 300,0 g/L de extrato de folha de moringa. O tratamento com extrato de moringa aumentou o teor de óleo volátil do coentro, promovendo maiores acúmulos dos componentes *Limoneno*, *β -Cymene* e *Linalool*. Além disso, houve um aumento das concentrações de potássio, fósforo, nitrogênio e açúcares totais. As evidências mostraram uma superioridade das amostras tratadas com 200,0 g/L, que foi considerada a dose mais promissora (MAZROU, 2019).

Diante do exposto, fica evidente que as aplicações associadas aos bioestimulantes são abrangentes, no entanto, a aplicação de óleos vegetais ainda é pouco explorada. Além disso, o estresse abiótico, causado por fatores ambientais, como o déficit hídrico, consiste na principal causa de perdas de rendimento, que variam de 50,0 a 80,0 %, dependendo da cultura e da localização geográfica (ZHANG , LI e ZHU, 2018).

1.2. Resíduos agroindustriais com potencial bioestimulante

O crescimento acelerado da população também impactou no aumento da produção global de resíduos sólidos, oriundos de processos industriais, agrícolas e da construção civil. Peng *et. al* (2023) estimaram que no ano de 2030 serão produzidos cerca de 2,59 milhões de toneladas de resíduos sólidos, fato que vem motivando o desenvolvimento de novas tecnologias que permitam o reaproveitamento destes materiais.

Majee *et al.* (2023) avaliaram uma combinação de resíduos sólidos (colágeno de couro *wet blue*, farinha de ossos e cinzas de cascas de arroz) como fontes de NPK no crescimento da cultura do pimentão, classificando a mistura como fertilizante bio-orgânico. Bhumbar e Dandge (2023) testaram um hidrolisado de resíduos do processamento de pescados como promotores de crescimento de *Vigna unguiculata*

(ervilha de vaca) e *Capsicum annum* (pimenta) e observaram incrementos no comprimento das raízes, parte aérea, número de folhas e frutos, bem como o aumento do teor de clorofila, em relação ao controle. Os resultados promissores indicaram que a produção de biofertilizantes a partir de resíduos da pesca pode ser uma abordagem eficiente, inovadora e ecológica, com potencial para substituir e/ou minimizar o uso de fertilizantes químicos (BHUIMBAR e DANDGE, 2023).

Gupta *et al.* (2023) abordaram o potencial de hidrolisados, produzidos a partir da biomassa de penas de aves, como fonte de N, em substituição às fontes inorgânicas, destacando que esta classe de resíduos, obtidos a partir do processamento enzimático ou microbiano das penas, é fonte de peptídeos, aminoácidos e proteínas solúveis que estimulam o crescimento microbiano na rizosfera, otimizando a absorção e o uso de nutrientes do solo.

Lim e Matu (2015) desenvolveram um método de fermentação em estado sólido, simples e de baixo custo para a produção de biofertilizantes a partir de resíduos agrícolas de mamão, abacaxi, melancia, banana e laranja, e obtiveram um aumento no rendimento na produção de hortaliças.

Prasad e Azeemoddin (1994) afirmaram que aplicação de óleos vegetais pode ser promissora, considerando os altos volumes de resíduos descartados por indústrias alimentícias, e o alto teor de compostos bioativos associados. Galanakis (2019) relatou que a indústria de sucos descarta cerca de 20,0 a 60,0 % da massa de frutas que entra no processo como resíduo, sendo que até 2016, a produção mundial de goiaba aproximava-se de 46,5 milhões de toneladas, fato que intensifica a necessidade da busca por novas aplicações para estes resíduos. Estes bioprodutos, incluindo sementes, são fontes de antioxidantes, polifenóis, carotenóides, proteínas e outros compostos bioativos, com potencial aplicação como bioestimulantes (RAMADAN, 2019) (KAPOOR, GANDHI , *et al.*, 2020).

O óleo da semente de goiaba, extraído das sementes dos frutos de *Psidium guajava* L., árvore nativa da América do Sul, é rico em ácido linoleico e antioxidantes, como o licopeno, um carotenoide vermelho que possui alta capacidade antioxidante, com potencial atuação no combate a estresses abióticos (PROMMABAN, UTAMA-ANG, *et al.*, 2019) (PRASAD e AZEEMODDIN, 1994). Embora a composição química do óleo de semente de goiaba tenha sido elucidada por Gualberto *et al.* (2021), Kapoor *et al.* (2020), Prommaban *et al.* (2019), Prommaban *et al.* (2020), Prasad e

Azeemoddin (1994) e Arain *et al.* (2017), não foram encontrados trabalhos que envolvam a aplicação deste óleo vegetal como bioestimulante. Arain *et al.* (2017), a partir de análises de espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), elucidaram a presença de ácidos graxos saturados e insaturados, como ácidos esteárico, mirístico e palmítico. Prommaban *et al.* (2020), por meio de um estudo fitoquímico, verificou a presença de compostos fenólicos, como ácido clorogênico, e fitoesteróis, além de demonstrar a capacidade de eliminação de radicais livres em culturas celulares hepáticas, dependente do aumento da concentração do óleo de semente de goiaba. No entanto, a incorporação deste óleo em formulações aquosas é dificultada devido ao seu caráter lipofílico (KAPOOR, GANDHI, *et al.*, 2020). Assim, acredita-se a encapsulação em sistemas lipídicos possa favorecer a absorção do óleo de goiaba, considerando a estrutura lipofílica das folhas e sementes vegetais, além de fornecer um meio de encapsulação promissor considerando a interação entre o óleo de goiaba (lipofílico) e a matriz lipídica do sistema, capaz de viabilizar a inserção do óleo vegetal em formulações aquosas.

De acordo com Jiménez-Arias *et al.* (2022), os trabalhos que envolvem a encapsulação de princípios ativos voltados para a agricultura, aplicam-se aos agroquímicos e fertilizantes, sendo que a encapsulação de bioestimulantes é pouco explorada. O estudo da encapsulação de bioestimulantes é promissor devido à facilidade de degradação destes materiais no campo, que demanda aplicações frequentes e, conseqüentemente, encarece o produto (JIMÉNEZ-ARIAS, HERNÁNDEZ, *et al.*, 2022). Nesse âmbito, a principal vantagem associada a este tipo de encapsulamento está associada a proteção contra a degradação, liberação lenta do princípio ativo e à possibilidade de inserção do material em produtos aquosos (SAMOATHKUMAR, TAN e LOO, 2022).

1.3. Nanopartículas lipídicas sólidas

A introdução de carreadores nanoestruturados no mercado de fármacos foi estabelecida por volta dos anos 50, com os estudos aplicados ao desenvolvimento de nanoemulsões do tipo óleo em água. A partir de então, outros sistemas, como lipossomas, micro e nanopartículas poliméricas foram descritos (WEBER, ZIMMER e PARDEIKE, 2014). No entanto, até os anos 2000, apesar do grande número de

pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de nanotecnologias, inseguranças associadas às dificuldades no escalonamento, citotoxicidade dos polímeros empregados como matrizes e assuntos regulatórios, dificultaram a inserção de produtos no mercado (MEHNER e MADER, 2001).

No início dos anos 90, o aparecimento de novos sistemas, denominados nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), despertaram o interesse da comunidade científica, pois foram descritas como carreadores alternativos aos sistemas coloidais tradicionais, como emulsões, lipossomas, micro e nanopartículas poliméricas (HOU, XIE, *et al.*, 2003). A proposta das NLS é baseada na combinação de vantagens associadas aos sistemas tradicionais e minimização das desvantagens (MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000).

A classe das NLS engloba sistemas coloidais, cujo tamanho varia 10 a 1000 nm, compostos por lipídios sólidos à temperatura ambiente e estabilizados por tensoativos dispersos em solução aquosa. Este conjunto de características torna a aplicação de NLS promissora na proteção e entrega de materiais bioativos lipofílicos, como óleos vegetais e essenciais (SHIRVANI, GOLI, *et al.*, 2022).

Considerando a encapsulação de óleos vegetais (lipídio líquido), o sistema resultante também pode ser denominado carreador lipídico nanoestruturado (NLC), a depender da proporção de lipídios sólidos e líquidos empregados. Os NLC fazem parte da segunda geração de NLS e consistem em uma mistura binária de lipídios distintos (lipídio sólido + lipídio líquido), devido a esta composição ocorre a formação de uma estrutura cristalina menos ordenada, capaz de superar as limitações associadas às NLS. Este tipo de sistema fornece uma maior capacidade de carga, alta estabilidade físico-química e modulação da liberação do princípio ativo encapsulado (WEBER, ZIMMER e PARDEIKE, 2014).

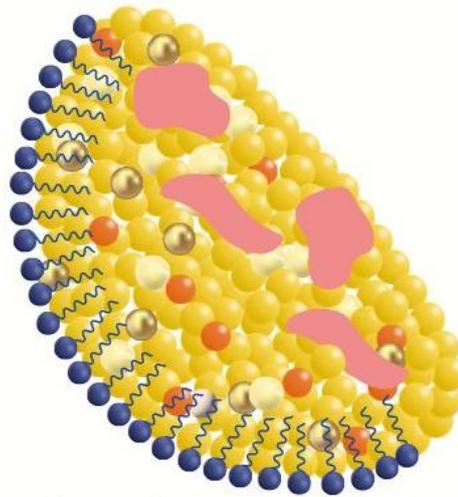
Existem métodos bem estabelecidos para a produção de carreadores lipídicos, que apresentam baixo custo, não utilizam solventes orgânicos e possibilitam o balanceamento de diferentes parâmetros que influenciam na composição e propriedades do sistema, permitindo que as formulações sejam customizadas (HANGARGEKAR, MOHANTY, e JAIN, 2021). Soleimanian *et al.* (2018) relataram que ácidos graxos, esteróis, ceras, triglicerídeos ou glicosídeos parciais são frequentemente utilizados como matriz lipídica, estabilizadas por tensoativos de caráter hidrofílico, como poloxâmeros, polissorbatos e lecitinas.

Segundo Shah *et al.* (2015) e Hou *et al.* (2013) o método de preparo das NLS é fundamental para o alcance de propriedades de interesse, como distribuição de tamanho de partícula e estabilidade, em função disso é fundamental compreender e avaliar os parâmetros que impactam na eficiência e estabilidade do sistema, como o tipo de tensoativo, interação entre o tensoativo e o óleo, velocidade de agitação e temperatura de resfriamento.

Lim e Kim (2002) verificaram que o tamanho médio do sistema de NLS, encapsulando o ácido trans-retinóico, poderia ser reduzido a partir do aumento da concentração da mistura de tensoativos tween-80 e lecitina. Karn-orachai *et al.* (2016) estudaram o efeito de tensoativos catiônicos, aniônicos e não-iônicos na formação de NLS compostas por compritol, encapsulando a droga modelo γ -orizanol. Foi verificado que o tensoativo influencia no tamanho de partícula e que a mistura de tensoativos resultou sistemas mais estáveis, comparados ao uso de tensoativos isolados, devido aos efeitos sinérgicos associados às cargas, efeitos de emparelhamento dos tensoativos catiônico e aniônico e ao volume do tensoativo não-iônico (KARN-ORACHAI, SMITH, *et al.*, 2015).

Mueller *et al.* (2000) descreveram que o método de resfriamento, que ocasiona a cristalização das NLS, influencia no alcance de um sistema estável, que depende da morfologia e da composição lipídica, de modo que podem ser originados diferentes formas polimórficas e conformações moleculares. Mueller *et al.* (2000) também relataram que a utilização lipídios puros acarreta a formação de estruturas cristalinas (altamente organizadas), dificultando a formação de defeitos na estrutura e impactando negativamente na encapsulação dos princípios ativos. Por outro lado, misturas de lipídios permitem a formação de reservatórios (defeitos), que possibilitam o armazenamento de princípios ativos lipofílicos, como mostrado pela figura 3. Por este motivo optou-se por utilizar a cera de abelha, classificada como mistura complexa, composta por mais de 300 substâncias, dentre elas hidrocarbonetos, ácidos graxos livres, ésteres de ácidos graxos, álcoois graxos, diésteres e substâncias exógenas (TULLOCH, 1970) (MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000) (HELGASON, AWAD, *et al.*, 2009).

Figura 3 - Estrutura genérica para nanopartículas lipídicas sólidas



Legenda:

-  **Lipídio/mistura de lipídios sólidos**
-  **Tensoativo**
-  **Princípio ativo encapsulado**

Fonte: Adaptado de Hangargekar *et al.* (2021) e Weber *et al.* (2014).

Jiménez-Arias *et al.* (2022) sugeriram que novos materiais precisam ser explorados na encapsulação de insumos agrícolas, além dos polímeros comuns (quitosana, alginato, carragena e goma xantana), com o intuito de melhorar as propriedades e a durabilidade dos princípios ativos em condições de campo.

A cera de abelha representa uma matriz lipídica interessante, pois é composta por uma mistura de ésteres de alta massa molar, pouco explorada no desenvolvimento de sistemas nanoparticulados, que pode ser utilizada como encontrada na natureza, sem purificação ou modificação química (MORGAN, TOWNLEY, *et al.*, 2013). Esta cera apresenta temperatura de fusão média (65°C) inferior a de ceras vegetais, como ceras de carnaúba (82°C), candelila (73°C) e arroz (85°C), fato que pode ser visto como uma propriedade nobre para aplicação em NLS, considerando a encapsulação de insumos sensíveis à temperatura, como óleos essenciais e vegetais (BAWEJA, KUMAR e KUMAR, 2020).

Soleimanian *et al.* (2018) desenvolveram um sistema de NLC a base de cera de abelha e própolis, visando a encapsulação do óleo de romã, a partir da proposição de um design experimental que envolveu o estudo da influência da composição lipídica,

concentração da mistura de tensoativos e variação do teor de óleo de romã. Foi verificado, por meio de uma avaliação estatística, que as variáveis avaliadas desempenham efeitos significativos nas propriedades físicas das NLS (SOLEIMANIAN , GOLI , *et al.*, 2018).

Muller *et al.* (2000) discutiram sobre a importância da caracterização físico-química e monitoramento das propriedades ao longo do tempo, e consequente impacto no controle de qualidade e determinação do prazo de validade do produto. Kathe *et al.* (2014) ressaltaram que a complexidade dos sistemas NLS torna sua caracterização desafiadora, por isso os métodos empregados devem envolver parâmetros associados ao desempenho do sistema de NLS.

As principais técnicas que envolvem a caracterização de NLS são baseadas na determinação da distribuição de tamanho de partículas, potencial zeta, morfologia de superfície, polimorfismo e cristalinidade dos lipídios, eficiência de encapsulação e liberação ao longo do tempo (KATHE, HENRIKSEN e CHAUHAN, 2014). Este conjunto de técnicas direcionam o desenvolvimento de metodologias específicas, dependentes da composição do sistema, que viabilizam a determinação das propriedades de interesse e controle de qualidade sendo, portanto, indispensáveis para um desenvolvimento eficiente.

1.4. Compostos antioxidantes no tratamento de sementes

A germinação consiste na primeira fase do desenvolvimento da plântula, sendo crucial para o estabelecimento inicial e posterior produtividade, em vista disso, a qualidade da semente é de extrema importância para a agricultura (MACEDO, SILVA, *et al.*, 2017). Nesta fase, fatores bióticos e abióticos podem impactar na preservação das sementes até o momento do plantio, afetar o processo de germinação e impactar no desenvolvimento e produtividade da cultura (JISHA, VIJAYAKUMARI e PUTHUR, 2013).

Gupta *et al.* (2022) demonstrou que os bioestimulantes atuam na liberação da dormência e melhora da germinação de sementes de diversas espécies de plantas, a partir da alteração de processos fisiológicos e atenuação de estresses abióticos. Por isso, o tratamento de sementes com bioestimulantes consiste em uma prática simples e sustentável, com potencial para elevar a produtividade das culturas (GUPTA, DOLEŽAL, *et al.*, 2022). Além disso, a busca por produtos para tratamento de

sementes, de baixo custo, que possam aumentar o desempenho, a capacidade de germinação e o vigor das plântulas é constante (PEREIRA, OLIVEIRA, *et al.*, 2021).

Bailly *et al.* (2008) descreveram que, para garantir uma germinação efetiva, a semente carece de mecanismos antioxidantes, enzimáticos ou não, para minimizar a superprodução de espécies reativas de oxigênio produzidas pelo processo fisiológico.

De acordo com Govindaraj *et al.* (2017) compostos antioxidantes são capazes de retardar, prevenir ou remover o dano oxidativo a uma molécula alvo. Segundo Pisoschi e Pop (2015), antioxidantes biológicos são moléculas capazes de prevenir ou retardar a oxidação de um substrato, em concentrações inferiores ao substrato oxidável. Pourreza (2013) relatou que compostos antioxidantes são capazes de proteger membranas celulares contra danos oxidativos, mesmo em baixas concentrações.

Nesse âmbito, Adetunji *et al.* (2021) investigaram os efeitos da aplicação exógena dos antioxidantes ácido ascórbico, ácido gálico, trolox, glicerol e glutathione reduzida, em concentrações de 0,2 a 0,6 mM, em sementes de *Brassica oleracea* (repolho) e *Lactuca sativa* (alface) sob deterioração induzida e verificaram que todos os antioxidantes promoveram a mitigação dos efeitos físicos e bioquímicos decorrentes do envelhecimento das sementes, por meio da redução da peroxidação lipídica e da oxidação de proteínas. Silva *et al.* (2021) avaliaram o potencial antioxidante do tirosol, um composto fenólico extraído do óleo de oliva ou de fungos endofíticos, no tratamento de sementes de soja e, apesar da ausência de incrementos de germinação, a análise metabolômica das folhas de soja mostrou diferenças na abundância de metabólitos, como o ácido aspártico, um precursor de aminoácidos essenciais. Desse modo, assume-se que a aplicação exógena de compostos bioestimulantes, com efeito antioxidante, possa beneficiar a germinação e o estabelecimento inicial da plântula.

Gupta *et al.* (2022), por meio de um trabalho de revisão, reuniu estudos que demonstram o potencial de bioestimulantes não microbianos no tratamento de sementes, dentre eles extratos de algas, substâncias húmicas, vermicompostos, polissacarídeos naturais e micronutrientes, discorrendo sobre a contribuição destes materiais para os processos metabólicos e fisiológicos para a germinação e estabelecimento inicial da plântula.

Pereira *et al.* (2021), por meio de uma revisão bibliográfica, descreveu a aplicação de diferentes sistemas nanométricos, como nanopartículas poliméricas e metálicas,

no tratamento de sementes. Estes sistemas foram capazes de estimular o crescimento da plântula e melhorar características metabólicas e fisiológicas (PEREIRA, OLIVEIRA, *et al.*, 2021).

Assim, buscando contribuir para a exploração do uso de sistemas nanoencapsulados na agricultura, o escopo deste trabalho consiste no desenvolvimento e caracterização de um sistema de nanopartículas lipídicas sólidas capaz de encapsular o óleo vegetal de goiaba, seguido da avaliação do potencial bioestimulante das NLS no tratamento de sementes de feijão.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

2.1.1. Reagentes

Cera de abelha (adquirida no comércio local); tween – 80 P.S (Dinâmica, CAS: 9005 – 65 – 6); dodecil sulfato de sódio (NEON, CAS: 151-21-3); óleo de semente de goiaba (Agtech LTDA); 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma-Aldrich, CAS: 1898- 66- 4); etanol absoluto (Dinâmica, CAS: 64-17-5); metanol (Dinâmica, CAS: 67-56-1); acetona (Dinâmica, CAS: 67-64-1); reativo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich); carbonato de sódio (NEON, CAS: 497-19-8); tetraciclina (Sigma Aldrich – CAS: 60-54- 8); meio de cultura ágar-nutriente (KASVI).

2.1.2. Equipamentos

Agitador magnético Ethinik; espectrofotômetro UV-vis UV-M51; DLS Zetasizer da Malvern Panalytical; microscópio eletrônico de varredura INSPECT S50; incubadora BOD Solab SL-120, autoclave Primatec CS 300 e analisador de solo digital 4 em 1 Chusui.

2.1.3. Outros

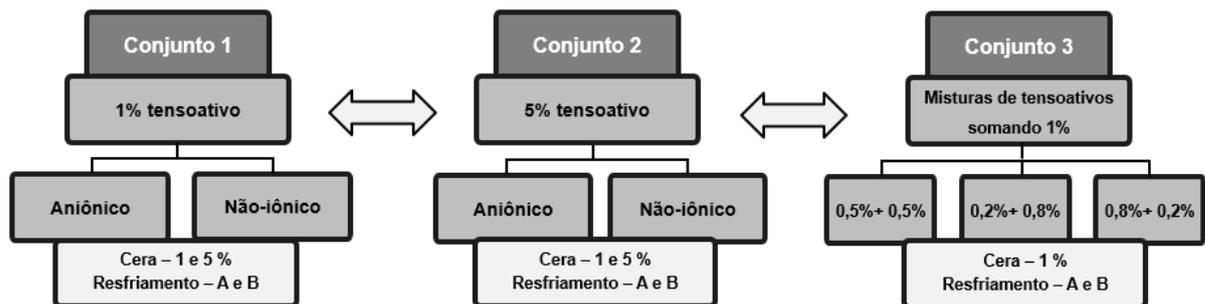
Bandeja sementeira Verdi Max (64 células); terra adubada Terral; miniestufa em PVC UISI.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparo das NLS

As NLS foram preparadas empregando-se a técnica de fusão – emulsificação, demonstrada por Shah *et al.* (2014) e Shirvani *et al.* (2022), com modificações. Foram preparados 3 conjuntos experimentais, envolvendo o uso de tensoativos aniônico, não-iônico e misturas, com o objetivo de compreender os fatores que influenciam na formação e na estabilidade de NLS (SHAH, ELDRIDGE, *et al.*, 2014) (SHIRVANI, GOLLI, *et al.*, 2022). Foram empregados os tensoativos Tween-80 (não-iônico) e dodecil sulfato de sódio (aniônico), isoladamente e em combinação, seguindo diferentes proporções, como demonstrado pela figura 4, que resume a composição dos conjuntos experimentais 1, 2 e 3.

Figura 4 - Composição dos conjuntos experimentais 1, 2 e 3



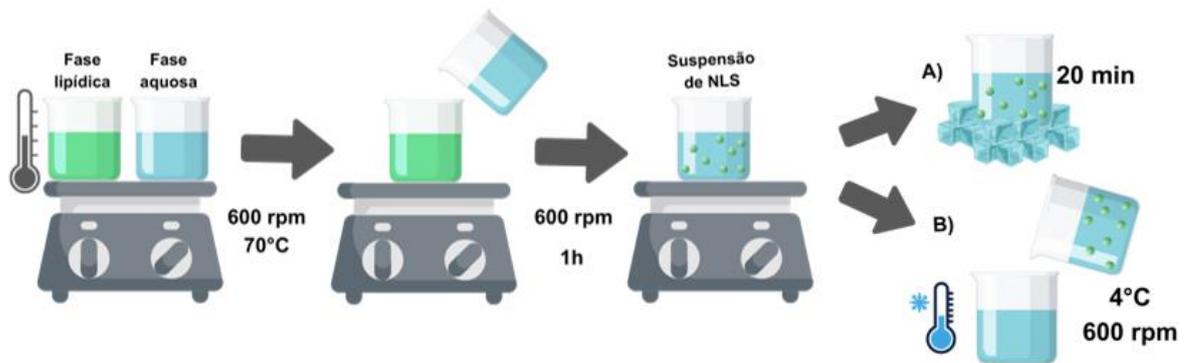
Fonte: Autora.

Inicialmente, a fase lipídica (cera de abelha) foi fundida, em banho maria, à 70°C. Ao mesmo tempo, a fase aquosa (água + tensoativo) foi aquecida, sob agitação (600 rpm), até 70°C e, em seguida vertida sob a fase lipídica. O sistema foi mantido sob agitação magnética (600 rpm), à 70°C, durante 60 minutos.

Após o período de agitação, a amostra foi resfriada empregando-se dois métodos, banho de gelo (IB) e dispersão em água gelada (ICW), para solidificação da fração lipídica. No método IB, o béquer contendo a amostra foi imerso em um recipiente de vidro, contendo gelo triturado (temperatura abaixo de 0°C), e mantido em repouso durante 20 minutos. No método ICW, a amostra foi vertida em um béquer contendo 50,0 mL de água deionizada na temperatura de 4°C. O sistema foi mantido sob agitação (600 rpm) durante 20 minutos. A figura 5, exemplifica o preparo. As

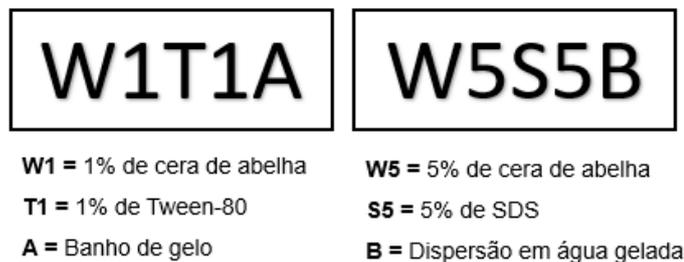
formulações resultantes foram nomeadas relacionando a concentração de cera, o tipo e concentração de tensoativo e o tipo de resfriamento, como exemplificado na figura 6. Após a identificação, as amostras foram armazenadas à temperatura ambiente.

Figura 5 - Método de preparo das nanopartículas lipídicas sólidas



Fonte: Autora.

Figura 6 - Exemplo de nomenclatura



Fonte: Autora.

A tabela 1 mostra as composições das amostras e respectivos métodos de resfriamento empregados. As amostras foram fotografadas no dia do preparo e após 30 dias, visando o monitoramento da estabilidade visual dos sistemas, mediante a observação de separação de fases. O melhor sistema, considerando propriedades de interesse, foi escolhido para encapsular o óleo de goiaba.

Tabela 1- Proposição de conjuntos experimentais visando a compreensão de fatores na formação de nanopartículas lipídicas sólidas

(continua)

	Amostra	Fase lipídica	Fase aquosa	Método de resfriamento	Estabilidade no dia zero	Estabilidade após 30 dias
Conjunto 1	<i>W1S1A</i>	1,0 % cera	1,0 % SDS	IB	+	-
	<i>W1S1B</i>	1,0 % cera	1,0 % SDS	ICW	+	-
	<i>W5S1A</i>	5,0 % cera	1,0 % SDS	IB	+	-
	<i>W5S1B</i>	5,0 % cera	1,0 % SDS	ICW	+	-
	<i>W1T1A</i>	1,0 % cera	1,0 % T- 80	IB	+	+
	<i>W1T1B</i>	1,0 % cera	1,0 % T- 80	ICW	+	+
	<i>W5T1A</i>	5,0 % cera	1,0 % T- 80	IB	-	-
	<i>W5T1B</i>	5,0 % cera	1,0 % T- 80	ICW	-	-
Conjunto 2	<i>W1S5A</i>	1,0 % cera	5,0 % SDS	IB	+	-
	<i>W1S5B</i>	1,0 % cera	5,0 % SDS	ICW	+	-
	<i>W5S5A</i>	5,0 % cera	5,0 % SDS	IB	+	-
	<i>W5S5B</i>	5,0 % cera	5,0 % SDS	ICW	+	-
	<i>W1T5A</i>	1,0 % cera	5,0 % T- 80	IB	+	+

Tabela 1- Proposição de conjuntos experimentais visando a compreensão de fatores na formação de nanopartículas lipídicas sólidas

(conclusão)

	Amostra	Fase lipídica	Fase aquosa	Método de resfriamento	Estabilidade no dia zero	Estabilidade após 30 dias
Conjunto 2	<i>W1T5B</i>	1,0 % cera	5,0 % T-80	ICW	+	+
	<i>W5T5A</i>	5,0 % cera	5,0 % T-80	IB	+	+
	<i>W5T5B</i>	5,0 % cera	5,0 % T-80	ICW	+	+
Conjunto 3	<i>W1S0.5T0.5A</i>	1,0 % cera	0,5 % SDS + 0,5 % T-80	IB	+	-
	<i>W1S0.5T0.5B</i>	1,0 % cera	0,5 % SDS + 0,5 % T-80	ICW	+	-
	<i>W1S0.2T0.8A</i>	1,0 % cera	0,2 % SDS + 0,8 % T-80	IB	+	-
	<i>W1S0.2T0.8B</i>	1,0 % cera	0,2 % SDS + 0,8 % T-80	ICW	+	-
	<i>W1S0.8T0.2A</i>	1,0 % cera	0,8 % SDS + 0,2 % T-80	IB	+	-
	<i>W1S0.8T0.2B</i>	1,0 % cera	0,8 % SDS + 0,2 % T-80	ICW	+	-

Fonte: Autora.

2.2.2. Caracterização do óleo de goiaba

O óleo de goiaba foi caracterizado por métodos diretos e indiretos, mediante a disponibilidade de equipamentos e reagentes.

O potencial antioxidante foi determinado pela capacidade de redução do radical DPPH, descrito por Chiari *et al.* (2014). Para tal, foram preparadas soluções de óleo de goiaba, dissolvido acetona, em concentrações que variaram de 0,0 a 30,0 mg/mL. Em paralelo, preparou-se uma solução etanólica de DPPH 0,004 %. Adicionou-se 2,5 mL da solução de óleo de goiaba e 1,0 mL da solução de DPPH em frascos âmbar, seguindo a curva de calibração mencionada. Os frascos foram armazenados durante 30 minutos, à temperatura ambiente e na ausência de luz. Após este período a absorbância foi medida em 517 nm, empregando-se etanol absoluto como branco e a mistura de 2,5 mL de etanol com 1,0 mL da solução DPPH como controle negativo (CHIARI, TROVATTI, *et al.*, 2014).

Os resultados dessas medições foram aplicados na construção do gráfico de porcentagem (%) de inibição de radicais livres *versus* concentração de óleo, calculado pela equação 1.

$$\%_{\text{inibição de DPPH}} = \frac{Abs_{\text{controle negativo}} - Abs_{\text{amostra}}}{Abs_{\text{controle negativo}}} \quad (1)$$

A análise de regressão linear dos gráficos permitiu o cálculo da concentração de óleo necessária para inibir 50,0 % dos radicais livres em solução (IC₅₀).

O teor de compostos fenólicos foi determinado empregando-se o método de Folin – Ciocalteau para identificação de substâncias redutoras, demonstrado por Pires *et al.* (2017). Neste ensaio, foi preparada uma solução de óleo de goiaba em acetona, na concentração 0,3 mg/mL. Em seguida, adicionou-se em um frasco âmbar, 50 µL da solução de OG em acetona, 1000 µL do reagente de Folin – Ciocalteau e 800 µL da solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃ (aq) 7,5 %). O sistema foi mantido em repouso durante 30 minutos, à temperatura ambiente, na ausência de luz. Após este tempo, a absorbância da amostra medida em 765 nm, utilizando-se o espectrofotômetro. Utilizando-se o mesmo método, foi construída uma curva de calibração para o padrão ácido gálico, variando as concentrações entre 0,0 e 50,0 mg/mL. O teor de compostos fenólicos foi expresso em equivalentes de padrão por massa de óleo de goiaba (mg/g). Para tal, a curva padrão de ácido gálico em mg/mL *versus* absorbância foi convertida

para mg de ácido gálico *versus* absorvância (PIRES, TORRES, *et al.*, 2017). Em seguida, o valor de y , proveniente da equação da reta, foi substituído pelo valor da absorvância do óleo de goiaba e o valor de x foi calculado. Por fim, calculou-se a massa de óleo de goiaba no meio reacional inicial, que foi dividida pelo equivalente de ácido gálico, resultando no valor de mg equivalentes de ácido gálico/mg de óleo de goiaba.

O potencial antimicrobiano do óleo de goiaba foi avaliado pelo método de difusão em disco (antibiograma), descrito por Bosnić *et al.* (2006) utilizando-se as bactérias gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 43895) e gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), em duplicata. Neste procedimento, as placas de petri foram preenchidas com o meio de cultura Ágar-Nutriente e, após a completa secagem do meio de cultura, inoculou-se a bactéria. Em seguida, os discos de papel filtro foram umedecidos com 20 μ L de amostra e inseridos na superfície do ágar. Além do óleo vegetal de goiaba, foi avaliado o antibiótico tetraciclina, na concentração de 0,285 mg/mL, como controle positivo. Logo depois, as placas de petri foram incubadas por 24h a 37°C. Após este período observou-se a existência (ou inexistência) de halos de inibição, que mostram a capacidade do princípio ativo em inibir o crescimento microbiano (BOSNIĆ, SOFTIĆ e GRUJIĆ-VASIĆ, 2006).

2.2.2. Encapsulação do óleo de goiaba

Considerando que o sistema W1T1B foi escolhido para prosseguir, a encapsulação do óleo de goiaba seguiu o mesmo método 2.2.1, empregando-se a mistura de cera de abelha + óleo de goiaba, na proporção 1:1, como fase lipídica. Após o preparo, a amostra foi armazenada à temperatura ambiente até o momento das análises posteriores.

2.2.3. Caracterização físico-química das NLS

A distribuição de tamanho de partícula foi determinada, à 25°C, pelo método de dispersão de luz dinâmica (DLS), usando o equipamento Zetasizer da Malvern Panalytical, cedido pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara. Antes das medições, as amostras foram diluídas 10 vezes em água deionizada. O tratamento de dados foi realizado utilizando-se o programa Origin.

O potencial zeta foi determinado pela medição da mobilidade eletroforética usando o equipamento Zetasizer da Malvern Panalytical, cedido pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), utilizando o equipamento MEV INSPECT S50. Para tal, as amostras foram gotejadas na superfície de fitas condutoras de carbono, secas em temperatura ambiente e recobertas com platina.

A quantificação do óleo de goiaba tornou-se possível a partir da identificação da região de absorção mais intensa do óleo, por meio da geração de um espectro de absorção na região do UV-vis, do óleo de goiaba dissolvido em acetona, em concentrações arbitrárias. Posteriormente, foi construída uma curva de calibração em função do aumento da concentração de óleo de goiaba dissolvido em acetona, de 0,0 – 200,0 mg/mL, medindo-se a absorbância na região de 330 nm, determinada acima.

A eficiência de encapsulação (EE %) foi determinada aplicando-se o método sugerido por Daneshmand *et al.* (2017) e Kathe *et al.* (2014), com modificações. A amostra de nanopartículas foi submetida a 4 ciclos de centrifugação, durante 20 minutos, à 13.000 rpm. Este processo foi capaz de desestruturar o sistema e possibilitar a coleta do sobrenadante, que foi seco na estufa à 55°C, durante 6 horas. Após a secagem, adicionou-se 2,0 mL de acetona, para solubilizar o óleo de goiaba seco, e a absorbância foi medida à 330 nm. A partir daí, a massa de óleo livre foi calculada substituindo-se o valor da absorbância na equação da reta e, em seguida, a EE % (considerando a diferença entre o óleo livre e a massa total de óleo adicionada ao sistema) foi calculada empregando-se a equação:

$$EE \% = \frac{\text{Quantidade de óleo encapsulado}}{\text{Quantidade total de óleo}} \times 100 \quad (2)$$

2.2.5. Testes *in vivo*

2.2.5.1. Emergência de plântulas

A emergência das plântulas de feijão foi avaliada a partir de 8 repetições de sementes, tratadas com as doses 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; e 30,0 mL/Kg de sementes, seguindo a metodologia proposta por Franzin *et al.* (2004). Inicialmente, 100,0 g de sementes de feijão foram alocadas em um saco plástico transparente (30

cm x 40 cm), em seguida, as doses correspondentes dos tratamentos foram adicionadas, com o auxílio de uma pipeta, como exemplificado pela tabela 2. Em seguida, o saco plástico foi agitado manualmente e armazenado até o momento do plantio.

Tabela 2 - Tratamento das sementes de feijão

Tratamento	Descrição	Dose (mL/kg de semente)	Massa de sementes tratadas (g)	Volume de tratamento adicionado (mL)
F ₀	Controle	0,00	100,0	0,0
F ₁	W1T1A	30,0	100,0	3,0
F ₂	GSO	5,00	100,0	0,5
F ₃	GSO	10,0	100,0	1,0
F ₄	GSO	15,0	100,0	1,5
F ₅	GSO	20,0	100,0	2,0
F ₆	GSO	25,0	100,0	2,5
F ₇	GSO	30,0	100,0	3,0

Fonte: Autora.

Em seguida, 1,0 Kg de terra vegetal adubada com esterco e carvão, da marca Terral, foi distribuída igualmente em uma bandeja sementeira. Em seguida, as sementes tratadas foram acomodadas sob a terra e cobertas com uma camada fina de terra adicional. A bandeja sementeira foi alocada dentro de uma estufa/viveiro de mudas de (100 cm x 70 cm), coberta com filme transparente de PVC, que permitiu a passagem de luz natural. O pH e a temperatura do solo foram medidos a cada 2 dias, com o auxílio do analisador de solo digital 4 em 1, da marca Chusui, a partir da inserção da ponteira do equipamento no solo. As plântulas foram regadas com 3,0 mL de água, 1 vez ao dia.

A porcentagem de emergência (% EG) das plântulas foi calculada após 24, 48 e 72 horas aplicando-se a equação:

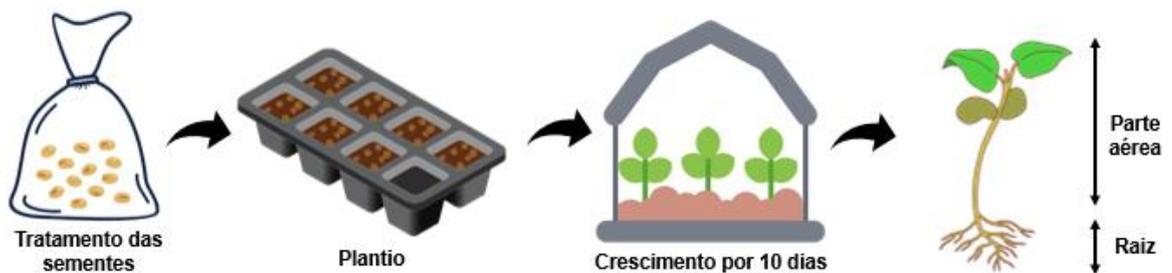
$$\% \text{ de emergência} = \frac{n^{\circ} \text{ de plântulas emersas}}{\text{total sementes plantadas}} \times 100 \quad (3)$$

2.2.5.2. Avaliação do potencial bioestimulante *in vivo* do óleo de semente de goiaba encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas

O potencial bioestimulante do sistema nanoparticulado foi avaliado, a partir de 2 experimentos (nomeados “Experimento 1” e “Experimento 2”), por meio do

acompanhamento do desenvolvimento das plântulas de feijão, plantadas conforme descrito no item 2.2.5.1, ao longo de 10 dias, como mostrado na figura 7. Durante este período, a bandeja sementeira foi fotografada diariamente e mediu-se o pH e a temperatura do solo a cada 2 dias. Após 10 dias, as plantas foram colhidas e higienizadas, removendo-se cuidadosamente a terra presente nas raízes. Em seguida, mensurou-se as massas das raízes e parte aérea, utilizando-se uma balança semi-analítica. Os resultados foram submetidos a avaliações estatísticas, incluindo os testes de ANOVA e Tukey, considerando intervalos de confiança de 95,0 %.

Figura 7 - Montagem do teste *in vivo* para avaliação do efeito bioestimulante em sementes de feijão



Fonte: Autora.

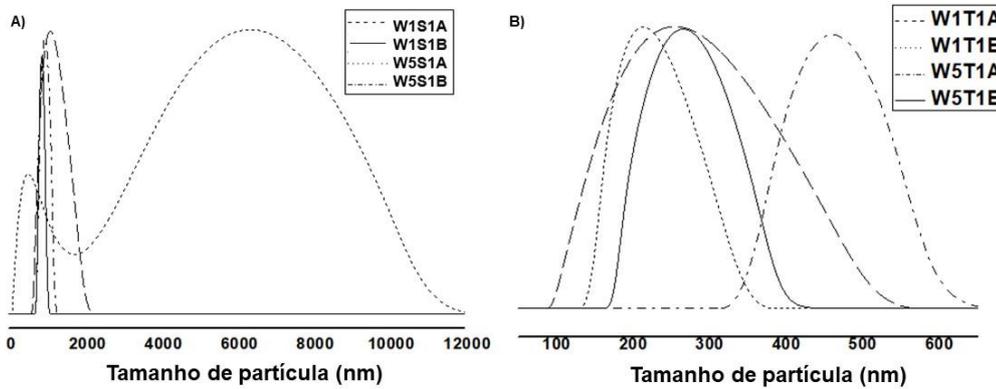
3. Resultados e discussão

3.1. Parâmetros que influenciam na formação das NLS

O estudo das propriedades dos sistemas envolveu a variação do tipo de tensoativo (aniônico, não iônico e misturas), concentração dos tensoativos, concentração de cera de abelha e método de resfriamento (banho de gelo e dispersão em água gelada). O tensoativo aniônico dodecilsulfato de sódio (SDS), apresenta 12 átomos de carbono ligados a um grupo sulfato, portanto sua fração polar confere cargas negativas ao sistema. Enquanto o tensoativo não-iônico Tween-80, derivado do ácido oleico (fração apolar), possui uma fração polar formada por macromoléculas derivadas de óxido de etileno, que conferem uma estrutura volumosa ao tensoativo.

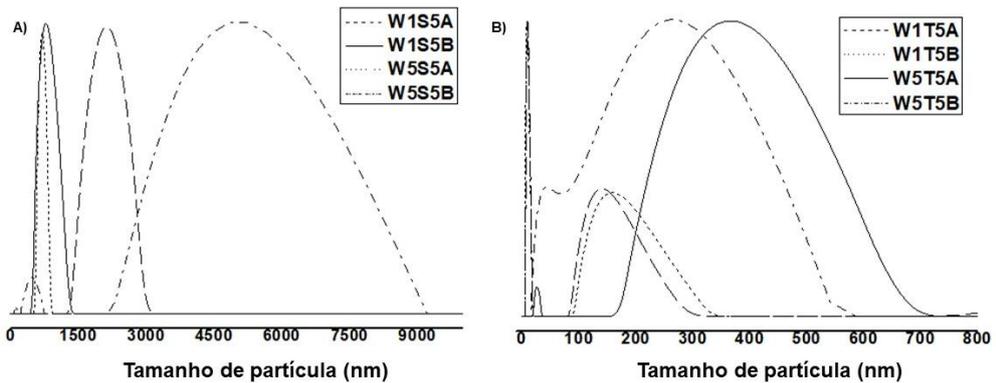
A tabela 1 mostra as composições dos sistemas desenvolvidos, o método de resfriamento e a estabilidade após 30 dias. Em paralelo, as figuras 8, 9 e 10 mostram os gráficos de DLS, comparando os conjuntos experimentais 1, 2 e 3, enquanto a tabela 3 agrupa os valores médios de tamanho de partícula.

Figura 8 - Conjunto experimental 1: Manutenção da concentração do tensoativo (1,0 %), A) tensoativo aniônico e B) tensoativo não-iônico e variação da concentração de cera (1,0 e 5,0 %) e método de resfriamento para ambos



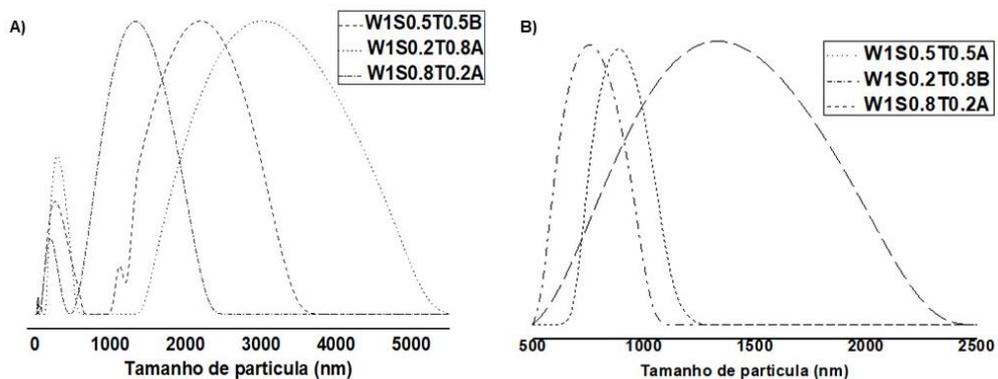
Fonte: Autora.

Figura 9 - Conjunto experimental 2: Manutenção da concentração do tensoativo (5,0 %), A) tensoativo aniônico e B) tensoativo não-iônico e variação da concentração de cera (1,0 e 5,0 %) e método de resfriamento para ambos



Fonte: Autora.

Figura 10 - Conjunto experimental 3: Combinações de diferentes proporções de tensoativos (aniônico e não-iônico), manutenção da concentração de cera (1,0 %) e variação do método de resfriamento para ambos



Fonte: Autora.

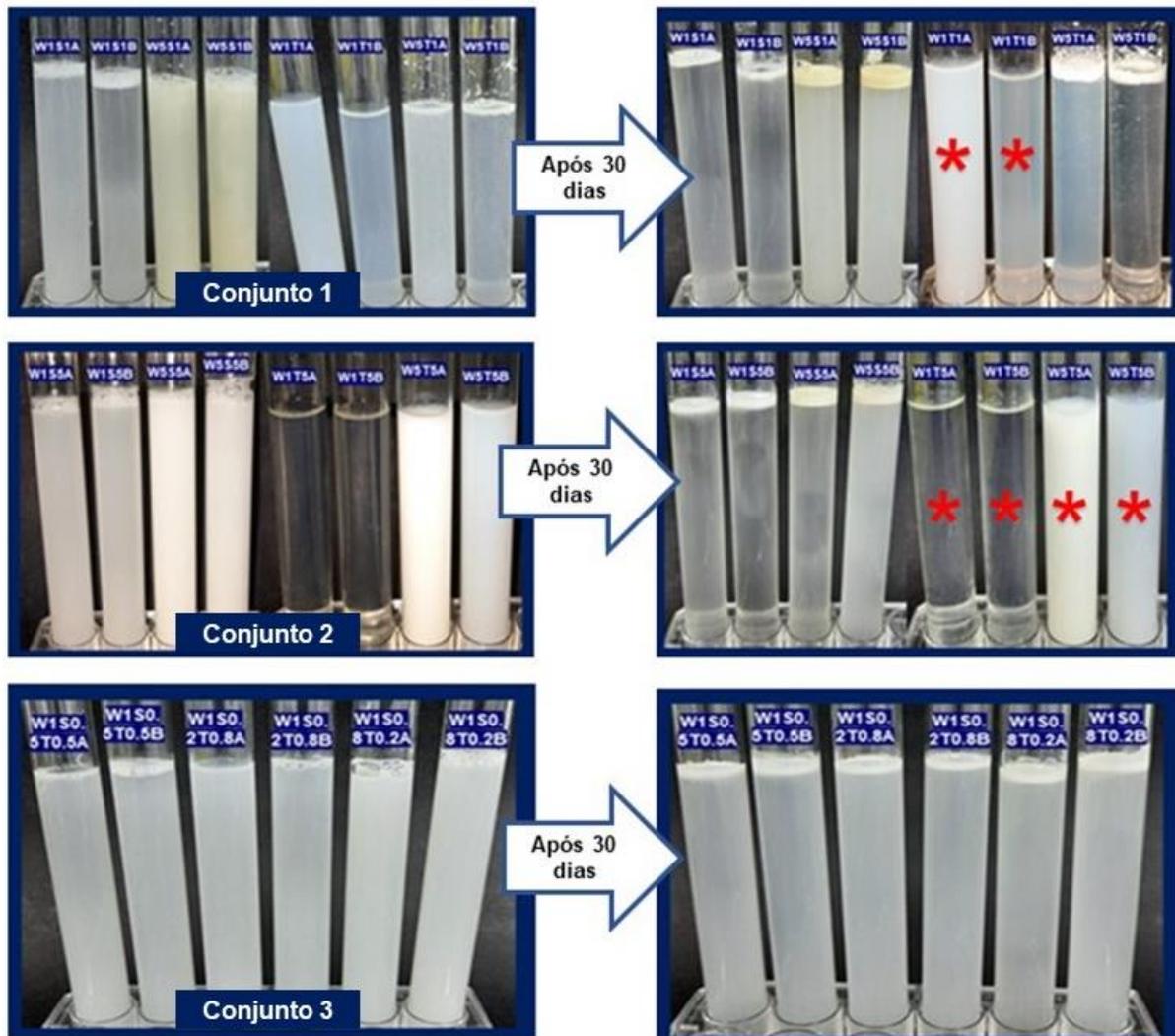
Tabela 3 - Tamanhos médios de partícula referentes aos conjuntos experimentais 1, 2 e 3

Amostra	Tamanho médio de partícula (nm)
W1S1A	1231,0 ± 0,5
W1S1B	881,4 ± 0,5
W5S1A	2459,0 ± 0,5
W5S1B	960,0 ± 0,5
W1T1A	249,6 ± 0,5
W1T1B	229,3 ± 0,5
W5T1A	466,1 ± 0,5
W5T1B	279,2 ± 0,5
W1S5A	2021,0 ± 0,5
W1S5B	809,7 ± 0,5
W5S5A	694,3 ± 0,5
W5S5B	4802,0 ± 0,5
W1T5A	170,5 ± 0,5
W1T5B	184,9 ± 0,5
W5T5A	359,6 ± 0,5
W5T5B	150,5 ± 0,5
W1S0.5T0.5A	891,1 ± 0,5
W1S0.5T0.5B	269,2 ± 0,5
W1S0.2T0.8A	2904,0 ± 0,5
W1S0.2T0.8B	730,7 ± 0,5
W1S0.8T0.2A	1515,0 ± 0,5
W1S0.8T0.2B	486,8 ± 0,5

Fonte: Autora.

A estabilidade das formulações foi avaliada mediante a ocorrência de separação de fases após 30 dias, dado este que aponta a instabilidade do(s) sistema(s). A ocorrência de separação de fases pode ser verificada na figura 11, em que os tubos de ensaio marcados com o asterisco vermelho correspondem aos sistemas que não apresentaram separação de fases após 30 dias (W1T1A, W1T1B, W1T5A, W1T5B, W5T5A, W5T5B) e, portanto, foram considerados estáveis.

Figura 11 - Estabilidade visual dos conjuntos experimentais 1, 2 e 3, após 30 dias (os asteriscos vermelhos indicam a ausência de separação de fases após 30 dias)



Fonte: Autora.

Acredita-se que a estabilidade inicial associada às amostras W1S1A, W1S1B, W5S1A e W5S1B, contendo o tensoativo aniônico, deve-se à repulsão entre as partículas carregadas negativamente. De acordo com Daltin (2011), as cargas superficiais negativas ao redor da partícula ocasionam um efeito de repulsão entre partículas vizinhas, mantendo as partículas estáveis, separadas e evitando a coalescência. Porém, com o passar do tempo as partículas tendem a sofrer aglomeração, desestabilizando o sistema. Além disso, assume-se que o excesso de cera nas amostras W5S1A e W5S1B, não permitiu uma interação completa entre a cera e o tensoativo, ocasionando a separação de fases após 30 dias. Observou-se também que o aumento do teor de cera, ocasiona o aumento da distribuição de tamanho de partículas.

Ainda no conjunto 1, a análise das amostras W1T1A, W1T1B, W5T1A e W5T1B, contendo tensoativo não-iônico, mostra novamente que o aumento da concentração de cera ocasiona o aumento de tamanho de partícula. Além disso, comparando todas as amostras do conjunto verifica-se que o método de resfriamento impacta na distribuição de tamanho de partícula, de modo que a dispersão em água gelada gera partículas menores. Considera-se que as amostras contendo o tensoativo não-iônico mantiveram-se estáveis após 30 dias devido ao impedimento estérico causado pelas moléculas do tensoativo, que não possuem carga verdadeira. Este efeito eletrostático também impede a aglomeração das partículas e a coalescência (DALTIM, 2011).

Avaliando o conjunto 2, observa-se que o aumento da concentração de tensoativo, apesar de gerar tamanhos médios de partículas inferiores ao conjunto 1, como esperado, ocasionou em distribuições de tamanho menos homogêneas, provavelmente devido à estrutura volumosa do tensoativo não-iônico.

Por fim, as amostras contendo misturas de tensoativos (conjunto 3) mostraram-se parcialmente estáveis após 30 dias, resultados esses que podem ser associados aos efeitos sinérgicos causados pela repulsão eletrostática (tensoativo aniônico) e estrutura volumosa do tensoativo não-iônico e pareamento de efeitos não-iônicos e aniônicos (ou catiônicos, quando usados). Esses resultados concordam com os estudos de Kovacevic *et al.* (2014), que relataram que o uso de misturas de tensoativos proporciona estabilidade superior quando comparado a sistemas que usam apenas tensoativo aniônico.

A avaliação dos resultados demonstrou que o tipo de resfriamento influencia na distribuição dos tamanhos das partículas, além disso, o tamanho da partícula está diretamente associado ao tipo e concentração do tensoativo. Comparando os conjuntos 1 e 2 observa-se que o aumento da concentração de um mesmo tensoativo diminui o tamanho das partículas, mas nem sempre aumenta a estabilidade do sistema, considerando que as NLS que continham somente o tensoativo aniônico não se mantiveram estáveis após 30 dias.

A tabela 4 descreve os valores médios de potencial zeta para os conjuntos 1, 2 e 3.

Tabela 4 - Valores médios de potencial zeta correspondentes aos conjuntos experimentais 1, 2 e 3

Amostra	Potencial zeta (mV)
W1S1A	-58,0
W1S1B	-53,0
W5S1A	-0,71
W5S1B	-46,0
W1T1A	-21,0
W1T1B	0,46
W5T1A	-54,0
W5T1B	-18,0
W1S5A	-73,0
W1S5B	-49,0
W5S5A	-62,0
W5S5B	-75,0
W1T5A	-16,0
W1T5B	-17,0
W5T5A	-59,0
W5T5B	17,0
W1S0.5T0.5A	-59,0
W1S0.5T0.5B	-35,0
W1S0.2T0.8A	-73,0
W1S0.2T0.8B	-0,26
W1S0.8T0.2A	-74,0
W1S0.8T0.2B	-30,0

Fonte: Autora.

De acordo com Mishara *et al.* (2018), para NLS contendo tensoativos aniônicos, valores de potenciais zeta superiores a $\pm 30,0$ mV podem estabilizar a dispersão coloidal por repulsão eletrostática. Segundo Kathe *et al.* (2014), valores de potencial zeta entre ± 20 a ± 40 mV conferem boa estabilidade aos sistemas e estão menos propensos a formar agregados e aumentar o tamanho das partículas durante o armazenamento. A figura 2 mostra as interações partícula-partícula de acordo com a carga de superfície correspondente. Estas interações, como demonstrado por Mishara *et al.* (2018), impactam diretamente na manutenção das propriedades dos sistemas. Assim, assume-se que os sistemas coloidais gerados a partir de tensoativos aniônicos tendem a gerar potenciais zetas negativos, devido a estabilização eletrostática,

enquanto sistemas estabilizados por tensoativos não-iônicos apresentam potenciais zetas próximos a neutralidade, por consequência da estabilização estérica.

No conjunto 1, o tensoativo aniônico conferiu valores de potencial zeta negativos e amostras (W1S1A, W1S1B e W5S1B) dentro da faixa de estabilidade. O valor discrepante apresentado por W5S1A foi atribuído ao excesso de cera, que provavelmente não permitiu a cobertura eficiente das nanopartículas pelo tensoativo. No entanto, após 30 dias, as amostras coalesceram, como demonstrado na figura 7.

Os valores de potencial zeta negativos atribuídos às NLS contendo o tensoativo não-iônico são provenientes da polarização, causada por átomos de oxigênio derivados do óxido de etileno, combinada com a adsorção de moléculas de água polarizadas na superfície das partículas. Além disso, Daltin (2011) relatou que este tipo de sistema comumente apresenta potencial zeta inferior quando comparado a sistemas contendo tensoativos aniônicos, devido a estabilização estérica mencionada. Mesmo assim, o aumento da concentração de tensoativo, de maneira geral, impactou no aumento do potencial zeta. Após 30 dias, as amostras W₁T₁A, W₁T₁B, W₁T₅A, W₁T₅B, W₅T₅A e W₅T₅B não apresentaram separação de fases.

A proposição do conjunto experimental discutido neste tópico possibilitou a compreensão dos mecanismos que impactam na definição de um sistema de NLS e como estes parâmetros podem ser modulados visando a obtenção de um sistema de interesse. Finalmente, a amostra W1T1B, composta por 1,0 % de cera de abelha e 1,0 % de tensoativo não-iônico, foi escolhida para encapsular o óleo de goiaba, devido à estabilidade após 30 dias, tamanho médio de partícula (249,0 nm) e potencial zeta (+0,46). Além disso, o sucesso da aplicação de nanopartículas nesta faixa de tamanho em aplicações agrícolas foi anteriormente relatado por Lai *et al.* (2006) e Nakasato *et al.* (2017).

3.2. Caracterização do óleo de goiaba

O óleo de semente de goiaba foi doado pela empresa Agttec LTDA, apresentou um laudo (confidencial) que descreveu a presença de 36,1 % de ácidos graxos livres. Os ácidos linoleico (76,70 % m/m), oleico (8,88 % m/m), palmítico (8,50 % m/m) e esteárico (4,56 % m/m), aparecem em maior quantidade. Enquanto os ácidos araquídico (0,50 % m/m), behênico (0,14 % m/m), lignocérico (0,13 % m/m), eicosenóico (0,13 % m/m), linolênico (0,13 % m/m), palmitoléico (0,12 % m/m),

mirístico (0,11 % m/m), margárico (0,08 % m/m), pentadecanóico (0,03 % m/m) e láurico (0,02 % m/m) são menos representativos.

O ensaio de atividade antimicrobiana demonstrou que o óleo de goiaba não foi capaz de inibir o crescimento das bactérias *S. aureus* e *E. Coli*, portanto este potencial não foi explorado. Foram empregadas as bactérias mencionadas neste ensaio devido à disponibilidade.

O método espectrofotométrico utilizado para determinação da atividade antioxidante empregou o DPPH, um radical livre estável com um elétron de valência desemparelhado. A solução de DPPH possui coloração violeta e absorção na região de 517 nm. Quando a solução de DPPH é misturada com um antioxidante, ou seja, uma substância que pode doar uma hidroxila, o DPPH é reduzido e a cor violeta é perdida. A curva obtida a partir da eliminação do radical DPPH, utilizando diferentes concentrações do candidato a antioxidante, permite calcular o IC₅₀, que representa a concentração de antioxidante que permite a eliminação de 50,0 % do radical DPPH (CHIARI, SEVERI, *et al.*, 2012) (CHIARI, TROVATTI, *et al.*, 2014).

Neste trabalho, o ensaio realizado em duplicata, está demonstrado graficamente na figura 12. A equação da reta obtida pela regressão linear do sistema possibilitou o cálculo do IC₅₀ a partir da substituição do valor de y por 50, considerando que o valor de interesse consiste na concentração de antioxidante necessária para inibir 50,0 % dos radicais DPPH presentes no meio.

A tabela 5 mostra o valor médio de IC₅₀ para o óleo de goiaba (10,605 mg/mL), erro, desvio padrão e variância. Apesar do valor de IC₅₀ do óleo de goiaba ser inferior ao do padrão ácido ascórbico (3,04 µg/mL) descrito por Chiari *et al.* (2014), o mesmo trabalho relata um IC₅₀= 4,60 mg/mL para o óleo de café verde, valor que assemelha-se ao IC₅₀ do óleo de goiaba. Esta discrepância nos resultados é esperada considerando que os óleos vegetais são produtos naturais não purificados, enquanto o ácido ascórbico consiste em um padrão de alta pureza (CHIARI, TROVATTI, *et al.*, 2014). Chiari *et al.* (2012) estudaram o potencial antioxidante de extratos de goiaba, extraídos empregando-se diferentes solventes, determinando valores de IC₅₀ que variaram de 0,2 a 0,7 mg/mL. Kapoor *et al.* (2020) verificou que o óleo de semente de goiaba foi capaz de inibir 58,90 % dos radicais livres presentes no meio reacional, enquanto neste trabalho o óleo de goiaba inibiu 91,72 % dos radicais DPPH, considerando a maior concentração empregada. Prommaban *et al.* (2020),

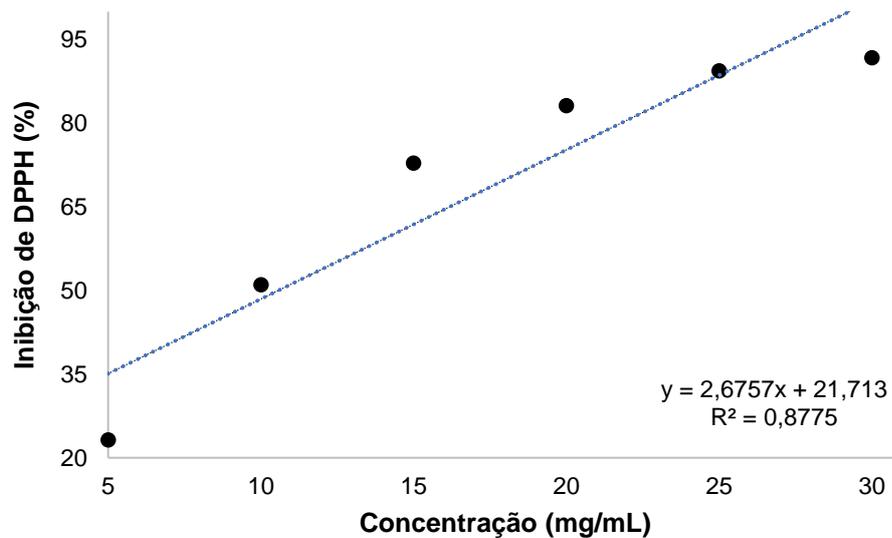
demonstrou que o potencial de inibição dos radicais DPPH para o GSO é dependente da concentração e determinou um $IC_{50}=13,9$ g de GSO/g DPPH. Empregando este mesmo raciocínio, seriam necessárias 0,5302 g do GSO avaliado neste estudo para inibir 50,0 % dos radicais DPPH presentes no meio reacional.

Tabela 5 - Valor médio e estatística: Atividade antioxidante do óleo de goiaba

Média (IC_{50})	Erro	Desvio padrão	Variância
10,605 mg/mL	0,0350	0,0495	0,047

Fonte: Autora.

Figura 12 - Avaliação da atividade antioxidante do óleo de goiaba



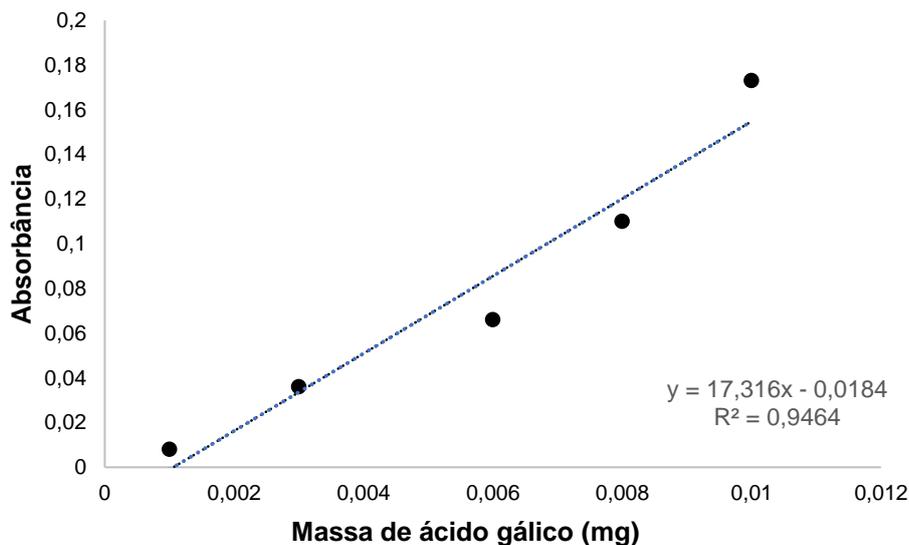
Fonte: Autora.

Macedo *et al.* (2017) mostraram que compostos antioxidantes possuem a capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio na tentativa de minimizar possíveis danos oxidativos que aparecem durante a germinação sementes, por meio da avaliação da aplicação exógena dos antioxidantes ácido kójico e tirosol em sementes de trigo. Foi constatado um efeito significativo do ácido kójico na proteção das membranas celulares, ao passo que o tirosol promoveu a aceleração da

germinação e contribuições para o crescimento da plântula (MACEDO, SILVA, *et al.*, 2017).

A avaliação do teor de compostos fenólicos baseou-se no ensaio colorimétrico que faz uso do reagente de *Folin-Ciocalteu*. Neste ensaio, o meio reacional precisa assumir um pH=10 para que as substâncias redutoras, como compostos fenólicos, possam dissociar um próton e formar ânions fenolatos capazes de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu, que é composto pelos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibídico (PÉREZ, DOMINGUEZ-LÓPEZ e LAMUELA-RAVENTÓS, 2023). A reação de redução resulta na formação de óxidos de tungstênio e molibdênio que apresentam absorção na região de 765 nm possibilitando, a quantificação das substâncias fenólicas empregando-se a técnica de espectrofotometria (PIRES, TORRES, *et al.*, 2017).

Figura 13 - Determinação do teor de compostos fenólicos em função do padrão ácido gálico



Fonte: Autora.

O teor de fenólicos foi expresso em equivalentes do padrão ácido gálico (EAG) por massa de óleo de goiaba, de modo que, foi identificado um teor de 1,8605 mg de EAG em 15,0 mg de óleo de goiaba, ou 0,124 mg de EAG/mg de óleo de goiaba. Em outras palavras, 12,4 % do óleo de goiaba corresponde a compostos fenólicos.

Kisiriko *et al.* (2021) descreveram que a identificação de compostos fenólicos presentes em insumos naturais, como extratos, abre caminho para o desenvolvimento industrial de novas formulações a base de bioestimulantes naturais, baseadas nestes

compostos. Diversos estudos mostram o efeito bioestimulante de extratos vegetais contendo compostos fenólicos na germinação, enraizamento, frutificação, produção de sementes, dentre outros parâmetros de crescimento, quando aplicados via sementes, solo ou foliar (KISIRIKO, ANASTASIADI, *et al.*, 2021). De acordo com Papadopoulos e Boskou (1991) e Macedo *et al.* (2017), diversos compostos fenólicos de origem natural ou microbiana, como o tirosol, possuem ação antioxidante, sendo capazes de atuar na proteção dos tecidos vegetais e oxidação de sementes, além de acelerar a germinação, quando aplicados de forma exógena.

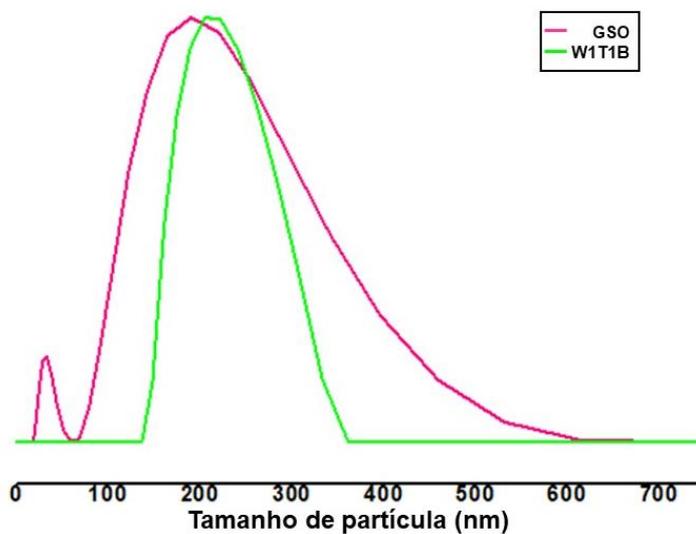
Aremu *et al.* (2015) demonstrou que os compostos fenólicos eckol e fluroglucinol, isolados da alga marrom *Ecklonia máxima* (Osbeck) Papenfuss, foram testados, via rega, nas doses 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M, avaliando o crescimento, teor de fitoquímicos e auxinas na planta modelo *Eucomis autumnalis* (Mill) Chitt. Foi verificado que o eckol aumentou significativamente o tamanho do bulbo, a biomassa e o teor de compostos bioativos da planta, entretanto, o mecanismo de ação deste tipo de composto não foi elucidado (AREMU, MASONDO, *et al.*, 2015).

3.3. Encapsulação do óleo de goiaba

A formulação contendo o óleo de goiaba encapsulado na matriz W1T1B, denominada GSO, apresentou tamanho médio de 280,59 nm e potencial zeta -22,4 mV. Comparando os sistemas W1T1B e GSO, observou-se que houve um aumento na distribuição de tamanho de partícula com a adição do óleo de goiaba (figura 14) mas, mesmo assim a estabilidade do sistema foi mantida, considerando a ausência de separação de fases. Este resultado corrobora com os estudos de Kheradmandnia *et al.* (2010), que verificou um aumento de tamanho de partícula, de 82,0 para 116,0 nm, devido ao aumento do teor de droga encapsulada.

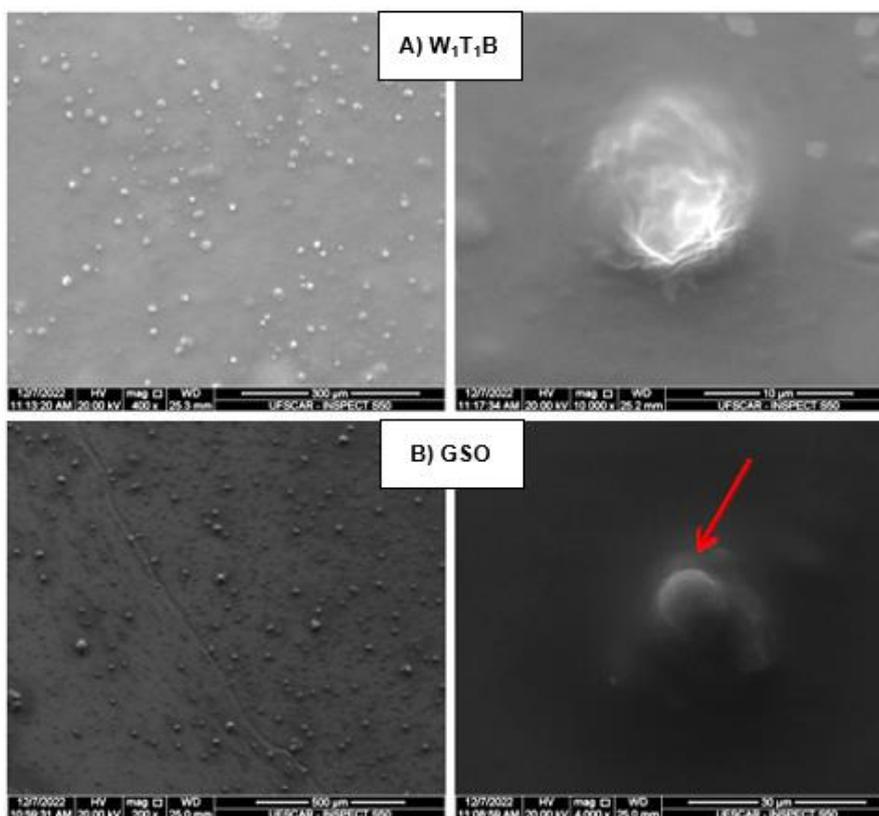
Kathe *et al.* (2014) relataram que a forma, a morfologia e o tamanho de partícula, influenciam no destino fisiológico e no desempenho da nanopartícula. As imagens de MEV, demonstradas na figura 15, obtidas para as amostras W1T1B e GSO, mostram que ambas apresentam morfologia esférica.

Figura 14 - Distribuição de tamanho de partícula das amostras W1T1B e GSO



Fonte: Autora.

Figura 15 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura. A) Amostra W₁T₁B e B) Sistema GSO



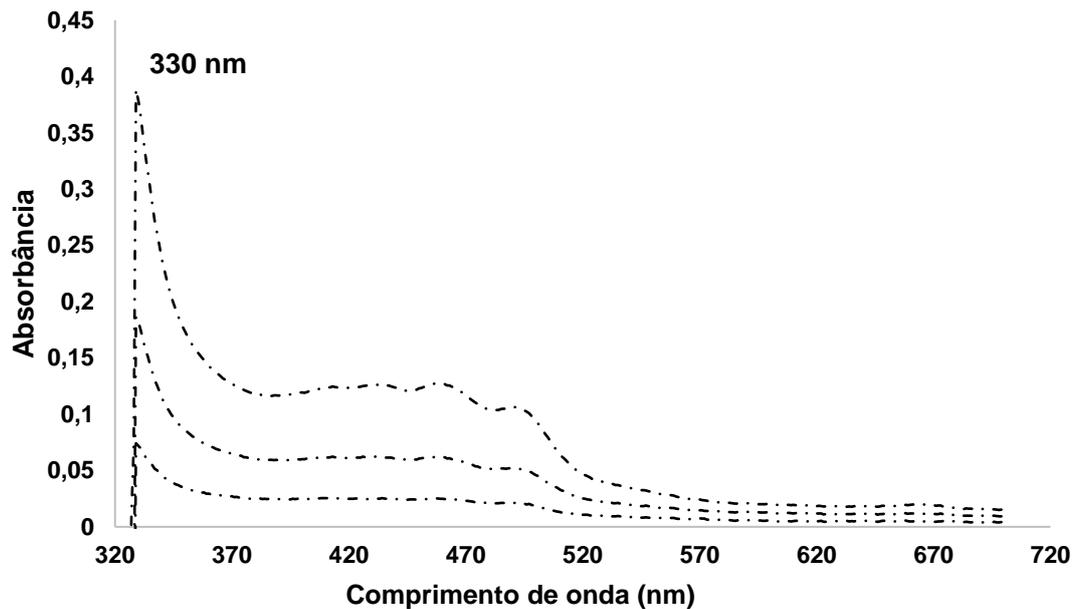
Fonte: Autora.

A quantificação da EE % foi possível mediante a identificação da região de absorção de maior intensidade do óleo de goiaba na região do UV-vis, a partir da varredura de uma solução de óleo de goiaba em acetona. Foi verificado, como

demonstrado na figura 16, que o óleo de goiaba absorve com maior intensidade na região de 330 nm. O comprimento de onda determinado é característico do ácido clorogênico, um composto fenólico presente no óleo de goiaba, demonstrado nos estudos de Velkoska-Markovska *et al.* (2020) e Prommaban *et al.* (2020).

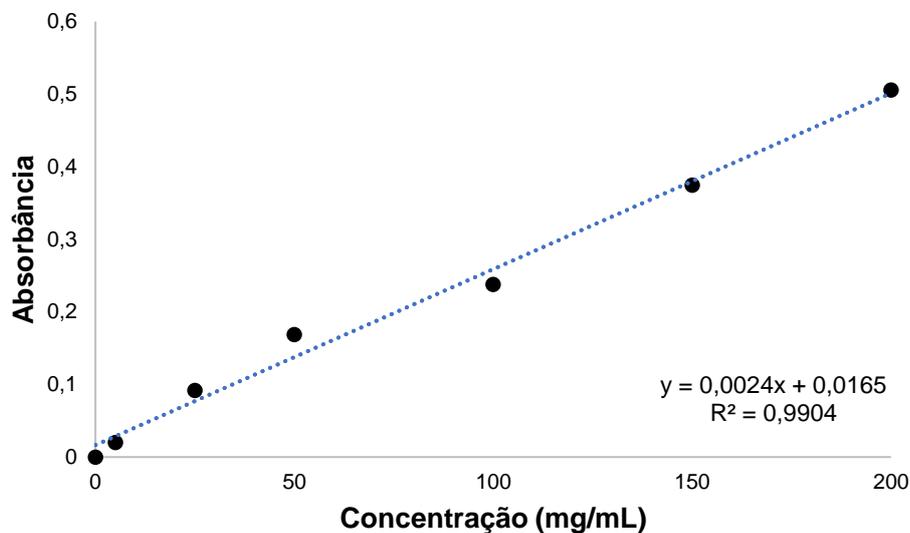
Assim, foi construída uma curva de calibração, demonstrada na figura 17, a partir das medidas de absorvâncias do óleo de goiaba dissolvido em acetona nas concentrações 0,0 – 200,0 mg/mL, para confirmar a hipótese de que o aumento da concentração de OG impactam no aumento dos valores de absorvância em 330 nm. Portanto, esta região de absorção pôde ser empregada na determinação da concentração do óleo de goiaba utilizando-se o espectrofotômetro de absorção na região do Uv-vis.

Figura 16 - Espectro de absorção na região do UV-vis do óleo de goiaba dissolvido em acetona em concentrações arbitrárias



Fonte: Autora.

Figura 17 - Monitoramento da absorbância em função do aumento da concentração de OG dissolvido em acetona em 330 nm



Fonte: Autora.

Em seguida, empregando-se o método descrito no item 2.2.4, foi possível identificar que cerca de 13,47 % do óleo de goiaba encontrava-se livre em solução, portanto não encapsulado. Empregando a equação, verificou-se uma EE %= 86,52 %, portanto assume-se que foi possível encapsular 259,58 mg do total de 300,00 mg de óleo de goiaba.

3.4. Validação do efeito bioestimulante *in vivo* do óleo de semente de goiaba encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas

A tabela 6 descreve as doses de GSO aplicadas por tratamento. O tratamento F₁ envolveu a aplicação do sistema W1T1A na ausência de óleo de goiaba, ou seja, somente nanopartículas compostas por cera de abelha.

Tabela 6 - Doses de GSO aplicadas no tratamento de sementes de feijão

Tratamento	Descrição	Dose (mL/kg de semente)
F ₀	Controle	0,00
F ₁	W1T1A	30,0
F ₂	GSO	5,00
F ₃	GSO	10,0

(continua)

Tabela 6 - Doses de GSO aplicadas no tratamento de sementes de feijão

(conclusão)

Tratamento	Descrição	Dose (mL/kg de semente)
F ₄	GSO	15,0
F ₅	GSO	20,0
F ₆	GSO	25,0
F ₇	GSO	30,0

Fonte: Autora.

A tabela 7 reúne os valores de % EG calculados após 24, 48 e 72 horas após o plantio.

Tabela 7 - Emergência de plântulas após 24, 48 e 72 horas

Tratamento	% EG 24h	% EG 48h	% EG 72h
F ₀	0,0	0,0	25,0
F ₁	0,0	12,5	62,0
F ₂	0,0	25,0	100,0
F ₃	0,0	0,0	87,50
F ₄	0,0	0,0	100,0
F ₅	0,0	0,0	100,0
F ₆	0,0	37,5	87,5
F ₇	0,0	62,5	100,0

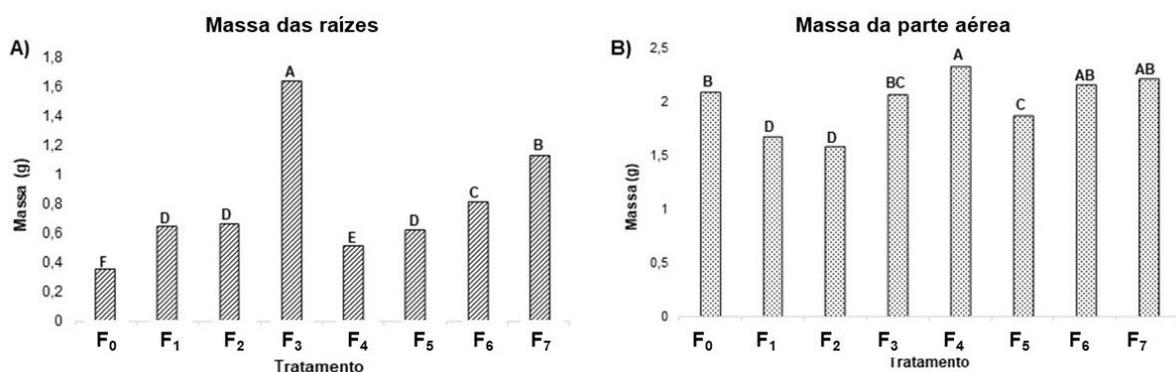
Fonte: Autora.

A tabela 7 mostra que o tratamento F₇ foi superior aos demais tratamentos, alcançando % EG= 62,5 após 48h, além disso, os tratamentos F₁, F₂, F₆ e F₇ demonstraram-se superiores ao controle F₀. Após 72h, os tratamentos F₂, F₄, F₆ e F₇ apresentaram % EG= 100, seguidos pelos tratamentos F₃, F₆, F₁, que apresentaram %EG= 87,5; 87,5 e 62, ao contrário do controle F₀, que apresentou % EG= 25. Portanto, fica evidente a contribuição do sistema GSO para a emergência das plântulas de feijão. De acordo com Lima *et al.* (2018), a germinação é essencial na melhoria da produção, portanto, o desenvolvimento de tecnologias que incrementem a germinação, torna a planta menos propensa ao ataque de patógenos no solo, além de atuar na melhora da qualidade de desenvolvimento, refletindo no aumento da produtividade (SILVA, BOLFARINI, *et al.*, 2014) (LIMA, ROSATO, *et al.*, 2018).

As figuras 18 e 19 mostram as massas das raízes e parte aérea referentes aos experimentos 1 e 2, respectivamente. A avaliação de parâmetros de crescimento, como a mensuração matéria orgânica da planta após determinado período, traz informações sobre o desenvolvimento da cultura e o impacto do fertilizante na promoção do crescimento. De acordo com Guimarães e Stone (2008), a massa fresca está diretamente relacionada com o teor de água na planta e traz informações indiretas sobre a capacidade fotossintética (STRASSBURGER, 2010) (BENINCASA, 2003). De acordo com Pereira e Machado (1987), as avaliações de crescimento trazem informações sobre a capacidade de assimilação de nutrientes e alocação de matéria orgânica e, portanto, estão relacionadas com a distribuição de massa na planta (STRASSBURGER, 2010).

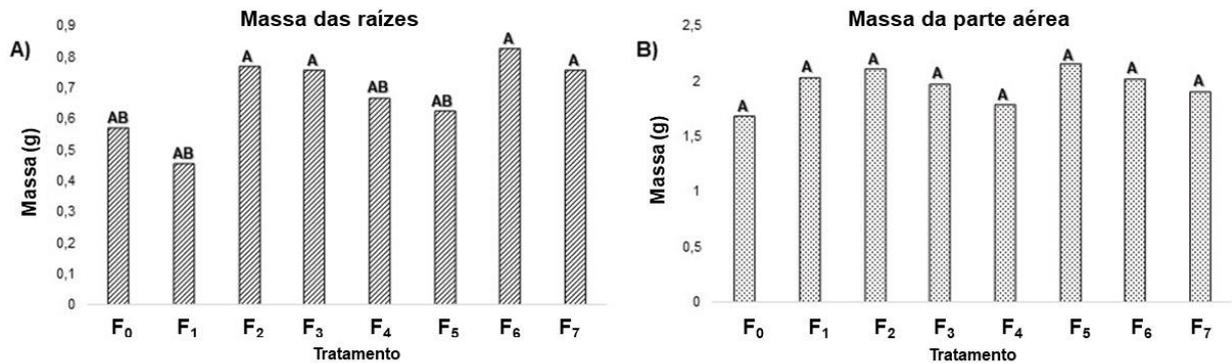
Analisando as figuras 18 e 19, observa-se que o sistema GSO, em diferentes doses, ocasionou incrementos de massa de raízes e parte aérea, em comparação ao controle. No experimento 1 o tratamento F₃ diferenciou-se estatisticamente dos demais, aumentando a massa das raízes cerca de 4,5 vezes em relação ao controle (F₀). Além disso, todos os demais tratamentos forneceram incrementos, comparando-se com o controle (F₀). A avaliação de massa de parte aérea demonstrou que o tratamento F₄ destacou-se, em relação ao F₀.

Figura 18 - Massa média das raízes (A) e parte aérea (B) referentes ao experimento 1. Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.



Fonte: Autora.

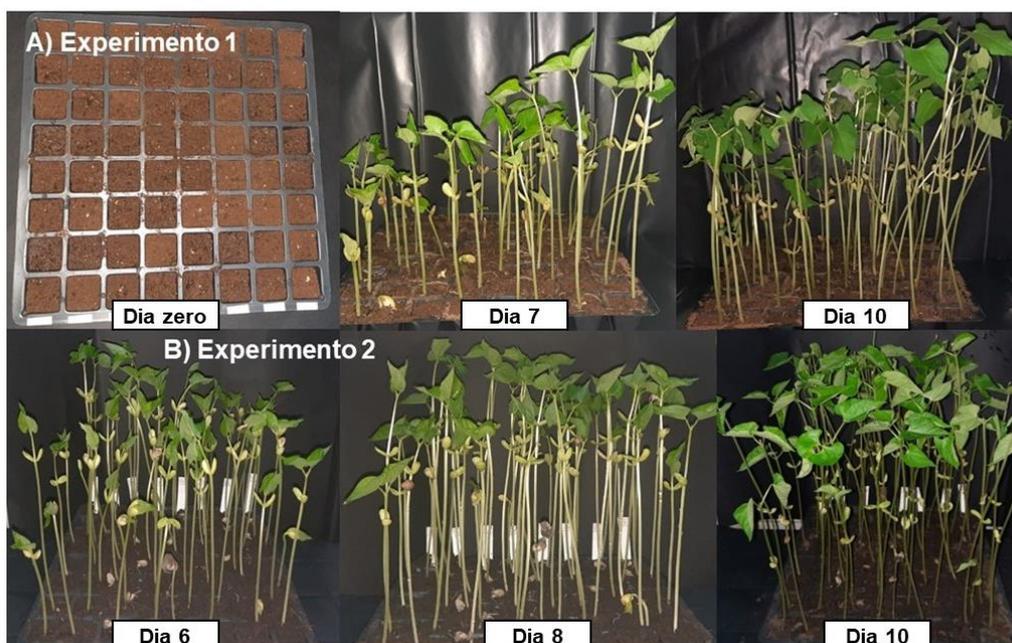
Figura 19 - Massas médias das raízes (A) parte aérea (B) referentes ao experimento 2. Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes



Fonte: Autora.

No experimento 2, os tratamentos F₂, F₃, F₆ e F₇ diferenciaram-se estatisticamente do controle F₀, fornecendo incrementos próximos de 1,5 vezes a massa do controle (F₀). Apesar das avaliações de massa de parte aérea não apresentarem diferenças estatísticas, o tratamento F₅ aumentou a massa em 20,0 %, em relação ao controle F₀. A figura 20 exemplifica a execução dos experimentos 1 e 2. Portanto, fica evidente que o sistema GSO trouxe contribuições, relacionadas à promoção de crescimento, para o desenvolvimento inicial da cultura do feijão.

Figura 20 - Desenvolvimento das sementes de feijão tratadas com o sistema GSO, em diferentes doses, nos experimentos 1 e 2



Fonte: Autora.

4. Conclusão

Os resultados alcançados neste capítulo demonstraram o potencial associado ao uso do óleo vegetal de goiaba no desenvolvimento inicial e estabelecimento de plântulas de feijão, a partir do estudo do potencial antioxidante, determinação do teor de compostos fenólicos e veiculação do óleo de goiaba a partir da encapsulação em NLS. Foi possível compreender os fatores que impactam no desenvolvimento de NLS (tipo de tensoativo, concentração de tensoativo, concentração de lipídio e métodos de resfriamento), desenvolver e caracterizar um sistema encapsulando o óleo de goiaba, com tamanho médio 280,59 nm e potencial zeta - 22,4 mV e testar *in vivo* o efeito do sistema desenvolvido.

Além disso, foram utilizados materiais com potencial para contribuir para o reaproveitamento de resíduos agroindustriais e diminuir a geração de resíduos tóxicos para o meio ambiente e para a saúde humana, considerando que tratam-se de materiais de origem natural e biotecnológica. Nesse âmbito, a biodiversidade brasileira apresenta uma ampla diversidade de óleos vegetais passíveis de exploração.

Por fim, considera-se que a validação *in vivo*, resultados iniciais acerca da validação do efeito bioestimulante associado ao sistema GSO, que mesmo necessitando de continuidade, como testes em casa de vegetação ou campo, abrem caminho para novos desenvolvimentos relacionados.

CAPÍTULO 2 – CO-ENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA E ÓLEO VEGETAL DE PEPINO EM NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS APLICADAS NO REVESTIMENTO DE FRUTAS COM POTENCIAL EFEITO PROTETOR

1. Introdução

1.1. Biodefensivos

Biodefensivos são substâncias oriundas de organismos vivos, como plantas, bactérias, fungos, vírus e nematóides, que possuem bioatividade contra patógenos e, portanto, podem ser utilizadas no controle de pragas agrícolas, na proteção de produtos pós-colheitas e na preservação de sementes. Dentre os grupos de biodefensivos citados, o uso de produtos botânicos vem ganhando relevância, considerando a baixa toxicidade, biodegradabilidade, rápida decomposição e sustentabilidade, diferenciando-os dos pesticidas químicos (NOLLET e MIR, 2023) (GUPTA, SINGH, *et al.*, 2023). Os mecanismos de controle a partir da utilização de biodefensivos contemplam a capacidade de combate direto ao patógeno e a indução de resistência, desencadeando mecanismos latentes de defesa do organismo vegetal (KESRAOUI, ANDRÉS, *et al.*, 2022) (VERO, GARMENDIA, *et al.*, 2023).

Além dos patógenos e pragas que afetam as culturas durante o período de plantio e cultivo, as perdas de frutas e vegetais pós-colheita representam uma preocupação mundial, responsáveis por cerca de 30,0 a 40,0 % das perdas ao longo da cadeia de abastecimento e ocasionadas por fatores como armazenamento, embalagem e manuseio inadequados, perdas de água e contaminação microbiana, que ocasionam danos fisiológicos, afetando a qualidade nutricional, sabor, cor e texturas, impactando significativamente na diminuição do prazo de validade destes alimentos (GOSWAMI, MONDAL, *et al.*, 2024). No ano de 2019, o Relatório do Índice de Desperdício Alimentar do Programa das Nações Unidas para o Ambiente, divulgou que 20,0 % dos 931 milhões de toneladas de alimentos desperdiçados correspondem a frutas e vegetais (PROKIC, CURCIC, *et al.*, 2022).

De acordo com Sivakumar e Bautista-Baños (2014), as doenças pós-colheita consistem na principal causa das perdas de hortifruti, afetando a qualidade e restringindo o prazo de validade destes alimentos. Nesse sentido, os produtos

defensivos químicos utilizados para este fim vêm sendo repreendidos por países importadores de produtos frescos, devido aos resíduos de pesticidas, por meio da implementação de legislações que estabelecem níveis máximos de resíduos permitidos na porção comestível da fruta (SIVAKUMAR e BAUTISTA-BAÑOS, 2014). Além disso, o desenvolvimento de resistência aos pesticidas pelos patógenos, que por vezes impactam no aumento da dose associada ao produto, e o descarte inadequado, podem afetar à saúde do solo, a fauna e os recursos hídricos (IPPOLITO e NIGRO, 2000). Nesse âmbito, produtos naturais, como extratos e óleos essenciais, surgem como uma alternativa promissora para substituição dos defensivos químicos, trazendo um caráter sustentável, biodegradabilidade, baixa toxicidade e impacto ambiental (SIVAKUMAR e BAUTISTA-BAÑOS, 2014).

Xing *et al.* (2019) testaram nanopartículas de prata incorporadas em carboximetilcelulose e goma guar aplicadas no revestimento de mangas, armazenadas após a colheita durante 4 semanas. Constatou-se que os sistemas nanométricos foram eficientes em retardar o amadurecimento dos frutos e manter sua qualidade durante o armazenamento refrigerado, prolongando sua vida útil (XING, LI, *et al.*, 2019). Hasheminejad e Khodaiyan (2020) investigaram a vida útil de romãs revestidas com óleo essencial de cravo, encapsulado em matriz de quitosana, e observaram que foi possível prolongar a conservação da fruta por 54 dias, ao contrário do controle que tornou-se inutilizável após 18 dias de armazenamento, devido à incidência de doenças fúngicas e decomposição (HASHEMINEJAD e KHODAIYAN, 2020).

Arroyo *et al.* (2020) demonstraram que revestimentos nanoestruturados à base de quitosana, alginato e misturas de quitosana e alginato e ZnO (que apresentam propriedades antimicrobianas), evitaram o apodrecimento, estendendo a vida útil da goiaba para 20 dias, enquanto os frutos não revestidos duraram apenas cerca de 7 dias (ARROYO, BEZERRA, *et al.*, 2020). Das *et al.* (2023) relatou que o revestimento de uvas de mesa com nanoemulsão de quitosana carregada com óleo essencial de *Angelica archangelica*, resultou na manutenção dos atributos de qualidade (peso, acidez titulável, teor de fenólicos e pH) e inibiu o crescimento *Botrytis cinerea*, fungo causador da “podridão cinzenta” (DAS, CHAUDHARI, *et al.*, 2023).

Gonçalves *et al.* (2024) avaliou a eficácia de emulsões contendo óleo essencial de melaleuca contra a antracnose em bananas, principal doença que afeta a cultura após

a colheita. Após 8 dias de armazenamento à 25°C, as bananas tratadas com emulsões contendo diferentes concentrações de óleo essencial de melaleuca (0,50, 1,00, 2,00, 3,00, 4,00 e 5,00 µg/L) apresentaram reduções significativas na curva de progresso da doença (80,0 %, 90,0 %, 95,0 %, 96,0 %, 97,0 % e 98,0 %), dependentes do aumento da concentração do óleo essencial. Arcot *et al.* (2024) encapsularam o óleo essencial de canela em matriz de proteína de soro de leite, incorporaram as nanopartículas resultantes em parafina. O revestimento resultante foi avaliado mediante testes *in vitro*, que demonstraram a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus*, responsável por causar bolor em maçãs (ARCOT , MU, *et al.*, 2024).

O interesse pela substituição de compostos sintéticos por equivalentes naturais e/ou biotecnológicos vêm motivando o estudo de materiais pouco explorados e o desenvolvimento de métodos de produção verdes, considerando os benefícios associados à saúde humana, meio ambiente e sustentabilidade. Nesse âmbito, insumos de origem natural, como polímeros e óleos essenciais, vêm incentivando o desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias de alto valor agregado, incluindo avanços em nanotecnologia (GUPTA, BANSAL, *et al.*, 2013) (SRIVASTAVA e BHARGAVA , 2022) (THAKUR, PRASAD, *et al.*, 2021).

1.2. Óleos naturais

Os óleos essenciais (OE), tradicionalmente utilizados na composição de perfumes e indústria alimentícia, podem ser extraídos de diferentes partes da planta, como folhas, flores e troncos, por meio de técnicas de destilação a vapor, e outras técnicas menos comuns. Os OE diferenciam-se dos óleos vegetais devido a sua composição complexa, que consiste majoritariamente de compostos orgânicos voláteis, de baixa massa molar, pertencentes principalmente às classes de terpenóides e fenilpropanóides, responsáveis por promover a bioatividade destes materiais (SEMERDJIEVA, ZHELJAZKOV, *et al.*, 2024) (WARRIE, DURENNE, *et al.*, 2020). São produzidos naturalmente pelas plantas, como metabólitos secundários, como mecanismo de defesa direta e indireta contra patógenos (PAVELA e BANELLI, 2016).

Os OE são fontes de substâncias biologicamente ativas que podem apresentar ação antioxidante, antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória, herbicida e nematicida (KESRAOUI, ANDRÉS, *et al.*, 2022) (BASSOLÉ e JULIANI, 2012)

(MAZROU, 2019). Essas propriedades permitem que sejam utilizados na preservação de alimentos, na eliminação de pragas agrícolas e no tratamento de doenças tópicas, como acne (GUPTA, BANSAL, *et al.*, 2013) (YUE, SHAO, *et al.*, 2020).

No entanto, estes materiais podem ser voláteis, instáveis, sensíveis à luz, temperatura, pH e oxidação (ZHANG, SUN, *et al.*, 2011). Assim, seu encapsulamento representa uma alternativa importante para preservar suas propriedades (ZHANG, SUN, *et al.*, 2011). Com este propósito, este trabalho descreve a co-encapsulação do óleo essencial de melaleuca e do óleo da semente de pepino, associação não encontrada na literatura.

O óleo essencial de melaleuca (OM) é extraído por destilação das folhas da árvore *Melaleuca alternifolia* Cheel, nativa da Austrália. É popular no tratamento de doenças causadas por fungos, apresenta ação antisséptica e antibacteriana, além de ação repelente contra *Aedes aegypti*, porém é volátil e lipofílico, portanto sua aplicação em formulações aquosas é dificultada (ZHANG, SUN, *et al.*, 2011) (KNIGHT e HAUSEN, 1994) (FONSECA-SANTOS, PACHECO, *et al.*, 2019) (DUARTE, TAIRA, *et al.*, 2020) (GAO, ZHOU, *et al.*, 2020).

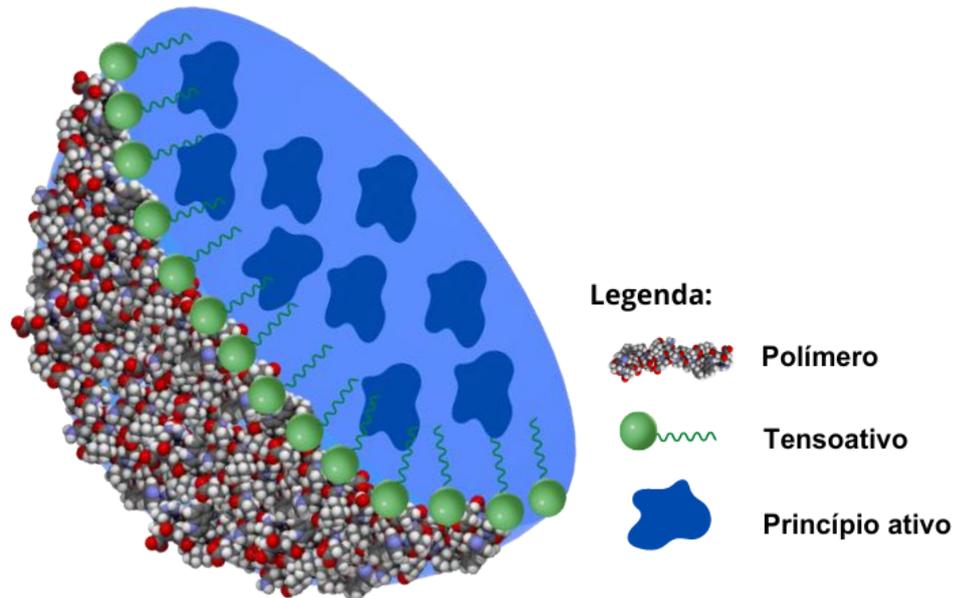
O óleo de semente de pepino, *Cucumis sativus* (OP), é nativo da Índia e apresenta propriedades medicinais, como atividade antioxidante e capacidade de redução glicêmica. Quando usado nas formas tópica ou oral, pode reduzir o aspecto envelhecido, acelerar o metabolismo e melhorar a imunidade (NAYIK e GULL, 2020). Nesse sentido, a encapsulação é uma abordagem tecnológica interessante para ampliar o leque de aplicação desses óleos, superando as limitações proporcionadas pelo seu caráter lipofílico nas formulações.

1.3. Nanocápsulas poliméricas

Nanocápsulas poliméricas (NC), cuja estrutura genérica está demonstrada na figura 21, são sistemas menores que 1,0 μm , compostas por núcleos oleosos circundados por paredes poliméricas estabilizadas por tensoativos, normalmente não-iônicos (LERTSUTTHIWONG, NOOMUN, *et al.*, 2008) (HOSSEINI, HOSSEINI, *et al.*, 2012). Lertsutthiwong *et al.* (2008) e Hosseini *et al.* (2012) descreveram que um método comum para o preparo de nanocápsulas baseia-se na deposição do polímero na superfície da gota de óleo, seguida da reticulação do polímero (GUPTA, BANSAL, *et al.*, 2013). A reticulação torna a matriz polimérica rígida, promovendo estabilidade

ao sistema ao longo do tempo por meio da preservação de sua estrutura (GUPTA, BANSAL, et al., 2013).

Figura 21- Estrutura genérica para nanocápsulas poliméricas



Fonte: Autora.

O alginato é um biopolímero hidrofílico versátil sintetizado por algas marrons e algumas bactérias. É biocompatível, biodegradável e sofre reticulação na presença de cátions divalentes, como íons de cálcio (PAQUES, LINDEN e RIJN, 2014). O alginato permite a formação de nanopartículas em condições brandas, favorecendo a encapsulação de substâncias voláteis e sensíveis à temperatura (OLIVEIRA, PAULA e PAULA, 2014) (TØNNESEN e KARLSEN, 2002).

Embora existam métodos bem estabelecidos para produção de nanopartículas na literatura, a necessidade de customizar estes sistemas, considerando as propriedades do ativo encapsulado, faz com que esta ciência esteja em constante expansão. Nesse âmbito, a nanotecnologia verde visa estabelecer métodos sustentáveis que dispensem o uso de solventes orgânicos, materiais e processos que gerem toxicidade ao meio ambiente e à saúde humana. Além disso, visa valorizar a utilização de materiais de origem renovável e biodegradáveis. Assim, prática da química verde pode trazer impactos benéficos significativos para a sociedade, contribuindo para o desenvolvimento de produtos e processos para uso em saúde, agricultura, energia, cosméticos, recuperação ambiental, entre outros (GUPTA, BANSAL, *et al.*, 2013) (SRIVASTAVA e BHARGAVA, 2022) (THAKUR, PRASAD, *et al.*, 2021).

Este trabalho, descreve a co-encapsulação do OM e OP em matriz de alginato, empregando-se diferentes concentrações de polímero e tensoativo, a fim de compreender os impactos da variação destes parâmetros no sistema visando o alcance de uma formulação estável, aplicando-se um método de preparo verde. As nanocápsulas resultantes foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta, eficiência de encapsulação e estabilidade visual ao longo do tempo. Além disso, atividade antioxidante e propriedades antimicrobianas das nanocápsulas foram avaliadas, a partir de métodos quantitativos e qualitativos, respectivamente.

Embora existam relatos da encapsulação do óleo de melaleuca em nanocápsulas poliméricas, não foram encontrados trabalhos que descrevam a encapsulação e avaliação das propriedades da mistura de óleos (melaleuca + pepino) em sistemas de alginato, fato que confere um caráter inovador a este trabalho (YUE, SHAO, *et al.*, 2020) (ZHANG, SUN, *et al.*, 2011) (LERTSUTTHIWONG, ROJSITTHISAK e NIMMANNIT, 2009) (CAI, ZHANG, *et al.*, 2021) (SATHIYASEELAN, SARAVANAKUMAR, *et al.*, 2021).

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

2.1.1. Reagentes

Alginato de sódio (Êxodo científica); Tween-80 (Dinâmica, CAS: 9005 – 65 – 6); cloreto de cálcio (Dinâmica, CAS: 10043-52-4); etanol absoluto PA (Êxodo científica, CAS: 64-17-5), óleo de semente de pepino (Engenharia das Essências), óleo de melaleuca (Agttec Inovação LTDA) Tetraciclina (Sigma Aldrich – CAS: 60-54-8); 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (Sigma Aldrich, CAS: 18-98-66-4); ágar-nutriente foi Kasvi.

2.1.2. Bactérias

E. coli (ATCC 43895) e *S. aureus* (ATCC 14458), adquiridas da American Type Culture Collection, ATCC, EUA.

2.1.3. Equipamentos

Agitador magnético Ethnik; espectrofotômetro UV-vis BEL UV-M51; DLS Zetasizer (Malvern Panalytical); incubadora BOD SL-120; autoclave Primatec CS 300.

2.1.4. Outros

Morango, goiaba e sementes de abóbora, adquiridas no comércio local.

2.2. Métodos

2.2.1. Avaliação dos potenciais antioxidantes e antimicrobianos dos óleos de melaleuca e pepino

Os óleos de melaleuca e pepino foram caracterizados usando metodologias indiretas, mediante a disponibilidade de reagentes e equipamentos.

Os potenciais antimicrobianos do OM, OP e OM + OP (1:1 v/v) foram avaliados pelo ensaio de difusão em placa de ágar, utilizando as bactérias *E. coli* (Gram-negativa, ATCC 43895) e *S. aureus* (Gram-positiva, ATCC 14458). Neste procedimento, após a esterilização dos materiais, em autoclave à 110°C, o meio de cultura ágar-nutriente foi fundido e utilizado no preenchimento das placas de Petri (20,0 mL de ágar-nutriente por placa de petri). Após a secagem do ágar, procedeu-se com a inoculação das bactérias. Em seguida, foram utilizados 20,0 µL de cada amostra para umedecer o disco de papel filtro (8 mm de diâmetro), que foram inseridos na superfície do ágar. Tetraciclina (20,0 µL, solução aquosa 0,285 mg/mL) foi usada como controle positivo. As placas de Petri foram incubadas por 24 horas a 37°C. O potencial antimicrobiano dos materiais foi avaliado mediante o aparecimento de halos de inibição.

O potencial antioxidante do OM, OP e OM + OP (1:1 v/v) foi avaliado seguindo o procedimento descrito no item 2.2.2, do Capítulo 1. Neste experimento, as amostras foram dissolvidas em etanol e foram preparadas curvas de calibração de 0,0 a 30,0 mg/mL.

2.2.2. Preparo das nanocápsulas poliméricas

O conjunto experimental mostrado na tabela 8 foi proposto com o intuito de possibilitar o estudo da influência da concentração de polímero e tensoativo nas propriedades físico-químicas das NC.

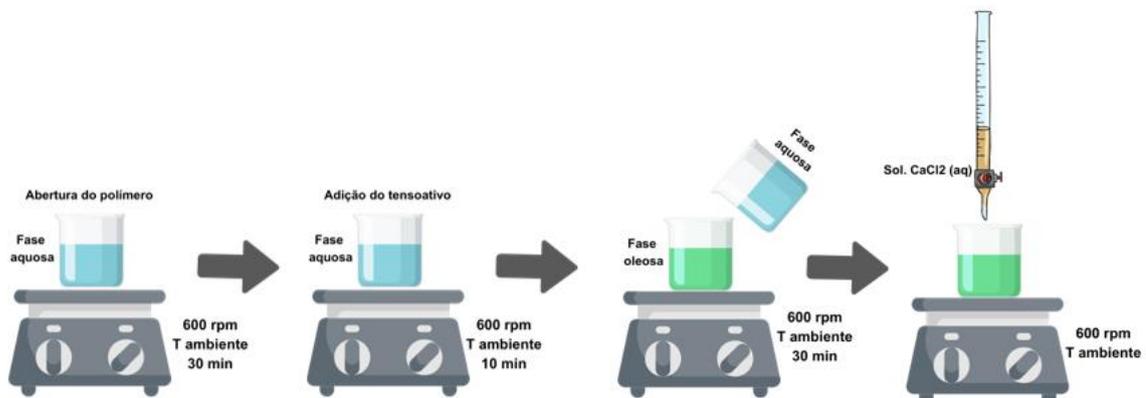
As NC foram preparadas considerando as metodologias propostas por Lertsutthiwong *et al.* (2008) e Hosseini *et al.* (2013), com modificações. Primeiramente, o alginato de sódio foi dissolvido em 20,0 mL de água destilada, utilizando-se as massas indicadas na tabela 8, e mantido sob agitação magnética (600 rpm) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado o tensoativo Tween-80, e prosseguiu-se com a agitação por 10 minutos, originando a fase aquosa, como demonstrado pela figura 22.

Tabela 8 - Composição das nanocápsulas poliméricas

Amostra	Alginato (g)	Tween-80 (g)	Solução CaCl ₂ (aq) (mL)	Mistura de óleos (g)	Volume total de água (mL)
ALG-1	0,30	0,30	10,0	0,30	20,0
ALG-1	0,15	0,30	10,0	0,15	20,0
ALG-3	0,03	0,30	10,0	0,03	20,0
ALG-4	0,30	0,03	10,0	0,30	20,0
ALG-5	0,30	1,50	10,0	0,30	20,0

Fonte: Autora.

Figura 22 - Método de preparo para as nanocápsulas poliméricas



Fonte: Autora.

A fase oleosa foi preparada utilizando a mistura de óleos (150,0 mg de OM + 150,0 mg de OP) dissolvida em 150,0 µL de etanol. As NC foram preparadas vertendo

a fase aquosa na fase oleosa e agitando o sistema à 600 rpm, durante 30 minutos. Após a emulsificação, 10,0 mL de solução aquosa de CaCl_2 0,006 g/mL foram adicionados lentamente à emulsão, agitando à 600 rpm, para reticulação do alginato. Após o preparo, as amostras foram fotografadas e armazenadas à temperatura ambiente, até o momento das análises subsequentes.

2.2.3. Caracterização físico-química das nanocápsulas

O tamanho das partículas foi determinado pelo método de espalhamento dinâmico de luz (DLS) utilizando equipamento Zetasizer (Nano-Zs, Malvern Instruments). As amostras foram diluídas 10 vezes com água deionizada e as medições foram realizadas a 25°C. As medições foram feitas em triplicata com 3 varreduras por amostra (LERTSUTTHIWONG, NOOMUN, *et al.*, 2008).

O potencial zeta foi determinado pela medição da mobilidade eletroforética das nanopartículas utilizando um equipamento Zetasizer de espalhamento dinâmico de luz (DLS) (Nano-Zs, Malvern Instruments). As amostras foram diluídas 10 vezes com água deionizada e as medições foram feitas em triplicata com 3 determinações para cada uma (LERTSUTTHIWONG, NOOMUN, *et al.*, 2008).

A eficiência EE % foi calculada seguindo o procedimento descrito no item 2.2.4, do Capítulo 1, com modificações. A amostra de NC foi centrifugada à 5.000 rpm, durante 10 minutos e o comprimento de onda utilizado para análise do sobrenadante foi 274 nm.

2.2.4. Avaliação do efeito protetor do sistema ALG-1 aplicados em frutas e sementes

Inicialmente, as frutas morango e goiaba e sementes de abóbora foram higienizadas com água de torneira e sabão neutro. Em seguida, as amostras foram revestidas com uma fina camada da formulação ALG-1, que foi espalhada na superfície da fruta/semente com o auxílio de um pincel. As amostras foram armazenadas a temperatura ambiente, em ambiente aberto e luz natural, durante 18 dias, visando o acompanhamento do envelhecimento delas. Amostras não revestidas foram utilizadas como controle. As frutas morango e goiaba, bem como as sementes

de abóbora, foram selecionados para o estudo devido à sua suscetibilidade a microrganismos e curto prazo de validade.

2.2.5. Análise estatística

Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey. Em todos os casos, um valor $p < 0,05$ indica significância estatística.

3. Resultados e discussão

3.1. Preparo das nanopartículas

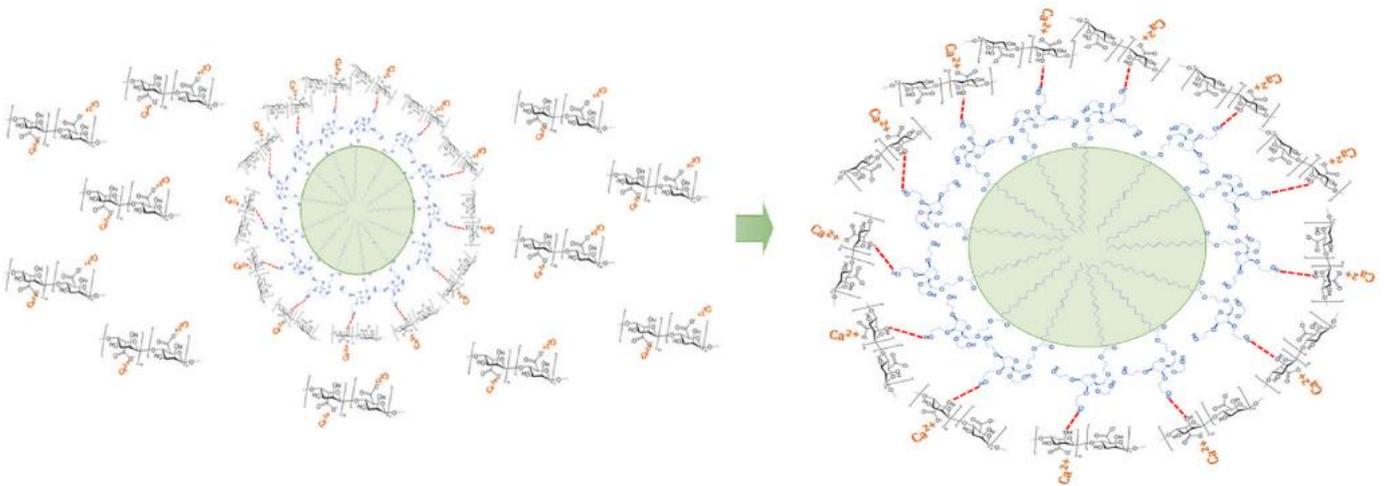
De acordo com Lertsutthiwong *et al.* (2008) e Hosseini *et al.* (2013), os métodos convencionais aplicados na produção de NC baseiam-se na deposição de um polímero ao redor das gotículas da emulsão. Neste método clássico, a fase aquosa (composta de água, polímero e tensoativo) é lentamente vertida sobre a fase oleosa (ingrediente ativo lipofílico + solvente orgânico) e, em seguida, sonicada visando a geração de uma emulsão óleo em água. Finalmente, o agente reticulante é lentamente adicionado à emulsão dando origem uma rede polimérica reticulada ao redor das gotículas (PAQUES, LINDEN e RIJN, 2014).

Neste trabalho, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa e, em seguida, a mistura foi homogeneizada utilizando um agitador magnético, à 600 rpm. Por fim, solução de cloreto de cálcio foi adicionada lentamente ao sistema, com o auxílio de uma bureta, seguindo o método convencional de reticulação. A adição da fase aquosa sob a fase oleosa e a utilização do agitador magnético para homogeneizar o sistema foram escolhidos para diminuir o tempo e os custos de processo, pensando no possível escalonamento do processo. Além disso, o uso do OP foi motivado visando o aumento da lipofilicidade da fase oleosa, a fim de favorecer a formação da emulsão, em combinação com o OM.

A figura 23 representa a estrutura físico-química das NC produzidas neste trabalho. O núcleo oleoso, composto pela mistura de óleos (OM + OP 1:1 v/v), demonstra-se estabilizado por Tween-80, formando uma emulsão óleo em água, na qual a gota de óleo constitui o centro da partícula. As cadeias alifáticas do tensoativo interagem com o óleo por forças hidrofóbicas (dipolo-dipolo, Van der Waals). A cabeça

polar do tensoativo permanece na interface com a água e o núcleo oleoso, expondo os grupos hidroxila do tensoativo na superfície da gota, que interagem estericamente com as cadeias de alginato. A reticulação física, também chamada de geilificação, é o resultado da interação entre cargas negativas das macromoléculas de alginato com os cátions divalentes de cálcio (Ca^{2+}). A densidade das ligações cruzadas aumenta as propriedades mecânicas do meio, o que pode aumentar a viscosidade da emulsão, de acordo com o aumento da concentração de alginato.

Figura 23 - Estrutura físico-química das nanocápsulas de alginato com núcleo oleoso



Fonte: Autora.

A figura 24 mostra as formulações de NC, que mantiveram-se estáveis após 3 meses de armazenamento, não apresentando separação de fases.

Figura 24 - Amostras após 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente



Fonte: Autora.

As análises de DLS, mostradas graficamente na figura 25, indicaram que o aumento da concentração de tensoativo ocasionou o aumento do tamanho de partícula, conforme mostrado na tabela 2 e figura 3 A. De acordo com Kroll *et al.* (2022), o tamanho de partícula aumenta com o aumento da concentração do tensoativo não-iônico, como resultado da automontagem das micelas no sistema (KROLL, BENKE, *et al.*, 2022).

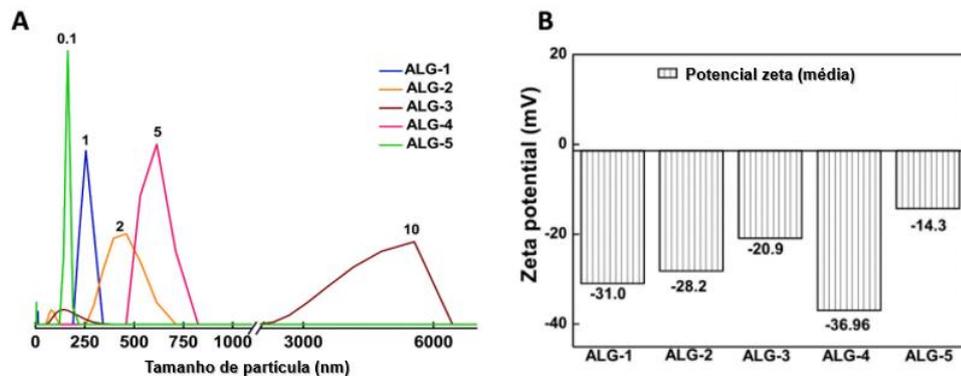
Como mostrado pela figura 3B, os valores de potenciais zetas relacionam-se com a concentração de alginato, de modo que o aumento da concentração de alginato ocasiona o aumento do potencial zeta, como pode ser observado nas amostras ALG-1 (concentração de alginato = 1,0 % e potencial zeta = - 31,0 mV), ALG -2 (concentração de alginato = 0,5 % e potencial zeta = - 28,2 mV) e ALG-3 (concentração de alginato = 0,1 % e potencial zeta = - 20,9 mV). Estes resultados corroboram com o trabalho de Lertsutthiwong *et al.* (2008), considerando uma mesma concentração de tensoativo. Além disso, observa-se que o aumento na concentração do tensoativo diminui os valores do potenciais zetas, como mostrado para ALG-4 (Tween 80 = 0,1 %p e potencial zeta = -36,9 mV) e ALG-5 (Tween 80 = 5,0 % e potencial zeta = - 14,3 mV), um comportamento típico de tensoativos não-iônicos (LERTSUTTHIWONG, NOOMUN, *et al.*, 2008; ZHAO, CUI, *et al.*, 2020). De acordo com Mora-Huertas *et al.* (2010), o potencial zeta de nanocápsulas é dependente da natureza química do polímero, do tensoativo e do pH do meio, de modo que, valores de potenciais zetas entre - 25,0 e - 30,0 mV conferem boa estabilidade ao sistema devido a alta barreira de energia entre as partículas.

A amostra ALG-1 foi escolhida para ser utilizada nos próximos testes devido à distribuição de tamanho de partícula (244,3 nm). Cadena *et al.* (2018) relatou que o ajuste de tamanho de partícula é essencial para o controle ou prevenção da internalização dos nanossistemas na planta, de modo que partículas de tamanho inferior a 8 nm são capazes de penetrar na célula (CADENA, PRESTON, *et al.*, 2018). A faixa de tamanho de partícula escolhida (> 100 nm) apresenta baixo risco de penetração no tecido (BECK, GUTERRES e POHLMANN, 2011).

Tabela 9 - Teores de polímero e tensoativo e impacto no tamanho de partícula

Amostra	Concentração de polímero (g/mL)	Concentração de tensoativo (g/mL)	Proporção de tensoativo:polímero	Tamanho de partícula (nm)	Desvio padrão
ALG-1	0,010	0,010	1,0	244,3±0,5	66,7
ALG-2	0,005	0,010	2,0	509,2±0,5	138,6
ALG-3	0,001	0,010	10,0	3975,0±0,5	1083,0
ALG-4	0,010	0,050	5,0	589,7±0,5	160,6
ALG-5	0,010	0,001	0,1	157,3±0,5	42,8

Fonte: Autora.

Figura 25 - A) Variação do tamanho de partícula em função da concentração de tensoativo B) Potencial zeta

Fonte: Autora.

Segundo Yang *et al.* (2018), os óleos vegetais são fontes de ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis (YANG, ZHANG, *et al.*, 2018). Murthy *et al.* (2021) avaliou a composição do óleo extraído das sementes de *Cucumis sativus L.* identificando minerais (potássio, zinco e manganês). Foi detectada a presença de compostos fenólicos, flavonóides, taninos, ácido fítico e ácido oxálico, classificados como antioxidantes. Os ácidos graxos linoleico, palmítico, oleico e esteárico apareceram como gorduras predominantes (MURTHY, DEWIR, *et al.*, 2021). Dutta (2018) também identificou a presença dos ácidos graxos linoleico, oleico, palmítico e esteárico como principais componentes do óleo de semente de pepino.

Yasin *et al.* (2021) relatou que o OM é composto cerca de 100 substâncias diversas, incluindo monoterpenos, sesquiterpenos, álcoois, fenilpropanóides e metil eugenol. Yu *et al.* (2015) e Groot e Schmidt (2016) descreveram que os principais componentes do OM consistem em terpinen-4-ol e 1,8-cineol, terpenos responsáveis

pelo efeito antimicrobiano. Entretanto, a composição dos OE pode variar, dependendo do ambiente de cultivo da planta originária e estresses bióticos e abióticos (MAES, BOUQUILLON e FAUCONNIER, 2019).

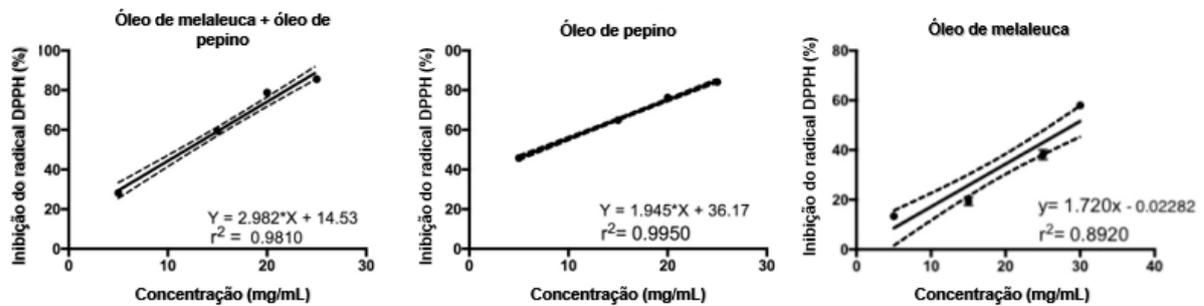
3.2. Eficiência de encapsulação

A amostra ALG-1 apresentou uma eficiência de encapsulação de 85,48 %, indicando que o método de preparo e a composição foram adequados para o carregamento de partículas com a mistura de óleos. A alta EE % tende gerar um sistema com desempenho de liberação superior, uma vez que quase toda a substância ativa foi incorporada nas nanocápsulas, sendo, portanto, regidas por um comportamento de liberação única, com pouca influência da contraparte livre na matriz. Oliveira *et al.* (2014) e Ahamad *et al.* (2006) demonstraram EE % entre 50,0 e 90,0 %, considerando sistemas semelhantes. De acordo com Mora-Huertas *et al.* (2010), a eficiência de encapsulação de nanocápsulas é determinada pela natureza química do princípio ativo, em particular a polaridade, de modo que princípios ativos lipofílicos atingem maiores EE %, em comparação aos princípios ativos hidrofílicos, cujas EE % não ultrapassam 10,0 %.

3.3. Potenciais antioxidantes e antimicrobianos

Os potenciais antioxidantes das amostras dos óleos de melaleuca e pepino livres e combinados foram abordados graficamente pela figura 26. Como mencionado no capítulo 1, o método espectrofotométrico para determinação da atividade antioxidante utiliza o DPPH, radical livre estável com um elétron de valência desemparelhado, que possui cor violeta e absorção na região de 515 nm. Quando a solução de DPPH interage com agentes antioxidantes, o radical é reduzido e a cor violeta é perdida. A curva de calibração é aplicada no cálculo do IC₅₀, que corresponde a concentração antioxidante capaz de inibir 50,0 % da atividade do radical DPPH (CHIARI, TROVATTI, *et al.*, 2014) (CHIARI, SEVERI, *et al.*, 2012). Os valores médios de IC₅₀ para os óleos de melaleuca, pepino e melaleuca + pepino foram 24,42 ± 0,41 mg/mL, 7,17 ± 0,08 mg/mL e 11,89 ± 0,19 mg/mL, respectivamente.

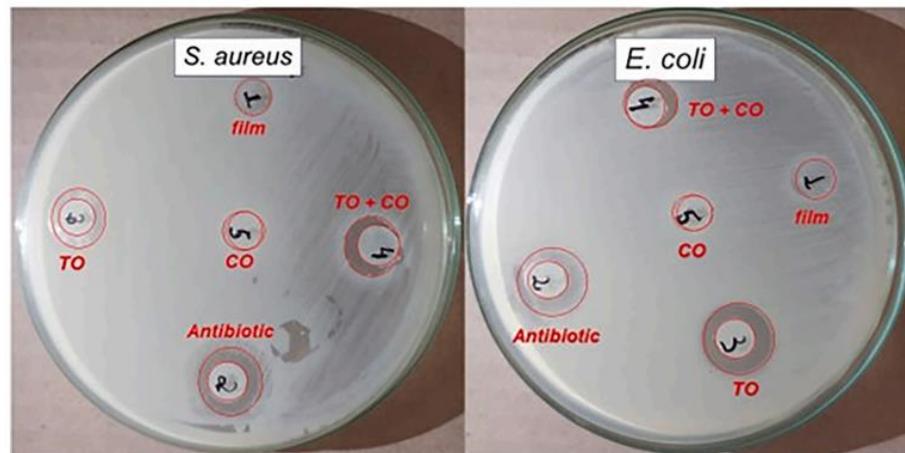
Figura 26 - Atividade antioxidante do óleo de pepino + óleo de melaleuca, óleo de pepino livre e óleo de melaleuca livre



Fonte: Autora.

Os potenciais antimicrobianos dos óleos livres e sua associação foram validados utilizando o ensaio de difusão em placa de ágar contra *E. coli* e *S. aureus*, como mostrado pela figura 27.

Figura 27 - Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro. TO = óleo de melaleuca, CO = óleo de pepino



Fonte: Autora.

O óleo de melaleuca foi capaz de inibir o crescimento de ambos os microrganismos, enquanto o óleo de pepino não impactou no crescimento das bactérias. A mistura de óleos (óleo de melaleuca + óleo de pepino) apresentou um halo de inibição menor que o óleo de melaleuca, correspondente à sua atividade na mistura, considerando a falta de contribuição do óleo de pepino. Além disso, os resultados mostraram maior inibição das bactérias Gram-negativas pelo óleo de melaleuca, em relação ao controle positivo. Esta alta atividade inibitória do óleo de melaleuca torna este óleo promissor para aplicação no controle de patógenos.

Os resultados de atividade antioxidante e antimicrobiana determinados neste trabalho corroboram com resultados mostrados na literatura, de modo que o óleo de melaleuca apresentou valores de IC₅₀ 48,35 µg/mL e 10,0 µL/mL, utilizando o radical DPPH, nos trabalhos de Zhang *et al.* (2018) e Kim *et al.* (2004), respectivamente. Enquanto Porusia e Septiyana (2021), relatou que o óleo de melaleuca foi capaz de inibir de 80,0 a 89,5 % dos radicais DPPH presentes no meio (ZHANG, GUO, *et al.*, 2018) (KIM, CHEN, *et al.*, 2004) (PORUSIA e SEPTIYANA, 2021).

Zhang *et al.* (2018) e Begun *et al.* (2019) demonstraram a inibição do crescimento de *S. aureus* e *E. coli*, determinando a concentração mínima de óleo de melaleuca necessária para inibir o crescimento das bactérias mencionadas. Sotiroudis *et al.* (2010) relatou que o extrato aquoso de *Cucumis sativus*, a 500 µg/mL, inibiu cerca de 56,0 % dos radicais DPPH e apresentou potencial antibacteriano (SOTIROUDIS, MELLIOU, *et al.*, 2010). Com base nestes resultados, o óleo de pepino possui potencial para atuar como conservante natural nas indústrias farmacêutica, alimentícia e agrícola.

3.4. Avaliação do efeito protetor *in vivo*

A Figura 23 apresenta os resultados do efeito protetor do sistema ALG-1 aplicado no revestimento de morango, goiaba e sementes de abóbora após 6, 8 e 18 dias de armazenamento. Os resultados indicaram que o revestimento proporcionou proteção antimicrobiana, evitando o apodrecimento do morango e da goiaba. Além disso, as imagens mostram visualmente que a maturação das goiabas foi retardada, possivelmente pelo efeito antioxidante proporcionado pelo revestimento.

Liu *et al.* (2020) verificou que aplicação, via imersão, de 0,5 mM de melatonina em mangas viabilizou o retardo da maturação, a partir da avaliação dos parâmetros de firmeza, cor da polpa, níveis de β-caroteno, teor de sólidos solúveis e acidez titulável. Na agricultura, a melatonina vem sendo associada a capacidade de inibição de radicais livres, ativadora do sistema antioxidante e inibidora da síntese de etileno, contribuindo para o retardo da maturação de frutas como uvas, mangas e bananas (LIU, HUANG, *et al.*, 2020). Giménez *et al.* (2016) avaliou o efeito da aplicação pós-colheita do salicilato de metila (composto fenólico antioxidante) em cereja doce, durante 20 dias de armazenamento, e constatou que além da melhora do *shelf-life*, por meio da redução do amolecimento, perdas de acidez e aumento teor de

compostos bioativos, em comparação ao controle. O retardo da maturação foi atribuído ao aumento do teor de compostos fenólicos, antocianinas, catalase, peroxidase, superóxido dismutase e ascorbato peroxidase, responsáveis pela eliminação de espécies reativas de oxigênio associadas ao amadurecimento e senescência (GIMÉNEZ, VALVERDE, *et al.*, 2016) (VALERO, DÍAZ-MULA, *et al.*, 2011). Zhu *et al.* (2021) demonstrou que o ácido rosmarínico, um composto antioxidante, retardou o amadurecimento de tomates a partir da inibição da produção de etileno e da supressão da degradação de sacarose e ácido málico. Além disso, os tomates tratados com ácido rosmarínico apresentaram maiores teores de aminoácidos (ácido aspártico, serina, tirosina e prolina) e fortaleceu o sistema antioxidante (ZHU, WU, *et al.*, 2021). Os trabalhos mencionados abordam a ação de compostos antioxidantes sob o retardo da maturação de frutas e vegetais, diante disso, acredita-se que o retardo da maturação observado neste trabalho está associado ao potencial antioxidante dos óleos avaliados.

O uso princípios ativos nanoencapsulados vêm sendo relatados, visando o aumento da vida útil de produtos naturais, como carnes, sementes e frutas (HU, WANG, *et al.*, 2015) (RAHNEMOON, SARABI-JAMAB, *et al.*, 2021). Cai *et al.* (2021) relatou a incorporação do OE de melaleuca em nanofibras de polissacarídeos e encapsulado em nanopartículas de gliadina utilizadas no controle de *Salmonella typhimurium* em carnes suínas e avinas. O tratamento das carnes ocasionou a inibição de 97,0 % e 98,0 % do crescimento bacteriano, nas amostras de frango e porco, respectivamente. O revestimento também retardou o processo de peroxidação lipídica, mantendo a textura e a cor das carnes durante 5 dias de armazenamento (CAI, ZHANG, *et al.*, 2021).

Mohammadi, Hashemi e Hossenli (2015) demonstraram a eficácia do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* encapsulado em matriz de quitosana no prolongamento da vida útil dos pepinos em até 21 dias, *versus* 15 dias para as amostras não revestidas (MOHAMMADI, HASHEMI e HOSSEINI, 2015). Sathiyaseelan *et al.* (2021) avaliaram a conservação de pimentões vermelhos revestidos com óleo essencial de melaleuca encapsulado em matriz de quitosana, e constataram que os pimentões revestidos mantiveram sua textura e qualidade ao longo de 18 dias, à 4°C (SATHIYASEELAN, SARAVANAKUMAR, *et al.*, 2021). Mondéjar-López *et al.* (2022), avaliaram o revestimento de sementes com óleo

essencial de alho encapsulados em matriz de quitosana e observaram que o revestimento apresentou ação antifúngica contra *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum*, promoveu a emergência de plântulas (trigo, aveia e cevada) e aumentou a massa fresca da parte aérea e da raiz (MONDÉJAR -LÓPEZ, RUBIO-MORAGA, et al., 2022).

Portanto, considerando os resultados apresentados na figura 28 e comparando os resultados com os relatos descritos acima, fica evidente que o sistema desenvolvido neste trabalho mostra-se adequado para conservação de alimentos e sementes. Além disso, o OE de melaleuca abrange um amplo espectro de ação antimicrobiana.

Figura 28 - Efeito do revestimento de morangos, goiaba e sementes de abóbora após 6, 8 e 18 dias, respectivamente



Fonte: Autora.

4. Conclusão

Os resultados alcançados neste capítulo demonstraram o potencial associado ao uso de óleos naturais encapsulados na conservação de frutas e sementes. Os resultados mostraram que foi possível desenvolver um sistema nanoestruturado estável, com tamanho variando de 200,0 a 400,0 nm, com alta eficiência de encapsulação (cerca de 85,0 %), e compreender os parâmetros que influenciam na formação das nanopartículas.

Além disso, o revestimento das frutas e sementes inibiu o crescimento de microrganismos e retardou a maturação dos frutos, mostrando a eficácia do sistema desenvolvido na proteção e aumento do shelf-life. O emprego de óleos vegetais no retardo da maturação de frutos abre caminhos para novos desenvolvimentos, considerando a diversidade de óleos, oriundos de resíduos industriais, como abordado no Capítulo 1.

Por fim, é importante ressaltar que este trabalho descreveu o desenvolvimento e aplicação de um sistema nanotecnológico verde, livre de solventes orgânicos, não tóxico, biodegradável e ecologicamente correto.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

I. Artigo científico

SANTOS, C.; TROVATTI, E. Potential Application of Essential Oils-based Nanocapsules as Environmentally Friendly Biopesticides. **Current nanoscience**, 19, n. 6, 2023. 870-872.

II. Artigo científico

SANTOS, C. *et al.* 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, 2023. 1-7.

III. Produto tecnológico

SANTOS, C.; TROVATTI, E. BAZITO, A. Síntese de ésteres via catálise enzimática. 2023.

REFERENCIAS

- ADETUNJI, A. E. et al. Effects of exogenous application of five antioxidants on vigour, viability, oxidative metabolism and germination enzymes in aged cabbage and lettuce seeds. **South African Journal of Botany**, n. 137, 2021. 85-97.
- AGHDAM, M. S. et al. The language of calcium in postharvest life of fruits, vegetables and flowers. **Scientia Horticulturae**, 144, 2012. 102-115.
- AHMAD, Z. et al. Alginate Nanoparticles as Antituberculosis Drug Carriers: Formulation Development, Pharmacokinetics and. **The Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences**, 48, 2006.
- ANANDHARAMAKRISHNAN, C. **Techniques for nanoencapsulation in food ingredients**. [S.l.]: Springer, 2014.
- ARAIN, A. et al. Spectroscopic and chromatographic evaluation of solvent extracted guava seed oil. **International Journal of Food Properties**, 20, n. S1, 2017. S556–S563.
- ARCOT , Y. et al. Edible nano-encapsulated cinnamon essential oil hybrid wax coatings for enhancing apple safety against food borne pathogens. **Current Research in Food Science**, 2024. 1-16.
- AREMU , O. A. et al. Physiological role of phenolic biostimulants isolated from brown seaweed *Ecklonia maxima* on plant growth and development. **Planta**, 12 fev. 2015. 1313–1324.
- ARROYO, B. J. et al. Antimicrobial active edible coating of alginate and chitosan add ZnO nanoparticles applied in guavas (*Psidium guajava* L.). **Food Chemistry**, 309, 2020. 125566.
- AUGUSTIN, M. A.; SANGUANSRI, P. Nanostructured Materials in the Food Industry. **Advances in Food and Nutrition Research**, 58, 2009. 183-213.
- BAILLY, C.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; CORBINEAU, F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **Comptes Rendus-Biol**, 331, 2008. 806-814.
- BASSOLÉ, I. H. M.; JULIANI, H. R. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. **Molecules**, 4, 2012.
- BAWEJA, P.; KUMAR, S.; KUMAR, G. Fertilizers and Pesticides: Their Impact on Soil Health and Environment. **Soil Health**, 59, 27 maio 2020. 265-285.
- BECK, R.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. **Nanocosmetics and Nanomedicines**. 1. ed. [S.l.]: Springer, 2011.

BEGUM, H. A. et al. Antioxidant, antimicrobial activity and phytochemical analysis of the seeds extract of *Cucumis sativus* Linn, 1, 2019. 433-441.

BENINCASA, M. M. P. **Análise do crescimento de plantas: Noções básicas.** Jaboticabal: FCAV, 2003. 43 p.

BERTAGNOLLI, S. M. M. et al. Bioactive compounds and acceptance of cookies made with Guava peel flour. **Food Science and Technology**, 2, jun. 2014. 303-308.

BHUIMBAR, M. V.; DANDGE, P. B. Production of Organic Liquid Biofertilizer from Fish Waste and Study of its Plant Growth Promoting Effect. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2023. 235–243.

BOSNIĆ, T.; SOFTIĆ, D.; GRUJIĆ-VASIĆ, J. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils. **Acta Medica Academica**, 24 out. 2006. 19-22.

CADENA, M. B. et al. Enhancing cinnamon essential oil activity by nanoparticle encapsulation to control seed pathogens. **Industrial Crops and Products**, 124, 2018. 755-764.

CAI, M. et al. Application of glycyrrhiza polysaccharide nanofibers loaded with tea tree essential oil/ gliadin nanoparticles in meat preservation. **Food Bioscience**, 43, 2021. 101270.

CALVO, P.; NELSON, L.; KLOPPER, J. W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and Soil**, 08 maio 2014. 3-41.

CHIARI, B. G. et al. Assessment of the chemical profile , polyphenol content and antioxidant activity in extracts of *Psidium guajava* L. fruits. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 4, n. 5, 03 out. 2012.

CHIARI, B. G. et al. Synergistic effect of green coffee oil and synthetic sunscreen for health care application. **Industrial Crops and Products**, 52, jan. 2014. 389-393.

CHRYSARGYRIS, A. et al. Assessing the Biostimulant Effects of a Novel Plant-Based Formulation on Tomato Crop. **Sustainability**, 13 out. 2020. 8432.

COLLA, G. et al. Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. **Frontiers in Plant Science**, set. 2014. 1-6.

DALTIN, D. **Tensoativos: Química, propriedades e aplicações.** [S.l.]: Blucher, 2011.

DANAEI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, 2, 2018. 1-17.

DAS, S. et al. Angelica archangelica essential oil loaded chitosan nanoemulsion as edible coating for preservation of table grape fruit against *Botrytis cinerea* contamination and storage quality deterioration. **Postharvest Biology and Technology**, 205, 2023. 112482.

DONNO, D. et al. Improving the nutritional value of kiwi fruit with the application of agroindustry waste extracts. **Journal of applied botany and food quality**, 2013.

DUARTE, J. L. et al. Novel bioadhesive polycarbophil-based liquid crystal systems containing Melaleuca alternifolia oil as potential repellents against Aedes aegypti. **Journal of Molecular Liquids**, 314, 2020. 113626.

DUTTA, K. Physicochemical characterization of Cucumis sativus L. seed oil. **International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology**, 6, n. 5, 2018. 624-630.

ETXEBERRIA, E. et al. Determining the Size Exclusion for Nanoparticles in Citrus Leaves. **HortScience**, 6, 2016. 732–737.

FONSECA-SANTOS, B. et al. An effective mosquito-repellent topical product from liquid crystal-based tea tree oil. **Industrial Crops and Products**, 128, 2019. 488-495.

FRANZIN, S. M. et al. Métodos para avaliação do potencial fisiológico de sementes de alface. **Revista Brasileira de Sementes**, 26, n. 2, 2004. 63-69.

GALANAKIS, C. M. **Valorization of Fruit Processing By-products**. 1. ed. [S.l.]: Academic Press, 2019. 324 p. ISBN 0128171065.

GAO, F. et al. Long-lasting anti-bacterial activity and bacteriostatic mechanism of tea tree oil adsorbed on the amino-functionalized mesoporous silica-coated by PAA. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 188, 2020.

GIMÉNEZ, M. J. et al. Postharvest methyl salicylate treatments delay ripening and maintain quality attributes and antioxidant compounds of 'Early Lory' sweet cherry. **Postharvest Biology and Technology**, 2016. 102-109.

GOMES, R. S. S. et al. Eficiência de óleos essenciais na qualidade sanitária e fisiológica em sementes de feijão-fava (Phaseolus lunatus L.). **Rev. Bras. Pl. Med.**, 18, n. 1, 2015. 279-287.

GONÇALVES, D. C. et al. Use of Melaleuca alternifolia essential oil as an efficient strategy to extend the shelf life of banana fruits. **Biochemical Systematics and Ecology**, 108, 2023. 104641.

GOSWAMI, M. et al. Effect of guar gum-chitosan composites edible coating functionalized with essential oils on the postharvest shelf life of Khasi mandarin at ambient condition. **Jornal Internacional de Macromoléculas Biológicas**, 54, n. 3, 2024. 127489.

GOVINDARAJ, M. et al. Role of antioxidant in seed quality- A review. **Agricultural Reviews**, 3, 2017. 180-190.

GROOT, A. C.; SCHMIDT, E. Tea tree oil: contact allergy and chemical composition. **Contact dermatitis**, 2016. 129-194.

GUALBERTO, N. C. et al. Bioactive compounds and antioxidant activities in the agro-industrial residues of acerola (Malpighia emarginata L.), guava (Psidium guajava L.),

genipap (*Genipa americana* L.) and umbu (*Spondias tuberosa* L.) fruits assisted by ultrasonic or shaker extracti. **Food Research International**, 147, set. 2021.

GUIMARÃES, C. N.; STONE, L. F. Métodos de avaliação das condições hídricas das plantas. **EMBRABA - Comunicado técnico**, 2008. 8.

GUPTA, et al. Nanocarriers and nanoparticles for skin care and dermatological treatments. **Indian Dermatol Online Journal**, 4, 2013. 267–272.

GUPTA, I. et al. Plant Essential Oils as Biopesticides: Applications, Mechanisms, Innovations, and Constraints. **Plants**, 12, n. 16, 2023. 2916.

GUPTA, S. et al. Role of non-microbial biostimulants in regulation of seed germination and seedling establishment. **Plant Growth Regulation**, n. 97, 2022. 271–313.

GUPTA, S. et al. Chicken Feather Waste Hydrolysate as a Potential Biofertilizer for Environmental Sustainability in Organic Agriculture Management. **Waste and Biomass Valorization** , 2023.

HANGARGEKAR, S. R.; MOHANTY, P.; JAIN, A. Solid Lipid Nanoparticles: A Trending Slant for Drug Delivery System. **Asian Journal of Pharmaceutics**, 1, mar. 2021. 15-21.

HASHEMINEJAD, N.; KHODAIYAN, F. The effect of clove essential oil loaded chitosan nanoparticles on the shelf life and quality of pomegranate arils. **Food Chemistry**, 309, 2020. 125520.

HELGASON, T. et al. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). **Journal of Colloid and Interface Science**, 28 mar. 2009. 75-81.

HOROWITZ, M.; GIVELBERG, A. Toxic effects of surfactants applied to plant roots. **Pesticide Science**, 10, n. 6, 1979. 547-557.

HOSSEINI, M. S. et al. Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. **International Journal of Biological Macromolecules**, 62, 2013. 582-588.

HOU, D. Z. et al. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). **Biomaterials**, 2003. 1781–1785.

HU, J. et al. Effect of chitosan nanoparticles loaded with cinnamon essential oil on the quality of chilled pork. **LWT - Food Science and Technology**, 63, n. 1, 2015. 519-526.

IPPOLITO, A.; NIGRO, F. Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. **Crop Protection**, 19, n. 8-10, 2000. 715-723.

- JAFARI, S. M. An overview of nanoencapsulation techniques and their classification. **Nanoencapsulation technologies for the food and nutraceutical industries**, 2017. 1-34.
- JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, 196, 30 nov. 2015. 3-14.
- JEEVANANDAM, J. et al. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein journal of nanotechnology**, 2018. 1050–1074.
- JÍMÉNEZ-ARIAS , D. et al. Encapsulation with Natural Polymers to Improve the Properties of Biostimulants in Agriculture. **Plants**, 1, 22 dez. 2022.
- JIMÉNEZ-ARIAS, D. et al. Applying bioestimulants to combat water deficit in crop plants: Research and debat. **Agronomy**, 571, 2022.
- JISHA, K. C.; VIJAYAKUMARI, J.; PUTHUR, J. T. Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. **Acta Physiologiae Plantarum**, 2013. 1381–1396.
- JOGAIAH, S. et al. **Advances in Nano-Fertilizers and Nano-Pesticides in Agriculture: A Smart Delivery System for Crop Improvement**. [S.I.]: Woodhead Publishing, 2020.
- KAPOOR, S. et al. Extraction and characterization of guava seed oil: A novel industrial byproduct. **LWT - Food Science and Technology**, 132, out. 2020. 1-32.
- KARN-ORACHAI , K. et al. Surfactant effect on the physicochemical characteristics of -oryanol-containing solid lipid nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, n. 488, 22 out. 2015. 118-128.
- KATHE, N.; HENRIKSEN, B.; CHAUHAN, H. Physicochemical characterization techniques for solid lipid nanoparticles: principles and limitations. **Drug development and industrial pharmacy**, 25 abr. 2014. 2-11.
- KESRAOUI, S. et al. Direct and Indirect Effects of Essential Oils for Sustainable Crop Protection. **Plants**, 11, n. 16, 2022. 2144.
- KHERADMANDNIA, S. et al. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 6, n. 6, 2010. 753-759.
- KIM, H. J. et al. Evaluation of Antioxidant Activity of Australian Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Oil and Its Components. **Agricultural and food chemistry**, 52, n. 10, 2004.
- KISIRIKO, M. et al. Phenolics from Medicinal and Aromatic Plants: Characterisation and Potential as Biostimulants and Bioprotectants. **Molecules**, 6343, 20 out. 2021. 1-37.

KNIGHT , T. E.; HAUSEN , B. M. Melaleuca oil (tea tree oil) dermatitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 30, 1994. 423-427.

KOVAČEVIĆ, A. B. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) stabilized with polyhydroxy surfactants: Preparation, characterization and physical stability investigation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 444, 03 maio 2014. 15-25.

KROLL, P. et al. Influence of Temperature and Concentration on the Self-Assembly of Nonionic CiEj Surfactants: A Light Scattering Study. **ACS Omega**, 2022. 7057–7065.

KUMAR, N.; KUMBHAT, S. Carbon-Based Nanomaterials. **Essentials in Nanoscience and Nanotechnology**, 2016. 189 - 236.

LAI, F. et al. Artemisia arborescens L Essential Oil–Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Potential Agricultural Application: Preparation and Characterization. **AAPS PharmSciTech**, 1, 03 jan. 2006. 1-9.

LEE, W. C. et al. Antioxidant Activities of Essential Oil of Psidium guajava L. leaves. **APCBEE Procedia**, Bangkok, 2012. 86-91.

LERTSUTTHIWONG, P. et al. Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. **Carbohydrate Polymers**, 74, 2008. 209-214.

LERTSUTTHIWONG, P.; ROJSITTHISAK, P.; NIMMANNIT, U. Preparation of turmeric oil-loaded chitosan-alginate biopolymeric nanocapsules. **Materials Science and Engineering: C**, 19, 2009. 856-860.

LIM, S. F.; MATU, S. U. Utilization of agro-wastes to produce biofertilizer. **International Journal of Energy and Environmental Engineering**, 6, n. 31, 2015. 31-35.

LIM, S. J.; KIM, C. K. Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid. **Int J Pharm**, 22 ago. 2002. 135-146.

LIMA, A. S. et al. EFEITO DO BIOESTIMULANTE STIMULATE® NA GERMINAÇÃO E NO VIGOR DE SEMENTES DE PEPINO, 17, n. 2, 2018. 101-112.

LIU, S. et al. Delay of ripening and softening in ‘Guifei’ mango fruit by postharvest application of melatonin. **Postharvest Biology and Technology**, 2020. 111136.

MACEDO, W. R. et al. Physiologic and metabolic effects of exogenous kojic acid and tyrosol, chemicals produced by on wheat seeds germination. **Natural Product Research**, 20 ago. 2017.

MAES, C.; BOUQUILLON , S.; FAUCONNIER, M. L. Encapsulation of Essential Oils for the Development of Biosourced Pesticides with Controlled Release: A Review. **Molecules**, 29, n. 14, 2019. 15.

MAJEE, S. et al. Bio-organic fertilizer production from industrial waste and insightful analysis on release kinetics. **Journal of Environmental Management**, 325, 01 jan. 2023. 116378.

MARTINS, S. et al. Potential impacts of guava seed meal on piglet feeding as a dietary fibre alternative. **Journal of Applied Animal Research**, 49, n. 1. 330-339.

MAZROU, R. M. Moringa leaf extract application as a natural bioestimulant improves the volatile oil content, radical scavenging activity and total phenolics of coriander. **Journal of medicinal plants studies**, 5, 25 ago. 2019. 45-51.

MEHANNA, M. M. et al. Superiority of microemulsion-based hydrogel for non-steroidal anti-inflammatory drug transdermal delivery: a comparative safety and anti-nociceptive efficacy study. **International Journal of Pharmaceutics**, 2022. 121830.

MEHNER, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2001. 165–196.

MISHRA, B.; BPHARM, B. P. P.; MPHARM, S. T. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 6, n. 1, 2010. 9-24.

MISHRA, V. et al. Solid Lipid Nanoparticles: Emerging Colloidal Nano Drug Delivery Systems. **Pharmaceutics**, 4, 18 out. 2018. 1-21.

MITTAL, D. et al. Nanoparticle-Based Sustainable Agriculture and Food Science: Recent Advances and Future Outlook. **Front. Nanotechnol**, 04 dez. 2020.

MOHAMMADI, A.; HASHEMI, M.; HOSSEINI, S. M. Chitosan nanoparticles loaded with Cinnamomum zeylanicum essential oil enhance the shelf life of cucumber during cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, 110, 2015. 203-213.

MONDÉJAR-LÓPEZ, M. et al. Chitosan nanoparticles loaded with garlic essential oil: A new alternative to tebuconazole as seed dressing agent. **Carbohydrate Polymers**, 277, 2022. 118815.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, 385, 2010. 113–142.

MORGAN, J. et al. Measurement of physical and mechanical properties of beeswax. **Materials Science and Technology**, 18, 19 jul. 2013. 463-467.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 50, n. 1, 03 jul. 2000. 161-177.

MURTHY, H. N. et al. Comparative physicochemical analysis of seed oils of wild cucumber (*Cucumis sativus* var. *hardwickii* (Royle) Alef.), cucumber (*Cucumis sativus* L. var. *sativus*), and gherkin (*Cucumis anguria* L.). **South African Journal of Botany**, 2021. 1-6.

NAKASATO, D. Y. et al. Evaluation of the effects of polymeric chitosan/tripolyphosphate and solid lipid nanoparticles on germination of Zea mays, Brassica rapa and Pisum sativum. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 28 ago. 2017.

NAYIK, G. A.; GULL, A. **Antioxidants in Vegetables and Nuts - Properties and Health Benefits**. 1. ed. [S.l.]: Springer, v. 572, 2020.

NOBBMANN, U. et al. Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, 24, 2007. 117-128.

NOLLET, L. M. L.; MIR, S. **Biopesticides handbook**. 2. ed. [S.l.]: Taylor & Francis, 2023. 334 p. ISBN 9781003265139.

OLIVEIRA, E. F.; PAULA, H. C. B.; PAULA, R. C. M. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 113, 2014. 146-151.

PANNACCI, E. et al. Mugwort (*Artemisia vulgaris* L.) Aqueous Extract: Hormesis and Biostimulant Activity for Seed Germination and Seedling Growth in Vegetable Crops. **Agriculture**, 9, 28 ago. 2022.

PAPADOPOULOS, G.; BOSKOU, D. Antioxidant Effect of Natural Phenols on Olive Oil. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, 68, n. 9, set. 1991. 669-671.

PAQUES, J. P.; LINDEN, E. V. D.; RIJN, C. J. M. D. Preparation methods of alginate nanoparticles. **Advances in colloid and interface science**, 209, 2014. 163-171.

PAVELA, R.; BANELLI, G. Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. **Trends in plant science**, 21, n. 12, 2016. 1000-1007.

PENG, X. et al. Recycling municipal, agricultural and industrial waste into energy, fertilizers, food and construction materials, and economic feasibility: a review. **Environmental Chemistry Letters**, 07 jan. 2023. 765–801.

PEREIRA, A. E. S. et al. Nanotechnology Potential in Seed Priming for Sustainable Agriculture. **Nanomaterials**, 267, 01 20 2021.

PÉREZ, M.; DOMINGUEZ-LÓPEZ, I.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. The Chemistry Behind the Folin–Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. **J Agric Food Chem**, 71, n. 46, 2023. 17543–17553.

PIRES, J. S. et al. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método de Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, 2017. 1-5.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European journal of medicinal chemistry**, 95, n. 5, 2015. 55-74.

PORUSIA, M.; SEPTIYANA, D. Larvicidal activity of Melaleuca leucadendra leaves extract against Aedes aegypti. **Caspian Journal of Environmental Sciences**, 19, n. 2, 2021. 277-285.

POURREZA, N. Phenolic Compounds as Potential Antioxidant. **Jundishapur J Nat Pharm Prod**, 4, 2013. 149-150.

PRASAD, N. B. L.; AZEEMODDIN, G. Characteristics and Composition of Guava (Psidium guajava L.). **Journal of the American Oil Chemist's Society**, 01 abr. 1994. 457-458.

PRASAD, R. D. et al. A Review on Modern Characterization Techniques for Analysis of Nanomaterials and Biomaterials. **ES Energy & Environment**, 23, 2024. 1087.

PROKIC, D. et al. The role of circular economy in food waste management in fulfilling the United Nations sustainable development goals. **Alimentaria**, 2022. 51–66.

PROMMABAN, A. et al. Linoleic acid-rich guava seed oil: Safety and bioactivity. **Phytotherapy research**, 33, n. 10, 22 jul. 2019. 2749-2764.

PROMMABAN, A. et al. Phytosterol, Lipid and Phenolic Composition, and Biological Activities of Guava Seed Oil. **Molecules**, 25, n. 2474, 27 maio 2020.

RAHNEMOON, P. et al. Nano-encapsulation of pomegranate (Punica granatum L.) peel extract and evaluation of its antimicrobial properties on coated chicken meat. **Food Bioscience**, 43, 2021. 101331.

RAMADAN, M. F. **Fruit Oils: Chemistry and Functionality**. 1. ed. [S.l.]: Springer Cham, 2019. ISBN 978-3-030-12473-1.

ROCHA, L. **CNN Brasil**, 2022. Disponível em: <[SAATH, K. C. O.; FACHINELLO, A. L. Crescimento da Demanda Mundial de Alimentos e Restrições do Fator Terra no Brasil. **RESR**, 56, n. 2, jul. 2018. 195-212.](https://www.cnnbrasil.com.br/saude/populacao-mundial-se-aproxima-de-8-bilhoes-numero-deve-ser-atingido-na-terca-15/#:~:text=Segundo%20a%20ONU%2C%20a%20popula%C3%A7%C3%A3o,populoso%20do%20mundo%20em%202023.>. Acesso em: 01 dez. 2022.</p></div><div data-bbox=)

SAMOATHKUMAR, K.; TAN, K. X.; LOO, S. C. J. Developing nano-delivery systems for agriculture and food applications with nature-derived polymers. **iScience**, 23, n. 5, 22 maio 2022.

SANTOS, C. et al. 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, 2023. 1-7.

SANTOS, C.; TROVATTI, E. Potential Application of Essential Oils-based Nanocapsules as Environmentally Friendly Biopesticides. **Current nanoscience**, 19, n. 6, 2023. 870-872.

SATHIYASEELAN, A. et al. Chitosan-tea tree oil nanoemulsion and calcium chloride tailored edible coating increase the shelf life of fresh cut red bell pepper. **Progress in Organic Coatings**, 151, 2021. 106010.

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

SEMERDJIEVA, I. et al. Phytochemical composition and biopesticidal potential of Pinus mugo Turra essential oil. **Industrial Crops and Products**, 209, 2024. 118019.
SHAH, R. et al. **Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Stability**. 1. ed. [S.I.]: Springer, 2014. 97 p.

SHAH, R. et al. **Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Stability**. [S.I.]: Springer, 2015. 106 p. ISBN 3319107100.

SHIRVANI, A. et al. Fabrication of edible solid lipid nanoparticle from beeswax/propolis wax by spontaneous emulsification: Optimization, characterization and stability. **Food Chemistry**, 387, 01 set. 2022.

SILVA, G. H. et al. Tyrosol, a phenolic compound from Phomopsis sp., is a potential biostimulant in soybean seed treatment. **Phytochemistry Letters**, 2021. 20-44.

SILVA, M. J. R. et al. Formação de mudas de melancia em função de diferentes concentrações e formas de aplicação de mistura de reguladores vegetais. **Scientia plena**, 10, n. 10, 2014. 1-9.

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

SOLEIMANIAN, S. et al. Formulation and characterization of novel nanostructured lipid carriers made from beeswax, propolis wax and pomegranate seed oil. **Food Chem**, 01 abr. 2018. 1-36.

SOTIROUDIS, G. et al. Chemical analysis, antioxidant and antimicrobial activity of three greek cucumber (Cucumis sativus) cultivars. **Journal of food biochemistry**, 2010.

SRIVASTAVA, S.; BHARGAVA, A. **Green Nanoparticles: The Future of Nanobiotechnology**. 1. ed. [S.I.]: Springer, 2022. 352 p.

SRIVASTAVA, S.; BHARGAVA, A. **Green Nanoparticles: The Future of Nanobiotechnology**. 1. ed. Singapore: Springer, 2020. 352 p.

STRASSBURGER, A. S. **Crescimento, partição de massa seca e produtividade do morangueiro em sistema de cultivo orgânico**. Pelotas: Tese, 2010.

TADROS, T. F. **Emulsion Formation and Stability**. [S.l.]: Wiley, 2013.

TAHA, R. S. et al. Elevating tolerance of drought stress in *Ocimum basilicum* using pollen grains extract; a natural biostimulant by regulation of plant performance and antioxidant defense system. **South African Journal of Botany**, 128, 12 nov. 2019. 42-63.

TAYLOR, T. M. et al. Liposomal Nanocapsules in Food Science and Agriculture. **Critical reviews in food science and nutrition**, 2007. 587-605.

THAKUR, R. K. et al. Nanotechnology for Agricultural and Environmental Sustainability. **Survival Strategies in Cold-adapted Microorganisms**, 09 dez. 2021. 413-424.

THAKUR, R. K. et al. Nanotechnology for Agricultural and Environmental Sustainability. **Survival strategies in cold-adapted microorganisms**, 2021. 413-424.

TØNNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Alginate in Drug Delivery Systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 28, n. 6, 2002.

TULLOCH, A. P. The composition of beeswax and other waxes secreted by insects. **Lipids**, fev. 1970. 247–258.

USMAN, M. et al. Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. **Science of The Total Environment**, 15 jun. 2020.

VALERO, D. et al. Postharvest Treatments with Salicylic Acid, Acetylsalicylic Acid or Oxalic Acid Delayed Ripening and Enhanced Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity in Sweet Cherry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 10, 2011. 5483–5489.

VELKOSKA-MARKOVSKA, L. et al. Development and Validation of RRLC–UV Method for Determination of Chlorogenic Acid in Green Coffee. **AKJournals**, 2020. 34-38.

VERO, S. et al. Microbial Biopesticides: Diversity, Scope, and Mechanisms Involved in Plant Disease Control. **Diversity**, 3, 2023. 457.

VIJAYAKUMAR, M. D. et al. Evolution and Recent Scenario of Nanotechnology in Agriculture and Food Industries. **Journal of Nanomaterials**, 11 jul. 2022. 17.

WARRIE, P. Y. et al. Phytotoxicity of Essential Oils: Opportunities and Constraints for the Development of Biopesticides. A Review. **Foods**, 9, 2020. 1291.

WEBER, S.; ZIMMER, A.; PARDEIKE, J. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: a review of the state of the art. **Eur J Pharm Biopharm**, 1, jan. 2014. 7-22.

XING, Y. et al. Antimicrobial Nanoparticles Incorporated in Edible Coatings and Films for the Preservation of Fruits and Vegetables. **Molecules**, 9, 2019. 1695.

YANG, R. et al. A review of chemical composition and nutritional properties of minor vegetable oils in China. **Trends in Food Science & Technology**, 74, 2018. 26-32.

YEH, K. W. et al. Release model of alginate microcapsules containing volatile tea-tree oil. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 1-3, 2011. 152-155.

YUE, Q. et al. Optimized preparation of tea tree oil complexation and their antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Postharvest Biology and Technology**, 2020. 111114.

ZHANG , H.; LI, Y.; ZHU, J. K. Developing naturally stress-resistant crops for a sustainable agriculture. **Nat Plants**, 04 dez. 2018. 989-996.

ZHANG, H. et al. Fabrication of microencapsulated phase change materials based on n-octadecane core and silica shell through interfacial polycondensation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 1-3, 2011. 104-117.

ZHANG, X. et al. In Vitro Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil. **BioMed Research International**, 2018. 1-8.

ZHAO, Z. et al. Preparation, characterization, and evaluation of antioxidant activity and bioavailability of a self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for buckwheat flavonoids. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, 52, n. 11, 2020. 1265–1274.

ZHU, C. et al. Rosmarinic Acid Delays Tomato Fruit Ripening by Regulating Ripening-Associated Traits. **Antioxidants**, 10, n. 11, 2021. 1821.