



**HENRIQUE GIACOMINI GOMES**

**NANOPARTÍCULAS DE PCL CARREGADAS  
COM ÓLEO ESSENCIAL DE EUCALIPTO:  
UM FUNGICIDA EFICIENTE E NATURAL**

**LAVRAS – MG**

**2022**

**HENRIQUE GIACOMINI GOMES**

**NANOPARTÍCULAS DE PCL CARREGADAS COM ÓLEO ESSENCIAL  
DE EUCALIPTO:  
UM FUNGICIDA EFICIENTE E NATURAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade Federal de Lavras, como parte  
das exigências do programa de graduação da  
Universidade Federal de Lavras, para a obtenção do  
título de bacharel em Engenharia de Materiais

Prof. Dr. Juliano Elvis Oliveira  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2022**

## RESUMO

O café é uma *commodity* agrícola e uma das principais cultivaras no mundo. Sua contaminação pelo fungo *Hemileia vastatrix* tem causado severos impactos econômicos para os produtores. A incorporação de óleos essenciais em nanopartículas biodegradáveis de poli( $\epsilon$ -caprolactona) tem se mostrado uma prática efetiva para a promoção da liberação controlada de constituintes bioativos, além de atuar como camada de proteção contra degradação por fatores externos. O objetivo deste trabalho foi extrair e caracterizar óleos essenciais de *E. citriodora*, *E. grandis* e *E. camaldulensis*, produzir e caracterizar nanopartículas incorporadas com estes óleos e avaliar as atividades antifúngicas *in vitro* e *in vivo*, dos bio-constituintes livres e encapsulados. Todos os óleos essenciais foram extraídos mediante técnica de hidrodestilação, usando um aparato Cleverger modificado. A caracterização química dos produtos naturais foi realizada por meio de cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS) e detector por ionização em chama (GC-FID). A ação dos princípios ativos contra o fungo *Hemileia vastatrix in vitro* foi realizada pela determinação da concentração inibitória mínima. O efeito preventivo e curativo *in vivo* dos princípios ativo sobre o crescimento de *H. vastatrix* em plantas de café foi determinado em estufa. Para caracterização das nanopartículas foram realizados ensaios de potencial zeta, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e espalhamento dinâmico de luz (DLS). Os principais constituintes do óleo essencial de *E. citriodora* foram citronelal, citronelol e isopulegol; os de *E. grandis* são  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol e  $\alpha$ -terpineol; e os de *E. camaldulensis*, 1,8-cineol, limoneno e  $\alpha$ -pineno. A atividade antifúngica contra *H. vastatrix* foi observada para todos os óleos e as nanopartículas com os bioativos incorporados. As nanopartículas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) carregadas com os óleos essenciais das espécies *E. citriodora*, *E. camaldulensis* e *E. grandis* apresentaram tamanhos de 429 nm, 294 nm e 328 nm, além de cargas superficiais de -12 mV, -9 mV e -7mV, respectivamente. A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier provou a encapsulação dos óleos essenciais pela matriz polimérica de poli( $\epsilon$ -caprolactona). Os testes *in vitro* e *in vivo* mostraram um aumento e a prolongação dos efeitos dos óleos como bio-fungicidas contra a ferrugem do café.

**Palavras-chave:** nanopartículas poliméricas, café, liberação controlada, *Hemileia vastatrix*, óleos essenciais

## LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 – Lista com alguns produtos nanotecnológicos para a agricultura comercializados no ano de 2017 . . . . .	12
Figura 4.2 – Frequentes caminhos para a perda e contaminação por agrotóxicos . . . . .	13
Figura 4.3 – Representação esquemática das técnicas de produção de nanopartículas poliméricas . . . . .	14
Figura 4.4 – Preparação de nanopartículas poliméricas pela técnica de emulsão- evaporação do solvente . . . . .	15
Figura 5.1 – Fluxo resumo dos procedimentos realizados durante o projeto de pesquisa . . . . .	19
Figura 5.2 – Sistema utilizado para o gotejamento da dispersão polimérica	22
Figura 5.3 – Etapas realizadas para o preparo do meio de cultivo . . . . .	24
Figura 5.4 – Escala diagramática para a avaliação da severidade de ferrugem no café . . . . .	25
Figura 6.1 – Composição química dos óleos essenciais extraídos das folhas de <i>E. citriodora</i> , <i>E. camaldulensis</i> e <i>E. grandis</i> . . . . .	28
Figura 6.2 – Espectros de infravermelho com transformada de Fourier para as nanopartículas (NP) e óleos isolados <i>E. citriodora</i> (OC), <i>E. grandis</i> (OG), <i>E. camaldulensis</i> (OCM) e encapsulados	29
Figura 6.3 – Atividade antifúngica <i>in vitro</i> das formulações estudadas . . . . .	32
Figura 6.4 – Comparação das esporulações de <i>H. vastatrix</i> na ausência e presença dos agentes ativos em diferentes concentrações . . . . .	33
Figura 6.5 – Ação preventiva dos óleos essenciais livres e nano-encapsulados referente as espécies <i>E. camaldulensis</i> , <i>E. citriodora</i> e <i>E. grandis</i> . . . . .	34
Figura 6.6 – Efeito curativos dos três óleos livres e encapsulados . . . . .	35

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> . . . . .	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA</b> . . . . .	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> . . . . .	<b>9</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivos específicos</b> . . . . .	<b>9</b>
<b>4</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> . . . . .	<b>10</b>
<b>4.1</b>	<b>Cultivo do Café e o fungo <i>Hemileia vastatrix</i></b> . . . . .	<b>10</b>
<b>4.2</b>	<b>Nanotecnologia e Agricultura</b> . . . . .	<b>11</b>
<b>4.3</b>	<b>Nanopartículas Poliméricas</b> . . . . .	<b>13</b>
<b>4.4</b>	<b>Polímeros Biodegradáveis</b> . . . . .	<b>16</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> . . . . .	<b>19</b>
<b>5.1</b>	<b>Planejamento e etapas do projeto</b> . . . . .	<b>19</b>
<b>5.2</b>	<b>Obtenção do Material Vegetal e Extração dos Óleos Essenciais</b> .	<b>19</b>
<b>5.3</b>	<b>Caracterização Química dos Óleos</b> . . . . .	<b>19</b>
<b>5.4</b>	<b>Produção das Nanopartículas Carregadas com óleos essenciais de eucalipto</b> . . . . .	<b>20</b>
<b>5.5</b>	<b>Análise no Infravermelho</b> . . . . .	<b>22</b>
<b>5.6</b>	<b>Medidas dos Tamanhos de Partículas</b> . . . . .	<b>22</b>
<b>5.7</b>	<b>Determinação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> das nanopartículas incorporadas com óleos essenciais e dos óleos isolados contra <i>H. vastatrix</i></b> . . . . .	<b>23</b>
<b>5.8</b>	<b>Obtenção dos inóculos de <i>H. vastatrix</i> e inoculação</b> . . . . .	<b>24</b>
<b>5.9</b>	<b>Atividade antifúngica <i>in vivo</i> contra <i>H. vastatrix</i></b> . . . . .	<b>24</b>
<b>5.9.1</b>	<b>Determinação do Efeito Curativo</b> . . . . .	<b>26</b>
<b>5.9.2</b>	<b>Determinação do Efeito Preventivo</b> . . . . .	<b>26</b>
<b>5.10</b>	<b>Análise Estatística</b> . . . . .	<b>26</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> . . . . .	<b>28</b>
<b>6.1</b>	<b>Composição química dos óleos essenciais</b> . . . . .	<b>28</b>

<b>6.2</b>	<b>Análise de Infravermelho . . . . .</b>	<b>29</b>
<b>6.3</b>	<b>Potencial Zeta e Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) . . . . .</b>	<b>31</b>
<b>6.4</b>	<b>Atividade antifúngica <i>in vitro</i> para os óleos essenciais e nanopar- tículas carregadas conta <i>H. vastatrix</i> . . . . .</b>	<b>32</b>
<b>6.4.1</b>	<b>Efeito Preventivo . . . . .</b>	<b>33</b>
<b>6.4.2</b>	<b>Efeito curativo . . . . .</b>	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO . . . . .</b>	<b>38</b>
<b>7.1</b>	<b>Perspectivas futuras . . . . .</b>	<b>38</b>
	<b>REFERÊNCIAS . . . . .</b>	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O café é uma das culturas mais importantes do mundo. Seus grãos são processados para a produção de bebidas consumidas em todos os continentes. Em geral, os grãos de café são cultivados em toda a zona equatorial, por mais de 70 países. A produção mundial de café foi estimada em aproximadamente 175 milhões de sacas de 60 kg em 2020 (International Coffee Organization, 2020). Mais de 50% da produção total vem de quatro países, que incluem Brasil, Vietnã, Colômbia e Indonésia. Alguns aspectos da cafeicultura podem influenciar a qualidade do produto final, como o preço da produção no mercado e o valor agregado ao produto (VOGT, 2020).

A cafeicultura pode ser afetada por diversos fatores, sendo as doenças das plantas um dos principais. A ferrugem do café causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, considerado uma das principais doenças que afetam esta cultura, devido a drástica redução da produtividade ocasionada (MCCOOK; VANDERMEER, 2015).

Tradicionalmente, o manejo da ferrugem do café é feito com o auxílio de fungicidas sistêmicos, como triazóis, estrobilurinas e hidróxido de cobre. Esses agroquímicos são aplicados de acordo com um cronograma fixo em data pré-determinada (prevenção) ou por monitoramento regular da fitopatologia (LIEBIG et al., 2019). A cafeicultura é influenciada atualmente por novos mercados consumidores e pela globalização, que demandam cada vez mais produtos e processos de baixo impacto ecológico. Para alcançar uma produção de café sustentável, é necessário que alguns requisitos sanitários sejam atendidos, como a redução ou até a eliminação do uso destes agrotóxicos (SYLVAINÉ et al., 2020).

Fungicidas naturais de baixa toxicidade, alta eficiência e que não geram resíduos no meio ambiente têm sido estudados com o objetivo de obter uma produção sustentável de café (PAVELA; BENELLI, 2016). Muitas atividades de pesquisa mostraram que, os óleos essenciais podem ser usados para o manejo de pragas e

doenças fúngicas (ANTONIOLI et al., 2020). Por exemplo, os óleos essenciais de eucalipto apresentam odor agradável, alto rendimento de extração e atividade contra diversos microrganismos devido à sua composição, rica em monoterpenos oxigenados e, principalmente, alta concentração de 1,8-cineol e citronelal (GALAN et al., 2020)

O eucalipto é um dos gêneros economicamente mais importantes da família *Myrtaceae*. Eles são compostos por cerca de 700 espécies de árvores de grande porte. O eucalipto tem sido uma das principais fontes de madeira para a produção de papel de alta qualidade (PENÍN et al., 2020). Além disso, as partes aéreas das árvores são uma fonte rica de óleos essenciais, que são usados comercialmente nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Vários estudos fitoquímicos relataram a potencial antifúngico de óleos essenciais de eucalipto contra uma ampla gama de fungos fitopatogênicos economicamente importantes, incluindo *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e *Fusarium subglutinans* (ESPAÑA et al., 2017).

Nos últimos anos, as nanopartículas biodegradáveis têm sido cada vez mais usadas como sistemas de liberação controlada para diferentes moléculas hidrofóbicas (HAO et al., 2020). Nanopartículas biodegradáveis têm vantagens exclusivas sobre outras de liberação controlada sistemas coloidais devido à sua grande área de superfície, baixo custo e facilidade de produção. O presente estudo busca extrair e caracterizar quimicamente óleos essenciais de três fontes botânicas (*E. citriodora*, *E.camaldulensis* e *E. Grandis*), encapsular esses óleos essenciais em nanopartículas poliméricas biodegradáveis e avaliar a atividade antifúngica in vitro e in vivo contra *Hemileia vastatrix* B.

## 2 QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA

Dentre os diversos fatores que afetam a cafeicultura e a economia agrícola como um todo, as doenças causadas por agentes externos são as mais nocivas por se espalharem rapidamente, reduzindo significativamente a produção. Como resposta a estas ameaças, durante a década de 1970 houve uma ascensão do uso de agentes químicos com a finalidade de controlar a proliferação de pragas.

Nas décadas subsequentes ao início do uso de agrotóxicos, diversos estudos mostraram o risco que estes agentes oferecem à saúde humana e aos ecossistemas. Entretanto, a regulamentação sobre seu uso ficou restrito a Europa e principalmente à América do Norte. Nos países em desenvolvimento, bloco reconhecido pela sigla BRICS, houve incentivos fiscais por parte do Estado para o uso de agrotóxicos, sendo seu consumo atrelado a indicadores de mercado.

Recentemente uma quantidade significativa de estudos interdisciplinares tem buscado metodologias capazes de minimizar o uso de agrotóxicos. Estes estudos podem ser classificados conforme o mecanismo envolvido na contenção dos fitopatógenos, entre aqueles que empregam substâncias naturais e os que usam controle biológico. O mecanismo de controle biológico baseia-se em relações ecológicas de competição, onde espécies são utilizadas para controlar pragas.

Ao longo deste trabalho, foi investigado o uso de substâncias naturais para o controle do fungo *Hemileia vastatrix* em cafeeiro. Foram empregadas nanopartículas de caprolactona, polímero biodegradável e atóxico cujo uso é vastamente difundido, como matriz para óleos essenciais extraídos de três espécies diferentes de eucalipto.

### 3 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo desenvolver uma forma alternativa de manejo da ferrugem do café, que seja atóxica, eficiente e de baixo impacto ecológico.

#### 3.1 Objetivos específicos

São objetivos desta pesquisa:

- extrair óleos essenciais de três espécies diferentes de eucaliptos, *E. citriodora*, *E. grandis* e *E. camaldulensis*, por meio de hidrodestilação;
- Produzir nanopartículas de PCL e encapsular os óleos essenciais;
- Caracterizar estes sistemas em termos de composição e estrutura;
- aferir sua atividade *in vitro* e *in vivo*.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Cultivo do Café e o fungo *Hemileia vastatrix*

Os primeiros registros do ataque de ferrugem do café no Brasil, ocorreram na espécie *C. arabica*, durante a década de 1970 na região austral do estado da Bahia. Atualmente a doença é encontrada em todos os países produtores, especialmente no café arábica (*Coffea arabica*) e café conilon (*Coffea conilon*), considerada o fitopatógeno mais nocivo, causando perdas produtivas entre 30 e 90% (ZAMBOLIM, 2016).

A doença popularmente chamada de ferrugem do café é causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, da família *pucciniaceae*, que contempla mais de vinte espécies. O nome popular "ferrugem" é devido à coloração alaranjada apresentada pelas folhas das plantas contaminadas. Uma característica única da gênero *Hemileia* é o modo de penetração no vegetal, que ocorre através da esporulação dos estômatos na uredínea, formando o urediniósporos (ZAMBOLIM, 2016).

Atualmente são encontradas uma grande variedade de raças do fungo *Hemileia*, sendo os mecanismos de variabilidade genética do fungo ainda não compreendido em sua plenitude. As hipóteses iniciais para a variação eram mutações e a seleção de genes por meio de pressões do ambiente, que levam a predominância de espécies mais adaptadas. Evidências citológicas demonstraram a ocorrência de cariogamia, ou seja, ocorrência de meiose na esporulação assexuada (uredinóide teliósporos). Contudo, essa hipótese foi deixada de lado com a descoberta da reprodução sexuada escondida (urediniósporos, esporos de formato tubular), conhecida como criptosexualidade (CARVALHO et al., 2011).

Os sintomas da ferrugem são amplamente conhecidos, sendo mais evidente o surgimento de pequenas manchas amarelo-alaranjadas (de 1 a 3 mm de diâmetro) com formato redondo na superfície abaxial das folhas da planta. As manchas então crescem, atingindo até cerca de 20 mm de diâmetro. Entretanto,

é na região adaxial que o fungo, através do urediniósporos, forma um apressório capaz de penetrar a parede vegetal (SERA et al., 2022).

## 4.2 Nanotecnologia e Agricultura

A agricultura é um importante e estável setor da economia, uma vez que é diretamente responsável por prover os insumos da indústria alimentícia. Dado esta característica, o setor é demandado constantemente por viabilidade produtiva e ecológica, já que o consumo mundial é (em geral) sempre crescente. Há um consenso de que esta viabilidade somente pode ser alcançada mediante o desenvolvimento de tecnologias específicas e inclusão social. Um primeiro marco para questão tecnológica ocorreu na década de 1960 com a palestra "There is plenty of room at the bottom", onde o físico Richard Feynman chama atenção para as possíveis aplicações de nanoprocessos/materiais, publicada em formato de artigo três décadas mais tarde (FEYNMAN, 1991).

Na agricultura moderna, é impossível imaginar uma produção suficiente e eficiente sem o uso de agrotóxicos, fertilizantes e outras técnicas tradicionais de manejo. Entretanto, os problemas destes métodos são vastamente conhecidos, contaminação de redes hídricas, solo e principalmente da população vulnerável. Um outro fator de relevância é que, grande parte dos alimentos consumidos mundialmente são cultivados em países considerados pobres, ou em desenvolvimento, que sofrem um deficit tecnológico (KAH; HOFMANN, 2014).

Desta forma, ao longo das décadas subsequentes ao ano de 1960, houve um aumento contínuo das investigações buscando solucionar os problemas da agricultura tradicional com uso de nanotecnologia. Dentre as aplicações que obtiveram sucesso estão o aumento da produtividade por meio do controle de nutrientes (nanofertilizantes) e o monitoramento da qualidade da água e deposição de agentes tóxicos no solo (nanobiosensores) (MUKHOPADHYAY, 2014).

A figura 4.1 exibe alguns nanoproductos comercializados. Em sua maioria, estes produtos comerciais tratam-se de fertilizantes, responsável por exercer um controle preciso da nutrição das culturas.

Figura 4.1 – Lista com alguns produtos nanotecnológicos para a agricultura comercializados no ano de 2017

Commercial product	Content	Company
Nano-Gro™	Plant growth regulator and immunity enhancer	Agro Nanotechnology Corp., FL, United States
Nano Green	Extracts of corn, grain, soybeans, potatoes, coconut, and palm	Nano Green Sciences, Inc., India
Nano-Ag Answer <sup>®</sup>	Microorganism, sea kelp, and mineral electrolyte	Urth Agriculture, CA, United States
Blozar Nano-Fertilizer	Combination of organic materials, micronutrients, and macromolecules	Fanavar Nano-Pazhoohesh Markazi Company, Iran
Nano Max NPK Fertilizer	Multiple organic acids chelated with major nutrients, amino acids, organic carbon, organic micro nutrients/trace elements, vitamins, and probiotic	JU Agri Sciences Pvt. Ltd, Janakpuri, New Delhi, India
Master Nano Chitosan Organic Fertilizer	Water soluble liquid chitosan, organic acid and salicylic acids, phenolic compounds	Pannaraj Intertrade, Thailand
TAG NANO (NPK, PhoS, Zinc, Cal, etc.) fertilizers	Proteino-lacto-gluconate chelated with micronutrients, vitamins, probiotics, seaweed extracts, humic acid	Tropical Agrosystem India (P) Ltd, India

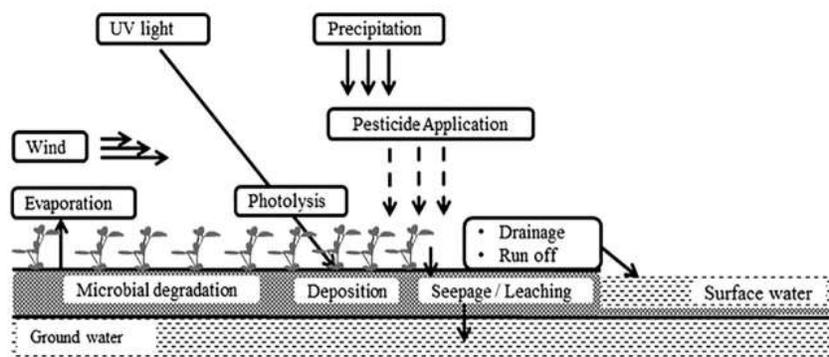
Fonte: (PRASAD; BHATTACHARYYA; NGUYEN, 2017)

Uma outra aplicação de particular interesse é de materiais nanométricos destinados ao controle de pestes. Estes materiais, chamados de nanopestidas, chamam a atenção pois as doenças das plantas são consideradas o principal problema produtivo e os agrotóxicos o insumo mais utilizado em agricultura (KHOT et al., 2012). As aplicações nanotecnológicas nesta área se dão, principalmente, por meio do micro/nanoencapsulamento de agentes ativos em matrizes poliméricas.

O uso de tecnologia para a liberação de pestidas tem se mostrado uma oportunidade mais segura que o método convencional. Isso acontece porque estima-se que 90% dos agrotóxicos sejam perdidos no ambiente ou por não conseguir a área de atuação desejada (PERLATTI et al., 2013). As quantidades perdidas variam conforme uma gama de fatores, sejam estes inerentes ao agente químico, ou

até à forma com a qual ele é aplicado. A figura 4.2 exibe as principais formas pelas quais se dão as perdas dos agrotóxicos.

Figura 4.2 – Frequentes caminhos para a perda e contaminação por agrotóxicos



Fonte: (NURUZZAMAN et al., 2016)

Desta forma, é evidente que, para uma aplicação de nanopesticida ser bem sucedida, o sistema deve ser capaz de suportar as condições externas. Além da proteção, a matriz deve ser capaz de sustentar a disponibilidade do agente ativo por períodos suficientes de tempo. Finalmente, é importante que o pesticida liberado sofra degradação a uma velocidade adequada, de forma a não contaminar o solo ou, em se tratando de um produto para consumo, seus traços não sejam tóxicos.

Considerando tais exigências, o interesse pelo uso de nanopartículas poliméricas é evidente. As nanoesferas funcionam como matrizes de proteção contra irradiação luminosa e volatilização mediante temperatura. Além disso, é obtido um regime de liberação controlado cuja taxa está intimamente relacionada à degradação da matriz polimérica e da difusão (KAMALY et al., 2016).

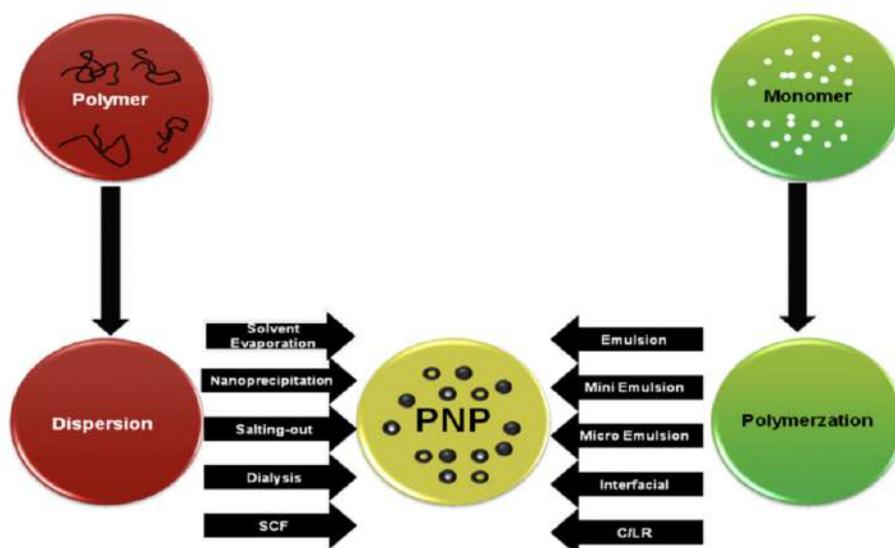
### 4.3 Nanopartículas Poliméricas

O termo nanopartículas poliméricas costuma ser utilizado para designar uma gama de materiais sólidos, coloidais, com dimensões variando entre 10-1000nm, principalmente de formato esférico e vesicular (cápsulas). Estas nanopartículas

costumam ser empregadas como matrizes, onde agentes ativos são incorporados em seu interior e ou, são encontrados adsorvidos em sua superfície (RAO; GECKELER, 2011).

Os métodos de produção de nanopartículas poliméricas podem ocorrer durante a polimerização ou a partir dos *pellets*. Apesar da grande variedade de técnicas possíveis, a escolha pela rota de produção das nanopartículas se dá pelos critérios do projeto, tais como o tamanho de partícula necessária, o polímero utilizado, etc. A figura 4.3 mostra uma representação esquemática das formas mais comuns de obtenção de nanopartículas poliméricas.

Figura 4.3 – Representação esquemática das técnicas de produção de nanopartículas poliméricas



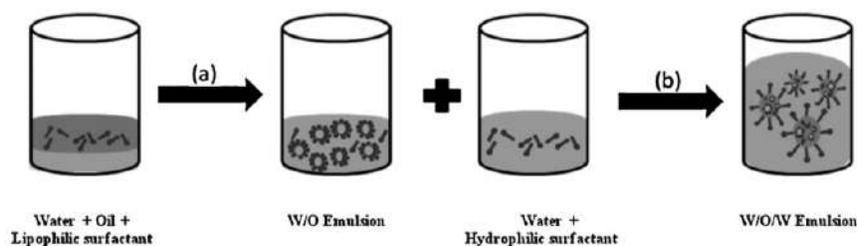
Fonte: (RAO; GECKELER, 2011)

A primeira técnica utilizada para produzir nanopartículas poliméricas partiu de polímeros pré-formados (VANDERHOFF; EL-AASSER; UGELSTAD, 1979). O método consiste na preparação de soluções poliméricas em solventes voláteis, subsequentemente procede-se a evaporação de tais solventes. Inicialmente eram utilizados como solvente diclorometano e clorofórmio, entretanto, por motivos de

menor toxicidade passou-se a ser utilizado acetato etílico. Outros solventes podem ser utilizados conforme o polímero utilizado na produção das nanopartículas. Esta técnica rapidamente foi utilizada pelo setor farmacêutico, que buscava produzir sistemas de liberação controlada de fármacos (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008).

A figura 4.4 ilustra as etapas procedidas durante a produção de nanopartículas poliméricas pela técnica de emulsão-evaporação do solvente. A homogeneização da solução polimérica ocorre mediante a agitação magnética, bem como a etapa de evaporação. Em algumas aplicações o surfactante é removido com uso de água destilada, ou então a dispersão é liofilizada.

Figura 4.4 – Preparação de nanopartículas poliméricas pela técnica de emulsão-  
evaporação do solvente



Fonte: (RAO; GECKELER, 2011)

A técnica de emulsificação-  
evaporação do solvente possui duas etapas. Na primeira ocorre a formação da emulsão, que consiste em mistura líquida com uma fase, onde uma parte não miscível é mantida no sistema pela ação de um aditivo anfifílico (tensoativo), que reduz a tensão interfacial. Desta forma, é importante que em aplicações farmacológicas o tensoativo seja removido. A segunda etapa é onde se dá a formação das nanopartículas, ou seja, é a etapa onde a solução polimérica é gotejada em água à taxas controladas e então procede-se a evaporação do solvente. As duas etapas ocorrem mediante agitação magnética (ou ultrassônica) (KAMALY et al., 2016).

As taxas de gotejamento e tamanho de gota são importantes para determinar o tamanho das nanopartículas obtidas. Entretanto, essas variáveis não são as únicas a serem consideradas. Estudos mostraram que, para o PLA, fatores como o aumento da quantidade de surfactante levam a uma redução dos tamanhos de partículas e da polidispersividade, o mesmo foi observado para taxas mais velozes de agitação (ZAMBAUX et al., 1998; BILATI; ALLÉMANN; DOELKER, 2003).

Uma parte importante das aplicações de nanopartículas poliméricas recai sobre as taxas de biodegradação, principal responsável por determinar a taxa de liberação dos agentes incorporados (CRUCHO; BARROS, 2017).

#### **4.4 Polímeros Biodegradáveis**

Biodegradação é o termo atribuído à processos onde as moléculas dispostas no ambiente são reduzidas em compostos mais simples, que então são mineralizados e redistribuídos através de ciclos naturais (ciclo do carbono, nitrogênio, etc). O uso de nanopartículas poliméricas está fortemente associado aos polímeros biodegradáveis, visto que as primeiras investigações foram na área de fármacos.

Existem diversas definições para o termo polímeros biodegradáveis na literatura, contudo todas elas contemplam a ação do ambiente ou organismos na cisão das moléculas. Os polímeros biodegradáveis costumam ser classificados em naturais e não naturais. Os polímeros naturais são aqueles produzidos naturalmente durante ciclos de crescimento de organismos, geralmente envolvendo enzimas catalisadoras e complexos ciclos metabólicos (CHANDRA; RUSTGI, 1998).

Entre os polímeros não naturais e biodegradáveis, estão aqueles cuja cadeia principal (*backbone*) é hidrolisável. Os poliésteres alifáticos são exemplos destes materiais hidrolisáveis. Para que polímeros sintéticos possam ser biodegradados é necessário que sua cadeia se encaixe no sítio ativo das enzimas presentes no ambiente (CHANDRA; RUSTGI, 1998).

A policaprolactona é um poliéster biodegradável, geralmente obtido por abertura de anel no grupo éster. Este polímero tem sido intensamente estudado, principalmente para aplicações onde são necessários longos tempos de trabalho. Estudos mostraram que o PCL é enzimaticamente degradável e sua catálise pode levar de 1 a 2 anos (CHANDRA; RUSTGI, 1998).

Alguns fatores podem influenciar a taxa de biodegradação, na policaprolactona a morfologia pode restringir de forma considerável sua catálise. Por se tratar de um polímero semicristalino são observados duas etapas de degradação. A primeira e mais rápida se dá com a cisão dos meros na fase amorfa, enquanto a parte cristalina do material é atacada mais lentamente. Esta seletividade é atribuída a maior facilidade das enzimas extracelulares alcançarem a cadeia em regiões de menor ordenamento geométrico (CHANDRA; RUSTGI, 1998).

Uma aplicação amplamente difundida que se vale dos períodos longos de degradação do PCL é como contêineres para proteger as mudas durante o plantio. Esta aplicação se mostra interessante pois permite o plantio mecanizado. Nestas aplicações foi observado que em 6 meses o PCL sofreu uma perda de 48% de massa, já após 1 ano constatou-se a perda de 98% da massa (CHANDRA; RUSTGI, 1998).

A velocidade de liberação possibilitada pela matriz de PCL está relacionada com a taxa de difusão do agente ativo. Quando este polímero está sujeito apenas a fenômenos erosivos (degradação superficial por cisão hidrolítica), o aumento na taxa de liberação é baixo pois fisicamente há apenas redução da espessura da matriz. Esta situação ocorre quando a taxa de cisão hidrolítica e produção de oligômeros difundem para o entorno a uma velocidade mais rápida que a velocidade da intrusão de água (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

Já a degradação volumétrica ocorre quando a penetração da água é mais veloz que a formação dos oligômeros. Este processo leva a cisões randômicas, capazes de reduzir significativamente a massa polimérica. A perda mássica aumenta

até atingir o equilíbrio, que pode ser facilmente perturbado, levando a mecanismos de degradação por autocatálise através de grupos carboxila e hidroxila. Este processo provoca um grande aumento na taxa de liberação do agente ativo (WO-ODRUFF; HUTMACHER, 2010).

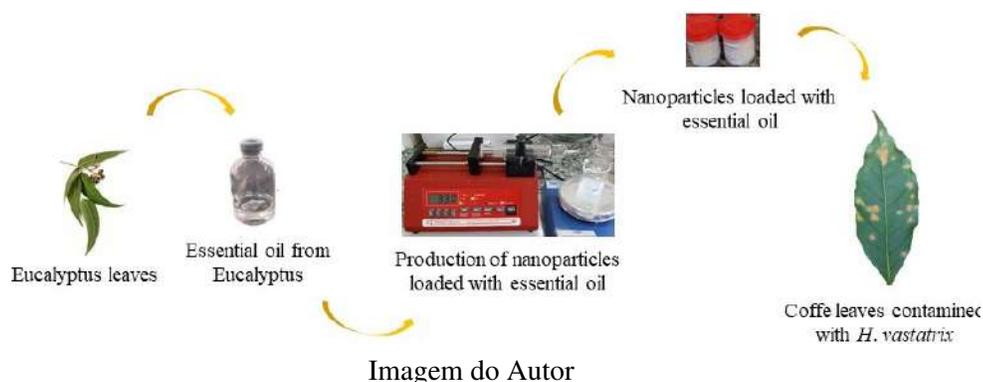
Estas características do PCL tornam o polímero adequado para aplicações com tempo de trabalho maiores. A agricultura é uma área que tem interesse nestas características, portanto este trabalho investiga o uso de nanopartículas de PCL como nanobiopesticida.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Planejamento e etapas do projeto

A figura 5.2 resume as etapas realizadas durante a pesquisa. O objetivo era desenvolver todas as etapas produtivas, desde a extração dos óleos e formulação das nanopartículas até sua aplicação no campo.

Figura 5.1 – Fluxo resumo dos procedimentos realizados durante o projeto de pesquisa



### 5.2 Obtenção do Material Vegetal e Extração dos Óleos Essenciais

As folhas das espécies de eucalipto *E. citriodora*, *E. grandis* e *E. camaldulensis* foram obtidas a partir de árvores cultivadas no Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Lavras, MG, Brasil (DEF/UFLA), com números de registro 10150, 10533 e 10266, respectivamente. As folhas foram lavadas, secadas, cortadas e pesadas, então foram levadas a um balão volumétrico de vidro com capacidade de 5 litros. Para a obtenção dos óleos foram adicionados 2,5 litros de água e então o balão foi submetido à hidro-destilação durante 2 horas.

### 5.3 Caracterização Química dos Óleos

Os constituintes dos óleos essenciais foram identificados em um equipamento de cromatografia á gás Shimadzu GC-17A, equipado com um detector de

massa QP 5050A e um capilar de sílica fundida (30 m x 0.25 mm) e uma fase estacionária vinculada ao DBS. O gás transportador utilizado foi hélio a um fluxo de 1.18 mL/min e 210°C. O programa de aquecimento foi setado para, partir dos 60°C, aumentando até 240°C a uma taxa de 3°C por minuto. Após este programa de aquecimento, a temperatura da coluna foi acrescida até 300°C, mantida por 7 minutos. A temperatura do injetor foi 220°C e a interface (detector) em 240°C. Para performar as análises uma alíquota de 0,1  $\mu$ L diluída na proporção 1:100 em hexano foi injetada na coluna. Uma mistura de hidrocarbonetos (C<sub>9</sub>H<sub>20</sub>, C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>, ..., C<sub>24</sub>H<sub>50</sub>, C<sub>25</sub>H<sub>52</sub>, C<sub>26</sub>H<sub>54</sub>) também foi injetada e a energia de impacto foi de 70 eV.

A quantificação dos constituintes ocorreu em equipamento Shimadzu CG-17A equipado com um detector de ionização de chama. Os parâmetros foram os mesmos utilizados para a detecção dos constituintes, exceto pelo gás de detecção e sua temperatura que, nesta etapa foi ar sintético à 300°C.

Os constituintes foram identificados pela comparação de seus índices de retenção e àqueles disponíveis na literatura (ADAMS et al., 2007). Os índices de retenção, por sua vez, foram determinados usando a série homóloga de alcanos (nC<sub>8</sub>-nC<sub>18</sub>), calculada conforme o método de Van Den Dool and Kratz (1963) com extrapolação para C<sub>19</sub> e C<sub>20</sub>. Os dados também foram comparados com duas bibliotecas NIST107 e NIST2 disponíveis no instrumento.

#### **5.4 Produção das Nanopartículas Carregadas com óleos essenciais de eucalipto**

O material polimérico  $\epsilon$ -policaprolactona (PCL),  $M_n = 50.000g/mol$  utilizado foi da marca Perstrop (Warrington, United Kingdom). O solvente acetona (Número CAS 67-64-1) e o tensoativo Tween 80 (número CAS 9005-65-6). obtido da empresa Synth (São Paulo).

As partículas biodegradáveis poliméricas foram produzidas pela técnica de emulsificação-evaporação do solvente. Foi preparada uma suspensão de PCL-acetona, partindo de 130mg de PCL solubilizados em 27mL de acetona, sob agitação magnética e à temperatura de 37°C. Quatro mililitros do surfactante Tween 80 foi adicionado à suspensão, que permaneceu sob agitação por 15 minutos até a homogeneização. Com o auxílio de uma seringa de vidro, a suspensão contendo PCL-acetona-tween 80 foi gotejada com uma velocidade de 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  em 53mL de água destilada sob agitação magnética e temperatura ambiente. Após o completo gotejamento, a suspensão contendo PCL-acetona-água-Tween 80 foi mantida sob agitação e à temperatura ambiente, até a completa evaporação do solvente. Uma alíquota de água destilada equivalente ao volume de acetona evaporado foi então adicionado ao sistema.

A obtenção das nanopartículas carregadas se deu de modo similar, diferindo apenas pela adição de 4mL de *E. citriodora*, *E. camaldulensis* e *E. grandis* após a solubilização do PCL em acetona. Desta forma, foram obtidos os seguintes sistemas: Nanopartículas de PCL (PCL), Nanopartículas contendo *E. citriodora* (NC), *E. camaldulensis* (NCM) e *E. grandis* (NG).

A figura 5.2 sintetiza o fluxo de procedimentos adotados durante a execução do projeto, desde a extração dos óleos essenciais até a aplicação das nanopartículas.

Figura 5.2 – Sistema utilizado para o gotejamento da dispersão polimérica



Imagem do Autor

## 5.5 Análise no Infravermelho

Os dados de FTIR foram registrados em um espectrofotômetro IRAffinity-1 FTIR (Shimadzu, Kyoto, Japão). O espectrofotômetro FTIR será purgado continuamente com nitrogênio. Um total de 64 exames ( $400 - 4000\text{cm}^{-1}$ ) foram coletados com resolução de  $2\text{cm}^{-1}$ . Os espectros de infravermelho vão ser registrados no modo de transmissão usando  $5\mu\text{L}$  de nanopartículas depositados em pastilhas Kbr.

## 5.6 Medidas dos Tamanhos de Partículas

O potencial zeta e o diâmetro médio das nanopartículas foram determinados por espalhamento dinâmico de luz em um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Inc., Worcestershire, Reino Unido). Água destilada foi usada como dispersante para evitar efeitos de múltiplas dispersões, dispersões e interações entre nanopartículas. O diâmetro médio acumulado (z médio) e o índice de poli-

dispersividade (PdI) foram usados para descrever o tamanho e a distribuição das nanopartículas, respectivamente.

### **5.7 Determinação da atividade antifúngica *in vitro* das nanopartículas incorporadas com óleos essenciais e dos óleos isolados contra *H. vastatrix***

A porcentagem de germinação do *H. vastatrix* foi determinada em triplicata para cada um dos sistemas e comparada com o tratamento negativo, utilizando o fungicida comercial Opera®, cuja atividade advém de moléculas de estrobilurina e triazol. Os inoculantes foram coletados em campo, diluídos em água até uma concentração de 10<sup>6</sup> UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mili litro) ser obtida, então houve a contagem em uma câmara de Neubauer. Alíquotas de 300 µL da solução inoculada foram transferidas para placas de Petri com 6 cm de diâmetro, contendo uma mistura de 5 mL do meio de cultura água-agar. Volumes de 0.65, 1.25, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, e 15.0 µL dos óleos essenciais e 12.5, 25, 50, 100, 150, 200, e 300 µL das nanopartículas incorporadas com os óleos essenciais foram adicionadas à placas de Petri para cada tratamento. O controle negativo foi obtido usando 5 mL do meio de cultura água-agar e 300 µL do inóculo. O controle positivo se deu através do uso de 15 µL de fungicida controle (Opera®) conforme a dosagem recomendada pelo fabricante, para 5 mL do meio. As placas de Petri foram incubadas em uma BOD (*Biochemical Oxygen Demand*), à 25° por um período de 24h. Padronizou-se a contagem de esporos em microscópio da região superior direita das placas.

Figura 5.3 – Etapas realizadas para o preparo do meio de cultivo



Imagem do Autor

### 5.8 Obtenção dos inóculos de *H. vastatrix* e inoculação

Os esporos de *H. vastatrix* utilizados na inoculação das mudas foram coletados de folhas naturalmente infectadas, em cafeeiros do cultivar *Mundo Novo*. Raspou-se as folhas para segregar as pústulas esporuladas, que foram armazenadas em tubos de ensaio. A produção do inóculo se deu pela produção de uma solução com concentração de  $1 \times 10^6$  urediniósporos por mL em água-agar (0,1 p/v), contendo Tween 20 (0,05 v/v). Na inoculação, as partes abaxiais das folhas foram borrifadas com a solução de urediniósporos, utilizando um borrifador manual. Em seguida, as mudas foram mantidas em uma câmara à 23°C, na ausência de luz e com umidade de 50%, por 24 horas. Após este período, as mudas foram transferidas para uma estufa, à temperatura de 30°C e umidade relativa de 47%. As mudas foram mantidas neste ambiente até o final dos experimentos.

### 5.9 Atividade antifúngica *in vivo* contra *H. vastatrix*

Para os testes *in vivo*, mudas de café da variedade Mundo Novo foram mantidas em casa de vegetação com temperatura controlada de 30°C e umidade

relativa de 47%. A determinação da atividade antifúngica *in vivo* foi realizada avaliando os efeitos curativos e preventivos.

As avaliações dos efeitos curativos e preventivos foram feitas por meio da escala diagramática desenvolvida por Cunha et al., (2001) para avaliar a severidade do ataque aos pés de café. As pontuações nesta escala variam de 0 a 5. A pontuação 0 corresponde à ausência de doença; 1, gravidade <3%; 2, de 3 a 6% de gravidade; 3, de 6 a 12% de gravidade; 4, de 12 a 25% de gravidade; e 5, de 25 a 50% de gravidade. A figura 5.4 exibe folhas naturalmente contaminadas e o critério visual adotado pela escala de contaminação.

Figura 5.4 – Escala diagramática para a avaliação da severidade de ferrugem no café

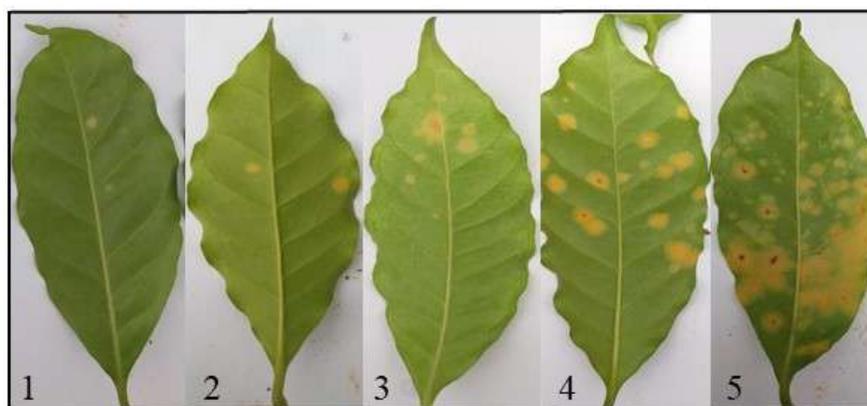


Imagem do Autor

As concentrações dos princípios ativos (óleos essenciais livres e nanoencapsulados) utilizadas para realizar as avaliações dos efeitos curativos e preventivos são de  $1500\mu\text{L.L}^{-1}$ , ou seja, uma concentração superior à CIM encontrada nos testes *in vitro*. Como controle negativo, realiza-se teste com água e leite em pó na concentração de  $10\text{ g.L}^{-1}$  para avaliar se existe atividade antifúngica contra *H. vastatrix* para este produto utilizado na diluição dos óleos essenciais. Um teste de microrganismo também deve ser realizado com uma solução de nanopartículas de policaprolactona (PCL). Como controle positivo foi utilizado o fungicida controle (Opera®).

### 5.9.1 Determinação do Efeito Curativo

O efeito curativo foi determinado pela pulverização dos princípios ativos na parte axial das folhas do café contaminadas com *H. vastatrix*. Após 7 dias, 4 folhas foram escolhidas aleatoriamente e avaliadas. As folhas são marcadas para avaliações posteriores, com uma avaliação por semana durante 5 semanas. A severidade da doença em cada folha antes da aplicação dos princípios ativos considerada é de 100%, de modo que é possível comparar o percentual de redução da doença após a aplicação de cada tratamento.

### 5.9.2 Determinação do Efeito Preventivo

O efeito preventivo foi determinado pela pulverização dos princípios ativos na parte axial das folhas sadias de mudas de café. Após 7 dias, as mudas de café foram contaminadas pela pulverização de suspensão de esporos de *H. vastatrix* na concentração de  $10^6$  UFC. $mL^{-1}$  na porção abaxial das folhas. As mudas de café são mantidas em viveiro a temperatura de 30°C. Vinte dias após a inoculação de *H. vastatrix*, quatro folhas devem ser escolhidas ao acaso para serem avaliadas e marcadas para posterior análise. As avaliações são realizadas semanalmente até o momento em que comecem a aparecer esporos nas folhas das mudas submetidas ao tratamento com o fungicida de controle Opera®.

## 5.10 Análise Estatística

Todos os experimentos foram conduzidos em um delineamento experimental totalmente casual com análises em triplicata para atividade in vitro e 15 repetições para atividade in vivo. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade para cada tratamento.

A figura 5.2 sintetiza o fluxo de procedimentos adotados durante a execução do projeto, desde a extração dos óleos essenciais até a aplicação das nanopartículas.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 Composição química dos óleos essenciais

A composição química dos óleos essenciais extraídos das folhas das três diferentes espécies de eucalipto apresentou resultados distintos para cada amostra, os resultados são apresentadas na figura 6.1. Contudo, os óleos *E. grandis* e o *E. camaldulensis* apresentaram semelhanças entre seus constituintes majoritários.

Figura 6.1 – Composição química dos óleos essenciais extraídos das folhas de *E. citriodora*, *E. camaldulensis* e *E. grandis*

Compound <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	(%) <sup>c</sup>		
		<i>E. grandis</i>	<i>E. camaldulensis</i>	<i>E. citriodora</i>
$\alpha$ -pinene	933	55.21	5.59	-
canfeno	950	0.78	-	-
<i>p</i> -cimene	1024	0.67	0.39	-
limoneno	1029	4.49	27.87	-
1,8-cineole	1032	16.52	58.71	-
terpinolene	1085		3.59	-
$\alpha$ -fenchol	1120	1.16	-	-
<i>trans</i> -pinocarveol	1142	0.65	-	-
isopulegol	1149		-	2.00
citronellal	1152		-	93.97
isoisopulegol	1159		-	1.45
isoborneol	1172	3.83	-	-
$\alpha$ -terpineol	1195	11.05	1.22	-
citronellol	1226		-	2.58
$\alpha$ -salinene	1438		0.48	-
viridiflorol	1586		2.15	-
Total identified		94.81%	100%	100%

<sup>a</sup>Os componentes estão listados por ordem de eluição na coluna capilar apolar de sílica fundida com fase estacionária ligada a DBS. <sup>b</sup> RI: índice de retenção calculado. <sup>c</sup> porcentagem de cada componente

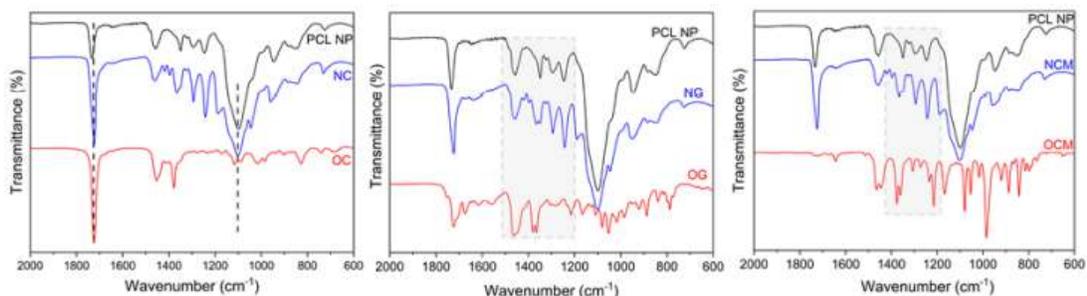
Para a espécie *E. grandis* foram identificados 10 dos 13 constituintes quantificados, sendo os três majoritários  $\alpha$ -pineno (55.21%), 1,8-cineol (16.52%) e  $\alpha$ -terpineol (11.05%). Enquanto para espécie *E. camaldulensis* houveram 8 constituintes identificados, com os majoritários sendo o 1,8-cineol (58.71%), limoneno (27.87%) e terpinoleno (3.59%). Por fim, o *E. citriodora* apresentou apenas um componente principal dentre os 4 identificados, este constituinte é o citrionelal (93.97%).

A composição de um óleo essencial pode variar conforme diversos fatores, tais como a temperatura, irradiação ultravioleta, altitude, disponibilidade de água, ataque de insetos e micro-organismos, entre outros. Este conjunto de fatores justificam as divergências em relação à literatura (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

## 6.2 Análise de Infravermelho

Esta técnica é de extrema relevância para a caracterização das nanopartículas uma vez que os espectros permitem confirmar a incorporação dos óleos essenciais pela policaprolactona. O espectro de transmissão das amostras é exibido na figura 6.2

Figura 6.2 – Espectros de infravermelho com transformada de Fourier para as nanopartículas (NP) e óleos isolados *E. citriodora* (OC), *E. grandis* (OG), *E. camaldulensis* (OCM) e encapsulados



O espectro base obtido das nanopartículas de PCL isoladas está de acordo com as informações encontradas na literatura. É notado forte presença na banda

$1720\text{cm}^{-1}$  característico de vibrações por alongamento do grupo carbonila (C=O). Já os picos no comprimento de banda de  $1720\text{cm}^{-1}$  é devido ao alongamento dos grupos C-C e C-O, presentes na cadeia principal do PCL e, por isso, esta região tem sido utilizada para investigar a cristalinidade do polímero. Os picos intensos e amplos observados a partir do comprimento  $1100\text{cm}^{-1}$  remetem a vibrações de grupo éster presentes no Tween 80, usado como tensoativo durante a produção das nanopartículas (Zanetti et al., 2019).

A incorporação dos óleos essenciais pelas nanopartículas é demonstrada pela presença de picos nas bandas em torno dos comprimentos  $1720\text{cm}^{-1}$ ,  $1520\text{cm}^{-1}$ ,  $1350\text{cm}^{-1}$  e  $1100\text{cm}^{-1}$ , combinado aos resultados obtidos com a análise de espalhamento dinâmico de luz, que indicaram aumento significativo do diâmetro médio das nanopartículas contendo os óleos. Estes picos característicos dos óleos isolados também são observados nos espectros das nanopartículas com óleo, sugerindo a ocorrência de interações intermoleculares entre os constituintes dos óleos essenciais e a matriz polimérica.

No espectro referente às amostras com *E. citriodora* é observado um pico intenso no comprimento  $1720\text{cm}^{-1}$ , referente ao grupo carbonil. Este fato reforça a hipótese de encapsulamento, uma vez que o grupo carbonil está presente no constituinte majoritário (94%) do óleo, o citronelal. Além disso, a banda  $1350 - 1500\text{cm}^{-1}$  é referente aos constituintes presentes no óleo essencial.

Uma banda intensa pode ser observada em  $1100\text{cm}^{-1}$  para os espectros contendo *E. grandis*. Esta banda é característica do tensoativo Twen 80, entretanto também pode ser devido a ligações éter presentes no principal constituinte deste óleo essencial, o 1,8-cineol. Já as bandas entre  $1350 - 1500\text{cm}^{-1}$  são devido a alongamentos nas ligações olefínicas dos compostos *camphene*, *limonene* e *p-cymene*.

Para as amostras contendo *E. camaldulensis* também são observadas bandas na região  $1350 - 1500\text{cm}^{-1}$ , referentes a ligações duplas presentes nos consti-

tuintes deste óleo essencial. O espectro apresenta uma intensa banda em  $1720\text{cm}^{-1}$  relativo ao grupo carbonil do PCL. Já a região de  $1100\text{cm}^{-1}$  refere-se aos grupos éster do PCL, tensoativo e também do constituinte 1,8-cineol.

### 6.3 Potencial Zeta e Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A incorporação dos óleos pelas nanopartículas de PCL provocaram alterações na distribuição de carga superficial, tamanho de partícula e índice de polidispersividade do polímero. Os dados do ensaio de potencial zeta mostram que as partículas com óleos essenciais são maiores que aquelas livre da presença dos extratos vegetais. As seguintes distribuições de tamanho em nanômetros foram obtidas 429 (95%) – 5015 (5%) nm, 329 (8%) – 3773 (92%) nm, e 294 (86%) – 3521 (14%) 349 nm para as nanopartículas contendo *E. citriodora*, *E. grandis* e *E. camaldulensis* respectivamente. Já as nanopartículas de PCL sem adição apresentaram tamanho 187 nm (100%). Também foi observado variação no índice de polidispersividade, 0.43; 0.56; 0.40, seguindo o mesmo ordenamento quanto a presença dos óleos essenciais.

O potencial zeta obtido para as nanopartículas de PCL foi de -8mV, enquanto as partículas com óleo incorporado obtiveram os resultados -12mV, -7mV, -9mV para os óleos de *E. citriodora*, *E. grandis* e *E. camaldulensis* respectivamente. De acordo com a literatura a estabilidade do sistema aumenta conforme o valor do potencial é reduzido, assim a formulação mais estável foi obtida com o óleo essencial *E. citriodora*.

A incorporação dos óleos essenciais nas nanopartículas de PCL tendem a tornar o potencial zeta mais negativo, isto ocorre devido aos óleos conterem grupos químicos hidroxila que, quando adsorvidos na superfície do polímero podem ionizar formando ânions. A tabela 6.1 mostra os resultados dos ensaios de Potencial Zeta e DLS.

Tabela 6.1 – Resultados do Potencial Zeta, tamanhos de partículas e polidispersividade

Formulação	Zeta Potencial (mV)	Particle Size (nm)	Polydispersity index
PCL	- 8	187 (100%)	0.08
NC	- 12	429 (95%) – 5015 (5%)	0.43
NG	- 7	329 ( 8%) – 3773 (92%)	0.56
NCM	- 9	294 (86%) – 3521 (14%)	0.4

PCL: nanopartículas de policaprolactona; NC: nanopartículas carregadas com óleo essencial de *E. citriodora*; NG: nanopartículas carregadas com óleo essencial de *E. grandis*; NCM: nanopartículas carregadas com óleo essencial de *E. camaldulensis*;

#### 6.4 Atividade antifúngica *in vitro* para os óleos essenciais e nanopartículas carregadas contra *H. vastatrix*

Os resultados das atividades *in vitro* dos óleos isolados e das nanopartículas incorporadas são exibidos na figura 6.3. Como pode ser observado, todos os óleos e nanopartículas apresentaram ação antifúngica contra a ferrugem do café, sendo esta atividade dose-dependente, ou seja, a ação aumenta com o aumento da concentração. Não foi observado ação para as amostras contendo apenas água e nanopartículas sem óleos essenciais incorporados.

Figura 6.3 – Atividade antifúngica *in vitro* das formulações estudadas

Concentration (µL/L)	Percent inhibition								
	W <sup>a</sup>	PCL <sup>b</sup>	O <sup>c</sup>	OC <sup>d</sup>	NC <sup>e</sup>	OG <sup>f</sup>	NG <sup>g</sup>	OCM <sup>h</sup>	NCM <sup>i</sup>
125	0Ga	0Ga	100Aa	99.18Aa	17.16Fc	57.59Cb	23.04Ed	69.36Bc	36.19Dc
250	0Da	0Da	100A	99.33Aa	95.46Bb	96.03Ba	47.12Cc	94.69Bb	95.46Bb
500	0Da	0Da	100A	100Aa	100Aa	98.86Aa	91.65Cb	95.63Bb	100Aa
1000	0Ba	0Ba	100A	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa

O fungicida Opera® apresentou inibição em 100% para todas as formulações. No tocante a ação dos óleos essenciais isolados, maior atividade foi observado para a espécie *E. citriodora*, mesmo em baixas concentrações (125 µL/L) os resultados foram equivalentes ao fungicida comercial. Os melhores resultados

para as nanopartículas incorporadas foram observados para os óleos das espécies *E. citriodora* e *E. camaldulensis*.

O mecanismo de ação dos óleos essenciais está relacionado à inibição da síntese de ergosterol, que culmina o impedimento biológico da germinação do esporo. Outro mecanismo associado a ação de terpenos é o impedimento do transporte de elétrons e inibição da enzima ATPase na mitocôndria (UMA; HUANG; KUMAR, 2017). A figura 6.4 exibe a presença e ausência de esporos da ferrugem.

Figura 6.4 – Comparação das esporulações de *H. vastatrix* na ausência e presença dos agentes ativos em diferentes concentrações



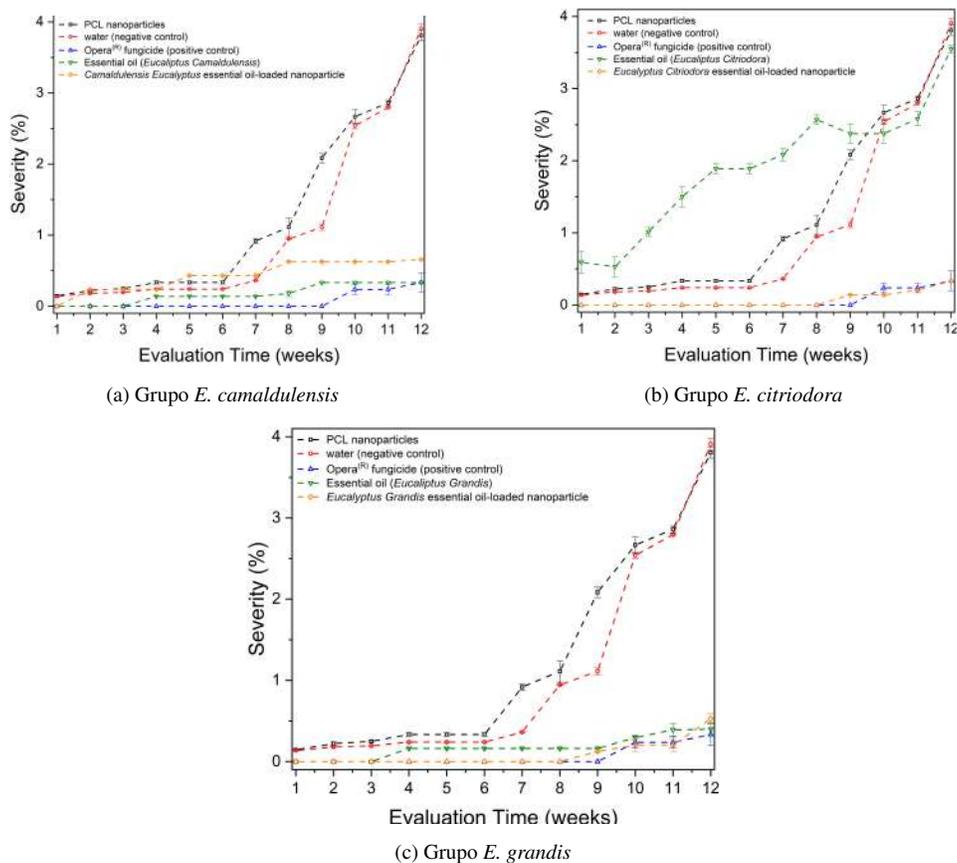
(A) Esporos da ferrugem; (B) Tratamentos com maiores concentrações de óleos essenciais e (C) Presença de esporos após tratamentos na concentração de 125  $\mu\text{L/L}$

#### 6.4.1 Efeito Preventivo

Como é observado na figura 6.5 as formulações que apresentaram atividade contra *Hemilélia vatatrix* foram os óleos essenciais *E. grandis* e *E. camaldulensis* livres e nano-encapsulados, as nanopartículas com *E. citriodora* incorporado e o fungicida Opera®.

Melhores performances foram observadas para os óleos essenciais encapsulados das espécies *E. citriodora* e *E. grandis* que para estas mesmas espécies em sua forma livre. Esta performance foi similar ao fungicida Opera®, cuja aplicação atrasou o surgimento da ferrugem em 8 semanas. O atraso relativo ao *E. grandis* em sua forma livre foi de apenas 3 semanas. Não foi observado efeito preventivo em amostras contendo *E. citriodora* em sua forma livre, o que pode estar relaci-

Figura 6.5 – Ação preventiva dos óleos essenciais livres e nano-encapsulados referente as espécies *E. camaldulensis*, *E. citriodora* e *E. grandis*



onado à sua volatilidade. Finalmente, o desenvolvimento da doença foi retardado em três semanas e uma semana, respectivamente, para *E. camaldulensis* livre e nano-encapsulado.

Assim é possível inferir que a nano-encapsulação dos óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. grandis* melhorou seu efeito preventivo. Esta melhora é um indício do efeito de liberação prolongada causada pelo PCL e da atuação preventiva do polímero diante de fatores degradantes (luz, temperatura, entre outros). Enquanto para o *E. camaldulensis* a melhora pode não ter sido observada devida

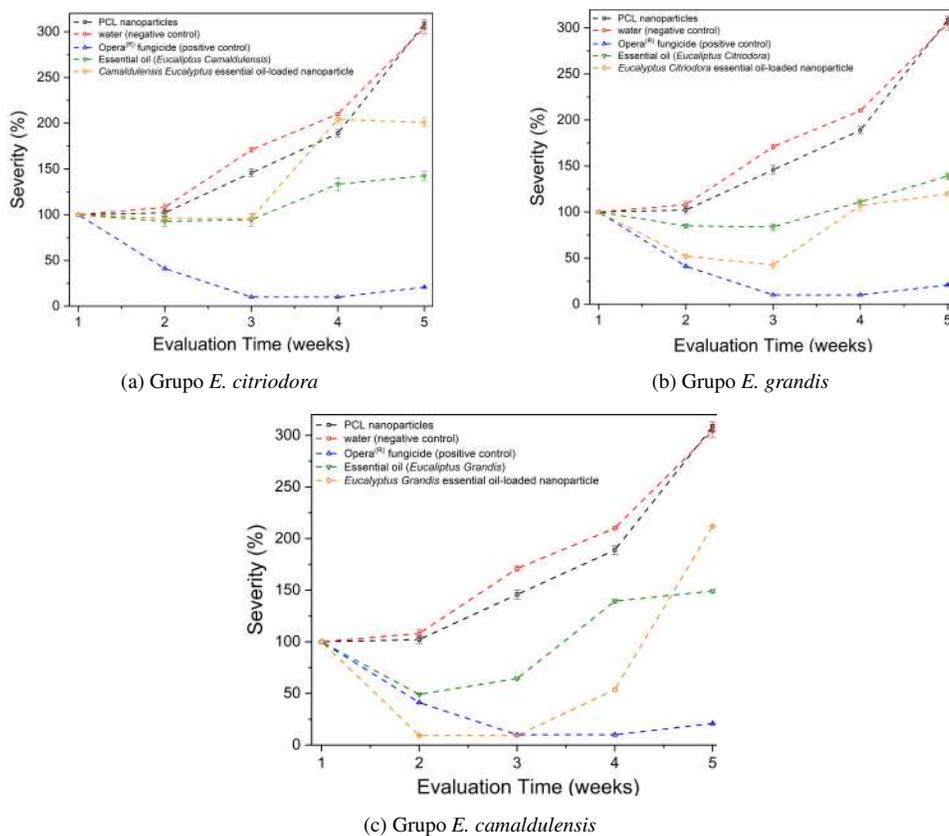
a sua presença mais interior nas nanopartículas, causando uma taxa de liberação insuficiente.

O uso de óleos essenciais como princípio ativo para prevenção de ataques patogênicos é devido a sua ação eliciadora, isto é, eles induzem um aumento de fito-alexinas que, estão ligadas aos mecanismos de proteção das plantas.

#### 6.4.2 Efeito curativo

O efeito curativo devido à atividade antifúngica das formulações pode ser observado na figura 6.6

Figura 6.6 – Efeito curativos dos três óleos livres e encapsulados



A maior atividade antifúngica *in vivo* dentre os óleos livres foi observada para o óleo essencial *E. grandis*. O decréscimo na severidade do patógeno foi de 0,76 para 0,37 após a primeira aplicação. Esta redução é equivalente a uma melhora de 49,09%. Houve aumento de severidade após 3 semanas de avaliação, com a severidade aumentando de 0,37 para 0,48 e 1,05 para 1,13 na quarta e quinta semana respectivamente.

A atividade deste óleo foi melhor em sua forma nano-encapsulada já que se observou aumento do efeito preventivo para estes sistemas se comparado ao efeito observado para os óleos isolados, como exibido na figura 6.6. Após sua aplicação, a severidade das plantas foi reduzida em 90,75%, 1,11 para 0,1 na segunda semana de avaliação. O aumento de severidade foi observado a partir da quarta semana de avaliação, de 0,1 para 0,59 e na quinta semana de 0,59, para 2,35.

Também foi observado atividade curativa para o *E. citriodora* livre, com queda na severidade de 1,11 para 0,94 após aplicação, com este valor mantendo-se constante até a quarta avaliação. Na quinta semana houve aumento de 0,93 para 1,23. Resultados melhores foram observados para este óleo encapsulado, com decréscimo de 52% na severidade do ataque, indo de 1,98 para 1,03. A severidade permaneceu reduzindo até a terceira semana de avaliação, atingindo a marca de 0,85. Após este período houve aumento da doença, atingindo a marca de 2,12 na quinta semana de avaliação.

O comportamento observado para as nanopartículas contendo estes dois óleos essenciais foi semelhante aquele registrado pelo agrotóxico Opera®. Este fungicida comercial reduziu a severidade de 0,68 para 0,28 após a primeira aplicação e continuou em decréscimo até a marca de 0,06 até a terceira avaliação (melhora de 58,84% e 91,18%). O aumento de severidade foi observado na última avaliação (quinta semana), passando de 0,06 para 0,14. Pode-se inferir destes

resultados que as nanopartículas promoveram uma liberação gradual dos óleos essenciais, tornando sua ação estável.

Os resultados apresentados pelo *E. camaldulensis* livre e encapsulados foram os mesmos. A severidade da doença foi reduzida (1,65-1,53 e 1,21-1,16) após a aplicação, então permaneceu constante até a terceira semana de avaliação. Isto representa um decréscimo de 92,6% para o estado livre e 96,24% para o encapsulado. O aumento de severidade foi observado a partir da quarta semana de avaliação. Estes resultados sugerem um comportamento fungistático nesta espécie, ou seja, ela inibiu o crescimento do fungo durante as duas primeiras semanas. Isto pode ter ocorrido pela ação do óleo adsorvido na superfície externa das nanopartículas.

A manutenção do efeito antifúngico observada para os óleos encapsulados sugerem a ação de liberação controlado pelas nanopartículas de PCL, garantindo um maior período de tempo em atividade. Estes resultados mostram-se equivalentes aos produtos comerciais testados.

## 7 CONCLUSÃO

O encapsulamento dos óleos essenciais de eucalipto em nanopartículas do polímero biodegradável policaprolactona levou a um aumento da atividade antifúngica preventiva e curativa, em comparação aos óleos livres. Os principais constituintes do óleo essencial de *E. citriodora* foram citronelal, citronelol e isopulegol, para a espécie *E. grandis* foram  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol e  $\alpha$ -terpineno e aqueles para a espécie *E. camaldulensis*, 1,8-cineol, limoneno e  $\alpha$ -pineno. As nanopartículas incorporadas com os óleos essenciais possuíram tamanhos variando entre 294 e 429 nanômetros, com variação nas cargas superficiais -7 e -12mV. A análise espectroscópica no infravermelho combinada aos resultados de DLS provou a encapsulação dos óleos essenciais pelas nanopartículas de PCL, uma vez que as bandas de vibração destes sistemas exibiram àquelas características dos constituintes e o diâmetro médio das nanopartículas contendo os óleos foram significativamente maiores. Os sistemas investigados neste trabalho mostraram atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* contra o fungo *Hemileia vastatrix*. A incorporação dos óleos essenciais pelas nanopartículas diminuiu sua volatilidade e prolongou sua atividade antifúngica. Os resultados deste trabalho são inovadores ao mostrar a viabilidade do uso de sistemas nanoestruturados para liberação controlada de óleos essenciais destinados ao combate de fungos fitopatogênicos em culturas de café.

### 7.1 Perspectivas futuras

Algumas investigações podem ser feitas a partir dos resultados levantados neste trabalho, visando o melhor entendimento dos nanossistemas e adequação ao uso comercial. Sugere-se entender as nanopartículas em termos de sua estrutura, isto é, quantificação das fases cristalinas e amorfa, traçar as curvas de liberação dos óleos e estudar o tempo de degradação no ambiente. Além disso, podem ser realizados testes para avaliar os resultados em outras culturas vegetais que também sofrem ataques por ferrugem ou outros fungos. Finalmente, é sugerido testar a

combinação dos óleos com melhores resultados (*E. citriodora* e *E. grandis*) para avaliar a possibilidade de sinergia entre eles.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. et al. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. [S.l.]: Allured publishing corporation Carol Stream, 2007. v. 456.
- ANTON, N.; BENOIT, J.-P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review. **Journal of controlled release**, Elsevier, v. 128, n. 3, p. 185–199, 2008.
- ANTONIOLI, G. et al. Poly (lactic acid) nanocapsules containing lemongrass essential oil for postharvest decay control: In vitro and in vivo evaluation against phytopathogenic fungi. **Food Chemistry**, Elsevier, v. 326, p. 126997, 2020.
- BILATI, U.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Sonication parameters for the preparation of biodegradable nanocapsules of controlled size by the double emulsion method. **Pharmaceutical development and technology**, Taylor & Francis, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2003.
- CARVALHO, C. et al. **Cryptosexuality and the genetic diversity paradox in coffee rust**. [S.l.]: Hemileia, 2011.
- CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. **Progress in polymer science**, Pergamon, v. 23, n. 7, p. 1273–1335, 1998.
- CRUCHO, C. I.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering: C**, Elsevier, v. 80, p. 771–784, 2017.
- ESPAÑA, M. D. et al. Eucalyptus leaf byproduct inhibits the anthracnose-causing fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 793–797, 2017. ISSN 0926-6690. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669017305137>>.
- FEYNMAN, R. There's plenty of room at the bottom. **Science**, v. 254, n. 5036, p. 1300–1301, 1991.
- GALAN, D. M. et al. Eucalyptol (1,8-cineole): an underutilized ally in respiratory disorders? **Journal of Essential Oil Research**, Taylor Francis, v. 32, n. 2, p. 103–110, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1716867>>.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, SciELO Brasil, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
- HAO, Y. et al. Near-infrared responsive 5-fluorouracil and indocyanine green loaded MPEG-PCL nanoparticle integrated with dissolvable microneedle for

skin cancer therapy. **Bioactive Materials**, v. 5, n. 3, p. 542–552, 2020. ISSN 2452-199X. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452199X20300542>>.

International Coffee Organization. **World Coffee Production Report**. 2020. Disponível em: <<http://www.ico.org/prices/po-production.pdf>>.

KAH, M.; HOFMANN, T. Nanopesticide research: current trends and future priorities. **Environment international**, Elsevier, v. 63, p. 224–235, 2014.

KAMALY, N. et al. Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release. **Chemical reviews**, ACS Publications, v. 116, n. 4, p. 2602–2663, 2016.

KHOT, L. R. et al. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review. **Crop protection**, Elsevier, v. 35, p. 64–70, 2012.

LIEBIG, T. et al. Interactive effects of altitude, microclimate and shading system on coffee leaf rust. **Journal of Plant Interactions**, Taylor Francis, v. 14, n. 1, p. 407–415, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/17429145.2019.1643934>>.

MCCOOK, S.; VANDERMEER, J. The Big Rust and the Red Queen: Long-Term Perspectives on Coffee Rust Research. **Phytopathology**®, v. 105, n. 9, p. 1164–1173, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-15-0085-RVW>>.

MUKHOPADHYAY, S. S. Nanotechnology in agriculture: prospects and constraints. **Nanotechnology, science and applications**, Dove Press, v. 7, p. 63, 2014.

NURUZZAMAN, M. et al. Nanoencapsulation, nano-guard for pesticides: a new window for safe application. **Journal of agricultural and food chemistry**, ACS Publications, v. 64, n. 7, p. 1447–1483, 2016.

PAVELA, R.; BENELLI, G. Essential oils as ecofriendly biopesticides? challenges and constraints. **Trends in plant science**, Elsevier, v. 21, n. 12, p. 1000–1007, 2016.

PENÍN, L. et al. Technologies for Eucalyptus wood processing in the scope of biorefineries: A comprehensive review. **Bioresource Technology**, v. 311, p. 123528, 2020. ISSN 0960-8524. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852420308002>>.

PERLATTI, B. et al. **Polymeric nanoparticle-based insecticides: a controlled release purpose for agrochemicals**. [S.l.]: IntechOpen, 2013.

PRASAD, R.; BHATTACHARYYA, A.; NGUYEN, Q. D. Nanotechnology in sustainable agriculture: recent developments, challenges, and perspectives. **Frontiers in microbiology**, Frontiers, v. 8, p. 1014, 2017.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. **Progress in polymer science**, Elsevier, v. 36, n. 7, p. 887–913, 2011.

SERA, G. H. et al. Coffee leaf rust in brazil: Historical events, current situation, and control measures. **Agronomy**, MDPI, v. 12, n. 2, p. 496, 2022.

SYLVAINÉ, L. et al. Coffee farmers' incentives to comply with sustainability standards. **Journal of Agribusiness in Developing and Emerging Economies**, Emerald Publishing Limited, v. 10, n. 4, p. 365–383, jan 2020. ISSN 2044-0839. Disponível em: <<https://doi.org/10.1108/JADEE-04-2019-0051>>.

UMA, K.; HUANG, X.; KUMAR, B. A. Antifungal effect of plant extract and essential oil. **Chinese journal of integrative medicine**, Springer, v. 23, n. 3, p. 233–239, 2017.

VANDERHOFF, J. W.; EL-AASSER, M. S.; UGELSTAD, J. **Polymer emulsification process**. [S.l.]: Google Patents, 1979. US Patent 4,177,177.

VOGT, M. A. B. Developing stronger association between market value of coffee and functional biodiversity. **Journal of Environmental Management**, v. 269, p. 110777, 2020. ISSN 0301-4797. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030147972030709X>>.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217–1256, 2010. ISSN 0079-6700. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670010000419>>.

ZAMBAUX, M. F. et al. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly (lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. **Journal of controlled release**, Elsevier, v. 50, n. 1-3, p. 31–40, 1998.

ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in brazil. **Tropical Plant Pathology**, Springer, v. 41, n. 1, p. 1–8, 2016.