DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE ZEÍNA CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *LITSEA CUBEBA* PARA CONTROLE DE PRAGAS NA AGRICULTURA

Barros, J. M. H. F.[1], Santos, A. A. [2], Stadnik, M. J. [2], Costa, C.[1,3*]

[1]*Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 88.040-900, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.*

[2]*Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, 88.034-000, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.*

[3]*Departamento de Engenharia Têxtil, Universidade Federal de Santa Catarina, 89.036-004, Blumenau, Santa Catarina, Brasil.*

E-mail de contato: cristiane.costa@ufsc.br (C. da Costa)

RESUMO

O uso de pesticidas sintéticos na agricultura pode trazer problemas ambientais e de saúde humana. Em resposta, os óleos essenciais (OEs) são uma alternativa natural, porém, apresentam alta volatilidade e baixa estabilidade. Diante disso, a encapsulação de OEs em biopolímeros como a zeína é uma solução eficaz, garantindo estabilidade a longo prazo e preservando sua atividade biológica. Nanopartículas de zeína com óleo essencial de *Litsea cubeba* (Z-OEL) foram preparadas por nanoprecipitação assistida por ultrassom e caracterizadas quanto à morfologia, eficiência de encapsulação (EE), estabilidade térmica e de armazenamento. As Z-OEL apresentaram diâmetro de ~ 200 nm, PDI < 0,3, EE > 90% e alta estabilidade térmica. A atividade antifúngica contra *Colletotrichum lindemuthianum*, fungo que afeta a cultura do feijão, foi de 65% na maior concentração testada, demonstrando o potencial da zeína como carreador de OEs no controle do fungo responsável pela antracnose do feijoeiro.

Palavras-chave: biopolímero, estabilidade, *Colletotrichum lindemuthianum*, biofungicidas.

INTRODUÇÃO

A antracnose do feijoeiro causada pelo *C. lindemuthianum* é responsável por causar danos consideráveis ao cultivo do feijão, resultando em grandes perdas de produção (Gillard e Ranatunga, 2013). Para enfrentar esse problema, os fungicidas sintéticos são utilizados no combate e prevenção dessa doença (Zubrod *et al.*, 2019). O manejo convencional das culturas, frequentemente, envolve o uso de pesticidas sintéticos, que, embora eficazes no tratamento, têm o inconveniente de contaminar o meio ambiente e causar problemas de saúde ao ser humano (Hu e Xianyu, 2021).

Os fungicidas sintéticos apresentam toxicidade ao meio ambiente e organismos vivos, bem como possibilidade de desenvolvimento de resistência dos patógenos aos ingredientes ativos devido ao seu uso contínuo. Diante disso, é fundamental considerar alternativas que visem ao controle sustentável da antracnose do feijoeiro. Os óleos essenciais, por exemplo, podem ser empregados como fungicidas botânicos, representando uma alternativa viável e ambientalmente sustentável aos fungicidas sintéticos (Deresa e Diriba, 2023). Esses compostos fitoquímicos apresentam propriedades antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes (Silva, da *et al.*, 2022). Devido a essas propriedades, os OEs têm aplicações na indústria cosmética, alimentícia e agrícola (Lammari *et al.*, 2021). Inclusive, o óleo essencial de *Litsea cubeba*, extraído de uma planta aromática da família *Lauraceae*, apresenta entre os seus compostos majoritários a mistura de isômeros geranial e neral, com propriedade antifúngica conhecida (Silva *et al.*, 2022).

Pesquisas vêm comprovando a atividade antifúngica dos óleos essenciais. No entanto, os OEs apresentam desafios relacionados à sua volatidade, instabilidade a longo prazo e baixa persistência no ambiente, o que pode dificultar sua aplicação na agricultura (Zhu *et al.*, 2021). A presença predominante de compostos voláteis torna os OEs susceptíveis a fatores como calor, luz, radiação e oxigênio, comprometendo sua atividade biológica (Zhu *et al.*, 2021). Nesse contexto, a encapsulação surge como uma estratégia promissora para contornar esses desafios e ampliar as funcionalidades dos OEs (Zhu *et al.*, 2021).

A encapsulação dos OEs em uma matriz polimérica permite a preservação de sua atividade, o aumento da biodisponibilidade e a liberação controlada dos compostos encapsulados (Sundar e Parikh, 2023). Dentre os invólucros normalmente utilizados para proteger os OEs, destaca-se a zeína, que é uma proteína de origem

vegetal derivada do milho, biodegradável, biocompatível e com propriedades de automontagem (Berardi *et al.*, 2018). Essas propriedades tornam a zeína um excelente candidato para proteger e preservar os compostos bioativos presentes nos OEs.

Portanto, o objetivo deste trabalho é a encapsulação do óleo essencial de *Litsea cubeba* em nanopartículas de zeína por nanoprecipitação assistida por ultrassom. As nanopartículas serão caracterizadas quanto a morfologia, tamanho de partícula, eficiência de encapsulação, composição química, estabilidade térmica e estabilidade de armazenamento. Dessa forma, esse estudo possibilita o desenvolvimento de nanocarreador a base de óleo essencial, sustentável, que pode substituir pesticidas convencionais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

A zeína foi adquirida de Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). O óleo essencial de *Litsea cubeba* foi adquirido de Ferquima Indústria e Comércio LTDA (São Paulo, Brasil). Tween 80 e etanol foram obtidos de Neon Comercial LTDA (São Paulo, Brasil). O meio de cultura BDA utilizado foi adquirido de Kasvi (Madrid, Espanha).

Preparação de Z-OEL

A encapsulação de OEL em zeína foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Xia *et al.* (2022), com algumas modificações. Em primeiro lugar, 0,2 g de zeína foi dissolvida em 10 mL de etanol 85% (v/v), sob agitação magnética por 30 min a 300 rpm. Em seguida, foi adicionado OEL à fase solvente e novamente agitados por 1 h a 600 rpm. A proporção em massa de zeína para OEL foi de 1:0,25, 1:0,5 e 1:1 (m/m), respectivamente. A fase não solvente consistiu em 30 mL de solução aquosa contendo Tween 80 (0,5 %, m/v). Em seguida, a fase solvente foi adicionada gota a gota à fase não solvente. Posteriormente, a dispersão formada foi submetida ao dispersor ultrassônico a 70 % de amplitude por 0,5, 1, 2 e 4 min, utilizando um regime pulsado (10 s ligado / 5 s desligado). Para proceder com os ensaios de encapsulação de OEL, foi adotada a melhor condição de tempo de sonicação e proporção em massa

Z:OEL. Por fim, o etanol foi evaporado em uma chapa de aquecimento por 18 h a uma temperatura de 30 °C.

Caracterização das nanopartículas

O diâmetro hidrodinâmico (d) e PDI das nanopartículas foram determinados por espalhamento dinâmico de luz (DLS) em ZetaSizer Nano S (Malvern Instruments).

A morfologia de Z-OEL foi investigada usando um microscópio eletrônico de transmissão (TEM), operando a 100 kV.

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada para investigar a estabilidade térmica do OEL, Z-NPs e Z-OEL em analisador térmico simultâneo, sob atmosfera de nitrogênio com vazão de gás de 60 mL/min, taxa de aquecimento de 10 °C/min de 20 a 600 °C.

A eficiência de encapsulação (E_E) foi determinada utilizando o método de ultrafiltração/centrifugação. Para isso, as dispersões das nanopartículas contendo OE foram submetidas a centrifugação empregando filtros Amicon Ultra com poros de exclusão de 100 kDa (Millipore) em centrífuga a 13 000 rpm por 30 minutos. Posteriormente, uma alíquota do filtrado foi diluído em etanol e a quantificação dos compostos não encapsulados foi realizada por meio da leitura da absorbância em espectrofotômetro de UV-vis. A E_E foi calculada como a diferença entre a concentração de OE total e a concentração de OE livre.

Ensaio do crescimento micelial

A atividade antifúngica in vitro de Z-OEL foi determinada através de ensaios de crescimento micelial de *C. lindemuthianum*. Para isso, as concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 mg/mL de OEL encapsulado foram utilizadas para mensurar a inibição do fungo. Também foram mantidos um controle (C) contendo água e meio de cultura e outro contendo dispersão de nanopartículas de zeína (Z-NPs) e meio de cultura. Os discos de micélio, foram posicionados no centro das placas de petri contendo meio de cultura BDA, juntamente com as dispersões de Z-OEL e os controles. Depois disso, as placas de petri foram incubadas a uma temperatura de 21 ºC ± 2 ºC, sob um fotoperíodo de 12 horas por 7 dias. Após a incubação, foi medido o crescimento micelial do fungo em

dois eixos perpendiculares entre si para quantificar a taxa de inibição do crescimento (TIC), conforme descrito por (Karimi e Meiners, 2021).

Análise estatística

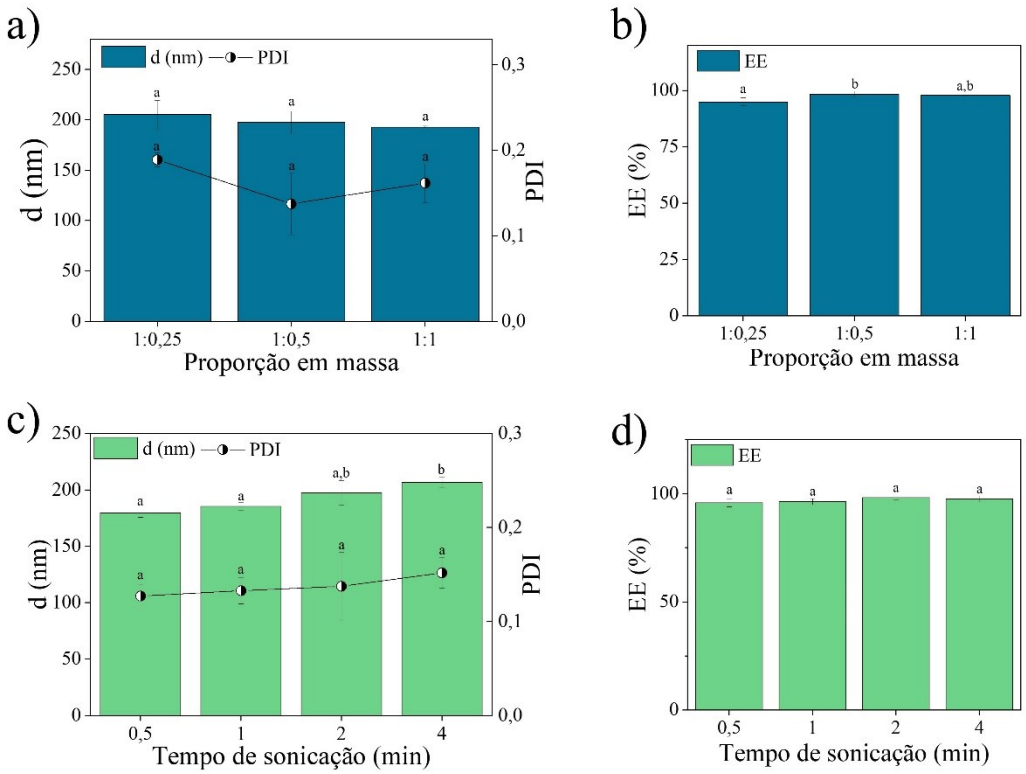
Os dados foram apresentados na forma de média ± desvio padrão, com todas as análises realizadas em triplicata. A avaliação estatística foi conduzida através de uma análise de variância de um fator, seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software Statistica (StatSoft, versão 10.0, Tulsa, EUA). A presença de letras diferentes nos gráficos denota variações estatisticamente significativas entre os grupos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de zeína carregadas com OEL em diferentes proporções em massa de OE para zeína pode ser visualizado na Figura 1. Os resultados revelaram que as proporções de OEL:Z não influenciaram significativamente o diâmetro das nanopartículas, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Os tamanhos obtidos para ambos os sistemas se situaram em torno de 200 nm, indicando a obtenção de partículas submicrométricas. Além disso, foi observado a distribuição homogênea do tamanho de partícula, com PDI < 0,3. Esses valores de d e PDI podem ser explicados pelo uso do ultrasom, um método de alta energia, que permite a obtenção de sistemas com tamanho e PDI menores em comparação a outras técnicas de alta energia, além de proporcionar maior estabilidade ao longo do tempo (Pongsumpun, Iwamoto e Siripatrawan, 2020).

Outro parâmetro importante é a eficiência de encapsulação, que determina a quantidade de composto bioativo retida no material de casca. Nesse contexto, também foi analisado a quantidade de OEL aprisionado em zeína em diferentes proporções de massa, conforme ilustrado na Figura 1b. À medida que a proporção em massa de OEL para zeína variou de 1:0,25 para 1:1, houve apenas uma pequena variação na eficiência de encapsulação do composto bioativo. No entanto, em todos os sistemas testados, a eficiência de encapsulação foi superior a 94 %.

Figura 1 – a) d e PDI, b) EE da formulação Z-OEL em diferentes proporções em massa, c) d e PDI, d) EE da formulação Z-OEL submetidas a diferentes tempos de sonicação.



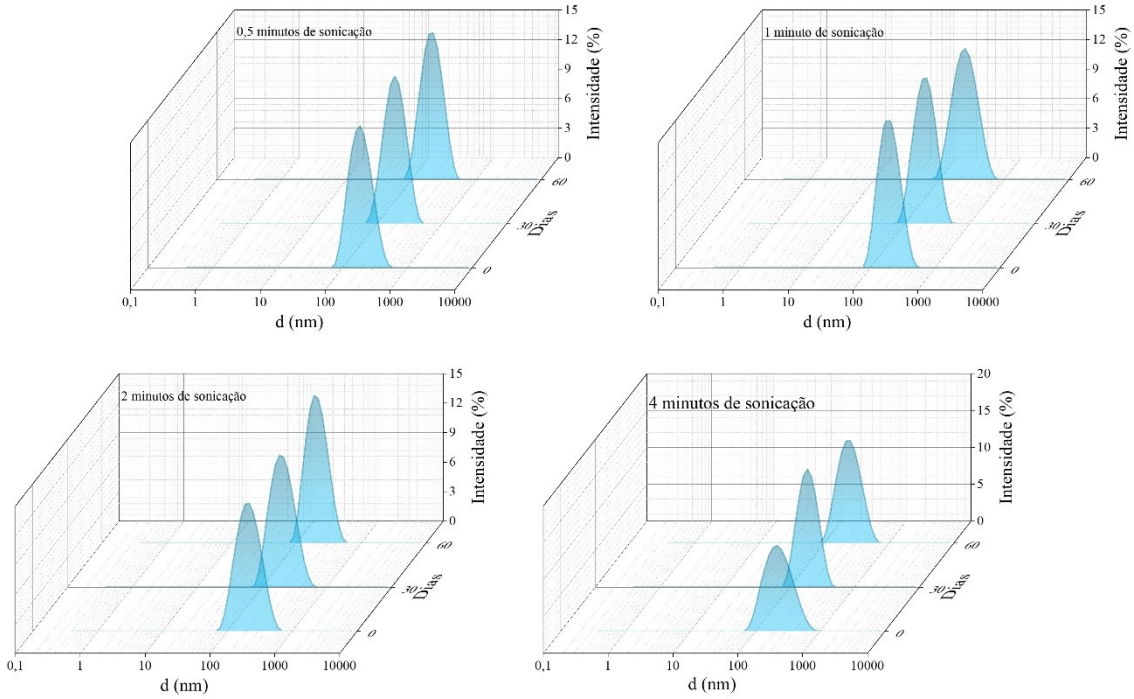
Também foi investigado o tamanho das partículas e a eficiência de encapsulação em diferentes tempos de sonicação, bem como a estabilidade das nanopartículas por até 60 dias. Para isso, foi selecionada a proporção 1:0,5 em massa, na qual foi alcançada a maior eficiência de encapsulação (98,25 ± 1,12%), para conduzir os testes em diferentes tempos de sonicação. Para os ensaios em diferentes tempos de sonicação foi observado que o diâmetro hidrodinâmico das formulações nos tempos de 0,5, 1 e 2 min permaneceu inferior a 200 nm, sem diferenças significativas entre eles. No entanto, a formulação obtida com 4 min de sonicação apresentou um tamanho de partícula ligeiramente superior a 200 nm. As formulações obtidas em diferentes tempos de sonicação exibiram uma distribuição estreita, com PDI < 0,2.

Além disso, também foi avaliada a eficiência de encapsulação do OEL em zeína na proporção de 1:0,5 em massa em diferentes tempos de sonicação. Novamente, foram obtidas altas eficiências de encapsulação, todas acima de 95%, sem detectar

diferenças significativas entre as eficiências obtidas nos tempos testados. Essas altas eficiências de encapsulação provavelmente resultam da afinidade entre a zeína e OEL. O óleo essencial é um composto hidrofóbico, enquanto a zeína possui caráter anfifílico, com uma proporção considerável de aminoácidos hidrofóbicos. Essas propriedades tornam a zeína um carreador ideal para encapsular OEL, garantindo um processo de encapsulação eficaz.

Por último, também foi avaliada a estabilidade das nanopartículas Z-OEL medindo o diâmetro hidrodinâmico em diferentes intervalos de tempo, conforme detalhado na Figura 2. Em todos os pontos de avaliação, foi observado que a distribuição do tamanho de partícula permaneceu estreita, com PDI inferior a 0,2, sem diferenças significativas entre os tratamentos nos períodos avaliados. Além disso, os diâmetros hidrodinâmicos das formulações de 0,5, 1 e 2 min de sonicação não apresentaram variações significativas ao longo de 60 dias, indicando a estabilidade dessas formulações durante o período de avaliação.

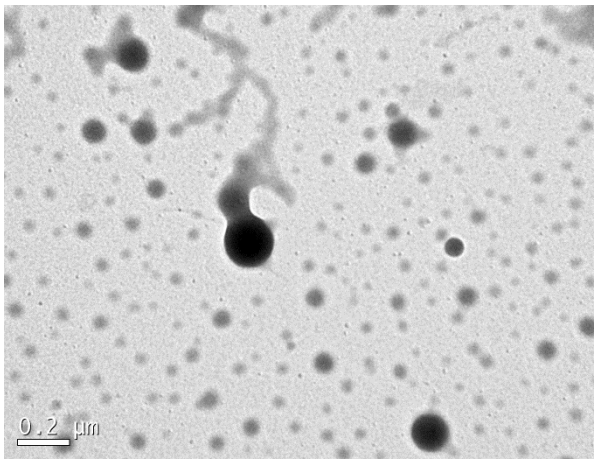
Figura 2 – Estabilidade de armazenamento de Z-OEL submetidos a diferentes tempos de sonicação.



Morfologia de Z-LEO

As características estruturais das nanopartículas Z-OEL foram determinadas utilizando TEM, conforme mostrado na Figura 3. As nanopartículas Z-OEL apresentaram uma forma homogênea e esférica, com surfactante presente na superfície, aparecendo como partículas individuais ou em aglomerados frouxamente associados.

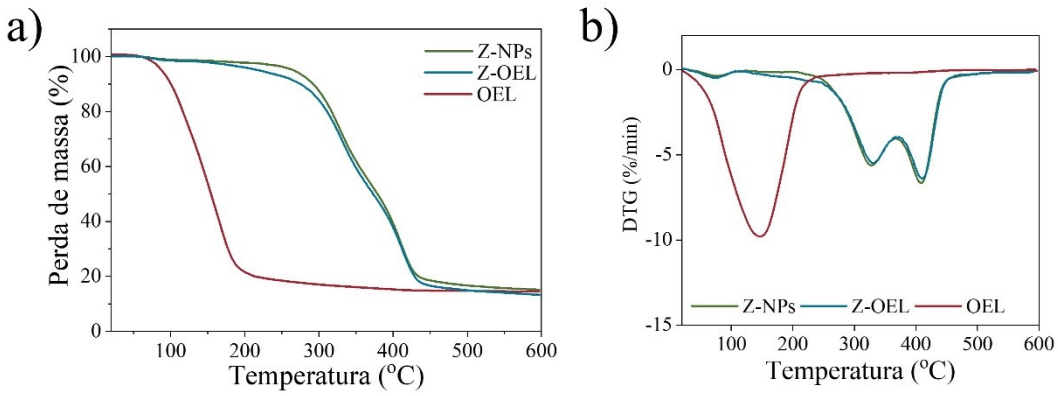
Figura 3 – Morfologia de Z-OEL por TEM.



Análise termogravimétrica

O perfil térmico dos OEL consiste em uma única etapa de degradação, com mais de 90 % de perda de massa em temperaturas inferiores a 300 ◦C (Figura 4). Essa decomposição dos componentes dos OEL está relacionada a alta volatilidade e ao baixo peso molecular dos seus compostos voláteis.

Figura 4 – TGA e DTG de OEL, Z-NPs e Z-OEL.



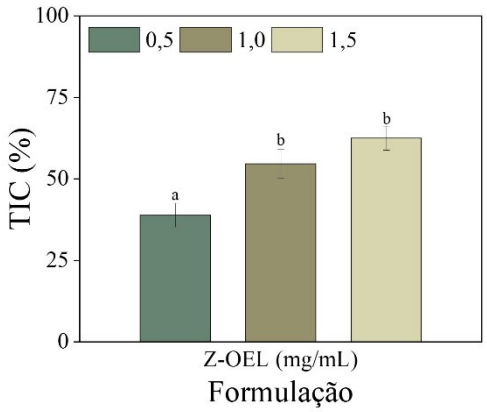
A curva termogravimétrica de Z-NPs teve três eventos térmicos. Inicialmente, Z-NPs apresentaram uma primeira perda de massa (~ 1,0 %) entre 45 e 127 °C, relacionada a perda de moléculas de água que podem estar aderidas à superfície da amostra. O segundo evento térmico entre 212 e 371 °C, apresentou a maior perda de massa (~ 45 %) das Z-NPs, correspondente à degradação da estrutura proteica do material (Angourani *et al.*, 2022). O terceiro evento térmico na faixa de 371 e 490 °C com ~ 37 % também está relacionado à degradação do polímero (Rosa, da *et al.*, 2015).

No perfil termogravimétrico de Z-OEL é possível notar uma similaridade com o perfil térmico de Z-NPs, em que houve a presença de três eventos térmicos. Especificadamente, Z-OEL também apresentou as três perdas de massa similares e em temperaturas próximas às observadas para Z-NPs. De uma maneira geral, os resultados obtidos por TGA/DTG reforçam a capacidade da zeína de aumentar a estabilidade térmica de OEL e postergar a degradação dos seus compostos.

Atividade antifúngica *in vitro*

O ensaio de crescimento micelial do *C. lindemuthianum* revelou que Z-OEL em zeína teve um efeito dose-dependente sobre o crescimento micelial do patógeno que acomete a cultura do feijão, conforme Figura 5. Z-OEL inibiu o crescimento micelial em 39 % na menor concentração testada e à medida que a concentração de OEL aumentou na dispersão coloidal foi possível observar uma maior inibição do fungo. Quando foi utilizado 1,5 mg/mL de OEL, foi observado cerca de 63 % de inibição do crescimento micelial, demonstrando boa atividade antifúngica. É possível que a liberação mais rápida desses compostos das nanopartículas tenha impedido o desenvolvimento do fungo. Os óleos essenciais não têm um mecanismo de ação específico devido à complexidade de sua composição química (Silva, da *et al.*, 2022). No entanto, um mecanismo amplamente aceito é o aumento da permeabilidade da membrana celular, devido à natureza hidrofóbica dos óleos essenciais, que facilita a difusão e interação com alvos potenciais na membrana plasmática fúngica ou até mesmo com componentes intracelulares (Hou *et al.*, 2022).

Figura 5 – Taxa de inibição do crescimento de *C. lindemuthianum* em diferentes concentrações de Z-OEL.



CONCLUSÃO

Em conclusão, a dispersão coloidal Z-OEL exibiu atividade antifúngica contra *C. lindemuthianum*. Os resultados deste estudo também mostraram que as nanopartículas apresentaram estabilidade física e estabilidade térmica, com diâmetro hidrodinâmico similar ao longo dos 60 dias de armazenamento. Além disso, a zeína mostrou-se eficaz ao encapsular mais de 90% do OEL em todas as proporções Z:OEL testadas, destacando seu potencial como material de casca. Logo, o estudo recomenda, então, Z-OEL como agente antifúngico para potencializar as propriedades do composto bioativo e protegê-lo contra condições ambientais desfavoráveis.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq).

REFERÊNCIAS

ANGOURANI, H. R.; HEYDARI, M.; YOUSEFI, A. R.; PASHAEI, B.; MASTINU, A. Nanoparticles Based-Plant Protein Containing Rosmarinus officinalis Essential Oil;

Fabrication, Characterization, and Evaluation. **Applied Sciences**, v. 12, n. 19, 2022.

BERARDI, A.; BISHARAT, L.; ALKHATIB, H. S.; CESPI, M. Zein as a Pharmaceutical Excipient in Oral Solid Dosage Forms: State of the Art and Future Perspectives. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 5, p. 2009–2022, 2018.

DERESA, E. M.; DIRIBA, T. F. Phytochemicals as alternative fungicides for controlling plant diseases: A comprehensive review of their efficacy, commercial representatives, advantages, challenges for adoption, and possible solutions. **Heliyon**, v. 9, n. 3, p. e13810, 2023.

GILLARD, C. L.; RANATUNGA, N. K. Interaction between seed treatments, surfactants and foliar fungicides on controlling dry bean anthracnose (Colletotrichum lindemuthianum). **Crop Protection**, v. 45, p. 22–28, 2013.

HOU, T.; SANA, S. S.; LI, H.; XING, Y.; NANDA, A.; NETALA, V. R.; ZHANG, Z. Essential oils and its antibacterial, antifungal and anti-oxidant activity applications: A review. **Food Bioscience**, v. 47, p. 101716, 2022.

HU, J.; XIANYU, Y. When nano meets plants: A review on the interplay between nanoparticles and plants. **Nano Today**, v. 38, p. 101143, 2021.

KARIMI, A.; MEINERS, T. Antifungal activity of Zataria multiflora Boiss. essential oils and changes in volatile compound composition under abiotic stress conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 171, p. 113888, 2021.

LAMMARI, N.; LOUAER, O.; MENIAI, A. H.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Plant oils: From chemical composition to encapsulated form use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 601, p. 120538, 2021.

PONGSUMPUN, P.; IWAMOTO, S.; SIRIPATRAWAN, U. Response surface methodology for optimization of cinnamon essential oil nanoemulsion with improved stability and antifungal activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 60, p. 104604, 2020.

ROSA, C. G. DA; OLIVEIRA BRISOLA MACIEL, M. V. DE; CARVALHO, S. M. DE; MELO, A. P. Z. DE; JUMMES, B.; SILVA, T. DA; MARTELLI, S. M.; VILLETTI, M. A.; BERTOLDI, F. C.; BARRETO, P. L. M. Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 481, p. 337–344, 2015.

SILVA, B. D. DA; ROSÁRIO, D. K. A. DO; WEITZ, D. A.; CONTE-JUNIOR, C. A. Essential oil nanoemulsions: Properties, development, and application in meat and meat products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 121, p. 1–13, 2022.

SILVA, G. DOS S. E; MARQUES, J. N. DE J.; LINHARES, E. P. M.; BONORA, C. M.; COSTA, É. T.; SARAIVA, M. F. Review of anticancer activity of monoterpenoids: Geraniol, nerol, geranial and neral. **Chemico-Biological Interactions**, v. 362, p. 109994, 2022.

SUNDAR, S. K.; PARIKH, J. K. Advances and trends in encapsulation of essential oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 635, p. 122668, 2023.

XIA, Y.; WANG, Y.; LOU, S.; WEN, M.; NI, X. Fabrication and characterization of zein-encapsulated Litsea cubeba oil nanoparticles and its effect on the quality of fresh pork. **Food Bioscience**, v. 49, p. 101834, 2022.

ZHU, Y.; LI, C.; CUI, H.; LIN, L. Encapsulation strategies to enhance the antibacterial properties of essential oils in food system. **Food Control**, v. 123, p. 107856, 2021.

ZUBROD, J. P. *et al.* Fungicides: An Overlooked Pesticide Class? **Environmental Science & Technology**, v. 53, n. 7, p. 3347–3365, 2 abr. 2019.

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF ZEIN NANOCAPSULES CONTAINING *LITSEA CUBEBA* ESSENTIAL OIL FOR PEST CONTROL IN AGRICULTURE

ABSTRACT

The use of synthetic pesticides in agriculture can lead to environmental and human health issues. Essential oils (EOs) offer a natural alternative but are limited by high volatility and low stability. To address these challenges, encapsulating EOs in biopolymers like zein provides an effective solution, ensuring long-term stability while preserving their biological activity. Zein nanoparticles loaded with *Litsea cubeba* essential oil (Z-LEO) were prepared via ultrasound-assisted nanoprecipitation and characterized for morphology, encapsulation efficiency (EE), thermal and storage stability. The Z-EO nanoparticles exhibited a diameter of ~200 nm, a PDI < 0.3, EE > 90%, and high thermal stability. Their antifungal activity against *Colletotrichum lindemuthianum*, a fungus affecting bean crops, was 65% at the highest concentration tested, highlighting zein's potential as a carrier for EOs in controlling the fungus responsible for bean anthracnose.

Keywords: biopolymer, stability, *Colletotrichum lindemuthianum*, biofungicides.