

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Avaliação da eficácia do óleo essencial de Melaleuca
encapsulado em pectina cítrica no controle *in vitro* de
Leucoagaricus gongylophorus”**

Bruno Ricardo Moreira*

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MESTRE EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA ORGÂNICA

Orientador: Prof. Dr. Moacir Rossi Forim

* Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnologia –
CNPq

São Carlos – SP
2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Bruno Ricardo Moreira, realizada em 26/03/2025.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim (UFSCar)

Prof. Dr. Felipe Christoff Wouters (UFSCar)

Profa. Dra. Jéssica Cristina Amaral (ESALQ/USP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Eppur si muove

Agradecimentos

A conclusão desta dissertação representa a soma dos esforços de muitas pessoas, às quais expresso minha profunda gratidão.

Primeiramente, agradeço ao meu orientador, Dr. Moacir Rossi Forim, pelo apoio, paciência e orientação ao longo de toda a pesquisa. Sua experiência e incentivo foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros dos laboratórios que compartilharam comigo essa jornada acadêmica, meu sincero agradecimento pelo apoio, pelas discussões produtivas e pela parceria nos desafios diários, especialmente àqueles que me ajudaram nas etapas finais, oferecendo conselhos, correções, ensinamentos e, acima de tudo, incentivando-me a concluir essa caminhada.

Um agradecimento especial à Dra. Dorai Periotto Zandonai, cuja ajuda foi essencial ao longo deste trabalho. Sua dedicação, paciência e generosidade ao compartilhar conhecimento fizeram toda a diferença nos momentos mais desafiadores. Sou imensamente grato pelo apoio constante, que contribuiu não apenas para esta pesquisa, mas também para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Agradeço também à minha família pelo suporte incondicional, pelo carinho e por sempre acreditarem no meu potencial, mesmo nos momentos mais difíceis, especialmente ao meu irmão Gabriel.

À UFSCar e aos laboratórios envolvidos, pela infraestrutura e recursos disponibilizados, que tornaram possível a realização deste estudo, e a todas as pessoas que compõem essa comunidade acadêmica, em especial ao Departamento de Química.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Química pelo suporte acadêmico e pelas oportunidades de aprendizado ao longo desta jornada.

Minha gratidão também ao CNPq pela bolsa, que viabilizou a realização desta pesquisa e contribuiu significativamente para seu desenvolvimento.

Aos membros da banca de qualificação e defesa, agradeço por dedicarem seu tempo e conhecimento na avaliação deste trabalho. Suas contribuições, sugestões e questionamentos foram fundamentais para o aprimoramento da pesquisa e para meu crescimento acadêmico.

Por fim, sou grato a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para esta caminhada. A cada palavra de incentivo, conselho e gesto de apoio, meu muito obrigado.

Lista de abreviaturas

BSE	Elétrons Retroespalhados
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
EDS	Espectrômetro de Dispersão de Energia
FEG	Feixe de Emissão de Campo
FT-ICR	Espectrometria de massas por ressonância ciclôtrica de íons com detecção por transformada de Fourier
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
MEP	Via do metileritritol fosfato
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MEV	Via do mevalonato
MS	Espectrometria de Massas
PCA	Análise de Componentes Principais
Q-TOF	Quadrupolo – Tempo de Voo
SE	Elétrons Secundários
STEM	Microscópio Eletrônico de Transmissão por Varredura
TOF	Tempo de Voo

Lista de tabelas

Tabela 1: Porcentagem de compostos em massa para uma solução de 100g .	40
Tabela 2: Bandas cromatográficas observadas na análise do óleo essencial de melaleuca, utilizando gc-ms headspace.....	55
Tabela 3: Principais compostos observados na análise do óleo essencial de melaleuca, utilizando gc-ms headspace.....	56
Tabela 4: Pontos da curva de calibração.	57
Tabela 5: Quantificação melaleuca.	57
Tabela 6: Tabela de planejamento fatorial.....	58
Tabela 7: Valores de porcentagem de encapsulamento.	59
Tabela 8: Tabela de planejamento fatorial.....	62
Tabela 9: Valores de porcentagem de encapsulamento.	62
Tabela 10: Quantificação das formulações secas,	63
Tabela 11: Tamanho das partículas.	68
Tabela 12: Tamanho das partículas.	70
Tabela 13: Cinética de crescimento com solução de pectina.	85
Tabela 14: cinética de crescimento com formulação.....	87

Lista de figuras

FIGURA 1: <i>Melaleuca alternifolia</i> (tea tree) -	20
FIGURA 2: Exsicata de <i>melaleuca alternifolia</i> (tea tree).....	20
FIGURA 3: Mapa da Austrália.....	21
FIGURA 4: Compostos presentes no óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>. 25	25
FIGURA 5: Dendrímeros, micelas e lipossomas.....	29
FIGURA 6: Fluxograma ilustrativo.	39
FIGURA 7: Cromatograma do óleo essencial de Melaleuca,	55
FIGURA 8: Cromatograma da curva de calibração,	56
FIGURA 9: Curva de calibração de Gama terpineno.	57
FIGURA 10: Gráfico de porcentagem de efeitos,.....	59
FIGURA 11: Gráfico de magnitude de efeitos,	60
FIGURA 12: Exemplo de espectro de massas da formulação.....	61
FIGURA 13: Estrutura das moléculas,	61
FIGURA 14: Problemas na microscopia eletrônica de varredura.....	65
FIGURA 15: Imagens correspondentes a uma das formulações líquidas.....	67
FIGURA 16: Imagens correspondentes a uma das formulações secas	69
FIGURA 17: MEV da pectina cítrica comercial	72
FIGURA 18: MEV da solução de pectina cítrica.	73
FIGURA 19: MEV da formulação	74
FIGURA 20: MEV da solução de pectina cítrica seca por <i>Spray-dryer</i>.	75
FIGURA 21: MEV da solução de pectina cítrica seca por liofilização.	76
FIGURA 22: MEV da formulação seca por <i>Spray dryer</i>.....	78
FIGURA 23: MEV da formulação seca por liofilização.....	79
FIGURA 24: MEV da formulação seca em condições atmosféricas.....	80
FIGURA 25: Formulação com maior rendimento (14)	82
FIGURA 26: Inibição de crescimento em relação à área micelial do limoneno. 83	83
FIGURA 27: Inibição de crescimento em relação à área micelial do óleo	84
FIGURA 28: Inibição de crescimento da formulação	89
FIGURA 29: Crescimento do micelial ao decorrer de 35 dias	89
FIGURA 30: Comparação do crescimento microbiano nas placas	91

RESUMO

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA ENCAPSULADO EM PECTINA CÍTRICA NO CONTROLE *IN VITRO* DE *LEUCOAGARICUS GONGYLOPHORUS*” – As formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são amplamente encontradas no Brasil. Esses insetos sociais coletam material vegetal para utilizá-lo como substrato no cultivo simbiótico do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, com o qual mantêm uma relação mutualística. No entanto, essa coleta causa danos às atividades humanas relacionadas à silvicultura, ao pastoreio e à agricultura.

O controle dessas formigas é geralmente realizado por meio de agentes químicos, que podem ter efeitos prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana. Uma abordagem alternativa consiste na utilização de metabólitos secundários de plantas para o controle dessas populações. No entanto, esses compostos muitas vezes são instáveis e apresentam dificuldade no controle da liberação. Para contornar esses problemas, busca-se empregar um processo de encapsulamento com biopolímeros. Dessa forma, o objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de uma formulação voltada para o controle das formigas cortadeiras. A proposta baseou-se na utilização do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, também conhecida como árvore-do-chá, *tea tree* ou simplesmente melaleuca. Esse óleo essencial é amplamente empregado na indústria em produtos de higiene e como fitoterápico para problemas de pele, entre outros usos, além de possuir eficácia comprovada no controle microbiano.

A primeira etapa do trabalho consistiu na realização de ensaios biológicos para avaliar a atividade do óleo essencial sobre o crescimento do fungo simbiote, em diversas concentrações. Observou-se inibição total do crescimento fúngico em concentrações superiores a 15 microlitros. Em seguida, com base em levantamento bibliográfico sobre biopolímeros, foi escolhida a pectina cítrica como agente encapsulante.

Para o desenvolvimento do método de preparo da formulação, foram realizados diversos experimentos com variações nos parâmetros do processo, visando maximizar o rendimento do encapsulamento. Esse rendimento foi quantificado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, empregando a técnica de *headspace*. Obteve-se uma formulação com rendimento aproximado de 84%. Com

ela, foi desenvolvido um ensaio biológico para verificar seu efeito sobre o crescimento do fungo *L. gongylophorus*, o qual apresentou uma inibição de 80%.

Esses resultados indicam que a formulação desenvolvida pode ser uma alternativa ecológica e eficiente em relação aos compostos tradicionais no controle de formigas cortadeiras.

Palavras-chave: *Atta* e *Acromyrmex*, *Leucoagaricus gongylophorus*, Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, Encapsulamento com biopolímeros, Controle de formigas cortadeiras, Pectina cítrica.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF MELALEUCA ESSENTIAL OIL IN CITRUS PECTIN FOR THE *IN VITRO* CONTROL OF *LEUCOAGARICUS GONGYLOPHORUS* – Leaf-cutting ants of the genera *Atta* and *Acromyrmex* are widely found in Brazil. These social insects collect plant material to use as a substrate for the symbiotic cultivation of the fungus *Leucoagaricus gongylophorus*, with which they maintain a mutualistic relationship. However, this foraging activity causes damage to human activities related to forestry, grazing, and agriculture.

The control of these ants is generally carried out using chemical agents, which may have harmful effects on the environment and human health. An alternative approach involves the use of plant secondary metabolites to control these populations. However, such compounds are often unstable and difficult to control in terms of release. To address these issues, an encapsulation process using biopolymers has been explored. The main objective of this study was to develop a formulation aimed at controlling leaf-cutting ants. The approach was based on the use of essential oil from *Melaleuca alternifolia*, also known as tea tree. This essential oil is widely used in hygiene products and as a herbal remedy for skin conditions, among other uses, and has proven effectiveness in microbial control.

The first part of the study consisted of biological assays to evaluate the activity of the essential oil on the growth of the symbiotic fungus at various concentrations. Complete inhibition was observed at concentrations above 15 microliters. Based on a literature review on biopolymers, citrus pectin was selected as the encapsulating agent.

To develop the formulation method, several experiments were conducted with variations in process parameters, aiming to maximize encapsulation yield. This yield was quantified using gas chromatography coupled with mass spectrometry, employing the headspace technique. A formulation with approximately 84% yield was obtained. Using this formulation, a biological assay was carried out to evaluate its effect on the growth of *L. gongylophorus*, resulting in 80% fungal growth inhibition.

These results indicate that the developed formulation may serve as an ecological and effective alternative to conventional compounds for the control of leaf-cutting ants.

Keywords: *Atta* and *Acromyrmex*, *Leucoagaricus gongylophorus*, *Melaleuca alternifolia* essential oil, Biopolymer encapsulation, Leaf-cutting ant control, Citrus pectin

Sumário

1	Revisão Bibliográfica	1
1.1	Atividades agrícolas e problemas relacionados	1
1.2	Etnobotânica, aspectos históricos e óleos essenciais	13
1.3	<i>Melaleuca alternifolia</i>	19
1.4	Técnicas relacionadas	27
2	Objetivos	36
2.1	Objetivo Geral	36
2.2	Objetivos Específicos	36
3	Material e Método	37
3.1	Materiais	37
3.1.1	Equipamentos	37
3.1.2	Reagentes	37
3.1.3	Softwares Utilizados	38
3.2	Métodos	38
3.2.1	Seleção dos Materiais	38
3.2.2	Obtenção da Formulação	40
3.2.3	Secagem por Aspersão (<i>Spray-Drying</i>)	41
3.2.4	Otimização do encapsulamento e análise química (PCA e CG-MS)	42
3.2.5	Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas	42
3.2.6	Desenvolvimento da Curva de Calibração por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS)	44
3.2.7	Caracterização morfológica	45
3.2.8	Ensaio biológico de cinética de crescimento com formulação	47
3.2.9	Avaliação do Crescimento Micelial	48
3.2.10	Avaliação de Contaminação da Formulação	48
4	Resultados e Discussão	50
4.1	Desenvolvimento da formulação	50
4.1.1	Escolha dos materiais	50
4.1.2	Problemas no desenvolvimento	53
4.2	Otimização do encapsulamento e análise química	55
4.3	Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	64
4.3.1	Problemas relacionados a análise de biopolímeros por MEV	64
4.3.2	Avaliação morfológica das primeiras formulações	66
4.3.3	Avaliação da formulação com maior rendimento	71
4.4	Ensaio biológicos e avaliação antifúngica	82
4.4.1	Ensaio biológico de cinética de crescimento com óleo essencial	82
4.4.2	Ensaio biológico de cinética de crescimento com formulação	85
4.4.3	Ensaio Biológico de Contaminação da Formulação	90
5	Conclusão	93
6.	Referências Bibliográficas	94
7.	Apêndices	101
7.1.	Apêndice A	101
7.2.	Apêndice B	120

1 Revisão Bibliográfica

1.1 Atividades agrícolas e problemas relacionados

O desenvolvimento humano, impulsionado pela ciência e pela tecnologia, tem proporcionado inúmeros avanços que transformaram profundamente a vida em sociedade. A partir desses progressos, novos saberes e ferramentas emergiram, resultando em melhorias significativas em diversos aspectos da vida cotidiana. Avanços sociais, médicos, de infraestrutura, de saneamento básico e na produção de alimentos são exemplos marcantes desse processo. No entanto, embora esses avanços tenham gerado benefícios inegáveis, também trouxeram consigo efeitos negativos que se manifestam em diferentes escalas de tempo, curto, médio e longo prazo e em diversas dimensões, como a social, médica, ecológica e econômica.

Um dos campos que mais sofreu transformações drásticas foi o da produção de alimentos e a gestão dos biomas. A adoção de novos paradigmas tecnológicos, aliada às previsões relacionadas às mudanças climáticas, abriu um leque de desafios e oportunidades. Por um lado, há um potencial significativo para aumentar a produtividade agrícola e reduzir os impactos ambientais por meio de práticas inovadoras. Por outro, as incertezas quanto aos efeitos a longo prazo dessas transformações exigem uma reflexão crítica e aprofundada sobre os modelos de desenvolvimento sustentável a serem adotados.

Nesse contexto, é fundamental analisar como a ciência e a tecnologia podem ser direcionadas para promover um equilíbrio entre o progresso humano e a preservação dos ecossistemas. E, portanto, contextualizar os avanços e os desafios decorrentes do desenvolvimento tecnológico, com foco especial na produção de alimentos e na gestão dos biomas, destacando a necessidade de um enfoque sustentável que considere tanto as demandas atuais quanto as futuras gerações. A preocupação com a produção de alimentos ou, melhor dizendo, com a sua possível escassez não é recente. No final do século XVIII, Thomas Robert Malthus, clérigo anglicano, economista e matemático, apresentou uma teoria que se tornaria um marco no debate sobre o crescimento populacional e a disponibilidade de recursos. Em 1798, Malthus propôs que a população humana tende a crescer de forma exponencial, enquanto a produção de alimentos aumenta apenas aritmeticamente. Essa teoria, conhecida como malthusianismo, previa que, sem um controle da natalidade, a

população ultrapassaria a capacidade de produção de alimentos, resultando em cenários catastróficos, como fome, doenças e conflitos. Malthus afirmava que a população mundial dobraria a cada 25 anos, enquanto a produção de alimentos cresceria de maneira muito mais lenta. (FONTANA, COSTA, SILVA & RODRIGUES, 2015).

Contudo, as previsões de Malthus não se concretizaram da forma como ele imaginou. Graças ao desenvolvimento de tecnologias agrícolas como o uso de insumos, a biotecnologia e a mecanização, a produção de alimentos aumentou significativamente, superando as expectativas mais pessimistas (FONTANA, COSTA, SILVA & RODRIGUES, 2015).

No entanto, é importante ressaltar que esses avanços não ocorreram sem impactos. A intensificação agrícola e a adoção de novas tecnologias trouxeram consigo desafios ambientais, sociais e econômicos que precisam ser cuidadosamente analisados. A espécie humana sempre dependeu da natureza para obter os recursos necessários à sua sobrevivência. Desde os primórdios, por meio da coleta, caça e pesca, até a consolidação da prática agrícola, a relação entre o homem e o meio ambiente foi fundamental para o desenvolvimento das sociedades. A agricultura, atividade responsável pela produção de alimentos, atende tanto as populações rurais quanto urbanas, sendo definida como o conjunto de técnicas empregadas para cultivar plantas com finalidades variadas, como alimentos, fibras, energia, matéria-prima para roupas, construções, medicamentos e ferramentas (LIMA, SILVA E IWATA, 2019).

Sua origem remonta ao período Neolítico, há mais de 10 mil anos, em áreas restritas e pouco extensas do planeta. Essas primeiras práticas agrícolas eram realizadas próximo às moradias e às vazantes de rios, em terras férteis que não exigiam desmatamento. Com o desenvolvimento de técnicas agrícolas e o estabelecimento de um modo de vida sedentário, houve maior fixação populacional, crescimento acelerado da população e aumento da demanda por terras destinadas à produção de cereais (LIMA, SILVA E IWATA, 2019).

Por volta de 1.000 a.C., sistemas agrícolas mais sofisticados começaram a surgir, com o uso de ferramentas para lavrar a terra. Até o século XIX, esses sistemas foram gradualmente substituídos pela agricultura especializada, como as monoculturas, que se beneficiavam de vantagens naturais e econômicas, dependentes de insumos, máquinas e comercialização industrial. Nas antigas colônias, implantou-se o modelo *plantation*, caracterizado por mão de obra escrava,

monocultura, produção voltada para exportação e grandes propriedades. Apesar das mudanças ao longo do tempo, essa estrutura permanece em muitos aspectos, com exceção do uso de mão de obra escrava (LIMA, SILVA E IWATA, 2019).

A "Revolução Verde" marcou um período de intensa industrialização na agricultura, promovendo o uso de tecnologias desenvolvidas durante a Segunda Guerra Mundial. Esse processo, no entanto, resultou em desmatamentos e na exploração excessiva dos solos em escala global. Já na década de 1970, preocupações começaram a surgir em relação aos impactos ambientais decorrentes dessas práticas, como a compactação do solo, erosão, enchentes, tempestades de poeira e secas, além da diminuição dos recursos hídricos, com rios começando a secar (PRIMAVESI, 2003).

A implementação das monoculturas, visando viabilizar a mecanização em grande escala, trouxe impactos profundos. As reservas naturais de matéria orgânica no solo foram rapidamente esgotadas, sendo substituídas por adubos químicos. Paralelamente, a mão de obra rural foi substituída por máquinas, o que levou a migrações em massa para as cidades e ao crescimento desordenado de favelas. Esse distanciamento da natureza e do solo prejudicou o equilíbrio ambiental, essencial para a manutenção da vida. Além disso, a agricultura passou a contribuir significativamente para o efeito estufa (PRIMAVESI, 2003).

Práticas como a lavração e as queimadas aumentam a emissão de CO_2 e metano (CH_4), sendo este último 25 vezes mais potente como gás de efeito estufa. Solos irrigados ou compactados emitem ainda óxido nitroso (N_2O), que possui um impacto 250 vezes maior que o CO_2 . A compactação do solo também reduz sua oxigenação, prejudicando o metabolismo vegetal e favorecendo condições anaeróbicas que geram energia insuficiente para as plantas e liberam compostos minerais tóxicos, como alumínio e ferro (PRIMAVESI, 2003).

Em contrapartida, a agricultura orgânica surge como um sistema de produção baseado no equilíbrio ecológico, priorizando a fertilidade natural do solo por meio do aumento de matéria orgânica. Os microrganismos presentes nos compostos biodegradáveis convertem nutrientes essenciais em formas biodisponíveis para as plantas, promovendo um ambiente saudável que fortalece os cultivos contra pragas e doenças (ORMOND et al., 2002).

Esse sistema visa trabalhar com processos biológicos naturais, onde interações ecológicas contribuem para a fertilidade do solo, a produtividade e a

proteção das culturas. As práticas orgânicas incluem a preservação da biodiversidade microbiana no solo, promovendo condições ideais de umidade, aeração e equilíbrio ambiental. O uso de insumos minerais não-renováveis ou sintéticos é evitado, pois compromete o solo e o ecossistema. Esses princípios garantem uma produção agrícola sustentável, respeitando o meio ambiente e promovendo alimentos de qualidade (ORMOND et al., 2002).

Em um ecossistema natural, os seres vivos mantêm um equilíbrio dinâmico, sustentado por fatores como nutrientes adequados, solo saudável, umidade ideal, luz adequada e a presença de níveis tróficos. A monocultura, ao substituir a biodiversidade por poucas espécies cultivadas e depender de agroquímicos, rompe esse equilíbrio biológico. Esse desequilíbrio pode levar a surtos populacionais de insetos, gerar competições entre espécies de plantas e causar surtos de doenças, reduzindo a produtividade e causando prejuízos econômicos. Essas espécies, que impactam negativamente a produção, são classificadas como pragas (ZANUNCIO JUNIOR et al., 2018).

Mesmo com esses efeitos negativos, o uso de agrotóxicos na agricultura permanece popular devido à sua simplicidade e eficácia aparente, exigindo pouco conhecimento do agroecossistema para sua aplicação. Contudo, estima-se que 90% dos agrotóxicos aplicados não atingem o alvo, sendo dispersos no meio ambiente, especialmente no solo e na água. Esses problemas ocorrem devido a aplicações inadequadas, como pulverizações feitas de forma preventiva ou sem necessidade, baseadas em calendários e não na presença real de pragas (BETTIOL E GHINI, 2003).

O uso de controles químicos evoluiu ao longo do tempo, começando com métodos simples e naturais, como a aplicação de sabão, óleos e plantas específicas. No final do século XIX, surgiram compostos sintéticos, como o verde de Paris (nome popular do acetoarsenito de cobre, $3\text{Cu}(\text{AsO}_2)_2 \cdot \text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) e emulsões para controle de pragas. Durante as décadas de 1920 a 1940, novas formulações químicas, incluindo arseniatos, compostos de enxofre e fumigantes, ganharam destaque, ampliando o controle sobre diferentes tipos de pragas agrícolas (SAITO E LUCCHIN, 1997)..

Na década de 1950, houve o desenvolvimento de defensivos químicos sintéticos, como o Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT). Embora inicialmente celebrado por sua eficácia no controle de pragas e doenças transmitidas por insetos, o uso

indiscriminado revelou problemas ambientais e de saúde pública, incluindo a resistência de pragas e a toxicidade ambiental (SAITO E LUCCHIN, 1997).

O Brasil, um país de proporções continentais com grande potencial agrícola, já é um dos maiores produtores de alimentos do mundo e ainda deve aumentar sua produção ao longo do tempo. Possui diversos biomas, que contribuem para a possibilidade de cultivo de uma ampla variedade de espécies vegetais. No entanto, a alta demanda e produção agrícola geram um uso intensivo de defensivos agrícolas, que, se mal utilizados, podem acarretar diversos problemas (ALVES, et al., 2016).

Os agroquímicos são substâncias químicas utilizadas com o intuito de controlar, prevenir e eliminar pragas, incluindo doenças que podem ser transmitidas ao ser humano. São classificados como inseticidas, fungicidas, avicidas, nematicidas, vermícidas e herbicidas. Quando os agroquímicos entram em contato com o meio ambiente, passam por transformações físicas, químicas e biológicas. Além disso, podem ser transportados pelo ar e pela água, alcançando locais distantes de sua aplicação original e impactando o ecossistema (CARREÑO-MELÉNDEZ, 2019).

Esses impactos podem ser os mais diversos, como a contaminação e morte de abelhas. Os inseticidas podem afetar as abelhas principalmente por três modos de intoxicação: contato, ingestão e fumigação. Seus efeitos podem ser relacionados à toxicidade aguda e a efeitos a longo prazo, provocando danos no funcionamento da colônia e diminuição da longevidade dos indivíduos. As abelhas são os principais agentes polinizadores, responsáveis pela polinização de mais de 70% das angiospermas e cerca de um terço das espécies agrícolas (NOCELLI, 2012).

Outro exemplo são as plantações de tabaco onde o Brasil é o maior exportador de folhas, geralmente produzido em propriedades familiares. O cultivo de tabaco envolve a aplicação de agrotóxicos de forma manual ou com pulverizadores, muitas vezes sem o uso adequado de Equipamentos de Proteção Individual (EPI). Isso expõe os agricultores a altos riscos de contaminação por via oral, dérmica ou inalação, há relatos de casos de lesões cutâneas e depressão relacionados a esse uso e estudos indicam uma possível associação entre o uso desses produtos e diversos tipos de câncer, incluindo câncer de próstata e pulmão. Outro problema destacado é o reaproveitamento do solo para outras culturas, o que pode representar um risco adicional à saúde (RIQUINHO, 2014).

Nicotiana tabacum L., conhecida como "tabaco", tem sua origem nos Andes da América do Sul e se espalhou até o México, onde é usada no sul do país para fins medicinais e recreativos. A planta cresce selvagem em jardins e trilhas, sendo frequentemente deixada intacta ou transplantada para jardins caseiros. Seu uso tradicional está associado às suas propriedades protetoras contra entidades malignas e ao fornecimento de folhas para rapé e medicamentos (GROARK, 2010).

É uma planta herbácea que pode ser anual, bienal ou perene, alcançando de 50 cm a 3 m de altura. Possui uma raiz fibrosa, caule ereto e viscoso, e folhas grandes e densas, com cerca de 30 a 40 cm de comprimento. As folhas são alternadas, ovadas a lanceoladas, com uma cor verde pálido e uma textura viscosa (GROARK, 2010).

O uso tradicional do tabaco nativo é altamente valorizado, sendo considerado uma "substância poderosa" com benefícios terapêuticos e protetores. É utilizado em formas líquidas ou esfregadas no corpo para tratar doenças, com efeitos como aceleração dos batimentos cardíacos e náuseas, que são vistos como manifestações de seu poder terapêutico, não como efeitos negativos. A ingestão do tabaco é considerada uma forma de "atacar" ou "superar" doenças, associando-se a qualidades como amargor e picância, características atribuídas ao tabaco em várias culturas indígenas (GROARK, 2010).

A nicotina é um alcaloide predominante nas folhas das espécies *Nicotiana tabacum*, *N. glauca* e *N. rustica*, pertencentes ao gênero *Nicotiana* da família *Solanaceae*, que conta com cerca de sessenta espécies nas Américas. A folha do tabaco contém mais de dez alcalóides, sendo a nicotina o principal constituinte. Em pequenas doses, a nicotina age como estimulante; no entanto, em grandes quantidades, bloqueia a ação do sistema nervoso autônomo e do músculo esquelético (FERREIRA et al., 2022).

O nome "nicotina" é uma homenagem a Jean Nicot, embaixador da França em Lisboa entre 1559 e 1561, que introduziu o hábito de fumar na Europa. A substância foi isolada pela primeira vez em 1828 pelos cientistas alemães Wilhelm Heinrich Posselt e Karl Ludwig Reimann. Sua fórmula empírica foi descrita em 1843 pelo físico-químico belga Louis-Henri-Frédéric Melsens, enquanto sua estrutura foi elucidada em 1893 pelo químico alemão Adolf Pinner e sintetizada em 1904 pelo químico suíço Amé Pictet. A nicotina é um dos inseticidas naturais mais antigos utilizados na agricultura, com ações antialimentares, atrativas para insetos,

antimicrobianas, vermífugas e repelentes. O extrato bruto das folhas de tabaco é uma mistura complexa de diversas aminas, pirróis e derivados de piridina, sendo a nicotina o alcalóide mais abundante. Além da nicotina, outros alcalóides presentes incluem nornicotina, (-)-anabasina e (-)-anatabina (FERREIRA et al., 2022).

Este produto natural se tornou uma molécula inspiradora para a exploração em síntese orgânica, levando à produção de derivados e análogos, criando-se assim a classe dos inseticidas neonicotinoides (FERREIRA et al., 2022).

A terminologia "neonicotinoide" abrange tanto a nicotina quanto os inseticidas análogos sintéticos com semelhanças estruturais e conformacionais discerníveis, e que compartilham o mesmo mecanismo de ação em insetos. São classificados como "primeira geração" (nicotina, anabasina), "segunda geração" (imidacloprida, tiacloprida, nitenpiram, clotianidina, acetamiprida, tiametoxame, dinotefurano) e "terceira geração" (sulfoxaflor, flupiradifurona, flupirimina, triflumezopirima, dicloromezotiaz), desenvolvidos ou lançados após 2010.

Esses compostos são particularmente eficazes no controle de insetos que se alimentam de seiva, como pulgões e cigarrinhas, e de insetos que mastigam tecidos vegetais, como besouros e larvas de algumas mariposas. (FERREIRA et al., 2022).

No entanto, sempre geraram preocupações devido ao seu impacto potencial sobre as abelhas. A exposição aos neonicotinoides prejudica a capacidade das abelhas de sobreviver à hibernação, o que é especialmente problemático, considerando que as abelhas melíferas são polinizadoras essenciais para lavouras e plantas nativas. O declínio das colônias de abelhas traz sérias consequências ecológicas, afetando a produção agrícola, a segurança alimentar e o bem-estar humano. Devido à sua persistência ambiental, esses pesticidas são encontrados no néctar, pólen e nas gotículas de gutação coletadas pelas abelhas (FERREIRA et al., 2022).

Os neonicotinoides foram descobertos no final da década de 1980, com a imidacloprida sendo um dos primeiros compostos a serem comercializados. Hoje, são amplamente utilizados no controle de pragas em cultivos. Seu sucesso como inseticidas deve-se, em parte, à ausência inicial de mecanismos de resistência em invertebrados (ESTRADA, BERROUET E GIRALDO, 2016).

O mecanismo de ação dos neonicotinoides envolve a ligação aos receptores nicotínicos de acetilcolina nos neurônios pós-sinápticos, interferindo na

transmissão de impulsos no sistema nervoso central. Sua afinidade pelos receptores nicotínicos de vertebrados é menor. A toxicidade dos neonicotinoides varia: a imidacloprida apresenta uma DL50 de cerca de 475 mg/kg em ratos e até 5.000 mg/kg em exposições dérmicas, enquanto a nicotina tem uma DL50 de aproximadamente 50 mg/kg (ESTRADA, BERROUET E GIRALDO, 2016).

Esses compostos são eficazes contra vários organismos que atacam diferentes cultivos e ajudam a controlar doenças virais transmitidas por esses vetores. No entanto, o aumento do uso global levou ao surgimento de resistência em diversos organismos. Mesmo assim, em 2004, os neonicotinoides já representavam 11,5% do mercado mundial de inseticidas, e sua produção continuou a crescer (ESTRADA, BERROUET E GIRALDO, 2016).

Segundo estudos realizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), diversas pragas representam um risco fitossanitário muito alto para a agricultura no Brasil. Entre elas, destacam-se: *Amaranthus palmeri* (caruru-palmeri), *Bemisia tabaci* (mosca-branca), *Xanthomonas citri* (cancro cítrico), *Ralstonia solanacearum* (murcha-bacteriana), *Candidatus Liberibacter asiaticus* (HLB ou greening dos citros), *Schizotetranychus hindustanicus* (ácaro-hindustânico), *Ceratitis capitata* (mosca-do-mediterrâneo), *Bactrocera carambolae* (mosca-da-carambola), *Helicoverpa armigera* (lagarta-do-velho-mundo), *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho), *Tetranychus urticae* (ácaro-rajado), *Botrytis cinerea* (mofo-cinzento) e *Xanthomonas campestris* pv. *Viticola* (cancro-bacteriano-da-videira).

Além dessas, as formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns) também são consideradas pragas de alto risco fitossanitário. Essas pragas representam uma ameaça significativa para diversas culturas agrícolas no país, podendo causar perdas econômicas expressivas e impactos ambientais (SOSA-CALVO, 2017).

A *Helicoverpa armigera*, por exemplo, é conhecida por atacar culturas como soja, milho e algodão, enquanto o *Candidatus Liberibacter asiaticus* é responsável por uma das doenças mais devastadoras da citricultura brasileira. Já as formigas cortadeiras, apesar de serem nativas, causam danos consideráveis em plantações ao desfolhar plantas e comprometer o crescimento das culturas (SOSA-CALVO, 2017).

As formigas que cultivam fungos formam um grupo monofilético exclusivo do continente americano. Há cerca de 55 a 65 milhões de anos, um ancestral

comum dessas formigas fez a transição de uma estratégia de caça-coleta para a agricultura. Entre elas, destacam-se as formigas cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta*, que cultivam o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (SOSA-CALVO, 2017).

Estas formigas estão amplamente distribuídas desde a Argentina até o sul dos Estados Unidos e são consideradas um dos herbívoros mais destrutivos dessa região (ALMEIDA, 2009). A interação entre formigas cortadeiras e fungos constitui uma simbiose obrigatória e altamente especializada, na qual as formigas cultivam fungos para se alimentar. Elas cortam folhas frescas e as utilizam como substrato para o crescimento do fungo, que, por sua vez, fornece alimento para as formigas na forma de gongilídias, estruturas ricas em nutriente (KOOIJ, 2014).

Além disso, as formigas contribuem com enzimas presentes no seu fluido fecal, que ajudam a decompor o material vegetal e a neutralizar as defesas químicas das plantas. Essa relação simbiótica é tão estreita que os fungos dependem das formigas para sua propagação, enquanto as formigas dependem do fungo para nutrição, permitindo que ambas as espécies tenham sucesso ecológico (KOOIJ, 2014).

O fungo simbiote é *Leucoagaricus gongylophorus*, identificado formalmente por (Singer) Möller em 1986, um fungo basidiomiceto pertencente ao grupo G1, caracterizado pela presença de gongilídeos, que cresce sobre o material vegetal, produzindo hifas e gongilídeos (SOUZA,2012).

No processo de coleta da folhagem, as formigas cortadeiras demonstram preferências em relação às espécies vegetais, mas não necessariamente com correlação com as plantas próximas ao ninho. Algumas preferem monocotiledôneas, enquanto outras não apresentam preferência específica. Isso provavelmente está relacionado às variações nas necessidades alimentares do *L. gongylophorus* para cada espécie. As formigas cultivam o fungo de forma controlada, organizam o substrato vegetal e manipulam o fungo para otimizar seu crescimento. Elas também transplantam o fungo de jardins antigos para novos e controlam contaminações (BORBA,2006).

As formigas cortadeiras causam grande impacto econômico, pois sua capacidade de causar danos à produção em sistemas agrossilvipastoris é significativa. Elas podem utilizar uma ampla diversidade de espécies vegetais cultivadas pelo homem para cultivar seus fungos, gerando prejuízos e desperdício de recursos. Diversos relatos documentam os danos causados por essas formigas, como em

plantações de eucalipto, onde representam 30% dos gastos no manejo da plantação até o terceiro ciclo. Com sucessivas desfolhas, esse valor pode aumentar (REIS FILHO, 2013).

Em canaviais, as formigas cortadeiras são consideradas a principal praga, além de causarem danos em pastagens. Esses danos não são apenas diretos, mas também indiretos, como a desvalorização das terras, a erosão do solo, prejuízos a pessoas, animais e implementos agrícolas, e impactos ao meio ambiente, caso haja um aumento na quantidade de formigas próximas à vegetação nativa (REIS FILHO, 2013).

Os métodos químicos mais utilizados para o controle das formigas cortadeiras são: as iscas granuladas, que são eficientes e práticas. Essas iscas consistem em um substrato atrativo (geralmente polpa cítrica) misturado a um inseticida dissolvido em óleo de soja. A atração da polpa cítrica pode variar dependendo das formigas. Os formicidas em pó, compostos por um princípio ativo de ação de contato e talco como veículo; os formicidas líquidos, que são pouco usados devido à sua baixa eficiência e à aplicação trabalhosa, além da necessidade de grandes quantidades de água, tornando esse método inviável em grandes áreas e em períodos de seca; e a termonebulização, que envolve a atomização de um formicida misturado com óleo diesel ou mineral, aplicado por termonebulizadores nos orifícios do ninho (BOARETTO & FORTI, 1997).

No controle dessas formigas, diversos compostos são empregados, como o fipronil, que pode ter impacto direto sobre a dinâmica dessas populações e outros organismos (COUTINHO ET AL., 2005).

O inseticida fipronil (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluormetil)fenil]-4-[(trifluormetil)sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitrila), pertencente à classe dos fenilpirazóis, é utilizado em diversas culturas agrícolas, além de ser aplicado no controle de pragas em ambientes domésticos, como baratas e formigas. Sua ação se dá sobre o sistema nervoso dos insetos, inibindo o receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA), o que resulta na hiperexcitação neural e morte do inseto (COUTINHO et al., 2005).

O fipronil pode ser aplicado em solo, folhas, sementes e até mesmo na irrigação de arroz, sendo empregado também na preservação de madeira e no controle de pulgas e carrapatos em animais. Sua degradação é lenta em água e sedimentos sob condições anaeróbias, com meia-vida variando entre 116 e 130 dias (COUTINHO ET AL., 2005).

No entanto, quando exposto à luz, o fipronil sofre fotodegradação, com meia-vida de 3,6 horas em água e 34 dias em solo argiloso. Ele é altamente tóxico para peixes e invertebrados aquáticos, mas apresenta toxicidade moderada para pequenos mamíferos quando ingerido. Curiosamente, é atóxico para minhocas, microrganismos do solo e plantas aquáticas, além de possuir baixa solubilidade em água, ligando-se aos sedimentos. No caso de ingestão por seres humanos, o fipronil é absorvido pelo trato gastrointestinal, metabolizado rapidamente e eliminado principalmente pelas fezes (COUTINHO ET AL., 2005).

A utilização de fipronil no controle de formigas cortadeiras, além de sua eficácia, também levanta questões sobre os impactos ambientais, considerando a sua toxicidade para organismos não-alvo e a persistência no ambiente. Esse tipo de controle químico, embora amplamente utilizado, pode ter consequências para os ecossistemas próximos às áreas afetadas, como os impactos sobre a fauna aquática e a biodiversidade do solo, o que deve ser cuidadosamente monitorado (COUTINHO et al., 2005).

Além dos fatores apresentados anteriormente, as mudanças climáticas também apresentam desafios significativos para a agricultura, afetando diretamente a produção agrícola e suas pragas. A elevação nos níveis de dióxido de carbono (CO₂) e outros gases de efeito estufa tem gerado alterações climáticas como o aumento da temperatura, eventos climáticos extremos e mudanças nos padrões de precipitação. Essas alterações influenciam não apenas o desenvolvimento das plantas, mas também o comportamento, a reprodução, a sobrevivência e a dispersão das pragas. Além disso, elas afetam as interações entre as pragas e o ambiente, bem como seus inimigos naturais (SKENDŽIĆ et al., 2021).

Os insetos, sendo organismos pecilotérmicos, têm seu desenvolvimento e comportamento fortemente influenciados pela temperatura, o que os torna particularmente vulneráveis às mudanças climáticas. A temperatura, portanto, é um dos fatores mais críticos para as pragas agrícolas. O aumento nas temperaturas pode criar novos nichos ecológicos, permitindo que espécies de pragas que antes não conseguiram se estabelecer em determinadas regiões, agora se adaptem e se proliferem nessas áreas. Isso agrava a ocorrência de surtos de pragas, muitas vezes de espécies invasoras, que encontram condições ideais para sua sobrevivência e reprodução. Além disso, as mudanças climáticas também podem reduzir a eficácia de métodos de controle biológico, como a ação de predadores naturais e parasitas. A

alteração nas condições climáticas pode afetar a viabilidade desses inimigos naturais, prejudicando o equilíbrio ecológico que limita a propagação de pragas (SKENDŽIĆ et al., 2021).

As temperaturas elevadas podem afetar a fisiologia de predadores, tornando-os menos eficientes ou até inviáveis, enquanto a alteração nos padrões de precipitação pode afetar a disponibilidade de alimentos ou habitats essenciais para esses organismos de controle. Assim, a interação entre mudanças climáticas e o controle biológico torna-se cada vez mais complexa, exigindo novas abordagens para o manejo sustentável das pragas (SKENDŽIĆ et al., 2021).

Na busca de práticas sustentáveis, o controle de pragas é um desafio importante. Embora métodos naturais, como o controle biológico e o uso de preparados vegetais, sejam enfatizados, a presença de pragas invasoras e os impactos das mudanças climáticas tornam esse controle mais complexo. Neste contexto, ao considerar a interação entre fatores bióticos e abióticos, incluindo a dinâmica das formigas cortadeiras, o manejo de pragas evidencia a complexidade dos desafios enfrentados pela agricultura moderna, reforçando a necessidade de estratégias integradas, sustentáveis e eficazes.

O aumento das temperaturas e as mudanças nos padrões climáticos criam condições mais favoráveis para pragas invasoras e reduzem a eficácia de métodos tradicionais de controle biológico. Esses desafios exigem uma abordagem integrada e adaptativa, que leve em consideração tanto os métodos químicos quanto os ecológicos, a fim de garantir a sustentabilidade da produção agrícola diante das pressões ambientais e biológicas.

1.2 Etnobotânica, aspectos históricos e óleos essenciais

A espécie humana tem interagido com a natureza – incluindo fauna, flora, microbiota e minerais desde muito antes das primeiras formações de sociedades sedentárias. Ao longo da história, essa interação moldou a cultura e a forma como os humanos utilizam os recursos naturais.

Com o passar das gerações, esse vasto conhecimento foi transmitido, principalmente, mas não exclusivamente, em relação à flora. Esse saber, que abrange tanto aspectos práticos quanto teóricos, orienta a utilização dos recursos naturais não apenas para necessidades básicas, como alimentação, moradia e vestuário, mas também para fins medicinais, religiosos e artísticos, demonstrando a importância e a versatilidade das plantas no cotidiano humano. A área acadêmica que organiza e estrutura o estudo desses fenômenos socioambientais é a etnobotânica. Definida por BECK & ORTIZ (1997), a etnobotânica é:

“... o estudo da inter-relação direta entre humanos e plantas. Atualmente, a etnobotânica abrange o estudo de todas as sociedades humanas, do passado e do presente, e de todos os tipos de interações ecológicas, genéticas, evolutivas e simbólicas. Os resultados da pesquisa etnobotânica servem como apoio e fornecem diretrizes para determinar práticas de gestão adequadas, utilizando o conhecimento obtido para resolver problemas comunitários ou para fins conservacionistas.”

Um exemplo fascinante dessa relação é o açaí, fruto da palmeira *Euterpe oleracea*, que, embora seja amplamente conhecido e consumido no Brasil e internacionalmente como um símbolo de brasilidade, possui uma história muito mais antiga de uso tradicional, originário das regiões estuarinas da Floresta Amazônica, o açaí era, e continua a ser utilizado pelas comunidades amazônicas em praticamente todas as suas partes desde as raízes e estipes até as folhas, inflorescências e frutos. Além de ser consumido e comercializado, o açaí tem uma ampla gama de aplicações, incluindo usos medicinais, na construção, como adubo, ração animal e lenha, entre outros (JARDIM & ANDERSON, 1987). Essa versatilidade reflete a complexidade do conhecimento tradicional e a integração entre os povos e seu ambiente.

Com os avanços modernos da ciência e tecnologia, existe uma crescente possibilidade de integrar os conhecimentos tradicionais com novas técnicas

para o desenvolvimento de uma variedade de insumos que podem melhorar a qualidade de vida humana. Esse processo não apenas garante a inovação, mas também respeita e preserva os aspectos sociais e ambientais das comunidades. O resultado dessa integração pode ser visto na criação de produtos mais ecológicos, sustentáveis e seguros, que vão desde medicamentos e cosméticos até defensivos agrícolas, promovendo uma produção mais consciente e alinhada aos desafios contemporâneos.

Brasil possui uma vocação agrícola bem consolidada, com a produção de uma ampla variedade de animais e plantas, sendo a laranja um dos principais produtos cultivados, com foco principalmente na produção de suco. A comercialização desse produto tem apresentado um aumento contínuo, impulsionado pela crescente demanda no mercado interno e externo. A laranja (*Citrus sinensis*) é uma planta perene originária da Ásia, que atualmente está amplamente disseminada em regiões de clima quente ao redor do mundo. A planta pode atingir até 10 metros de altura, com folhas alternadas e flores brancas, além de frutos globosos ou ovais. O fruto é composto pelo pericarpo (casca), que se divide em flavedo (parte externa) e albedo (parte interna), e pelo endocarpo (polpa), que contém glândulas de suco e diversas sementes (FAVELA-HERNÁNDEZ et al., 2016).

Além de ser consumida mundialmente, a laranja é reconhecida como um potente antioxidante natural, sendo um alimento que fortalece o sistema imunológico. Tradicionalmente, seus usos medicinais incluem o tratamento de diversas condições, como constipação, cólicas intestinais, diarreia, bronquite, tuberculose, tosse, resfriado, obesidade, distúrbios menstruais, angina, hipertensão, ansiedade, depressão, estresse, asma, vômitos, febre, soluços e indigestão (DONGRE, DOIFODE, CHOUDHARY & SHARMA, 2023).

A laranja também foi utilizada historicamente no tratamento do escorbuto, uma condição causada pela deficiência de vitamina C. Durante suas viagens, o navegador português Vasco da Gama (1460/69–1524 d.C.) observou que a ingestão de laranjas aliviava os sintomas dessa doença, como inchaço nas pernas, braços e gengivas (MAGIORKINIS, BELOUKAS & DIAMANTIS, 2011).

Em 2011, o Brasil se destacou como o maior exportador mundial de suco de laranja, com cerca de 1,5 milhão de toneladas exportadas. No entanto, a quantidade de suco extraída da fruta corresponde a cerca de 50% do seu peso total,

gerando, assim, uma grande quantidade de resíduos, como polpa e casca (SANTIN et al., 2023).

Esses resíduos podem ser reaproveitados de diversas formas, como na produção de ração animal e como fonte de energia para termoelétricas. Além do suco, outros subprodutos da laranja, como o limoneno e a pectina, apresentam alto valor agregado e utilizam-se de maneira crescente (SANTIN et al., 2023).

O d-limoneno é um composto que tem sido amplamente utilizado na medicina para dissolver cálculos biliares compostos por colesterol, além de aliviar a azia devido à sua capacidade de neutralizar o ácido gástrico. Ele também possui uma atividade quimiopreventiva bem estabelecida contra vários tipos de câncer (J. SUN, 2007).

O d-limoneno é o 1-metil-4-(1-metiletenil) cicloexano, um líquido incolor com odor característico de limão à temperatura ambiente. Esse composto pode ser encontrado como D-Limoneno e L-Limoneno e é considerado seguro, com baixa toxicidade. Em estudos com animais, não apresentou riscos significativos e foi classificado como não mutagênico e não carcinogênico para seres humanos, embora possa provocar reações alérgicas em algumas pessoas (ANANDAKUMAR, KAMARAJ & VANITHA, 2020).

Por outro lado, a pectina é um grupo de oligossacarídeos e polissacarídeos com características comuns, embora variando em sua estrutura fina. A pectina comercial em pó pode ser classificada em dois tipos: alta ou baixa metoxilação. Seu esqueleto péctico é composto por um homopolímero de ácido galacturônico ligado por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$, com variação na quantidade de grupos carboxilas metil esterificados, interrompidos por unidades de $(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-L-ramnose}$, que são ligadas a cadeias laterais formadas por açúcares neutros como D-galactose, L-arabinose, D-xilose, L-ramnose, L-fucose e, em menor quantidade, 2-O-metilfucose (BRANDÃO & ANDRADE, 1999).

Já no século XVIII, havia relatos sobre o uso da pectina para a produção de geleias. Sua descoberta como composto químico foi realizada por Vauquelin em 1790. Em 1824, Braconnot foi o primeiro a caracterizá-la e sugerir seu nome, derivado do grego *πηχτοζ*, que significa "espesso". No século XX, a produção comercial de pectina já era uma realidade nos Estados Unidos e na Europa, com a utilização do bagaço de citros e maçãs. No Brasil, a primeira e única fábrica de pectina foi inaugurada em Limeira, São Paulo, em 1954, consolidando o país como o maior produtor mundial de pectina cítrica. A produção industrial de pectina é feita por meio

de prensagem ou centrifugação, seguida de filtração e concentração, sendo necessário um processo de precipitação química para a obtenção do pó (CANTERI, MORENO, WOSIACKI & SCHEER, 2012).

Além dos usos anteriormente descritos, as plantas também fornecem outros recursos valiosos, como os óleos essenciais. Estes compostos, extraídos de várias partes das plantas, têm grande relevância tanto no campo medicinal quanto comercial. Sua diversidade e propriedades biológicas ampliam ainda mais o potencial das plantas como fontes sustentáveis e multifuncionais, agregando valor a diversos produtos e práticas. Os óleos essenciais são compostos metabólicos secundários que, segundo registros históricos, já eram utilizados pelos antigos egípcios e chineses. No entanto, foi durante a Idade Média, com as pesquisas dos alquimistas muçulmanos sobre os processos de extração, que esses óleos começaram a ser comercializados (SILVEIRA, BUSATO, COSTA, COSTA JUNIOR, 2012)..

As principais formas de extração incluem a hidrodestilação, onde o material vegetal é colocado em contato com a água em ebulição, e, em seguida, o vapor e o óleo são resfriados e separados devido à diferença de polaridade. A destilação por arraste a vapor segue um processo semelhante, mas apenas o vapor entra em contato com o material vegetal. Além dessas técnicas, é possível realizar a extração com solventes orgânicos, fluidos supercríticos, métodos mais específicos como a prensagem a frio e a enfleurage, que utiliza gorduras à temperatura ambiente. Nesse processo, as pétalas das flores são depositadas e retiradas sucessivamente até que a gordura se sature, e, por fim, o óleo é extraído com etanol (SILVEIRA, BUSATO, COSTA, COSTA JUNIOR, 2012).

O metabolismo é um conjunto de reações químicas contínuas que ocorrem nas células, com o objetivo de sintetizar compostos essenciais à sobrevivência dos organismos, como açúcares, aminoácidos, nucleotídeos e alguns polímeros. Os compostos finais ou intermediários são classificados como metabolitos primários, pois estão diretamente envolvidos no crescimento e manutenção da vida dos seres vivos. Por outro lado, os metabolitos secundários são substâncias produzidas pelos organismos, mas, não são essenciais à sobrevivência imediata, mas conferem vantagens ecológicas e adaptativas, esses compostos são específicos de certos grupos e atuam por exemplo como atrativos defensivos ou reguladores (OFOEDUM ET AL, 2025).

Nos primeiros estudos sobre metabolitos secundários, acreditava-se que esses compostos eram produtos do metabolismo primário ou até resíduos sem utilidade para a planta. No entanto, já se conheciam suas aplicações medicinais e comerciais. Foi apenas na década de 1960 que os pesquisadores começaram a identificar suas funções ecológicas. Como as plantas não podem se proteger fisicamente dos predadores, elas utilizam compostos químicos. Embora nem todas as funções dos metabolitos secundários sejam completamente compreendidas, sabe-se que desempenham papéis cruciais, como a proteção contra herbívoros, atração de polinizadores e dispersores de sementes, defesa contra radiação UV, alelopatia e atração de inimigos naturais (BETTIOL & MORANDI, 2009).

Os óleos essenciais são misturas de substâncias voláteis, lipofílicas, de baixo peso molecular, geralmente líquidas e odoríferas. Frequentemente compostos por moléculas terpênicas, esses óleos são extraídos principalmente por arraste a vapor, ou, no caso de frutos cítricos, pela prensagem do pericarpo. As matérias-primas mais comuns para a extração de óleos essenciais incluem flores, folhas, cascas, rizomas e frutos, como os de rosas, eucalipto, canela, gengibre e laranja (BIZZO, HOVELL & REZENDE, 2009).

Os terpenos são compostos formados por duas ou mais unidades de isopreno, cada uma contendo cinco átomos de carbono (C₅). Dependendo do número de unidades isoprênicas, os terpenos são classificados como monoterpenos (C₁₀), com duas unidades, como o mentol e o limoneno; sesquiterpenos (C₁₅), com três unidades, como o α -selineno e o β -cariofileno; diterpenos (C₂₀), com quatro unidades; e triterpenos (C₃₀), com seis unidades. Os monoterpenos e sesquiterpenos são os mais comuns na natureza e têm grande importância nas atividades biológicas dos óleos essenciais (BETTIOL & MORANDI, 2009).

Porém devido à baixa concentração de óleos essenciais nas matérias vegetais, o processo de extração desses compostos gera uma grande quantidade de material secundário. A fase aquosa ou hidrolato, embora considerada um subproduto, apresenta um potencial comercial significativo. Por outro lado, o resíduo sólido gerado no processo de extração representa um desafio ambiental. No caso da produção de óleos essenciais de noz-moscada e cravo, por exemplo, os resíduos podem chegar a representar entre 88% e 94% da matéria-prima processada. Outro ponto crítico do processo de destilação é a quantidade de energia necessária para a extração, o que torna a operação intensiva em termos energéticos. No entanto, existem alternativas

para reaproveitar esses resíduos, como a produção de briquetes de biomassa (bio-briquetes), que são blocos compactos de matérias vegetais utilizados como combustível. Além disso, os resíduos podem ser usados como substratos em reatores de biogás, gerando metano que pode ser convertido em energia elétrica ou térmica. Em um cenário de crescente escassez energética e alta emissão de CO₂, principal responsável pelo aquecimento global, a utilização de fontes de energia renováveis, como biomassa e biogás, se apresenta como uma solução eficaz para reduzir o impacto ambiental e promover o desenvolvimento econômico sustentável, especialmente em regiões rurais (AGUSTINA E KHOLIFAH, 2022; OMER, 2018).

Portanto, a variedade de recursos naturais que as plantas oferecem, desde alimentos e medicamentos até óleos essenciais, demonstra a importância delas na sustentabilidade e no bem-estar humano. O estudo e aproveitamento desses recursos têm ganhado cada vez mais relevância, especialmente quando se considera a busca por alternativas naturais e ecologicamente responsáveis. Assim, as plantas não são apenas fontes essenciais de substâncias nutritivas, mas também aliados importantes para a saúde e o desenvolvimento sustentável, refletindo a complexa e vital relação entre os seres humanos e o mundo natural (AGUSTINA E KHOLIFAH, 2022; OMER, 2018).

1.3 *Melaleuca alternifolia*

A melaleuca, uma planta que tem sido fundamental tanto na medicina tradicional quanto na ciência moderna. Conhecida por suas propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias, a melaleuca se destaca como um recurso valioso em tratamentos naturais, especialmente no contexto da medicina popular. Através da análise de suas características botânicas, propriedades terapêuticas e usos práticos, buscamos compreender a importância dessa planta, especialmente em tempos de busca por alternativas mais sustentáveis e eficazes para problemas modernos.

A árvore do chá ou melaleuca possui o nome científico de *Melaleuca alternifolia*. Ela pertence ao gênero *Melaleuca* da família *Myrtaceae*, que compreende cerca de 230 espécies, com aproximadamente 119 delas sendo endêmicas da Austrália (Craven e Lepschi, 1999). Popularmente conhecida como tea tree, árvore do chá ou apenas melaleuca, é descrita como uma árvore arbustiva com casca de cor e textura semelhante a papel, que se descasca em camadas macias. O crescimento da árvore apresenta valores médios de 2 a 14 metros de altura (FIGURA1) (QUINN E BARLOW, 1989).

Ela foi descrita por Maiden e Betche como uma variedade de *Melaleuca linariifolia*. Possui folhas alternadas, mas, diferentemente da outra variedade, elas são muito mais estreitas e geralmente mais curtas. Suas flores são dispersas de forma solta em uma espiga interrompida, e toda a planta é glabra (isto é, sem pelos) (FIGURA 2). Embora possua semelhanças, quando examinada com maior atenção, é possível observar que o tamanho da árvore é mais compacto e não tão alto quanto o da outra espécie. Além disso, a localização de ambas as espécies difere (CHEEL, 1924).



FIGURA 1: *Melaleuca alternifolia* (tea tree) - Imagem representando um espécime vivo no Royal Botanic Gardens, Sydney

Fonte: Digital image © board of trustees, rbg kew (unless otherwise stated) Raffi Kojian(photo: gardenology.org)



FIGURA 2: Exsicata de *Melaleuca alternifolia* (tea tree).

Fonte: Kew's Herbarium - K000793546Herbarium, RBG Kew

Melaleuca alternifolia é uma espécie nativa do leste da Austrália, com ocorrência predominante no nordeste de Nova Gales do Sul (NSW) e no sudeste de Queensland (FIGURA 3) (Quinn & Barlow, 1989). Essa região faz parte do bioma de floresta úmida de esclerofila, caracterizado por um dossel alto e perene, um sub-bosque denso e uma vegetação adaptada a condições ambientais variadas, incluindo tolerância a geadas e resistência moderada à seca. Além disso, a área apresenta um regime pluviométrico bem distribuído ao longo do ano, com baixa sazonalidade na precipitação, o que favorece o desenvolvimento contínuo da vegetação (PICKETT, 2004).



FIGURA 3: Mapa da Austrália com destaque para a região nordeste do país, abrangendo os estados de Queensland ao norte e Nova Gales do Sul ao sul, área de ocorrência natural de *melaleuca alternifolia*.

Fonte: Maiden; Betche.

A espécie prospera em ambientes de alta umidade, sendo frequentemente encontrada em solos encharcados próximos a pântanos, brejos e margens de rios. Essas áreas oferecem condições ideais para seu crescimento, pois combinam umidade constante com exposição moderada à luz solar. A capacidade de adaptação da *M. alternifolia* a solos saturados de água e seu crescimento em áreas de vegetação densa indicam uma forte relação com ecossistemas ripários e úmidos, tornando-a uma espécie ecologicamente relevante na manutenção dessas paisagens naturais (SWORDS & HUNTER, 2006).

James Cook foi um explorador, cartógrafo e oficial naval britânico, conhecido por suas três grandes viagens pelo Oceano Pacífico entre 1768 e 1779. Durante essas expedições, fez o primeiro contato europeu registrado com a costa leste da Austrália, além de realizar a primeira circunavegação da Nova Zelândia. Em seu diário de bordo, intitulado *Uma Viagem ao Polo Sul* (1777), foi o primeiro a utilizar

o termo "árvores do chá". Seus marinheiros preparavam uma infusão a partir das folhas dessa árvore como substituto do chá comum (KNIGHT & HAUSEN, 1994). Além disso, Cook relatou o uso da planta na produção de cerveja:

"... inicialmente fizemos [cerveja] de uma decocção das folhas de abeto; mas ao perceber que isso sozinho tornava a cerveja muito adstringente, posteriormente misturamos a planta do chá (um nome que ela obteve em minha viagem anterior devido ao uso como chá naquela ocasião, o que também fizemos agora), o que parcialmente destruiu a adstringência do outro e tornou a cerveja extremamente saborosa, sendo apreciada por todos a bordo."

Os aborígenes Bundjalung, do norte de New South Wales, já conheciam as propriedades medicinais das folhas da árvore do chá, que eram esmagadas e utilizadas para tratar ferimentos e infecções. Além disso, uma lagoa natural onde folhas caíam e se decompunham há séculos era considerada sagrada por suas propriedades curativas, sendo utilizada pelos nativos para banhos terapêuticos. Com o início dos assentamentos britânicos na Austrália, os colonos adotaram o hábito de preparar infusões com as folhas da árvore do chá (MURRAY & MICHAEL, 2020).

Em 1930, o cirurgião Humphery, de Sydney, publicou no Medical Journal of Australia um relato sobre o uso do óleo essencial da árvore do chá na assepsia de feridas cirúrgicas:

"Os resultados obtidos em uma variedade de condições, quando ele foi usado pela primeira vez, foram muito encorajadores, sendo uma característica marcante que ele dissolvia pus e deixava a superfície das feridas infectadas limpa, de modo que sua ação germicida se tornava mais eficaz sem causar danos aparentes aos tecidos. Isso era algo novo, pois a maioria dos germicidas eficientes destruía tanto os tecidos quanto as bactérias..."

Durante a Segunda Guerra Mundial, o óleo essencial da árvore do chá foi amplamente utilizado como desinfetante e distribuído aos soldados. Sua produção foi considerada tão essencial que os cortadores de folhas foram isentos do serviço militar para garantir o fornecimento contínuo. No entanto, com o fim da guerra e o avanço dos medicamentos sintéticos, o uso de fitoterápicos declinou, levando à

estagnação da produção do óleo. Somente no final da década de 1970 houve um ressurgimento do interesse pelo produto, impulsionado por novas pesquisas e pela crescente valorização dos tratamentos naturais (KNIGHT & HAUSEN, 1994).

Nos últimos anos, o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* tornou-se amplamente aceito comercialmente e é agora utilizado principalmente como agente antimicrobiano ou conservante em diversos produtos farmacêuticos e cosméticos para uso externo. Isso inclui lavagens para o rosto e as mãos, géis para espinhas, cremes, shampoos e condicionadores, além de loções corporais e desodorantes naturais, evidenciando sua versatilidade na indústria de cuidados pessoais (COX et al., 2001).

Estudos têm demonstrado que o óleo de *Melaleuca* possui atividade fungicida, sendo eficaz contra dermatófitos e fungos filamentosos. Embora poucos estudos anteriores tenham investigado sua eficácia de forma detalhada, os métodos utilizados sugerem que o óleo pode ter tanto ação fungicida quanto fungistática, sendo sua eficácia variável conforme as condições e dependendo da estrutura das paredes celulares dos fungos (HAMMER, CARSON, & RILEY, 2002).

O óleo de *Melaleuca* é eficaz em várias infecções de pele devido às suas propriedades antissépticas e à sua capacidade de penetrar na epiderme, misturando-se com as secreções sebáceas. Tem sido utilizado no tratamento de furúnculos, promovendo a cicatrização e o controle da infecção. Em casos de acne, os tratamentos demonstraram melhora significativa na redução do número médio de lesões inflamadas e não inflamadas. Outro uso relevante está relacionado à saúde dos pés, sendo empregado no tratamento da *Tinea pedis* (pé de atleta), irritações nos pés e bromidrose (odor desagradável). Além disso, auxilia na cicatrização de incisões cirúrgicas em casos de calos, calosidades e joanetes, bem como no tratamento de infecções fúngicas nas unhas (onicomicose), condição que afeta aproximadamente 2–13% da população (MURRAY & PIZZORNO, 1999).

O óleo de *Melaleuca* também apresenta atividade germicida contra patógenos vaginais como *Trichomonas vaginalis* e *Candida albicans*, sendo utilizado no tratamento de infecções vaginais. Na maioria dos casos, a aplicação do óleo puro é mais eficaz, embora formulações diluídas possam ser utilizadas para minimizar irritações. Estudos indicam que o óleo de *Melaleuca* é extremamente seguro para uso como antisséptico tópico. No entanto, como ocorre com outros óleos essenciais, algumas pessoas suscetíveis podem desenvolver dermatite alérgica de contato. A

ingestão oral não é recomendada, mas, culturalmente, a infusão das folhas da árvore do chá tem sido relatada como relativamente segura (MURRAY & PIZZORNO, 1999).

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* é composto por diversos constituintes, principalmente terpenos, que são hidrocarbonetos produzidos por uma variedade de plantas. Estes compostos ocorrem em abundância em frutas, vegetais, flores, resinas e nas partes reprodutivas das plantas, onde atuam como atrativos ou repelentes, sendo responsáveis pelo aroma característico de muitas espécies. Os terpenos são derivados de unidades de isopreno (C₅H₈), podendo ser lineares ou formar anéis. Quando modificados quimicamente, como pela adição de grupos contendo oxigênio (hidroxila ou carbonila), passam a ser denominados terpenoides (PADUCH et al., 2007). Terpenos são metabólitos secundários naturais derivados da polimerização de unidades (C₅ - MEP ou MEV), frequentemente classificados de acordo com o número de unidades presentes. Eles podem ser hidrocarbonetos insaturados (alcenos), saturados (alcanos) ou compostos funcionalizados (álcoois, cetonas, etc.). (MCMURRY, 2011).

Especificamente em *Melaleuca alternifolia*, os principais compostos são monoterpenos hidrocarbonetos e monoterpenos oxigenados. Os monoterpenos são uma classe de terpenos formados por duas unidades de isopreno, resultando em uma estrutura com 10 átomos de carbono (C₁₀). Essas substâncias são incolores, lipofílicas e voláteis, sendo implicadas como mecanismos de defesa contra herbívoros e patógenos (LANGENHEIM, 1994).

Segundo Gallart-Mateu, Rodriguez-Sojo e de la Guardia (2016), o óleo essencial de tea tree contém uma variedade de compostos principais, incluindo terpinen-4-ol, presente em concentrações entre 30% e 48%, γ -terpineno entre 10% e 28%, α -terpineno de 5% a 13%, α -terpineol de 1,5% a 8%, terpinoleno de 1,5% a 5%, α -pineno de 1% a 6%, p-cimeno de 0,5% a 8% e limoneno de 0,5% a 1,5%. Além disso, o 1,8-cineol (eucaliptol) pode estar presente em concentrações variáveis, de traços até 15%, enquanto sabineno aparece em traços até 3,5%. Outros compostos, como aromadendreno, ledeno, δ -cadineno, globulol e viridiflorol, podem estar presentes em concentrações de até 3%. (FIGURA 4) Essa composição complexa é responsável pelas propriedades biológicas do óleo essencial, tornando-o um dos fitoterápicos mais versáteis e amplamente utilizados na atualidade.

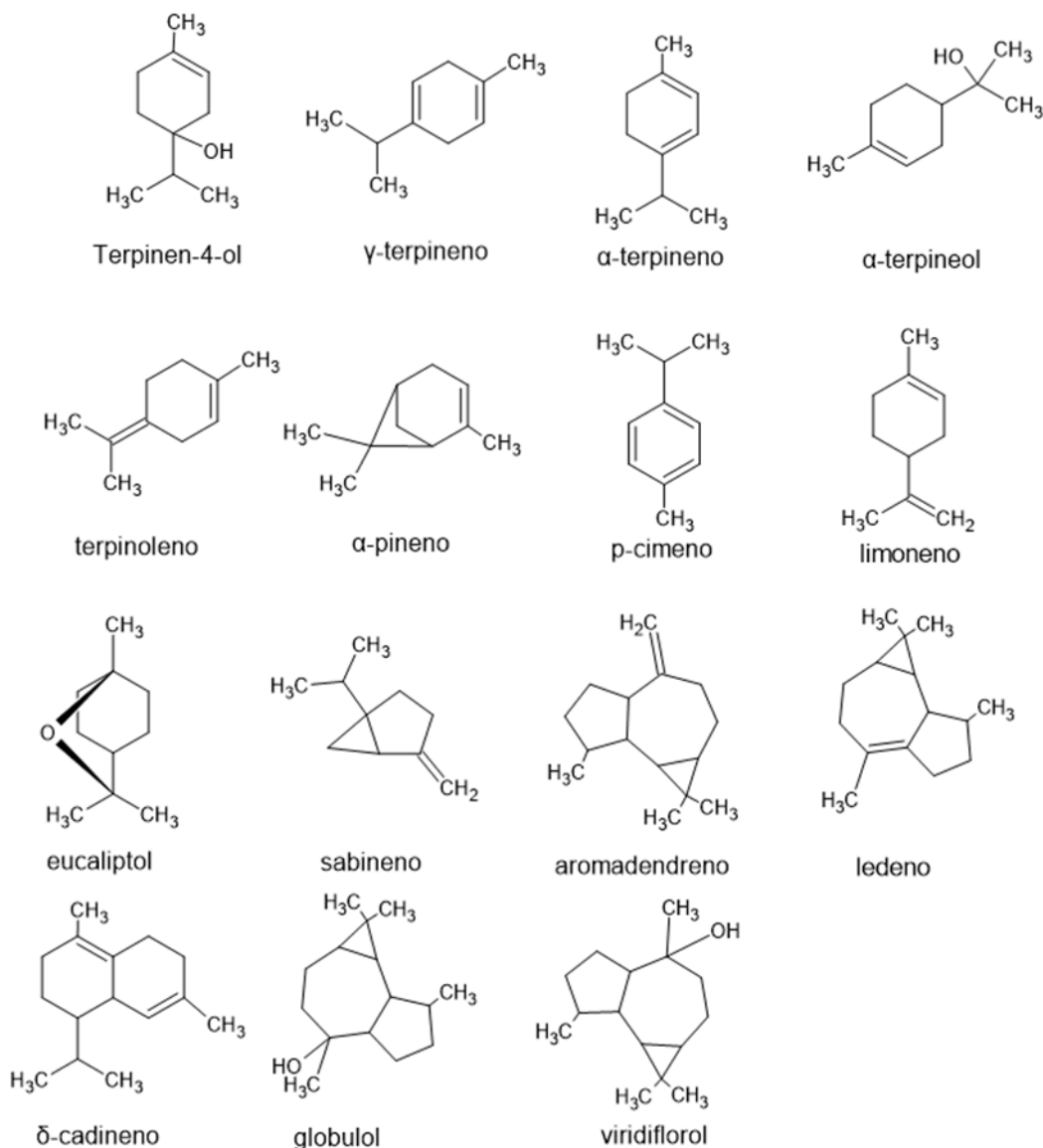


FIGURA 4: Compostos presentes no óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*.
 Fonte: Acervo pessoal, 2025.

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* é extraído das glândulas de óleo subepidérmicas presentes nas folhas da planta, por meio dos processos de destilação a vapor ou hidrodestilação. Comercialmente, a destilação a vapor é a técnica mais utilizada para a obtenção do óleo, embora a hidrodestilação também possa ser empregada em algumas situações (BAKER, LOWE E SOUTHWELL, 2000).

Na hidrodestilação, o material vegetal é imerso diretamente na água, que é então aquecida. O calor volatiliza os compostos do óleo essencial, que são carregados pelo vapor até o condensador, onde se resfriam e são coletados. Já na destilação por arraste de vapor, a água é aquecida separadamente do material vegetal, gerando um vapor que é direcionado até um segundo compartimento

contendo as folhas. Esse vapor atravessa o material vegetal, arrastando os compostos voláteis, que seguem para o condensador, onde se precipitam e são coletados na forma de óleo essencial (VALENTIM E SOARES, 2018).

A Melaleuca é uma planta de extrema importância, não apenas por suas propriedades curativas, mas também pela sua aplicabilidade em diversos campos da saúde e da agricultura. Com seu potencial terapêutico bem documentado, a Melaleuca continua a ser um objeto de estudo e um aliado na busca por tratamentos mais naturais e acessíveis. Além disso, seus compostos têm demonstrado eficácia como antifúngico natural, sendo uma alternativa interessante na agricultura alternativa, especialmente no controle de pragas de forma sustentável (COSTA GONÇALVES ET AL. 2023). À medida que a pesquisa sobre suas capacidades avança, é possível que novas descobertas revelem ainda mais formas de integrar a Melaleuca no cuidado diário, na prevenção de doenças e na produção agrícola, consolidando-a como um elemento-chave tanto na medicina alternativa quanto na agricultura sustentável.

1.4 Técnicas relacionadas

1.4.1. Emulsões

As emulsões são sistemas coloidais amplamente utilizados pela indústria de alimentos, caracterizando-se pela mistura, dispersão ou suspensão de dois ou mais líquidos imiscíveis, sendo o óleo e a água os componentes mais comuns. Esses sistemas possuem uma fase dispersa, formada por gotas esféricas de pequeno diâmetro, geralmente variando de 0,1 μm a 100 μm , e uma fase contínua. Embora sejam termodinamicamente instáveis devido à alta energia livre associada à tensão interfacial entre as fases, a estabilidade cinética das emulsões pode ser aumentada com a diminuição do tamanho das gotas e o aumento da densidade e viscosidade da fase contínua. As emulsões podem ser classificadas em simples e múltiplas, dependendo da distribuição das fases. As emulsões simples, como as óleo/água (O/A), são amplamente usadas em alimentos como leite, iogurte, cremes e maionese, enquanto as emulsões água/óleo (A/O) são menos comuns, sendo encontradas em produtos como margarina e manteiga (PEREIRA & GARCIA-ROJAS, 2015).

Emulsões múltiplas, por sua vez, possuem uma estrutura mais complexa, com tipos como água/óleo/água (A/O/A) e óleo/água/óleo (O/A/O). Essas emulsões têm sido frequentemente aplicadas no desenvolvimento de micro e nanoencapsulados, que são utilizadas para o transporte e liberação controlada de substâncias bioativas, como fármacos, antioxidantes, vitaminas e probióticos, tanto na indústria alimentícia quanto farmacêutica (PEREIRA & GARCIA-ROJAS, 2015).

O comportamento de uma emulsão é amplamente influenciado pelo tamanho das gotículas, que são formadas por moléculas anfipáticas, que possuem características tanto polares quanto apolares, e se dispersam em um líquido formando uma fase interna. Em uma emulsão, uma fase líquida é estabilizada em outra, resultando em uma dispersão que pode variar em estabilidade dependendo de fatores como o tipo de emulsionante utilizado, a viscosidade da fase contínua e a temperatura. A estabilidade de uma emulsão é caracterizada pelo tempo necessário para o início da separação de fases, que pode variar de minutos a anos, dependendo da aplicação. Emulsões mais estáveis apresentam separação de fases mais lenta. A coalescência ocorre quando gotículas ou bolhas se unem, formando uma única gotícula maior, o que pode ser acelerado pelo aumento da temperatura, que aumenta a energia cinética das partículas. Para reduzir a coalescência, é importante aumentar a viscosidade do

sistema ou garantir um tamanho uniforme das gotículas. (FRANZOL & REZENDE, 2015).

A sedimentação, que é a migração de uma das fases para o topo da emulsão devido a diferenças de densidade, pode ser reversível e corrigida pela agitação. Já a floculação é o processo em que as gotículas se agrupam e, se intensificada, pode levar à separação total da emulsão, conhecida como “quebra”, outros fatores que afetam a estabilidade das emulsões incluem a interação entre moléculas, como forças eletrostáticas e hidrofóbicas, e a escolha adequada de emulsionantes, que devem ser compatíveis com as fases envolvidas para garantir uma interface estável (FRANZOL & REZENDE, 2015).

1.4.2. Nanopartículas

Uma maneira eficaz de melhorar as propriedades das emulsões é reduzir o tamanho das partículas, uma abordagem que pode ampliar significativamente suas vantagens funcionais. O estudo da nanotecnologia tem se mostrado essencial nesse contexto, oferecendo técnicas especializadas para alcançar essa redução de tamanho com precisão. Por meio da nanotecnologia, é possível manipular e controlar as partículas em escalas nanométricas, o que resulta em emulsões com propriedades superiores, como maior estabilidade, maior área superficial e uma dispersão mais homogênea. A nanotecnologia é um campo de pesquisa dedicado ao estudo e à produção de nanopartículas, que são estruturas com dimensões entre 1 e 100 nanômetros. Com o avanço das tecnologias e a crescente demanda por novos materiais, essa área tem ganhado destaque devido às propriedades únicas das nanopartículas em escala nanométrica, como maior área superficial, reatividade aprimorada e elevada resistência mecânica. Essas características permitem aplicações em diversos setores, desde utensílios domésticos até produtos farmacêuticos e indústrias de alta tecnologia, como a aeroespacial. As nanopartículas podem apresentar uma grande diversidade de características, variando em tamanho, forma e estrutura. Elas podem ser classificadas conforme suas dimensões: zero-dimensional (átomos ou moléculas), uni, bi ou tridimensionais (como filmes finos ou partículas 3D). Suas formas incluem estruturas esféricas, tubulares, cônicas, entre outras. Em relação à estrutura, podem ser cristalinas (bem-organizadas) ou amorfas (sem organização definida), além de possuírem superfícies uniformes ou irregulares.

As nanopartículas podem ser classificadas em três categorias principais (EALIA & SARAVANAKUMAR, 2017):

- Inorgânicas: não contêm carbono e incluem materiais metálicos e óxidos metálicos. Os metais mais utilizados são alumínio (Al), ouro (Au), prata (Ag) e ferro (Fe), conhecidos por sua elevada relação área/volume e diferentes sensibilidades a fatores ambientais como ar, umidade, calor e luz. Já as nanopartículas de óxidos metálicos melhoram a reatividade e a eficiência dos metais.
- As nanopartículas de carbono: por sua vez, incluem fulerenos, grafeno, nanotubos de carbono, nanofibras de carbono, negro de fumo e até carvão ativado em escala nanométrica. Essas estruturas apresentam propriedades excepcionais, tornando-se valiosas para aplicações na medicina, eletrônica e energia renovável.
- As nanopartículas orgânicas: também chamadas de poliméricas, são amplamente utilizadas na área biomédica, principalmente para o transporte e liberação controlada de medicamentos. Sua estabilidade, composição, morfologia e capacidade de encapsulamento determinam sua eficiência e campo de aplicação. Dentre suas principais formas estão os dendrímeros, micelas e lipossomas (FIGURA 5).

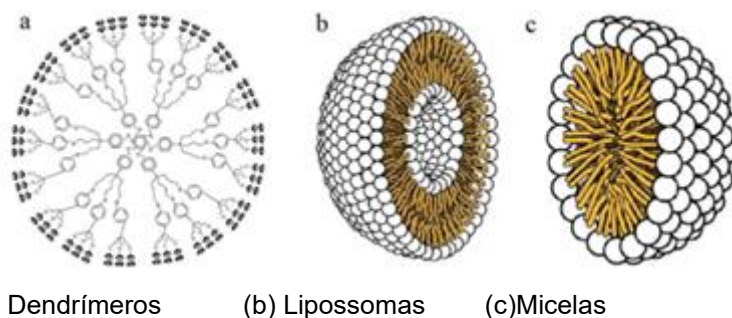


FIGURA 5: Os dendrímeros são moléculas altamente ramificadas, capazes de encapsular medicamentos e interagir de maneira controlada com células. As micelas são estruturas esféricas formadas espontaneamente por moléculas anfífilas (com partes hidrofílicas e hidrofóbicas) em solução, onde o núcleo hidrofóbico pode armazenar fármacos insolúveis em água, enquanto a parte externa hidrofílica facilita sua dispersão no meio aquoso. Já os lipossomas possuem uma estrutura semelhante às micelas, mas com um núcleo oco hidrofílico e uma camada interna lipídica, permitindo o encapsulamento tanto de medicamentos hidrofílicos (no núcleo) quanto

hidrofóbicos (na camada lipídica), tornando-os extremamente versáteis *FONTE: EALIA; SARAVANAKUMAR, 2017.*

A síntese de nanopartículas ocorre por meio de dois principais métodos: *bottom-up* e *top-down*. No método *bottom-up*, as nanopartículas são construídas a partir de átomos ou moléculas, utilizando técnicas como sol-gel, spinning, deposição química de vapor, pirólise e biossíntese. No método *top-down*, materiais maiores são reduzidos a nanopartículas por técnicas como moagem mecânica, que utiliza deformação plástica e fratura; nanolitografia, que cria estruturas em nanoescala; ablação a laser, que condensa partículas metálicas; sputtering, que deposita nanopartículas ao colidir com os íons com uma superfície; e decomposição térmica, que quebra compostos químicos sob calor para formar nanopartículas. Devido às suas propriedades únicas, as nanopartículas possuem uma ampla gama de aplicações. Na cosmética, nanopartículas como dióxido de titânio (TiO_2) e óxido de zinco (ZnO) são utilizadas para proteção UV, enquanto óxidos de ferro são empregados como pigmentos em batons. No setor eletrônico, são essenciais para displays de alta luminosidade e baterias de alto desempenho. Além disso, atuam como sensores de gás e catalisadores em reações químicas, sendo empregadas, por exemplo, em conversores catalíticos automotivos. Na medicina, nanopartículas possibilitam a entrega direcionada de medicamentos, reduzindo efeitos colaterais e custos. No setor alimentício, são utilizadas para aprimorar processos de embalagem e conservação, como em nanocápsulas para liberação controlada de vitaminas. Na construção civil, conferem maior resistência e durabilidade a materiais como concreto e aço, além de melhorar propriedades de vidros, tornando-os autolimpantes e com controle de luz. Por fim, as nanopartículas desempenham um papel crucial na energia renovável e na remediação ambiental, contribuindo para processos mais sustentáveis e eficientes (EALIA & SARAVANAKUMAR, 2017).

1.4.3. Ultrassom

Para a preparação de partículas poliméricas encapsuladas em nanoescala, o ultrassom se destaca como uma ferramenta de grande potência e eficácia. O ultrassom, utilizado principalmente por meio de um processo conhecido como sonicação, oferece uma abordagem altamente eficiente para a produção de nanopartículas e nanoemulsões, além de permitir o encapsulamento de ativos bioativos dentro dessas partículas. A sonoquímica é uma área de pesquisa que

estuda os fenômenos químicos resultantes da aplicação de radiação ultrassônica de alta potência (20 kHz–10 MHz) (GEDANKEN, 2007).

O ultrassom é amplamente utilizado na produção de nanoemulsões, pois suas vibrações de alta frequência e energia geram cavitação e alto cisalhamento, promovendo a fragmentação das gotículas da emulsão. A intensidade da sonicação influencia diretamente o tamanho das gotículas, embora exista um limite para essa redução. No entanto, o aumento da temperatura devido à sonicação pode ser prejudicial a materiais sensíveis ao calor. Apesar de ser um método eficiente e relativamente econômico, apresenta algumas desvantagens, como aquecimento excessivo, possível contaminação por resíduos de titânio da sonda, ampla distribuição do tamanho das gotículas e baixa reprodutibilidade (ALMEIDA et al., 2008).

O alto cisalhamento gerado pelo ultrassom de alta potência é considerado suficiente para processos de nanoemulsificação e nanoencapsulação, permitindo a formação de gotículas em escala nanométrica, ideais para a encapsulação de compostos bioativos. Essas nanoemulsões podem atuar como suplementos alimentares, melhorando a entrega e a biodisponibilidade dos ativos.

Além disso, o ultrassom pode reduzir a espessura da casca dos alimentos, facilitando a evaporação da água no processo de spray drying. Também é empregado na pasteurização, promovendo a ruptura de membranas de micro-organismos e a inativação de enzimas, contribuindo para a conservação e prolongamento da vida útil dos alimentos. Outro uso relevante é a otimização da extração de lipídios e nutrientes de plantas, os quais podem ser posteriormente emulsificados e encapsulados como nanoemulsões (LOW et al., 2020).

A cavitação, fenômeno essencial para a atuação do ultrassom, ocorre quando ondas ultrassônicas atravessam um líquido, gerando bolhas que se expandem e colapsam repetidamente. Esse colapso libera grandes quantidades de energia, promovendo uma intensa agitação mecânica, com ondas de choque e micro-jatos que impactam diretamente as partículas e aglomerados presentes no meio. Caso haja gás dissolvido ou partículas em suspensão no líquido, a resistência à tração do meio pode ser reduzida, facilitando a formação das bolhas. A presença de núcleos de vapor-gás, como nanobolhas, é fundamental para a cavitação, pois diminui o limiar de pressão necessário para sua ocorrência (SAUTER et al., 2008).

1.4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura

Uma forma eficiente de avaliar as características físicas das emulsões é utilizando a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A MEV é uma técnica poderosa que permite a observação detalhada das superfícies e estruturas das partículas com altíssima resolução. No contexto das emulsões, ela é particularmente útil para analisar o tamanho, a morfologia e a distribuição das gotículas dispersas, além de permitir a avaliação da estabilidade das emulsões ao longo do tempo. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem suas origens no início do século XX, a partir dos primeiros trabalhos sobre microscopia eletrônica, realizados pelos cientistas Ruska e Knoll em 1933. Inicialmente, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) permitiu ampliações além daquelas obtidas por microscópios ópticos, mas com a adição da bobina de varredura por Von Ardenne em 1938, surgiu o microscópio eletrônico de transmissão por varredura (STEM). A partir de então, inovações importantes, como o aprimoramento das lentes eletrostáticas e a introdução de amplificação não linear de sinais, impulsionaram o desenvolvimento do MEV. A tecnologia evoluiu ainda mais com a inclusão do espectrômetro de dispersão de energia (EDS) nos anos 60, permitindo a análise da composição química das amostras. A partir de 1965, o primeiro MEV comercial foi lançado, e desde então a tecnologia continuou a se aperfeiçoar, com o desenvolvimento de sistemas digitais para geração e análise das imagens. Hoje, os microscópios eletrônicos modernos são equipados com sistemas EDS e software avançado, possibilitando análises mais precisas e rápidas das amostras (MOHAMMED & ABDULLAH, 2018).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica amplamente utilizada para a análise da morfologia e composição química de materiais, oferecendo imagens com alta resolução e grande profundidade de campo. Diferente da microscopia óptica, que utiliza luz visível e lentes de vidro, o MEV emprega um feixe de elétrons focalizado para interagir com a superfície da amostra. Essa interação gera uma série de sinais que fornecem informações detalhadas sobre a topografia, textura e composição dos materiais analisados. O princípio de funcionamento do MEV baseia-se na emissão de elétrons por um canhão eletrônico, que são então acelerados em direção à amostra por meio de um campo eletromagnético. Ao atingir a superfície do material, o feixe de elétrons interage com os átomos da amostra, resultando na emissão de diferentes tipos de partículas e radiações. Os sinais mais utilizados na microscopia eletrônica de varredura são os elétrons secundários (SE) e os elétrons

retroespalhados (BSE), que permitem a formação de imagens detalhadas da superfície. Os elétrons secundários são gerados a partir da interação do feixe de elétrons com os elétrons da camada mais externa dos átomos da amostra. Como possuem baixa energia, esses elétrons emergem das camadas mais superficiais do material, resultando em imagens com alto nível de detalhamento topográfico. Por outro lado, os elétrons retroespalhados são aqueles que interagem elasticamente com os átomos da amostra e são refletidos de volta. Como sua intensidade está diretamente relacionada ao número atômico do material, esses elétrons são utilizados para diferenciar regiões com diferentes composições químicas. Esse recurso possibilita a identificação qualitativa e quantitativa dos elementos presentes na amostra, sendo amplamente utilizado em áreas como ciência dos materiais, nanotecnologia, geociências e biomedicina. Amostras não condutoras frequentemente requerem a deposição de uma fina camada de ouro ou carbono para evitar o acúmulo de carga elétrica na superfície, o que poderia distorcer as imagens. Com sua capacidade de gerar imagens tridimensionais detalhadas da superfície de diferentes materiais, o MEV se tornou uma ferramenta indispensável para pesquisa científica e desenvolvimento tecnológico. Seu avanço contínuo tem possibilitado análises cada vez mais precisas, tornando-o essencial para a caracterização microestrutural em diversas áreas do conhecimento (ZHOU et al., 2006).

1.4.5. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) com *headspace*.

Além dos aspectos físicos, é crucial avaliar a composição química e o rendimento das encapsulações. Uma ferramenta extremamente útil para esse tipo de análise é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) utilizando-se a técnica de *headspace*. Essa técnica permite a identificação e quantificação dos compostos voláteis presentes na emulsão e nos sistemas de encapsulação, proporcionando informações detalhadas sobre os componentes químicos. Há 70 anos, com a introdução da cromatografia gasosa (GC), a amostragem e a introdução das amostras foram identificadas como cruciais para uma análise eficaz. A GC exige amostras voláteis, tornando-a ideal para analisar misturas na fase vapor. A análise de *headspace* envolve a extração dos analitos da fase líquida ou sólida para a fase vapor, que é então transferida para análise em GC. Existem diversas técnicas de amostragem de vapores de *headspace* para esse processo. O

uso de *headspace* com cromatografia gasosa (GC) começou em 1958, e o uso de *headspace* dinâmico ("*purge and trap*") foi popularizado na década de 1970. Ao longo do tempo, as técnicas de *headspace* evoluíram, e hoje existem diversas abordagens miniaturizadas e automatizadas, como a amostragem estática (onde os vapores são amostrados diretamente de um frasco hermético) e dinâmica (onde a fase vapor é capturada por um sorvente). Técnicas como SPME (Extração em Fase Sólida Microextraction) e membranas também foram introduzidas para melhorar a extração de vapores. A amostragem de *headspace* com GC é amplamente aplicada, com milhares de artigos publicados nos últimos anos, destacando o uso crescente de técnicas combinadas com sorventes, como *purge-and-trap* e SPME (SNOW & SLACK, 2002).

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica de alta resolução usada para analisar várias substâncias em uma amostra, com sensibilidade que permite detectar até 10-12 g de composto por mL de solução. A fase estacionária pode ser líquida ou sólida, permitindo a separação das substâncias com base em sua solubilidade e volatilidade. A fase móvel, um gás de arraste, transporta a amostra pela coluna até o detector, com gases como hélio, hidrogênio, nitrogênio e argônio sendo utilizados, sendo o hélio mais raro e caro no Brasil. As colunas cromatográficas podem ser de níquel, aço inox ou vidro, e variam em formato e tamanho dependendo da amostra. As colunas analíticas possuem diâmetros de 1,0 a 4,0 mm, enquanto as preparativas têm diâmetros maiores (5,0 a 100,0 mm). As colunas capilares, com diâmetros menores (0,15 a 0,75 mm) e comprimento maior (10,0 a 100,0 m), são as mais comuns, especialmente as de sílica fundida (PERES, 2002).

Já espectrometria de massas (MS) é uma técnica utilizada para determinar a relação entre a massa e a carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa. Um espectrômetro de massas é composto por uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados. Os analisadores de massas separam os íons de acordo com suas relações m/z e podem ser de diversos tipos, como Q-TOF, *ion-traps*, TOF, FT-ICR e *orbitrap*. Esses analisadores podem ser usados isoladamente ou acoplados entre si para formar equipamentos híbridos, permitindo experimentos em sequência (*tandem*), onde um íon detectado pode ser fragmentado para análises posteriores. Os íons separados são então detectados por eletromultiplicadoras, que são os detectores mais comuns em MS (CANTÚ et al., 2008).

1.4.6. Análise de Componentes Principais

Com a grande quantidade de dados e parâmetros envolvidos, é necessário utilizar ferramentas estatísticas para otimizar os resultados. Nesse contexto, a quimiometria se destaca, e o PCA (Análise de Componentes Principais) é uma ferramenta extremamente útil. Nos últimos 50 anos, a Química passou por transformações significativas devido ao avanço tecnológico, especialmente nas áreas espectroscópica e cromatográfica. O desenvolvimento de detectores de arranjo de diodos, métodos hifenados e instrumentos portáteis de baixo custo, aliado à miniaturização dos supercomputadores, possibilitou que equipamentos de laboratório fossem conectados a microcomputadores. Isso democratizou o uso de instrumentação sofisticada, tornando-a parte das análises de rotina, simultaneamente, o campo da Quimiometria surgiu na década de 1970, impulsionado pela necessidade de desenvolver métodos para lidar com grandes volumes de dados digitais gerados por instrumentos analíticos, como cromatogramas e espectros. Fundada por Bruce Kowalski e Svante Wold, a Quimiometria teve papel crucial na Química Analítica nas décadas seguintes, com destaque para o surgimento de métodos multivariados de calibração e reconhecimento de padrões. Nos últimos anos, a área de reconhecimento de padrões se expandiu para aplicações como detecção de falhas em processos industriais, autenticação de produtos e identificação de metabólitos médicos (FERREIRA, 2022).

A Análise de Componentes Principais (PCA) é uma ferramenta fundamental na análise multivariada, amplamente utilizada em diversos campos, especialmente em problemas químicos, devido à sua capacidade de simplificar conjuntos de dados complexos. O PCA é crucial para identificar padrões e relações entre variáveis, bem como para detectar amostras anômalas e agrupar amostras semelhantes. No contexto da quimiometria, que envolve a aplicação de métodos estatísticos a problemas químicos, a PCA assume um papel central ao lidar com grandes volumes de dados gerados por instrumentos analíticos. O avanço da tecnologia computacional facilitou o processamento desses dados, tornando a PCA uma ferramenta indispensável nos laboratórios modernos de química. A utilização crescente dessa técnica reflete sua importância na interpretação e modelagem de dados químicos complexos, sendo comum sua presença em publicações científicas e pesquisas nessa área (LYRA et al., 2010).

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e otimizar, por meio de planejamento fatorial, uma formulação em suspensão coloidal biodegradável, feita a partir de subprodutos agrícolas, pectina cítrica, e contendo compostos ativos encapsulados, óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, para o controle do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, simbionte das formigas cortadeiras, avaliando suas propriedades químicas, morfológicas e biológicas.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver uma formulação contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (tea tree), limoneno encapsulados em pectina cítrica;
- Otimizar a formulação por meio de planejamento fatorial;
- Realizar análises químicas e quantitativas utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) para identificar o perfil químico da formulação e calcular a porcentagem de encapsulamento dos compostos ativos;
- Caracterizar a morfologia da formulação por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliar a atividade antifúngica das formulações por meio de ensaio de cinética de crescimento micelial da cepa fúngica estudada.

3 Material e Método

3.1 Materiais

3.1.1 Equipamentos

- Autoclave Vertical CS Prismatec
- Balança Analítica Bel
- Cabine de Fluxo Laminar Esco Opti Mair
- Copo Ford Tech Vision
- Cromatógrafo Gasoso (CG-2010 Plus Shimadzu) acoplado ao Espectrômetro de Massas (CG-MS-TQ8030 Shimadzu)
- Liofilizador L101 Liotop
- Mini Spray Dryer Buchi B-290
- pH-metro Metrohm 827pH lab
- Pipetas Eppendorf (10, 100, 1000 µL)
- Sonicador Qsonica Q500
- Ultra-Turrax IKA T 25 Digital

3.1.2 Reagentes

- Água Ultrapura
- Agar (Himedia)
- Citronelal (Aldrich)
- Extrato de Levedura (Kasvi)
- Extrato de Malte (Kasvi)
- Gama Terpineno (Aldrich)
- Hexano HPLC (Êxodo Científica)
- Limoneno de Laranja (Quinarí)
- Óleo Essencial de *Melaleuca alternifolia* Austrália (Destilaria Bauru)
- Pectina Cítrica (Êxodo Científica)
- Peptona G (Acumedia)

3.1.3 Softwares Utilizados

- Excel
- GCMS Solution (Shimadzu)
- ImageJ
- Octave

3.2 Métodos

3.2.1 Seleção dos Materiais

A escolha dos materiais foi baseada em uma revisão teórica e em uma análise de produtos comerciais já utilizados no controle de formigas cortadeiras. Os critérios para a seleção envolveram eficácia biológica, sustentabilidade e viabilidade de aplicação.

O primeiro material escolhido foi o óleo essencial comercial de *Melaleuca alternifolia*, devido ao seu reconhecido potencial antifúngico. Assim, sua incorporação à formulação teve como principal objetivo inibir o crescimento do fungo, tornando-se uma alternativa natural e biodegradável aos métodos químicos tradicionais.

Em seguida, foi realizado um levantamento sobre os principais produtos comerciais disponíveis no mercado para o controle dessas pragas. Um dos destaques foram as iscas granuladas contendo formicida, produzidas a partir de polpas descartadas de cítricos. Esses produtos demonstraram relação com a proposta do estudo, pois utilizam subprodutos agroindustriais e serviram como base para o desenvolvimento de uma formulação mais sustentável. Considerando a necessidade de um material que garantisse a estabilidade e liberação controlada do óleo essencial, optou-se pela pectina cítrica como biopolímero encapsulante.

Para evitar a rejeição das formigas cortadeiras à formulação, foi adicionado limoneno, um composto obtido da casca da laranja. As formigas possuem um olfato altamente sensível e podem evitar substâncias com odores desconhecidos. Porém nas iscas comerciais feitas a base de bagaço de laranja pode haver contaminação de limoneno assim, a inclusão do limoneno teve a função de mascarar o cheiro do óleo essencial de melaleuca, reduzindo a probabilidade de rejeição.

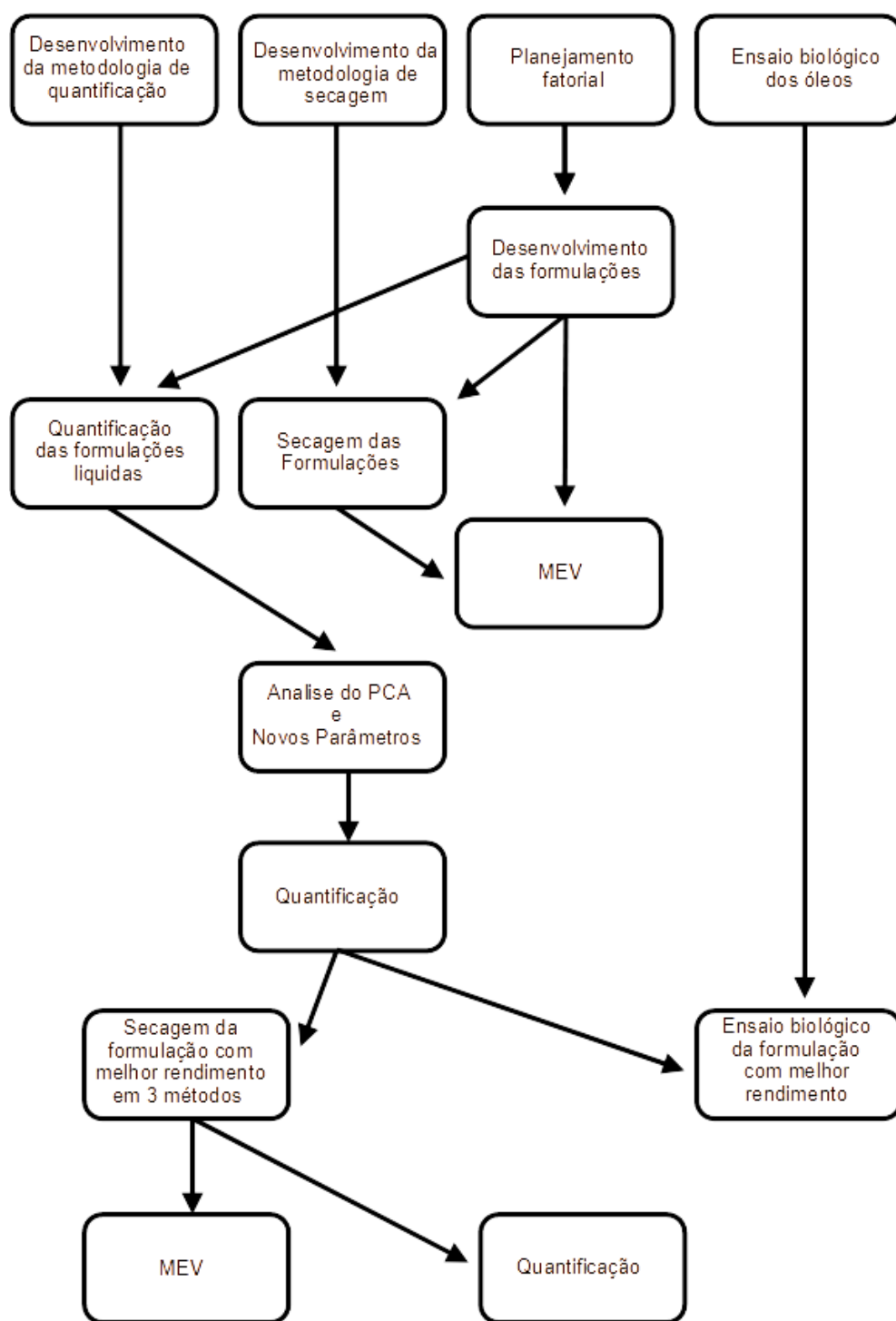


FIGURA 6: Fluxograma ilustrativo das etapas envolvidas no desenvolvimento da formulação proposta neste trabalho.

3.2.2 Obtenção da Formulação

A obtenção da formulação foi realizada em várias etapas, com o objetivo de garantir a correta preparação e a eficiência da emulsão:

Inicialmente, o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e o limoneno foram pesados individualmente, sendo então misturados em uma solução estoque contendo 50% de cada composto, expressos em massa. Esta solução foi reservada para utilização posterior no processo de formulação.

Em seguida, foram pesados os demais componentes da formulação: a pectina, a água destilada e a mistura de óleo essencial com limoneno. Estes ingredientes foram preparados e reservados em recipientes separados, prontos para serem combinados de acordo com o procedimento descrito, inicialmente foram preparadas 8 soluções de 100g cada, usando planejamento fatorial, a seguir está a tabela (1) em valores de porcentagem em massa dos compostos presentes.

TABELA 1: Porcentagem de compostos em massa para uma solução de 100g

Formulação	Proporção de água	Proporção de pectina	Proporção de óleos
1	92,50%	5,63%	1,88%
2	92,50%	5,63%	1,88%
3	90,00%	7,50%	2,50%
4	90,00%	7,50%	2,50%
5	92,50%	6,25%	1,25%
6	92,50%	6,25%	1,25%
7	90,00%	8,33%	1,67%
8	90,00%	8,33%	1,67%

A pectina em pó foi gradualmente adicionada à água destilada, com o auxílio de um Ultra-Turrax, um equipamento de alta rotação, que favoreceu a homogeneização da solução. Este processo de dissolução da pectina é crucial para garantir que a substância se integre de maneira eficiente à fase aquosa.

Após a completa homogeneização da pectina em água, a mistura de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e limoneno foi adicionada à solução aquosa. A fase apolar foi incorporada à solução de pectina, sendo agitadas suavemente com um bastão de vidro, de modo a promover uma mistura inicial entre as duas fases líquidas.

Para garantir a completa emulsificação da mistura, o becker contendo a solução foi colocado em uma sonda ultrassônica. O uso da sonda ultrassônica permite a geração de ondas de alta energia que auxiliam na formação de uma emulsão estável, promovendo a distribuição homogênea das partículas e garantindo a uniformidade da formulação.

Após a emulsificação, a solução foi cuidadosamente armazenada em ambiente resfriado, garantindo a estabilidade da formulação. Este armazenamento foi realizado para preservar as propriedades da emulsão até a realização de experimentos e análises subsequentes.

3.2.3 Secagem por Aspersão (*Spray-Drying*)

O processo de secagem por aspersão foi adotado para transformar a formulação líquida em pó, garantindo maior estabilidade e facilitando a aplicação. No entanto, a secagem de sistemas contendo pectina cítrica apresentou desafios específicos, exigindo uma otimização cuidadosa do método para garantir um produto final de qualidade.

Para minimizar essas dificuldades e melhorar a eficiência do processo de secagem, foram realizados diversos testes para otimizar os parâmetros operacionais no Mini Spray Dryer Büchi B-290. Os testes foram para observar os parâmetros onde não havia desperdício de formulação no coletor de resíduos e ao mesmo tempo a formulação coletada não apresentava umidade, ou seja o material resultante estava em forma de pó e sem passar de valores de temperatura que poderiam degradar os óleos. Após análise dos resultados, foram definidos os seguintes parâmetros:

- Temperatura de entrada do ar quente (Inlet temperature): 50°C (para evitar a degradação do óleo essencial)
- Taxa de aspiração (Aspirator rate): 50%
- Bomba peristáltica (Pump rate): 5%
- Limpador do bico (Nozzle cleaner): 0
- Pressão de atomização: 60 psi

3.2.4 Otimização do encapsulamento e análise química (PCA e CG-MS)

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi utilizada para explorar padrões e relações entre as variáveis experimentais, auxiliando na interpretação dos dados obtidos e na otimização do processo de encapsulamento.

Para a aplicação do PCA, foram avaliados três parâmetros experimentais principais, que poderiam impactar diretamente a eficiência do encapsulamento:

- Tempo de agitação ultrassônica, refere-se ao tempo de exposição da amostra à sonda ultrassônica, influenciando a dispersão dos componentes e a estabilidade da emulsão.
- Proporção de água em relação aos demais compostos afeta a solubilidade e a formação da matriz encapsulante, sendo um fator determinante na obtenção de micropartículas estáveis.
- Relação entre biopolímeros e óleos essenciais – Impacta diretamente a eficiência da encapsulação, influenciando a retenção do óleo essencial e a integridade das partículas formadas.

A variável resposta utilizada para a análise foi a porcentagem de encapsulamento, obtida através da quantificação por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, que representou o rendimento do processo em termos de retenção do óleo essencial dentro da matriz biopolimérica.

A análise foi conduzida utilizando os softwares Excel e GNU Octave, com o auxílio de uma biblioteca disponibilizada pelo Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho. Os resultados foram visualizados por meio de gráficos específicos, permitindo a interpretação das correlações entre os fatores estudados.

3.2.5 Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

A caracterização dos compostos voláteis presentes na formulação foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), utilizando injeção automatizada por *headspace*.

A técnica de *headspace* foi empregada para a extração dos compostos voláteis, permitindo a análise sem a necessidade de injeção direta da amostra líquida como também a análise de amostras sólidas, o que minimiza perdas e contaminações.

O equipamento utilizado foi um injetor automático acoplado ao sistema cromatográfico (CG-MS-TQ8030 Shimadzu), configurado com os seguintes parâmetros:

- Volume da amostra: 1 mL
- Temperatura de incubação: 80 °C, garantindo volatilização eficiente dos compostos sem degradação térmica significativa
- Tempo de incubação: 20 minutos, permitindo o equilíbrio da fase gasosa com os compostos voláteis da amostra
- Agitação: 300 rpm, em ciclos alternados de 1 segundo ligado e 1 segundo desligado, para favorecer a homogeneização da amostra e melhorar a reprodutibilidade da extração

A separação dos compostos foi realizada utilizando um cromatógrafo gasoso equipado com uma coluna capilar DB-5 UI, conhecida por sua elevada estabilidade térmica e eficiência na separação de compostos semipolares. As condições cromatográficas foram ajustadas para garantir uma adequada resolução dos picos e minimizar coeluições:

- Razão de split: 5, permitindo um equilíbrio entre sensibilidade e sobrecarga da coluna
- Tempo total de corrida: 18 min, tempo suficiente para a eluição dos compostos voláteis presentes na formulação
- Programa de temperatura: inicial de 40 °C, com rampa gradual uniforme até 200 °C, otimizando a volatilização e separação dos componentes da amostra
- Detecção por Espectrometria de Massas

A identificação dos compostos foi realizada por espectrometria de massas operando no modo Q3 Scan, permitindo a análise da distribuição de fragmentos moleculares e identificação dos compostos com base em suas massas e padrões espectrais. Para garantir a confiabilidade dos resultados, foram adotadas as seguintes condições em full Scan:

- Temperatura da fonte de íons: 290°C, promovendo uma ionização eficiente dos compostos sem induzir degradação excessiva
- Temperatura da interface: 200°C, assegurando uma transferência adequada dos analitos da fase gasosa para a região de detecção
- Tempo de corte do solvente: 3 min, evitando interferências iniciais na análise

- Faixa de detecção (m/z): 35 a 250, abrangendo os principais fragmentos esperados para os compostos estudados

3.2.6 Desenvolvimento da Curva de Calibração por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS)

O desenvolvimento da curva de calibração foi realizado para quantificar o analito presente nas amostras utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS). Para garantir maior precisão nas quantificações, foi utilizado tanto um padrão externo (gama-terpineno) quanto um padrão interno (citronelal), conforme descrito abaixo:

Foram preparadas soluções padrão com concentrações conhecidas do analito, utilizando gama-terpineno (2% m/m) como padrão externo e citronelal (2% m/m) como padrão interno. As concentrações das soluções foram ajustadas para cobrir a faixa de interesse, proporcionando uma distribuição adequada para a curva de calibração. As soluções do externo foram dissolvidas em solvente adequado (hexano) e devidamente homogeneizadas, dividindo a quantidade por 2 sucessivamente.

Em cada vial de *headspace* foi adicionada uma quantidade constante de solução de citronelal (padrão interno, 10 μ L) e 10 μ L de solução de gama-terpineno. O padrão interno foi utilizado para corrigir eventuais variações no processo de preparação e nas análises instrumentais, além de normalizar os resultados da cromatografia.

As soluções padrão foram analisadas utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS-TQ8030 Shimadzu) utilizando *headspace*. As condições de análise foram otimizadas para garantir a boa separação dos compostos, utilizando uma coluna capilar adequada, método utilizado foi o mesmo descrito no item 3.2.5.

A partir dos dados obtidos, a curva de calibração foi construída utilizando a área do pico correspondente ao gama-terpineno (padrão externo) e a área do pico do citronelal (padrão interno). A relação entre essas áreas foi utilizada para determinar a concentração do analito nas amostras. Assim, a concentração foi calculada dividindo a área do pico do gama-terpineno pela área do pico do citronelal.

3.2.7 Caracterização morfológica

A preparação das amostras para análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) envolveu a aplicação de fitas de carbono, secagem em dessecador com sílica e recobrimento com ouro para garantir a condutividade elétrica. Como o MEV pode degradar amostras biológicas, foi necessário um cuidado extra para preservar a integridade das amostras, assegurando resultados de qualidade e imagens precisas.

Inicialmente, foram preparados os suportes metálicos (*stubs*) com o uso de fita de carbono condutora, a qual foi adesivada nas superfícies dos *stubs* para garantir que as amostras ficassem bem fixadas e condutoras, permitindo uma análise eficiente no MEV. As formulações secas foram cuidadosamente aplicadas sobre as fitas de carbono. As amostras foram distribuídas de maneira uniforme, assegurando que uma quantidade representativa da formulação fosse analisada durante o experimento.

Após a adição das formulações, as amostras foram secas em um dessecador com sílica gel para remover qualquer umidade residual, garantindo que as amostras estivessem completamente secas antes do recobrimento. Para melhorar a condutividade da amostra durante a análise no MEV, foi realizado o recobrimento das amostras com uma camada fina de ouro, utilizando um equipamento específico para deposição de metal.

Por fim, as amostras foram analisadas na Microscopia Eletrônica de Varredura, XL30 FEG, com o auxílio de um técnico especializado. A técnica MEV foi utilizada para caracterizar a morfologia das formulações, observando suas estruturas superficiais e as propriedades das partículas formadas.

Após a obtenção das imagens, as mesmas foram processadas no ImageJ[®]. O *software* foi utilizado para converter as imagens obtidas em formato adequado e realizar a medição do diâmetro das partículas. A escala das imagens foi previamente ajustada comparando a quantidade de pixels em relação a escala de cada imagem, e as medições foram realizadas diretamente nas imagens digitais, garantindo a precisão nas medições.

As partículas foram analisadas individualmente no ImageJv[®], onde foi medida a distância entre os pontos extremos de cada partícula. O diâmetro médio das partículas foi calculado a partir das medições realizadas em diferentes pontos das

partículas. A análise considerou a forma das partículas, que variava de esférica a ligeiramente alongada.

3.2.9 Ensaio biológico de cinética de crescimento com óleos essenciais

Os experimentos com o microrganismo *Leucoagaricus gongylophorus* foram conduzidos no Laboratório de Bioensaios do grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos - campus de São Carlos (UFSCar).

O fungo *L. gongylophorus* foi isolado a partir do ninho de formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* e mantido em laboratório em meio de cultivo composto por extrato de malte ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), peptona G ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), extrato de levedura ($2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e ágar ($17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Para o ensaio, utilizou-se o mesmo meio de cultura empregado no crescimento do fungo. Um volume de 10 mL do meio foi adicionado em cinco tubos de ensaio, que foram autoclavados a 120°C e 1.0 atm por 20 min. Após o resfriamento até aproximadamente 50°C , os meios de cultura foram vertidos em cinco placas de Petri ($75 \times 15 \text{ mm}$) estéreis, dentro da cabine de fluxo laminar (Cabine de Fluxo Laminar Esco Opti Mair), previamente esterilizadas por luz ultravioleta por 30 min.

Após a solidificação do meio de cultura, as placas foram reservadas por 24 h para observação de possíveis contaminações antes do início do experimento. Cada placa de Petri foi inoculada com um disco de ágar (aproximadamente 9 mm) previamente colonizado pelo fungo simbiótico *L. gongylophorus*, colocado na posição central da placa.

Além disso, na mesma placa foi inserido um pequeno recipiente (tampa de Eppendorf®) contendo óleo essencial de Melaleuca ou limoneno, permitindo a exposição do fungo aos compostos voláteis sem contato direto com o meio de cultura.

As placas foram incubadas a 21°C , e as medições do crescimento micelial foram realizadas em cinco eixos da massa micelial nos períodos de 7, 14, 21, 28 e 35 dias. A área de crescimento do fungo simbiótico foi calculada para cada amostra.

As análises foram realizadas em quintuplicata, incluindo dois controles: um com o recipiente vazio e outro com o meio de cultura sem adição de formulação, inoculado apenas com o fungo simbiote.

3.2.8 Ensaio biológico de cinética de crescimento com formulação

Os experimentos com o microrganismo *L. gongylophorus* foram conduzidos no Laboratório de Bioensaios do grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos - campus de São Carlos (UFSCar).

O fungo *L. gongylophorus* foi isolado a partir do ninho de formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* e mantido em laboratório em meio de cultivo composto por extrato de malte ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), peptona G ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), extrato de levedura ($2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e ágar ($17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Para o ensaio, preparou-se o mesmo meio de cultura utilizado para o crescimento do fungo. Um volume de 10 mL do meio foi adicionado em cinco tubos de ensaio para formulação e mais 5 para a solução de pectina, quintuplicada, que foram autoclavados a 120°C e 1.0 atm por 20 min. Após o resfriamento até aproximadamente 50°C , foram incorporados ao meio de cada tubo 1 mL da formulação ou 1 mL de solução de pectina a 5% em água. Apenas a solução de pectina passou pelo processo de autoclavagem. Em seguida, realizou-se a homogeneização da substância no meio de cultura.

Os meios de cultura foram vertidos em cinco placas de Petri ($75 \times 15 \text{ mm}$) estéreis, dentro da cabine de fluxo laminar (Cabine de Fluxo Laminar Esco Opti Mair), previamente esterilizados por luz ultravioleta por 30 min. Após a solidificação do meio de cultura, as placas foram reservadas por 24 h para observação de possíveis contaminações antes do início do experimento.

Cada placa de Petri foi inoculada com um disco de ágar (aproximadamente 9 mm) previamente colonizado pelo fungo simbiótico *L. gongylophorus*, colocado na posição central da placa. As placas foram incubadas a 21°C .

As medidas do crescimento micelial foram realizadas em cinco eixos da massa micelial nos períodos de 7, 14, 21, 28 e 35 dias. A área de crescimento do fungo simbiótico foi calculada para cada amostra. Todas as análises foram realizadas em quintuplicata, incluindo o controle experimental, composto pelo meio de cultura sem adição de formulação e inoculado apenas com o fungo simbiote.

3.2.9 Avaliação do Crescimento Micelial

A análise do crescimento do fungo simbiótico *L. gongylophorus* foi realizada utilizando o software ImageJ®, permitindo a medição precisa da área de crescimento micelial ao longo do experimento. As placas de Petri contendo o fungo foram escaneadas para obtenção das imagens digitais. Esse procedimento garantiu uma visualização clara e uniforme dos fungos, permitindo medições precisas.

Após a digitalização, as imagens das placas foram analisadas no software ImageJ®. A escala das imagens foi ajustada previamente para garantir precisão nas medições, comparando o número de pixels da imagem com a régua de inserção de escala de referência. A medição do crescimento foi realizada manualmente, considerando cinco eixos para cada placa de Petri. Esse método permitiu um acompanhamento detalhado da expansão da colônia ao longo dos dias.

Os dados obtidos a partir das medições no ImageJ® foram organizados e analisados no Excel. Foram calculados o desvio padrão (SD), desvio relativo (RSD) e a porcentagem de inibição nos respectivos dias de experimento. Esses cálculos permitiram avaliar a variação no crescimento micelial e a eficácia das formulações testadas.

A medição do crescimento do fungo possibilitou avaliar o impacto dos diferentes tratamentos sobre sua expansão. A análise estatística ajudou a verificar a homogeneidade dos dados e a eficiência dos compostos testados na inibição ou estímulo do crescimento micelial.

3.2.10 Avaliação de Contaminação da Formulação

O ensaio foi realizado para avaliar a contaminação da formulação quando exposta a um ambiente não controlado. O procedimento foi realizado conforme os seguintes passos:

Foram utilizadas duas placas de Petri de 9 cm de diâmetro, na primeira placa de Petri, foi adicionado 10 mL de solução controle composta exclusivamente por pectina em água. A segunda placa recebeu 10 mL da formulação desenvolvida. Nenhuma das placas passou por qualquer procedimento de esterilização ou controle de contaminação microbiana, com o intuito de simular as condições naturais em que a formulação seria exposta.

As placas foram deixadas em ambiente aberto e não foram seladas, permitindo a livre circulação de ar e a exposição à contaminação do ambiente. Esse procedimento visou testar a eficácia da formulação na prevenção da contaminação microbiológica em um contexto real.

Diariamente, as placas eram abertas para permitir o arejamento e garantir a circulação de ar. Esse processo foi fundamental para permitir a exposição da formulação ao ambiente externo, favorecendo a interação com possíveis contaminantes presentes no ar.

As placas foram observadas diariamente durante 30 dias. Durante esse período, foi monitorado o crescimento de microorganismos. A avaliação da contaminação foi realizada observando o crescimento de microorganismos nas placas ao longo do período de exposição. A presença de contaminantes foi monitorada visualmente, permitindo uma análise da resistência da formulação frente a microorganismos presentes no ambiente.

4 Resultados e Discussão

4.1 Desenvolvimento da formulação

4.1.1 Escolha dos materiais

Para o desenvolvimento da formulação, partiu-se da ideia de criar uma formulação bioencapsulada utilizando o óleo essencial de melaleuca, uma abordagem que já é amplamente discutida na literatura devido aos seus benefícios e propriedades antimicrobianas. A partir dessa premissa, iniciou-se a busca por biopolímeros e substâncias que pudessem estabilizar a formulação, garantindo sua eficácia e durabilidade. Durante o levantamento bibliográfico, foi realizada uma seleção cuidadosa de polímeros e emulsificantes adequados para a formulação, levando em consideração suas propriedades de estabilização e compatibilidade com o óleo essencial. Simultaneamente, foi realizada uma pesquisa de mercado para identificar produtos comerciais utilizados para controle de formigas cortadeiras. O intuito dessa busca foi entender as soluções já disponíveis, suas formulações e como elas poderiam servir como referência para o desenvolvimento da proposta experimental. Essa análise auxiliou na definição dos parâmetros para a formulação e ajudou a otimizar as escolhas dos componentes, buscando garantir a eficiência e a viabilidade do produto.

Entre os produtos comerciais analisados, o mais interessante foi a isca peletizada com fipronil. Esses pellets, fabricados a partir do bagaço de citrus descartado pela indústria de citros, chamaram a atenção devido à sua composição e propriedades. A polpa do citrus, rica em pectina cítrica, demonstrou ser um material promissor para a formulação, uma vez que a pectina é utilizada tanto como biopolímero quanto como emulsificante. Esse componente tem a capacidade de formar geles e estabilizar emulsões, o que a torna uma excelente escolha para a formulação bioencapsulada que se buscava desenvolver.

Esse *insight* foi fundamental para a adaptação e aprimoramento da formulação proposta, alinhando-a com as propriedades desejadas para garantir a eficácia e estabilidade do produto.

Dessa forma, a pectina cítrica atendeu a vários requisitos importantes para a formulação proposta, destacando-se como um material de grande valor para o desenvolvimento de soluções mais sustentáveis. Em primeiro lugar, trata-se de um

produto biodegradável, o que é fundamental para garantir que a formulação final tenha um impacto ambiental mínimo. O uso de materiais biodegradáveis é uma prioridade em muitas indústrias, especialmente no contexto atual, onde há uma crescente preocupação com a preservação ambiental. Além disso, a pectina é um subproduto proveniente da indústria de citros, extraída a partir de materiais descartados, o que a torna um biopolímero de origem sustentável. Ao utilizar um produto secundário como a pectina cítrica, estamos não apenas aproveitando um recurso que, de outra forma, seria descartado, mas também agregando valor a esses resíduos, transformando-os em um material útil e funcional para a produção de novos produtos.

Essa característica de reaproveitamento e agregação de valor a materiais descartados não só contribui para a sustentabilidade, mas também reduz a necessidade de se buscar novas matérias-primas, o que pode diminuir os impactos ambientais associados à extração e ao processamento de recursos. Em contraste com polímeros mais comuns, como o amido de milho, que são amplamente utilizados na alimentação e envolvem a utilização de recursos agrícolas de forma mais intensiva, a pectina cítrica oferece uma solução mais ecológica. Já que pectina, por ser um subproduto da indústria de citros, tem uma origem mais abundante e menos competitiva em relação aos recursos agrícolas destinados à alimentação humana.

Outro fator importante a ser destacado é a relevância do Brasil como um dos maiores produtores mundiais de laranja. Esse fato garante a disponibilidade constante e a acessibilidade do bagaço de citrus, de onde a pectina é extraída, tornando a pectina cítrica uma matéria-prima abundante e facilmente disponível no território nacional e possui produção e comercialização no Brasil. Isso representa uma grande vantagem econômica e logística, uma vez que o país já possui uma infraestrutura consolidada na produção e comercialização de citros, o que facilita a obtenção dessa substância

Além de ser um biopolímero sustentável, a pectina cítrica apresenta características adicionais que a tornam ainda mais vantajosa para o desenvolvimento da formulação bioencapsulada. Como emulsificante, a pectina possui uma viscosidade elevada, o que facilita a formação de emulsões estáveis, essenciais para a encapsulação eficaz do óleo essencial de melaleuca. A capacidade da pectina de estabilizar esses sistemas garante uma liberação controlada do ativo encapsulado, aumentando sua eficácia e prolongando seu efeito. Essa estabilidade é fundamental para garantir que o óleo essencial, que pode ser volátil, permaneça protegido durante

o armazenamento e tenha seu potencial antimicrobiano preservado até o momento da aplicação. Além disso, devido ao seu pH naturalmente baixo, a pectina elimina a necessidade de adicionar conservantes sintéticos à formulação, o que torna o produto final mais natural e livre de substâncias que possam afetar sua segurança ou desempenho.

Em suma, a pectina cítrica não só cumpre os requisitos de ser um biopolímero sustentável e biodegradável, mas também oferece múltiplos benefícios adicionais, como estabilização de emulsões e eliminação da necessidade de conservantes. Isso faz dela uma excelente escolha para o desenvolvimento de formulações mais ecológicas e eficazes, alinhando-se com as tendências atuais de sustentabilidade e inovação na indústria de produtos naturais e bioencapsulados.

A partir da ideia dos *pellets*, surgiu uma nova abordagem. Embora o bagaço de citrus, de onde a pectina cítrica é extraída, possua compostos voláteis, sendo o limoneno o principal, ele tendo seu uso comercial, foi planejado que o limoneno poderia ser adicionado à formulação como uma possível forma de camuflagem química. Essa estratégia tem como objetivo evitar que as formigas percebam o produto como uma ameaça, uma vez que seus órgãos sensoriais são extremamente sensíveis a substâncias químicas. As formigas, sendo organismos altamente organizados, possuem um sistema de comunicação e uma capacidade de percepção química bem desenvolvidos, que as tornam aptas a detectar e evitar substâncias que possam representar perigo para o fungo simbiote ou para o próprio formigueiro.

As formigas, ao coletarem material para o seu formigueiro, são conhecidas por selecionar substâncias que possam trazer benefícios para o crescimento e manutenção do fungo, que é uma parte crucial de sua alimentação. Portanto, se um composto é percebido como tóxico ou prejudicial, elas naturalmente o evitam para proteger o equilíbrio do formigueiro. Nesse contexto, a adição do limoneno pode atuar como uma estratégia de disfarce, mimetizando substâncias naturais que não desencadeiam a resposta de rejeição das formigas, permitindo que o produto seja transportado de maneira mais eficiente sem ser detectado. Essa abordagem poderia, assim, otimizar a distribuição do produto nas colônias de formigas, ao mesmo tempo que mantém a ação bioencapsulada do óleo essencial de melaleuca intacta, sem comprometer sua eficácia antimicrobiana.

Durante o desenvolvimento da formulação, foi utilizado limoneno de alta pureza, principalmente para facilitar o processo de análise e garantir resultados mais precisos nas etapas iniciais. O uso de limoneno puro permitiu um controle mais rigoroso sobre as variáveis envolvidas na experimentação, como a concentração do composto e a avaliação de sua eficácia na inibição do crescimento do fungo e no comportamento das formigas. No entanto, a ideia é que, no futuro, o limoneno seja utilizado em concentrações menos puras, com o objetivo de reduzir os custos de produção sem comprometer a eficácia do produto final.

A utilização de limoneno em menor pureza pode ser viável, já que, para o propósito de camuflagem química e controle do crescimento do fungo, a pureza elevada não é necessariamente um requisito. Ao usar limoneno de menor pureza, o custo da formulação pode ser significativamente reduzido, tornando o produto mais acessível e viável para produção em larga escala. Além disso, o uso de limoneno com menor pureza pode ser vantajoso do ponto de vista ambiental, pois pode ser obtido a partir de fontes menos processadas e mais sustentáveis, como os subprodutos da indústria de cítricos.

4.1.2 Problemas no desenvolvimento

Embora a pectina apresente diversas características úteis para a formulação, como a sua biodegradabilidade, capacidade de estabilizar emulsões e ser um biopolímero sustentável, ela também apresenta alguns desafios durante o processo de obtenção da formulação. O primeiro problema está relacionado à dificuldade de obter uma solução homogênea utilizando as técnicas tradicionais de laboratório. Métodos convencionais, como agitação manual ou utilização de equipamentos básicos, não foram suficientes para dissolver a pectina de maneira eficiente. Para superar esse obstáculo, foi necessário recorrer ao uso do Ultra-Turrax, um equipamento mais poderoso que permite uma mistura mais intensa e eficaz, garantindo que a pectina fosse completamente dissolvida e integrada à formulação.

Além disso, a solução de pectina pode variar de fluido newtoniano para não newtoniano dependendo da concentração utilizada, o que traz um desafio adicional. Esse fenômeno pode afetar o desempenho do produto final, dificultando o controle sobre a consistência e a estabilidade da emulsão. A necessidade de ajustes na concentração e na formulação para garantir o comportamento desejado da solução

como a homogeneidade, viscosidade propicia para manuseio e a não solidificação da formulação é, portanto, um fator a ser considerado cuidadosamente.

Outro fator que complicou o processo de formulação foi a tendência da pectina a formar filmes. Embora isso possa ser uma característica desejável em alguns casos, pois pode contribuir para a estabilização e liberação controlada do ativo, a formação de filmes representou um desafio significativo no processo de secagem por aspersão. Quando os filmes se formam durante a secagem, eles podem obstruir o a passagem de ar do equipamento, dificultando a remoção da umidade de maneira eficaz. Esse comportamento impede uma secagem uniforme e pode afetar a integridade da formulação, comprometendo a dispersão do produto final. Como a secagem por aspersão é uma técnica crucial para a produção de formulações em pó, a formação de filmes precisa ser cuidadosamente controlada para garantir que a eficiência da secagem não seja prejudicada.

Portanto, apesar das vantagens da pectina, que é um biopolímero sustentável e tem propriedades que favorecem a estabilização do produto, a formação de filmes durante a secagem é um desafio técnico importante que exige ajustes no processo para garantir a consistência e a qualidade da formulação final.

4.2 Otimização do encapsulamento e análise química

Inicialmente, foi desenvolvido um método de análise por headspace para o óleo essencial de Melaleuca, com o objetivo de avaliar seu perfil químico de forma eficiente e reprodutível. A técnica permitiu a identificação dos compostos voláteis presentes no óleo em concordância com a literatura proporcionando uma caracterização detalhada de sua composição. Esse procedimento foi essencial para estabelecer uma metodologia confiável, garantindo a precisão das análises subsequentes e possibilitando a comparação dos resultados ao longo do estudo. Abaixo se encontra o cromatograma (FIGURA 7) e as tabelas de tabela de picos cromatográficos e dos principais compostos (TABELA 2 e 3).

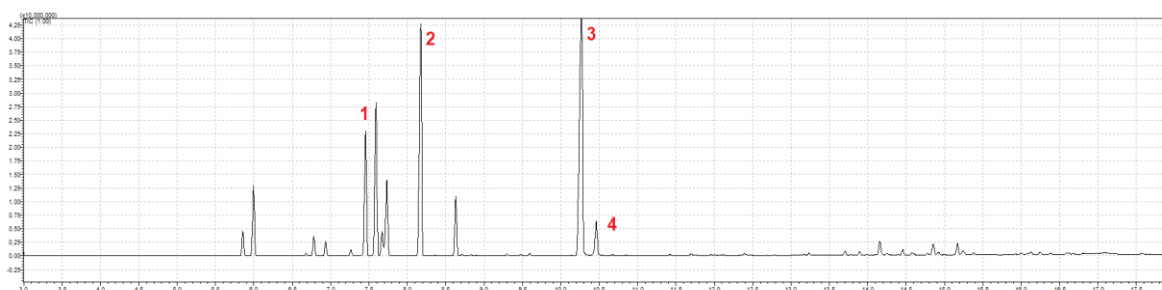


FIGURA 7: Cromatograma do óleo essencial de Melaleuca, com os compostos principais marcados, Alfa terpineno(1), Gama terpineno (2), Terpinen-4-ol(3), Alfa terpineol(4).

TABELA 2: Bandas cromatográficas observadas na análise do óleo essencial de melaleuca, utilizando gc-ms headspace.

Peak	Ret tm	Start tm	End tm	Area	Area%	Height	Heitgh%	A/H
1	5,86	5,8	5,91	7449716	1,81	4557188	2,3	1,63
2	6	5,93	6,08	22345263	5,43	12943849	6,54	1,73
3	6,78	6,75	6,82	5967407	1,45	3562760	1,8	1,67
4	7,45	7,4	7,53	40477545	9,84	22887192	11,56	1,77
5	7,59	7,53	7,64	54777050	13,32	28163713	14,23	1,94
6	7,67	7,64	7,69	5190059	1,26	3595850	1,82	1,44
7	7,73	7,69	7,78	21542130	5,24	12910532	6,52	1,67
8	8,18	8,08	8,24	90848197	22,09	42756784	21,6	2,12
9	8,63	8,57	8,68	18542815	4,51	10886132	5,5	1,7
10	10,27	10,17	10,37	127087188	30,9	46904178	23,71	2,71
11	10,46	10,36	10,54	12366067	3,01	6290561	3,18	1,97
12	14,16	14,1	14,230	4702742	1,14	2461370	1,24	1,91

TABELA 3: Principais compostos observados na análise do óleo essencial de melaleuca, utilizando gc-ms headspace.

Peak	Principais componentes	Similarity
1	alpha-Thujene	95%
2	a-pinene	95%
3	L-beta-Pinene	94%
4	a-terpinene	94%
5	p-Cimeno	92%
6	Limonene	95%
7	Eucalyptol	95%
8	y-terpinene	95%
9	Terpinoleno	94%
10	Terpinen-4-ol	94%
11	a-terpineol	95%

Para a construção da curva de calibração (TABELA 4), utilizou-se vial para análise por *headspace* de 20mL, cada ponto da curva foi realizado em triplicata, assegurando a confiabilidade dos dados. Foram utilizados 5 pontos para a construção do gráfico (FIGURA 9).

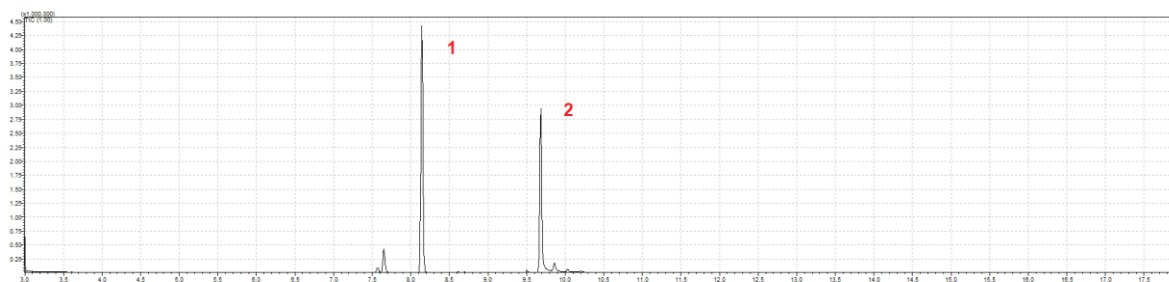


FIGURA 8: Cromatograma dos compostos usados para a obtenção da curva de calibração, gama-terpineno (1) e citronela (2).

TABELA 4: Pontos da curva de calibração.

Ponto	Média	SD	RSD
1	0,12	0,01	5,19
2	0,26	0,07	25,62
3	0,49	0,02	4,48
4	0,85	0,06	6,61
5	1,68	0,11	6,69

SD = Desvio Padrão

RSD = Desvio Padrão Relativo

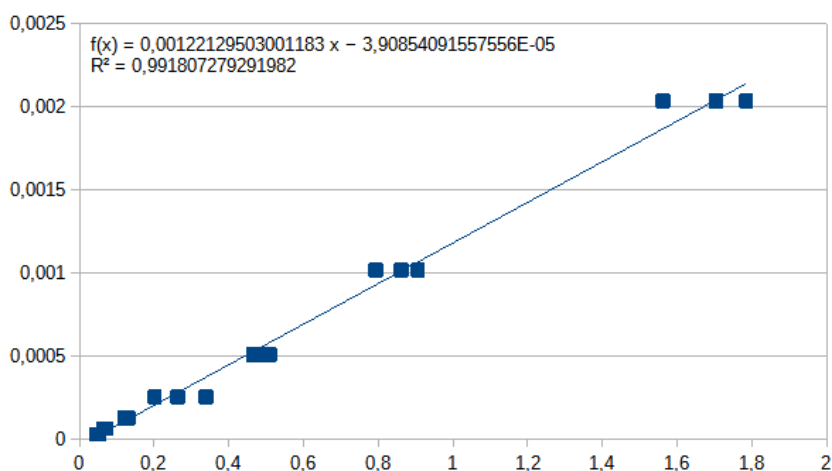


FIGURA 9: Curva de calibração de gama terpineno para quantificação.

A partir da curva de calibração desenvolvida, foi possível quantificar a quantidade do analito presente no óleo essencial de Melaleuca, permitindo a determinação de sua porcentagem na amostra (TABELA 5). Esse procedimento é essencial para a posterior quantificação das formulações contendo o óleo essencial, possibilitando a avaliação da eficiência do processo de encapsulamento e a determinação da quantidade de óleo efetivamente encapsulada.

TABELA 5: Quantificação melaleuca.

	Média	SD	RSD
Melaleuca	28,32	4,34	15,34

SD = Desvio Padrão

RSD = Desvio Padrão Relativo

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada para explorar padrões e relações entre as variáveis experimentais, auxiliando na interpretação dos dados e na otimização do processo de encapsulamento. A técnica permitiu reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados, preservando a maior variabilidade possível e facilitando a identificação das variáveis mais influentes. Foram avaliados três parâmetros experimentais principais: tempo de agitação ultrassônica, proporção de água na formulação e relação entre biopolímeros e óleos essenciais (TABELA 6). A variável resposta utilizada foi a porcentagem de encapsulamento, representando o rendimento do processo em termos de retenção do óleo essencial dentro da matriz biopolimérica (TABELA 7).

TABELA 6: Tabela de planejamento fatorial.

Formulação	tempo de agitação ultrassônica	proporção de água na formulação	relação entre biopolímeros e óleos essenciais
-	10 min	2,5%	1/2
+	20 min	5%	2/3
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

TABELA 7: Valores de porcentagem de encapsulamento.

	Média	SD	RSD
1	11,50	0,31	2,69
2	15,46	0,45	2,91
3	10,69	0,20	1,85
4	11,63	0,06	0,53
5	10,78	0,65	5,99
6	7,69	0,25	3,30
7	25,45	0,63	2,46
8	22,96	0,05	0,24

SD = Desvio Padrão

RSD = Desvio Padrão Relativo

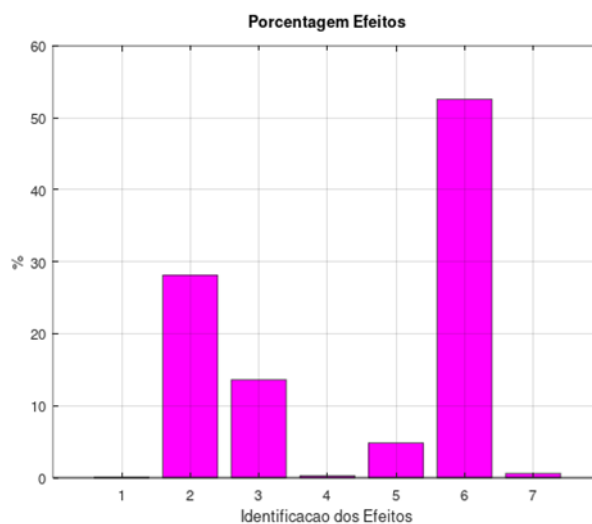


FIGURA 10: Gráfico de porcentagem de efeitos, tempo de agitação na sonda (1), a proporção de água na formulação (2), relação entre polímero e os óleos (3), influência combinada do tempo de agitação com a proporção de água na formulação (4), tempo de agitação com relação entre polímero e os óleos (5), interação entre a proporção de água na formulação e a relação entre polímero e os óleos (6) interação simultânea entre todos os fatores (7).

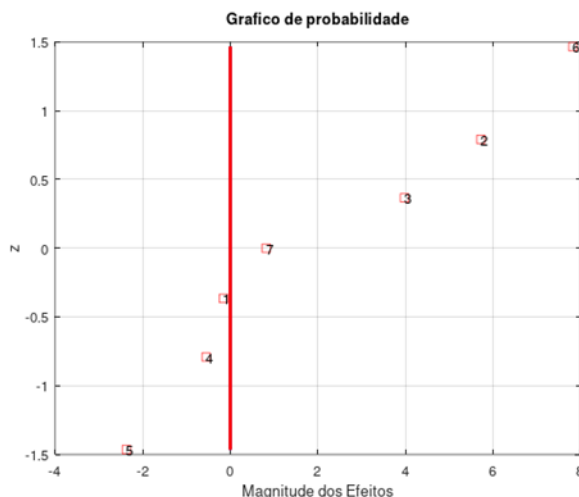


FIGURA 11: Gráfico de magnitude de efeitos, tempo de agitação na sonda (1), a proporção de água na formulação (2), relação entre polímero e os óleos (3), influência combinada do tempo de agitação com a proporção de água na formulação (4), tempo de agitação com relação entre polímero e os óleos (5), interação entre a proporção de água na formulação e a relação entre polímero e os óleos (6) interação simultânea entre todos os fatores (7).

Foram analisados três efeitos e interações entre as variáveis do processo de encapsulamento (FIGURA 10 e 11). O primeiro fator considerado foi o tempo de agitação na sonda (1), a proporção de água na formulação (2), relação entre polímero e os óleos (3), e suas interações, a influência combinada do tempo de agitação com a proporção de água na formulação (4), bem como sua interação com a relação entre polímero e os óleos (5), a interação entre a proporção de água na formulação e a relação entre polímero e os óleos (6) e por fim, a análise incluiu a interação simultânea entre todos os fatores (7).

Os resultados indicaram que o tempo de agitação (1) teve uma influência quase nula no rendimento do processo, apresentando um efeito levemente negativo. Já a proporção de água na formulação (2) e a relação entre polímero e óleos (3) demonstraram impacto positivo significativo no rendimento, com o aumento de ambos levando a um maior desempenho do processo. A interação entre a proporção de água (2) e a relação entre polímero e óleos (3) foi ainda mais expressiva (6), resultando em um efeito positivo acentuado. Por outro lado, as interações envolvendo o tempo de agitação (1), apesar de menos relevantes, apresentaram efeitos negativos no rendimento, mostrando que o aumento de qualquer uma dessas variáveis, quando combinadas com o tempo de agitação, reduziu o desempenho do processo (4 e 5).

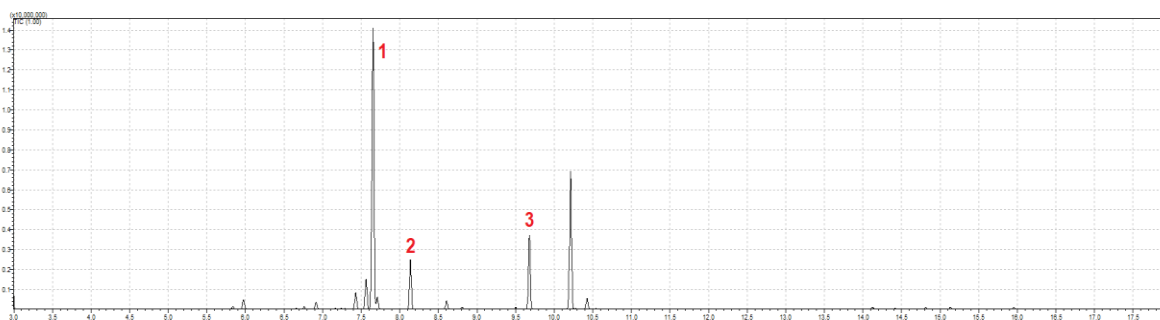


FIGURA 12: Exemplo de espectro de massas da formulação, limoneno (1), gama terpineno (2) e citronelal (3).

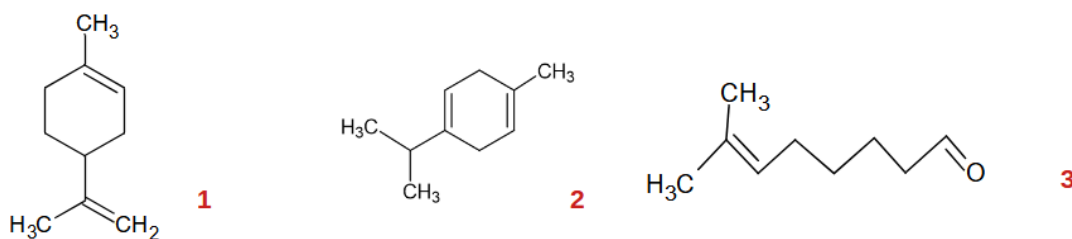


FIGURA 13: Estrutura das moléculas, limoneno (1), gama terpineno (2) e citronelal (3).

Com base nos dados obtidos, foram feitas alterações nos parâmetros do processo. O tempo de agitação foi reduzido, e a proporção de água na formulação foi ajustada para no máximo 10%, já que esse valor foi o limite para garantir a quantidade de pectina necessária para que o ultra-turrax mantivesse a homogeneidade da solução. A quantidade de óleo também foi diminuída, mas de forma que ainda fosse possível manter uma quantidade suficiente de óleo (50% limoneno e 50% de óleo essencial de melaleuca) na formulação final, em seguida as formulações foram quantificadas, abaixo as tabelas do planejamento fatorial e quantificação (TABELA 8 e 9).

TABELA 8: Tabela de planejamento fatorial.

Formulação	tempo de agitação ultrassônica	proporção de água na formulação	relação entre biopolímeros e óleos essenciais
-	2,5 min	7,5%	3/4
+	5 min	10%	5/6
9	-	-	-
10	+	-	-
11	-	+	-
12	+	+	-
13	-	-	+
14	+	-	+
15	-	+	+
16	+	+	+

TABELA 9: Valores de porcentagem de encapsulamento.

	Média	SD	RSD
9	16,17	0,86	5,35
10	38,60	1,88	4,88
11	17,12	0,72	4,22
12	12,63	0,44	3,53
13	16,94	0,32	1,86
14	84,02	1,13	1,34
15	21,10	1,22	5,80
16	65,52	2,14	3,26

SD = Desvio Padrão

RSD = Desvio Padrão Relativo

A formulação que apresentou o maior rendimento (14) foi selecionada para ensaios de secagem utilizando diferentes métodos: spray dryer, liofilizador e condições atmosféricas. Esses ensaios foram realizados para comparar a eficiência de cada técnica em relação à preservação das características das amostras e ao rendimento final. Após o processo de secagem, as amostras foram quantificadas para avaliar a quantidade de óleo de melaleuca presente na formulação, e o impacto de cada método de secagem e assim determinar o mais eficaz para a formulação em questão (TABELA 10).

TABELA 10: Quantificação das formulações secas,

	Média	SD	RSD
Spray Dryer	2,45	0,29	11,91
Liofilização	0,34	0,12	33,60
Atmosférico	0,29	0,24	82,03

SD = Desvio Padrão

RSD = Desvio Padrão Relativo

Nos dois últimos ensaios, realizados com o liofilizador e em condições atmosféricas, o desvio padrão relativo ficou acima do ideal devido à quantidade de analito ter sido muito baixa. No entanto, não considerei necessário refazer as análises, pois os valores de rendimento obtidos foram muito baixos, o que já indicava uma limitação no processo.

Nos próximos capítulos, será discutido o baixo rendimento observado nos ensaios, com foco nas possíveis causas que influenciaram esses resultados. Serão analisados os fatores envolvidos no processo de secagem e como eles impactaram a eficiência do processo, buscando entender as limitações observadas.

4.3 Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

4.3.1 Problemas relacionados a análise de biopolímeros por MEV

A análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para biopolímeros encapsulando óleos essenciais apresentou quatro principais desafios, sendo três gerais e um mais específico. O primeiro problema está relacionado ao feixe de elétrons, que pode vaporizar os óleos essenciais encapsulados, rompendo as cápsulas e comprometendo a análise estrutural. Esse efeito ocorre devido à baixa estabilidade térmica de muitos óleos essenciais, que são voláteis e podem sofrer degradação quando expostos a fontes intensas de energia. Além disso, o feixe de elétrons pode causar a queima dos biopolímeros encapsulantes, o que leva à degradação da estrutura e dificulta a preservação das amostras. Para minimizar esses efeitos, é necessário manter níveis de feixe mais baixos, o que, por outro lado, pode comprometer a qualidade da imagem e a resolução da análise.

Outro problema relevante é o acúmulo de carga elétrica nas amostras. Devido às propriedades dos biopolímeros, os elétrons podem ficar presos na superfície, gerando um excesso de iluminação na imagem capturada. Esse fenômeno, conhecido como carregamento eletrônico, pode distorcer os resultados e dificultar a visualização adequada das partículas e da estrutura da matriz polimérica. Para mitigar esse problema, a metalização das amostras com ouro ou outro material condutor é frequentemente utilizada, pois essa técnica reduz o acúmulo de carga e melhora a qualidade da imagem obtida. No entanto mesmo assim pode ocorrer esse fenômeno.

Especificamente para formulações líquidas, um desafio adicional é a formação de filmes poliméricos durante a secagem das amostras. Esses filmes podem obscurecer a visualização das partículas encapsuladas, dificultando a identificação da morfologia real da formulação. Esse efeito ocorre porque a secagem pode levar à redistribuição dos componentes da matriz polimérica, alterando a forma como as partículas se organizam na amostra.

Abaixo, são apresentadas três figuras que ilustram os fenômenos observados durante a análise por MEV (FIGURA 14). A primeira figura (A) demonstra a ruptura das cápsulas devido à vaporização dos óleos essenciais sob o feixe de elétrons. A segunda imagem (B) evidencia o efeito da queima dos biopolímeros, decorrente da interação com o feixe de alta energia, os quadrados formados indicam o espaço que sofreu o efeito. Por fim, a terceira figura (C) ilustra a retenção de elétrons na amostra, resultando em um excesso de iluminação na imagem e dificultando a análise da estrutura das partículas.

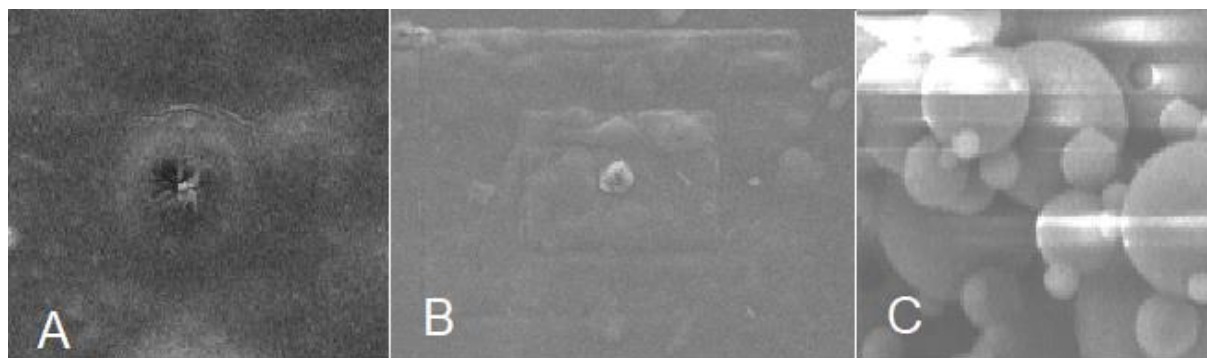


FIGURA 14: As imagens ilustram os problemas que a microscopia eletrônica de varredura pode causar na análise da formulação de biopolímeros encapsulantes. (A) demonstra a ruptura das cápsulas devido à vaporização dos óleos essenciais sob o feixe de elétrons, (B) evidencia o efeito da queima dos biopolímeros, decorrente da interação com o feixe de alta energia, os quadrados formados indicam o espaço que sofreu o efeito, (C) ilustra a retenção de elétrons na amostra, resultando em um excesso de iluminação na imagem e dificultando a análise da estrutura das partículas.

4.3.2 Avaliação morfológica das primeiras formulações

Inicialmente, foram analisadas as oito primeiras formulações desenvolvidas, com o objetivo de avaliar o tamanho das partículas. Além disso, buscou-se verificar se os parâmetros utilizados no PCA (Análise de Componentes Principais) gerariam diferenças significativas tanto no tamanho quanto na estrutura das partículas. Esse procedimento permitiu uma análise detalhada das variáveis envolvidas, possibilitando identificar possíveis padrões ou comportamentos inesperados que pudessem influenciar a eficácia das formulações.

O tamanho das partículas foi avaliado de forma geral, sem a realização de uma análise estatística avançada, devido a dois fatores principais. O primeiro está relacionado ao fato de que apenas uma pequena parte da amostra foi analisada pelo MEV, uma vez que, para uma análise total, seria necessária uma grande quantidade de horas de equipamento. O segundo fator é que, mesmo com uma análise completa, seria necessário um tempo considerável ou o desenvolvimento de um algoritmo específico para análise de imagens, a fim de processar os dados de forma eficiente.

Visualmente, foram selecionadas as maiores e menores partículas presentes nas imagens, sendo medidos 3 eixos das partículas. Em seguida, foram calculadas a média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo dos dados obtidos. Abaixo estão as imagens das formulações líquidas, antes de passarem pelo processo de secagem em *Spray-dryer* (FIGURA 15).

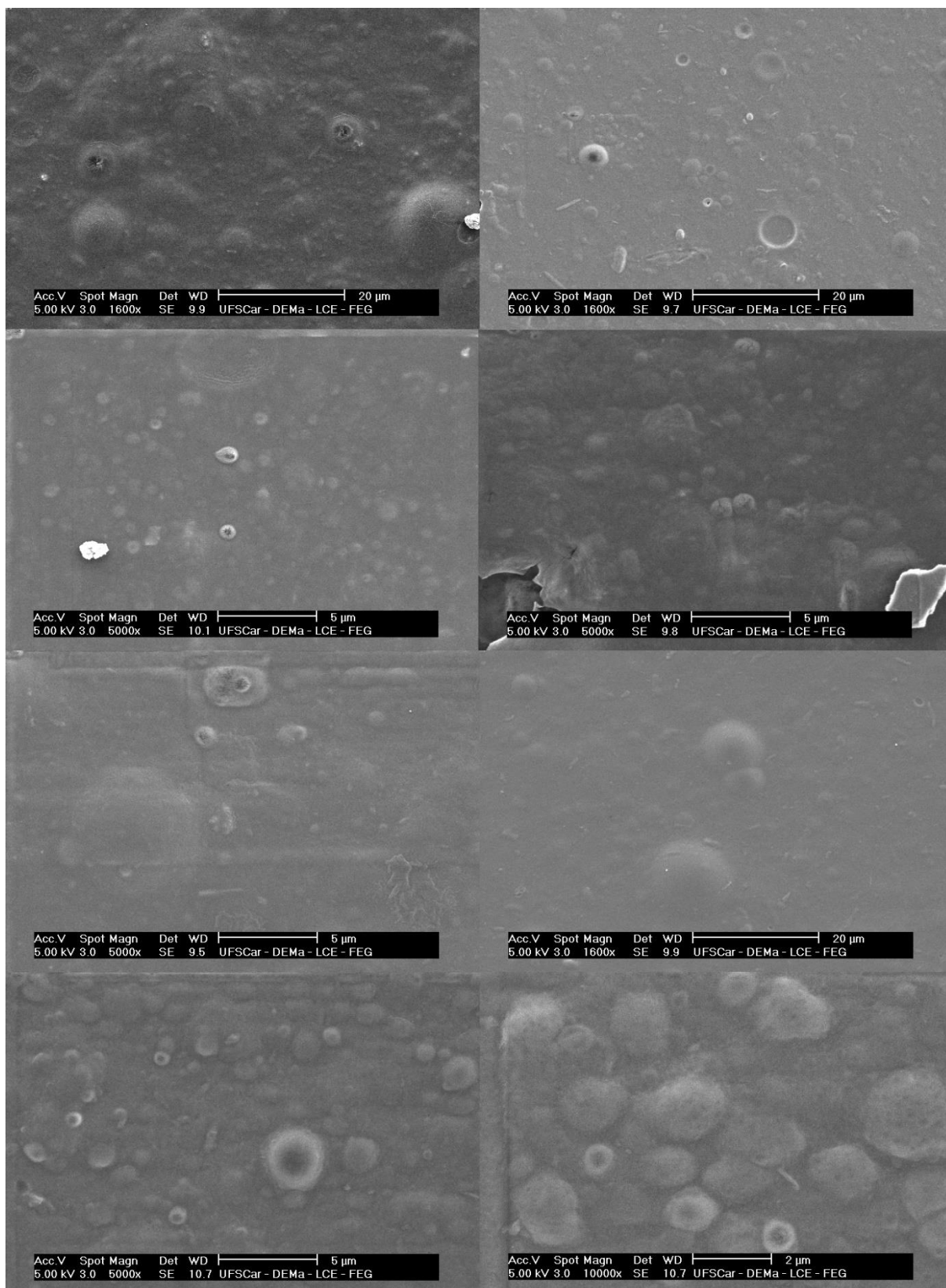


FIGURA 15: Cada uma das oito imagens corresponde a uma das formulações líquidas avaliadas, a primeira imagem corresponde a primeira formulação (1) e a segunda a formulação (2) e assim sucessivamente.

Como mencionado na seção anterior, a formação de filme dificulta a visualização das partículas. As diferenças observadas entre as imagens estão mais relacionadas ao processo de análise do que aos diferentes parâmetros empregados. Abaixo está a tabela de tamanho observados nas amostras (TABELA 11).

TABELA 11: Tamanho das partículas.

Menor Media (μm)	SD	SDR	Maior Media (μm)	SD	SDR
0,36	0,06	15,75	4,03	0,11	2,86
0,86	0,06	6,66	6,33	0,32	5,07
0,33	0,06	17,32	1,10	0	0
0,40	0	0	1,50	0,10	6,66
0,56	0,06	10,19	3,40	0,26	7,78
0,70	0,10	14,29	13,73	1,26	9,22
0,40	0	0	3,23	0,25	7,78
0,43	0,06	13,32	2,83	0,11	4,07

SD = Desvio Padrão

RSD = Desvio Padrão Relativo

O tamanho das partículas menores apresentou uma maior consistência, com valores mais próximos entre si. Por outro lado, as partículas maiores mostraram uma discrepância mais acentuada.

Visualmente, foram selecionadas as maiores e menores partículas presentes nas imagens, sendo medidos 3 eixos das partículas. Em seguida, foram calculadas a média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo dos dados obtidos. Abaixo estão as imagens das formulações líquidas, após passarem pelo processo de secagem em *Spray-dryer* (FIGURA 16).

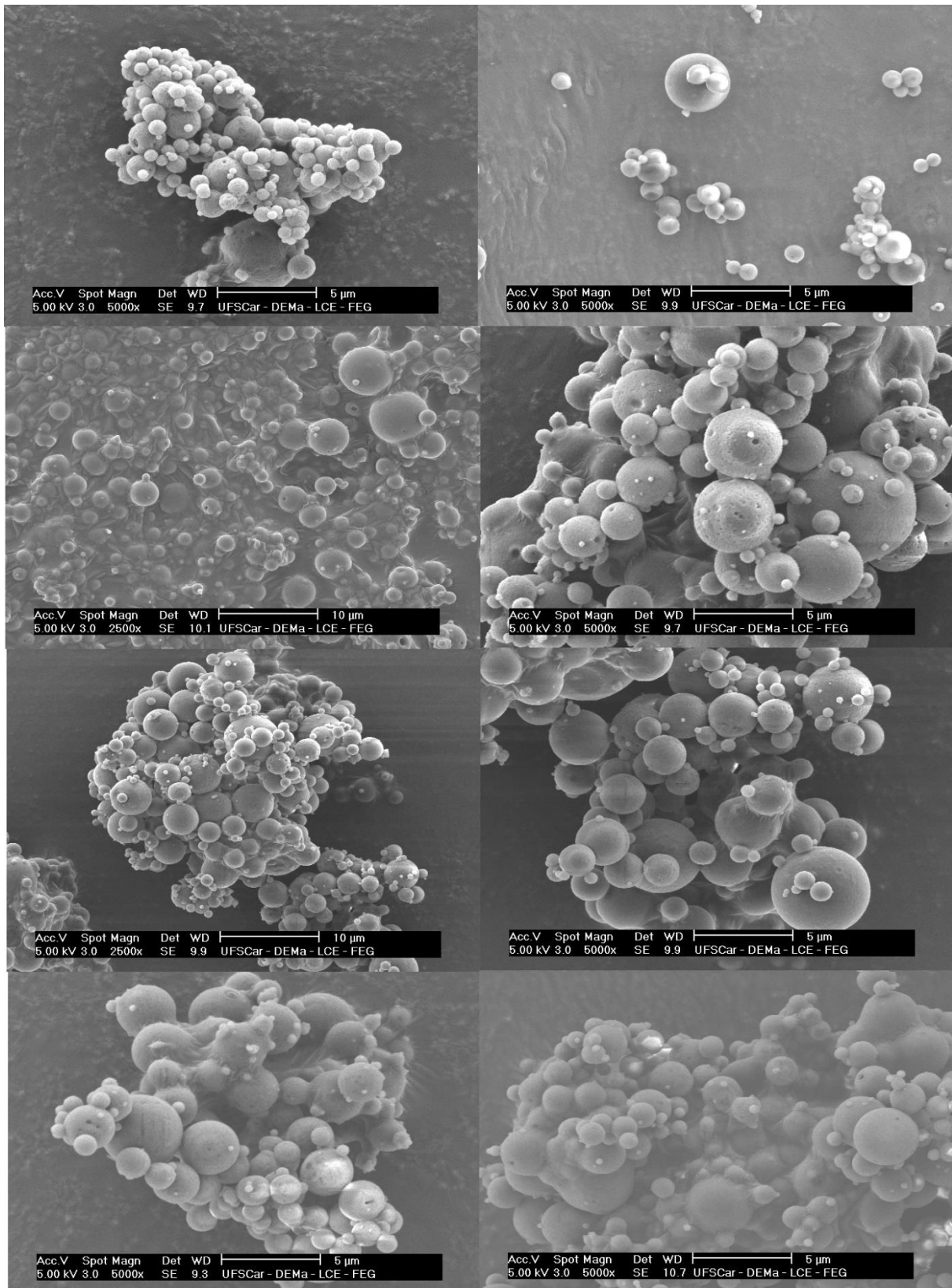


FIGURA 16: Cada uma das oito imagens corresponde a uma das formulações secas avaliadas, a primeira imagem corresponde a primeira formulação (1) e a segunda a formulação (2) e assim sucessivamente.

Diferente das imagens das formulações líquidas, após o processo de secagem no spray dryer, a visualização da forma e do tamanho das partículas torna-se mais fácil. Abaixo está a tabela com os tamanhos observados nas amostras (TABELA 12).

TABELA 12: Tamanho das partículas.

Menor Media (μm)	SD	SDR	Maior Media (μm)	SD	SDR
0,30	0	0	4,2	0,20	4,76
0,30	0	0	3,63	0,12	3,18
0,46	0,06	12,37	6,13	0,21	3,39
0,36	0,06	15,75	6,37	0,06	0,90
0,50	0	0	4,43	0,06	1,30
0,23	0,06	24,74	5,10	0,10	1,96
0,30	0	0	4,13	0,06	1,39
3,30	0	0	0,37	0,06	15,75

SD = Desvio Padrão

RSD = Desvio Padrão Relativo

O tamanho das partículas menores apresentou uma maior consistência, com valores mais próximos entre si. Por outro lado, as partículas maiores apresentaram uma discrepância mais acentuada.

Os tamanhos e formatos das partículas obtidas se mantiveram dentro dos parâmetros esperados, com as partículas apresentando uma forma predominantemente esférica. No entanto, em relação ao tamanho das partículas, observou-se que elas foram maiores do que o esperado para nanopartículas. Isso pode ser explicado por dois fatores principais. O primeiro fator é o uso de biopolímeros, que, devido à sua natureza molecular, tendem a formar partículas de tamanho superior mesmo na ausência de encapsulação. Esses polímeros possuem uma estrutura que favorece a formação de partículas maiores quando comparados a outros materiais típicos de nanopartículas. O segundo fator está relacionado ao processo de encapsulação dos óleos. Durante esse processo, as partículas geradas acabam formando estruturas ainda maiores devido ao efeito de agregação ou à incorporação dos óleos, o que resulta em um aumento no tamanho final das partículas.

Nas características observadas, a forma esférica das partículas, estão dentro do esperado para a formulação, mesmo que o tamanho delas seja maior do que o ideal para nanopartículas

4.3.3 Avaliação da formulação com maior rendimento

Após a realização do estudo quimiométrico, foi necessário refazer as formulações, ajustando os parâmetros com base nos dados obtidos. A partir dessas modificações, foram desenvolvidas oito novas formulações, que passaram por um processo de quantificação para avaliar o rendimento de encapsulamento. Entre elas, a que apresentou o maior rendimento foi selecionada para dar continuidade aos testes, passando pelo processo de secagem utilizando o método desenvolvido para o *Spray-dryer*.

Além da secagem por *Spray-dryer*, a mesma formulação também foi submetida a dois outros métodos de secagem: liofilização e secagem em condições atmosféricas. Essa abordagem permitiu comparar os efeitos de diferentes processos na estabilidade e integridade da formulação final. Paralelamente, o controle (branco) também foi submetido às três formas de secagem, garantindo uma análise comparativa mais detalhada dos efeitos de cada método sobre a estrutura e as características da formulação encapsulada.

Inicialmente, foi obtida uma imagem por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da pectina cítrica comercial, sem qualquer modificação química ou física. Esse procedimento teve como objetivo caracterizar a morfologia original do biopolímero, fornecendo uma referência para futuras comparações, especialmente após os processos de encapsulamento e secagem.

A imagem obtida, apresentada abaixo, permite a visualização da estrutura da pectina cítrica comercial em seu estado natural (FIGURA 17). Essa análise é essencial para compreender a organização e a textura do material antes de qualquer tratamento, servindo como base para identificar possíveis alterações estruturais decorrentes das etapas subsequentes de processamento.



FIGURA 17: Microscopia eletrônica de varredura da pectina cítrica comercial

Na imagem é possível observar a morfologia da pectina cítrica comercial, possui partículas irregulares e angulares, possivelmente fragmentos do biopolímero desidratado e moído, além de partículas alongadas e laminares, que podem ser resultantes da aglomeração de fibras durante o preparo da amostra. Também foram observados aglomerados menores, provavelmente devido à tendência da pectina de formar agregados em baixa umidade, textura apresentou superfície áspera, associada à natureza fibrosa do material, abaixo está a imagem da solução de pectina preparada como controle (Branco 5 % m/m) (FIGURA 18).

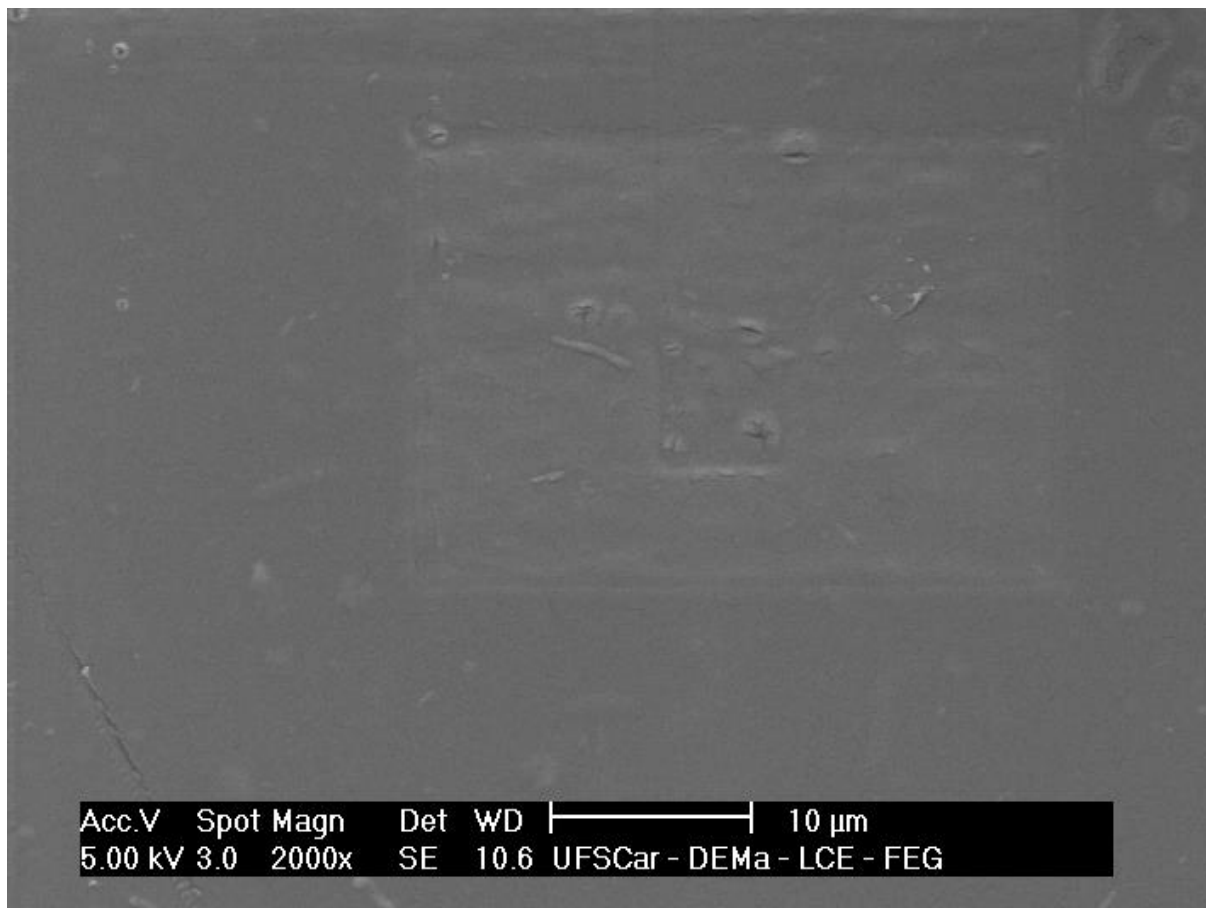


FIGURA 18: Microscopia eletrônica de varredura da solução de pectina cítrica.

A micrografia obtida revelou uma superfície predominantemente lisa e homogênea, sugerindo uma distribuição uniforme da pectina na solução. Foram observadas marcas lineares sutis, possivelmente decorrentes do processo de preparação da amostra ou da ação do Ultra Turrax, sem impacto significativo na uniformidade da superfície. Pequenas irregularidades e pontos claros dispersos podem indicar impurezas, resíduos do preparo ou leves aglomerações de pectina.

Diferentemente da imagem anterior, não há partículas aglomeradas ou fragmentos grandes, o que demonstra a eficácia do Ultra Turrax na homogeneização e solubilização da solução. A uniformidade da superfície confirma que a pectina foi bem dispersa, e hidratada, evitando a formação de agregados. Em seguida esta imagem da formulação sem passar pelos processos de secagem (FIGURA 19).

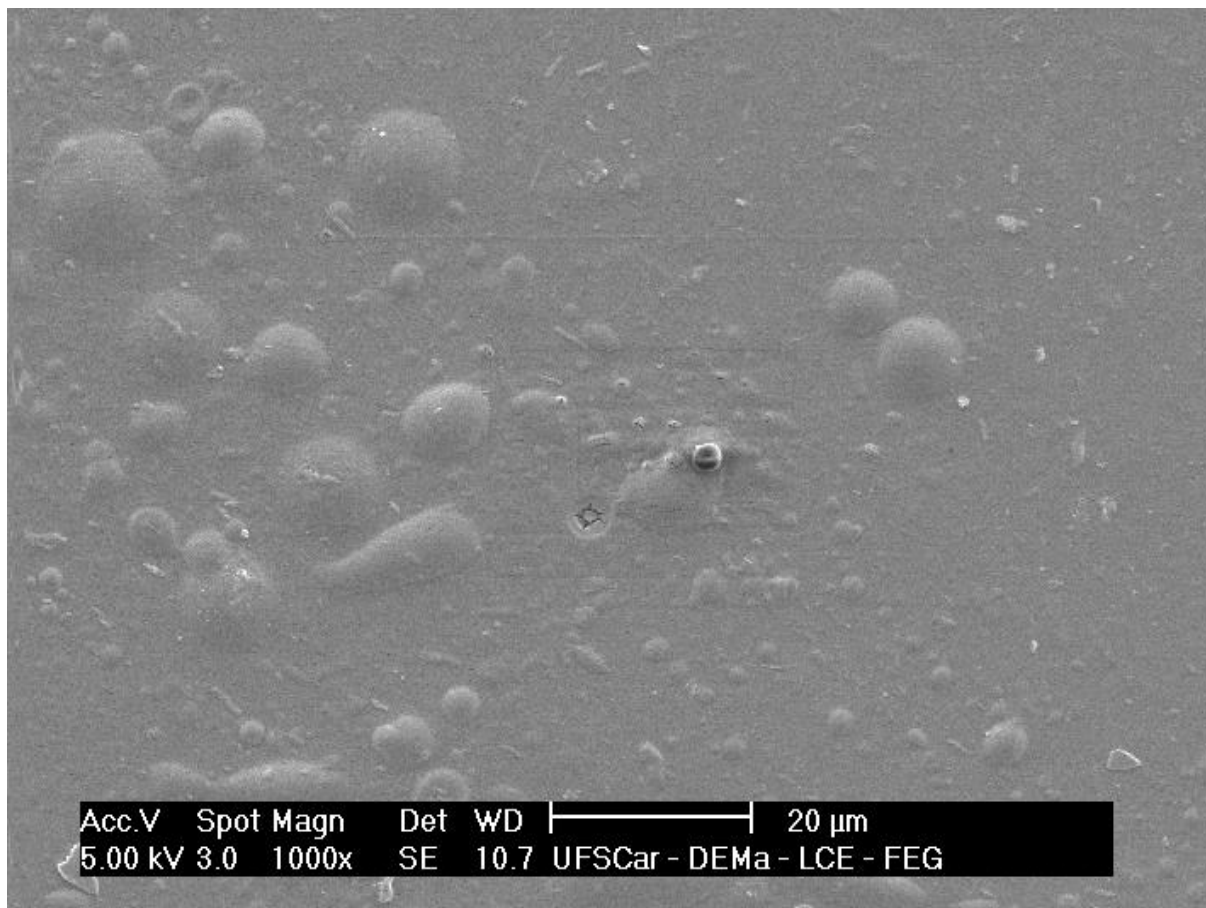


FIGURA 19: Microscopia eletrônica de varredura da formulação com maior rendimento (14).

A micrografia revela uma superfície relativamente uniforme, a maior parte da imagem mostra uma superfície homogênea e lisa, indicando uma distribuição uniforme da pectina. No entanto, observa-se a presença de pequenas vesículas ou bolhas dispersas pela superfície, que representam as partículas de óleo essencial encapsuladas na matriz de pectina. As vesículas variam em tamanho e estão distribuídas de forma relativamente uniforme, o que sugere um processo de encapsulação bem controlado. Além disso, há algumas pequenas irregularidades e pontos claros dispersos pela superfície, que podem ser impurezas, resíduos do processo de preparação ou pequenas aglomerações de pectina.

Em conclusão, a análise revela a presença de vesículas dispersas em uma matriz de pectina, indicando a encapsulação bem-sucedida de óleo essencial. A morfologia da superfície sugere que o óleo essencial está disperso de forma homogênea na matriz de pectina, além disso como a formação de um filme sobre a fita de carbono, micelas menores podem estar encobertas.

Em seguida, foi analisado o controle (branco), que passou pelos processos de *Spray dryer* (FIGURA 20), liofilização (FIGURA 21) e secagem em condições atmosféricas. O objetivo foi comparar os efeitos de cada método nas propriedades do material, observando as diferenças nas características físicas e estruturais após a secagem.

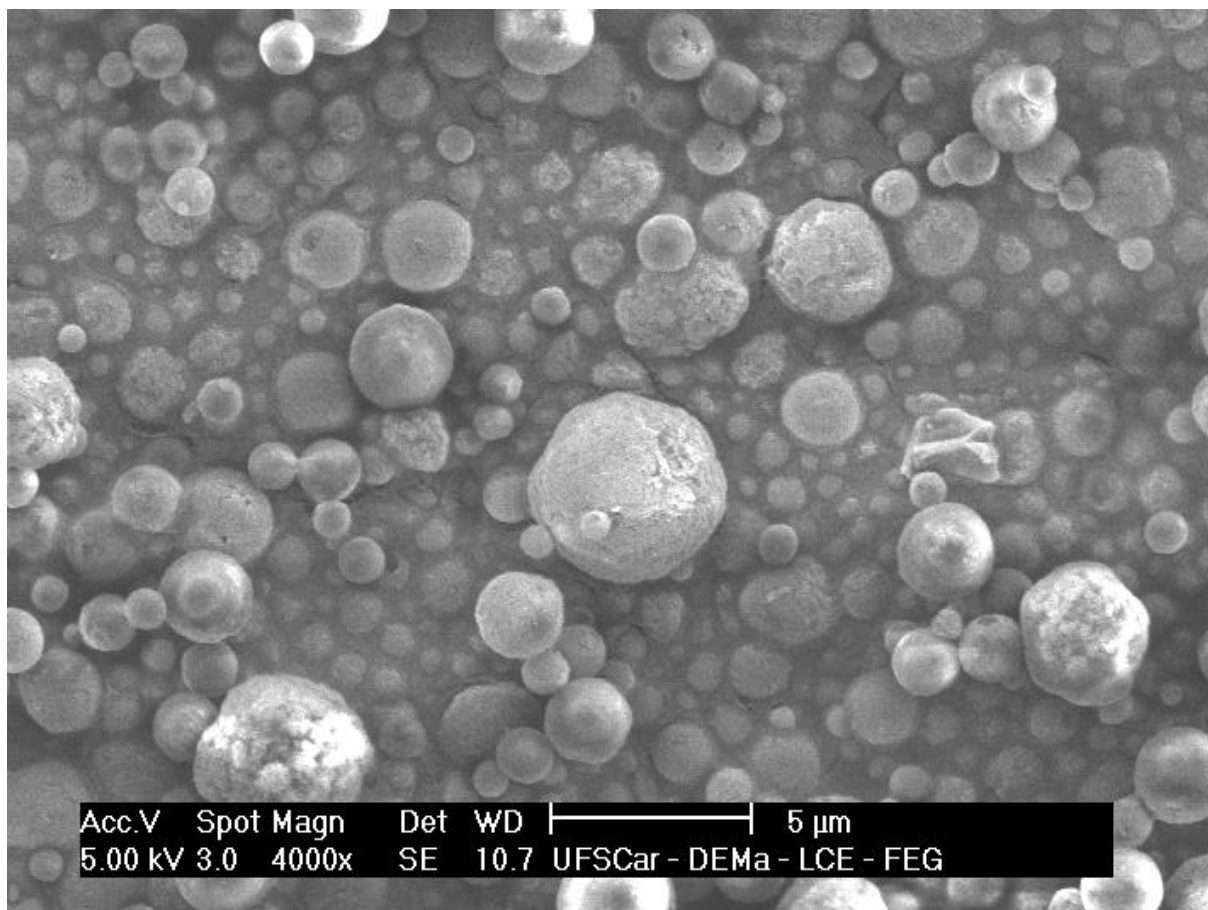


FIGURA 20: Microscopia eletrônica de varredura da solução de pectina cítrica seca por *Spray-dryer*.

A análise das partículas de pectina seca por *Spray dryer* revela características essenciais sobre a morfologia e a qualidade do produto obtido, refletindo diretamente no processo de secagem. A principal característica observada na micrografia é a morfologia esférica das partículas, um resultado direto do processo de secagem, já que o controle não apresentou essas características e como não havia óleo não se espera a formação de micelas. Durante a secagem, as gotículas atomizadas de solução de pectina solidificam-se, formando partículas esféricas, com um tamanho e uma distribuição que podem variar. A superfície das partículas apresenta-se relativamente lisa, o que sugere que a secagem foi realizada de forma

uniforme, sem grandes deformações ou colapsos das partículas. No entanto, podem ser observadas pequenas irregularidades e rugosidades, que podem ser causadas por fenômenos como o enrugamento ou outras alterações durante a secagem. Além disso, a distribuição uniforme das partículas indica que o processo de *spray drying* foi bem controlado, com uma dispersão homogênea das partículas na superfície.

A micrografia confirma a eficiência do *spray dryer* na formação das partículas esféricas de pectina e oferece informações valiosas sobre a qualidade e as propriedades do produto final. A morfologia esférica das partículas confere à pectina seca por *spray dryer* propriedades vantajosas, como alta solubilidade, boa dispersão e grande área superficial, características que são altamente valorizadas em diversas aplicações.

Abaixo está a imagem da solução de pectina seca por meio do processo de liofilização, método que opera a temperaturas baixas e por sublimação.

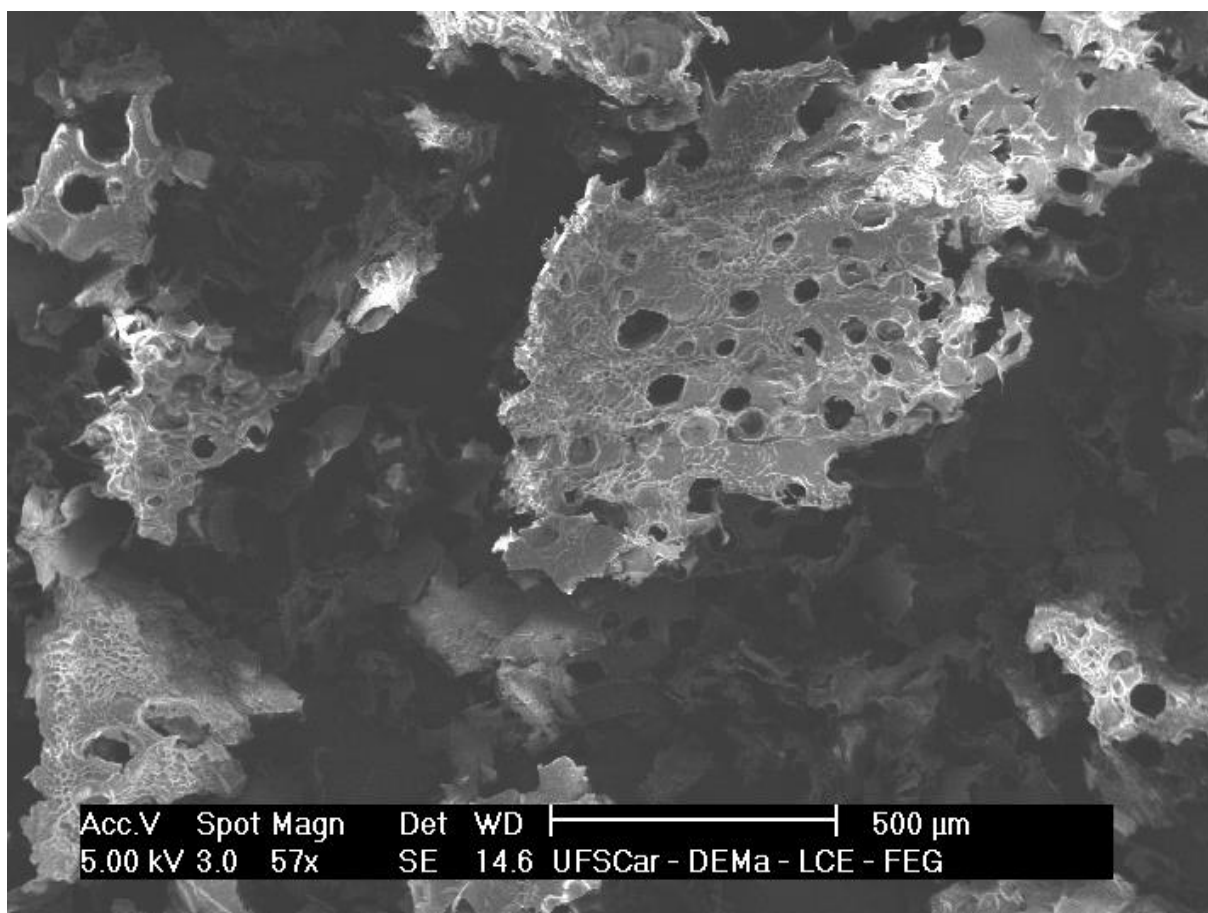


FIGURA 21: Microscopia eletrônica de varredura da solução de pectina cítrica seca por liofilização.

A principal característica observada é a presença de numerosos poros e cavidades na estrutura da pectina, que variam em tamanho e forma, criando uma rede tridimensional. Essa estrutura porosa é um reflexo direto do processo de secagem, que ocorre por sublimação da água. Além disso, observa-se a presença de fragmentos e fibras dispersos pela estrutura porosa, os quais podem ser resultado da quebra da estrutura durante o processo de liofilização. A textura superficial da pectina varia entre áreas lisas e áreas rugosas, o que pode ser consequência da distribuição desigual da água durante o congelamento e da sublimação que ocorre durante o processo de liofilização.

Não foi possível obter a micrografia da solução seca em condições atmosféricas devido ao crescimento microbiano observado nas amostras. A pectina serviu como substrato para o desenvolvimento de microorganismos, esse crescimento microbiano comprometeu a qualidade das amostras, tornando inviável a análise detalhada da morfologia das partículas por microscopia.

A primeira imagem refere-se à secagem da formulação por *spray dryer* (FIGURA 23), seguida pelo processo de liofilização (FIGURA 22) e, por fim, pela secagem em condições atmosféricas (FIGURA 24). Cada um desses métodos de secagem apresenta características distintas que influenciam a morfologia e a qualidade do produto final.

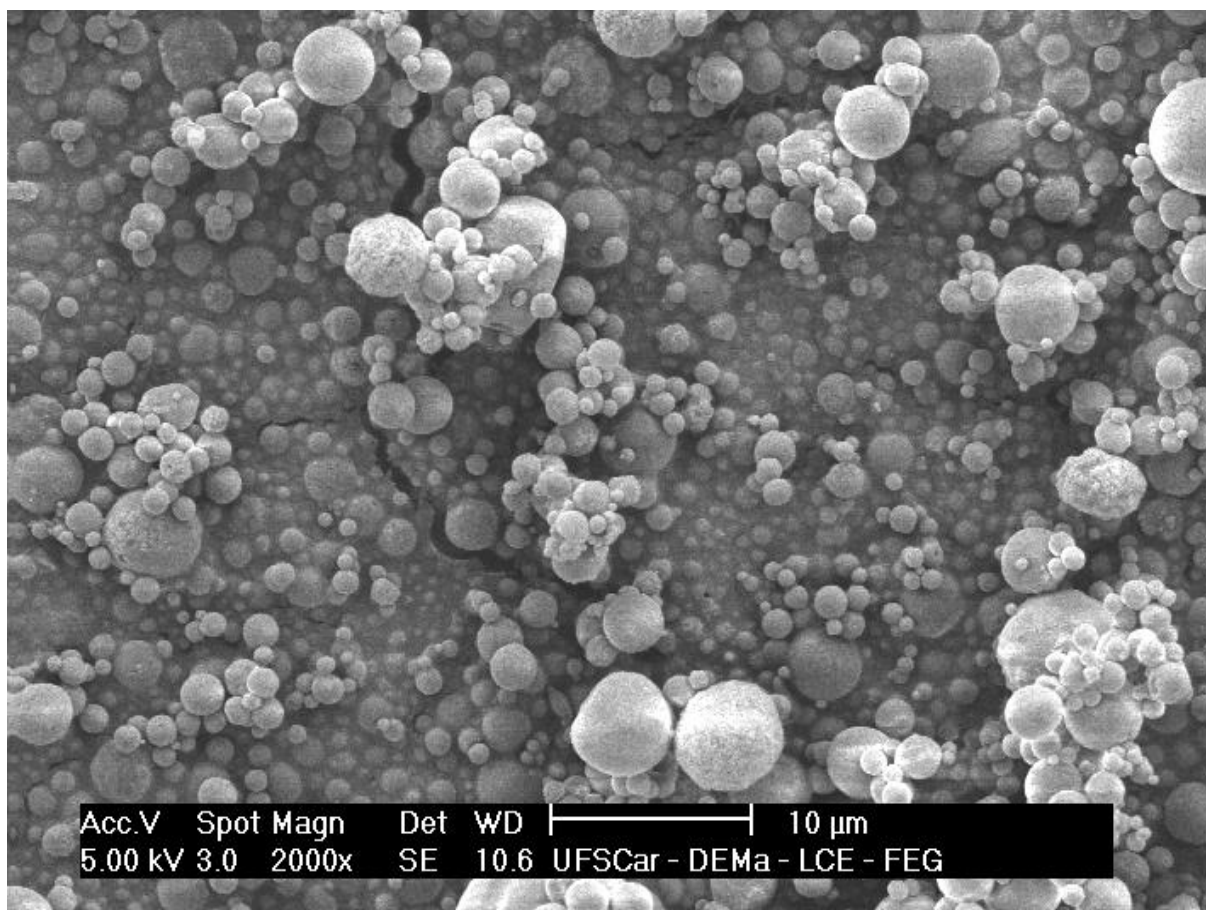


FIGURA 22: Microscopia eletrônica de varredura da formulação seca por *Spray dryer*.

A característica mais marcante da imagem é a presença de partículas com morfologia esférica bem definida, variando em tamanho. Além disso, observa-se a formação de aglomerados, indicando que houve colisão e coalescência durante o processo de secagem. A superfície das partículas aparenta ser relativamente lisa, embora apresente algumas irregularidades e texturas sutis.

A formação de conglomerados é mais acentuada em relação ao controle, possivelmente devido às alterações nas interações intermoleculares causadas pela formação de micelas. A formação de micelas pode modificar a distribuição de cargas na superfície das partículas, alterando o equilíbrio entre forças repulsivas e atrativas e promovendo a aproximação e adesão das partículas entre si. Além disso, o aumento da interação entre as micelas e a matriz da pectina pode influenciar a estabilidade coloidal da suspensão inicial, afetando o comportamento das partículas durante o processo de secagem. Assim, a maior formação de conglomerados observada pode estar diretamente ligada às mudanças estruturais promovidas pela presença das micelas, impactando a morfologia final do material obtido.

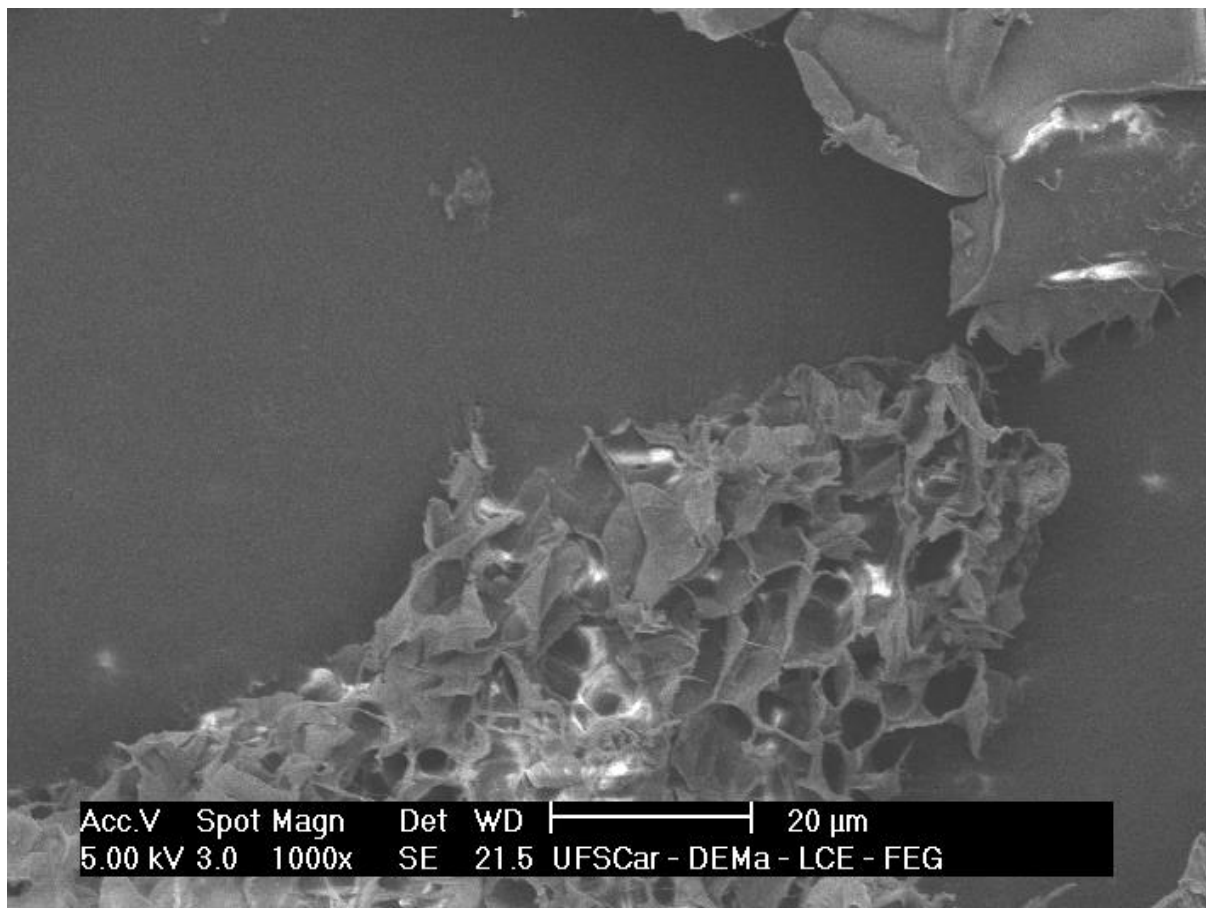


FIGURA 23: Microscopia eletrônica de varredura da formulação seca por liofilização.

A micrografia (FIGURA 23) revela uma estrutura tridimensional complexa, caracterizada pela presença de inúmeros poros e cavidades que variam em tamanho e forma, criando uma rede interconectada. A superfície da formulação é altamente irregular, apresentando diversas saliências, reentrâncias e fragmentos. Além disso, observam-se fragmentos e fibras de pectina dispersos pela estrutura porosa, que podem ter se formado devido à quebra da matriz durante o processo de liofilização.

A estrutura porosa indica que o óleo essencial foi encapsulado na matriz de pectina, porém, a liofilização parece ter modificado significativamente a organização das micelas, o que pode afetar a funcionalidade da formulação, comprometendo a integridade das micelas. O processo se mostrou bastante destrutivo e descaracterizou a formulação.

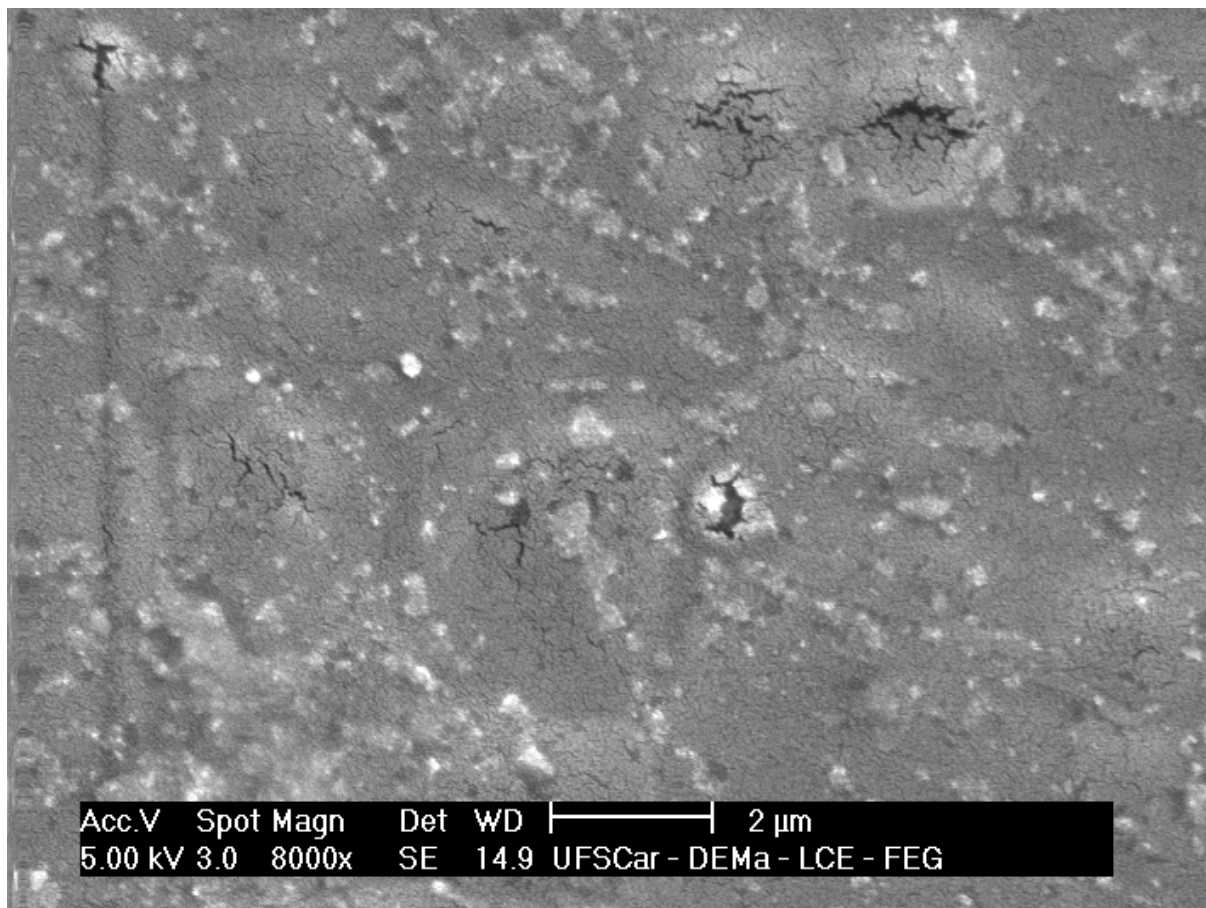


FIGURA 24: Microscopia eletrônica de varredura da formulação seca em condições atmosféricas.

A imagem revela uma superfície altamente irregular, caracterizada por diversas saliências, reentrâncias e fissuras. Observam-se fissuras e rachaduras na superfície da formulação, possivelmente resultantes da contração da matriz de pectina durante a secagem devido à perda de água. Além disso, há a presença de pontos claros dispersos, que podem corresponder a impurezas, resíduos do processo de preparação ou pequenas aglomerações de pectina. A morfologia irregular e fissurada da formulação é uma consequência direta da secagem em condições atmosféricas, uma vez que a evaporação descontrolada da água leva à contração da matriz e ao surgimento dessas fissuras.

4.3.3 Formulações secas e taxa de encapsulamento

A quantificação dos teores de óleo essencial revelou perdas significativas em todas as formas de secagem, com valores de 2,45 % para *spray dryer*, 0,34 % para liofilização e 0,29 % para secagem em condições atmosféricas. Dentre os métodos avaliados, a liofilização causou danos estruturais severos às

micelas, inviabilizando a utilização da formulação seca por esse processo, pois compromete a integridade do encapsulamento. Já a secagem em condições atmosféricas gerou um filme fino e quebradiço, de difícil manuseio, com alta higroscopicidade, absorvendo umidade da atmosfera. Seu uso, nesse formato, se tornaria viável apenas para aplicações como revestimentos protetores contra o crescimento fúngico, o que não atende ao propósito principal do trabalho. Ainda assim, essa abordagem poderia ser explorada para outras finalidades, desde que fossem realizados estudos adicionais para aumentar a eficiência do encapsulamento após a secagem.

O *Spray-dryer*, apesar das perdas significativas de rendimento, apresentou características morfológicas interessantes para aplicações desejadas. As partículas esféricas obtidas indicam um encapsulamento mais eficiente do óleo essencial, preservando sua estabilidade. No entanto, para viabilizar o uso desse método em maior escala, seria necessário otimizar o processo para reduzir as perdas durante a secagem, melhorando a eficiência do encapsulamento e o rendimento final da formulação.

A saída de água da formulação evidenciou um enfraquecimento na capacidade do polímero de reter o óleo essencial, resultando em perdas significativas durante o processo de secagem. Esse problema poderia ser mitigado com a adição de um composto polar à formulação, que atuaria estabilizando externamente as micelas sem ser removido durante a secagem. Dessa forma, a interação entre o polímero e o óleo essencial seria reforçada, reduzindo a migração do óleo para a superfície e minimizando sua perda. A escolha do composto estabilizante deveria considerar sua compatibilidade com a matriz polimérica, além de sua capacidade de preservar a integridade estrutural das partículas formadas, garantindo um encapsulamento mais eficiente e estável.

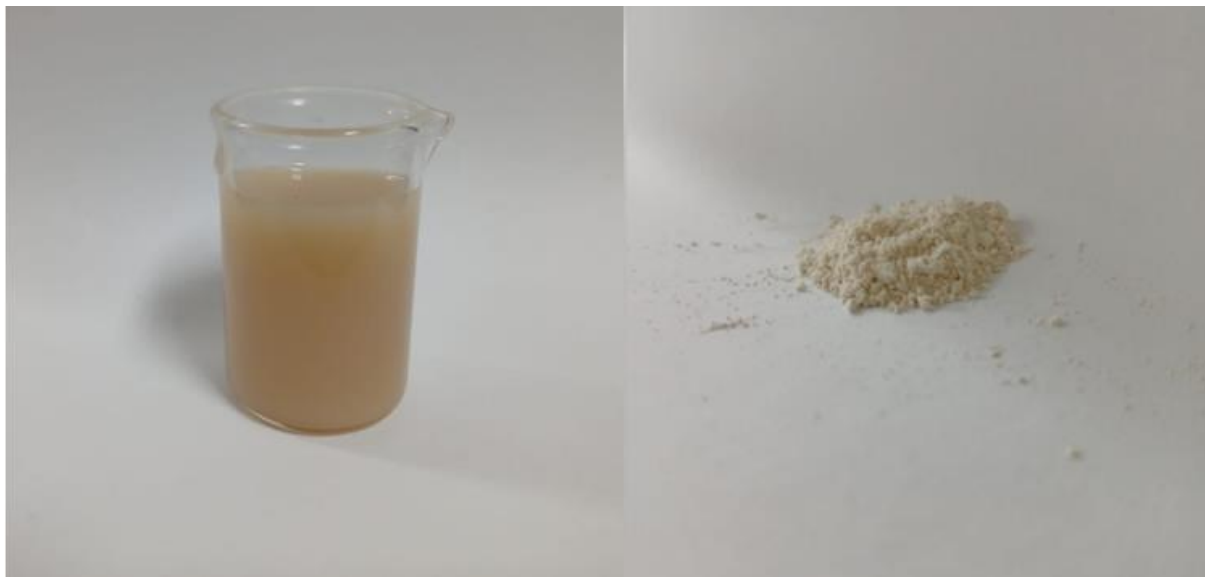


FIGURA 25: Formulação com maior rendimento (14), a primeira imagem ela líquida e a segunda a após ser seca em *Spray-Dryer*.

4.4 Ensaios biológicos e avaliação antifúngica

4.4.1 Ensaio biológico de cinética de crescimento com óleo essencial

Os experimentos realizados tiveram como objetivo avaliar o efeito do limoneno e do óleo essencial de melaleuca sobre o crescimento de um fungo simbiote. A principal intenção foi verificar a capacidade desses compostos de inibir o crescimento micelial do fungo, com ênfase na análise de como diferentes concentrações de limoneno e do óleo essencial influenciam esse processo, a seguir está o gráfico do crescimento com limoneno, as tabelas correspondentes estão no apêndice A.

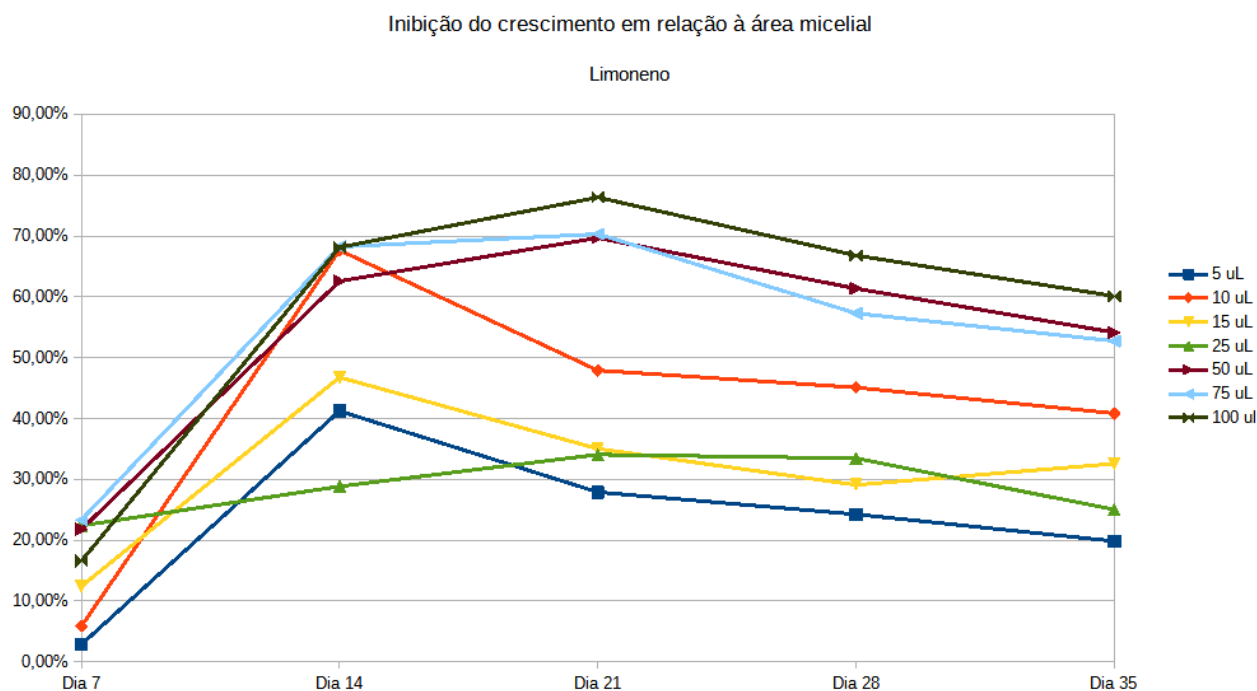


FIGURA 26: Inibição de crescimento em relação à área micelial do limoneno.

Os resultados indicaram que o limoneno teve um efeito inibitório no crescimento micelial, e essa inibição não foi diretamente proporcional ao volume adicionado de limoneno, mas para as concentrações maiores do composto, observava-se uma redução mais acentuada no crescimento do fungo (FIGURA 26). Esse achado sugere que o limoneno possui um potencial antimicrobiano, podendo interferir no desenvolvimento do fungo, embora o grau de inibição seja variável dependendo da quantidade utilizada.

Porém, mesmo quando foram testados volumes mais elevados de limoneno, não foi possível observar uma inibição total do crescimento micelial. Esse fato sugere que, embora o limoneno tenha uma ação inibitória significativa, ele não é capaz de erradicar completamente o fungo em questão. Isso levanta a possibilidade de que o fungo possui mecanismos de resistência ao limoneno, ou que a concentração necessária para uma inibição total seja muito mais alta do que a testada nos experimentos.

Embora, inicialmente, o limoneno tenha sido considerado apenas uma forma de camuflagem química em relação ao óleo essencial de melaleuca, com o objetivo de evitar a rejeição por parte das formigas, os resultados dos experimentos indicaram que ele demonstrou algum nível de inibição no crescimento micelial do fungo. Este achado sugere que, além de sua função de mascarar o aroma do óleo de

melaleuca, o limoneno pode ter propriedades antimicrobianas que influenciam diretamente o desenvolvimento do fungo simbiote. Assim, o limoneno se mostrou mais eficaz do que esperado, oferecendo uma perspectiva interessante para o uso de compostos naturais no controle de organismos indesejados, embora não tenha sido capaz de eliminar completamente o fungo. Abaixo este o gráfico do crescimento com óleo essencial de melaleuca, as tabelas correspondentes estão no apêndice A.

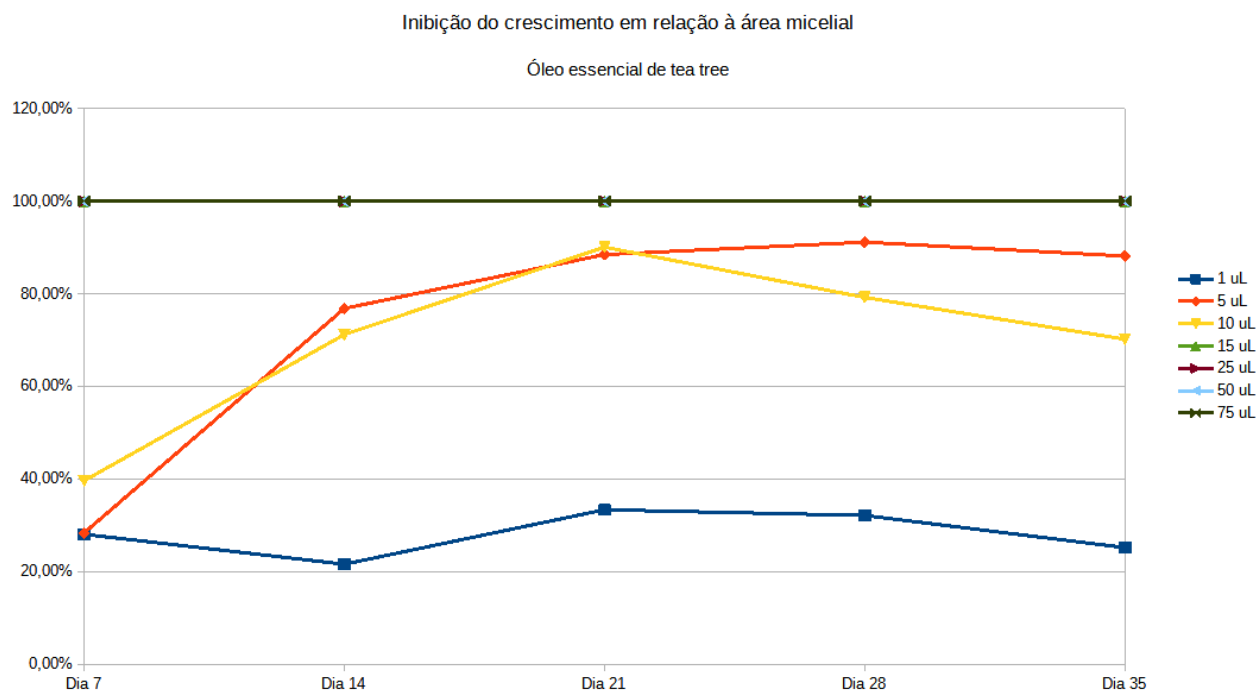


FIGURA 27: Inibição de crescimento em relação à área micelial do óleo essencial de melaleuca.

O óleo essencial de melaleuca apresentou valores de inibição elevados, com resultados que chegaram a até 100% de inibição do crescimento micelial do fungo simbiote (FIGURA 27). Esses dados indicam um grande potencial do óleo essencial de melaleuca como uma ferramenta eficaz no controle desse fungo, evidenciando sua ação antimicrobiana robusta. Esse resultado estava dentro das expectativas, uma vez que a literatura existente já relatava a eficácia do óleo essencial de melaleuca contra diversos microrganismos. No entanto, durante o levantamento bibliográfico realizado para esta pesquisa, não foi encontrado nenhum estudo específico que investigasse a interação entre o óleo essencial de melaleuca e o fungo simbiote em questão, o que torna esses achados ainda mais relevantes e inovadores no contexto da pesquisa atual.

4.4.2 Ensaio biológico de cinética de crescimento com formulação

Os experimentos avaliaram o efeito da formulação e da solução de pectina sobre o fungo simbionte das formigas cortadeiras. Foram analisados o crescimento microbiano e a possível inibição do fungo. A seguir, são apresentadas as tabelas resumidas do crescimento nos meios com a solução de pectina (TABELA 13).

TABELA 13: Cinética de crescimento com solução de pectina.

Ensaio (Réplicas)	Solução de pectina 7 dias	Controle 7 dias
1	0,6358	0,6079
2	0,6079	0,6079
3	0,6358	0,6358
4	0,5806	---
5	0,6079	---
Média	0,6136	0,6172
SD	0,0231	0,0161
RSD	3,7738	2,6140
% inibição	0,5833	---

Ensaio (Réplicas)	Solução de pectina 14 dias	Controle 14 dias
1	0,8167	1,0201
2	0,9498	0,9156
3	0,8820	0,9498
4	0,9156	---
5	0,8820	---
Média	0,8892	0,9619
SD	0,0493	0,0533
RSD	5,5474	5,5422
% inibição	7,5517	---

Ensaio (Réplicas)	Solução de pectina 21 dias	Controle 21 dias
1	2,0096	2,3767
2	1,9597	1,9596
3	1,4519	2,0096
4	1,8617	---
5	1,2861	---
Média	1,7138	2,1153
SD	0,3245	0,2277
RSD	18,9364	10,7648
% inibição	18,9807	---

Ensaio (Réplicas)	Solução de pectina 28 dias	Controle 28 dias
1	2,3223	3,7306
2	2,5434	3,7306
3	2,9544	3,3312
4	3,7306	---
5	3,2668	---
Média	2,9635	3,5975
SD	0,5631	0,2306
RSD	18,9998	6,4099
% inibição	17,6224	---

Ensaio (Réplicas)	Solução de pectina 35 dias	Controle 35 dias
1	4,9062	5,9798
2	4,7505	4,9852
3	6,0668	6,3315
4	4,0807	---
5	---	---
Média	4,9511	5,7654
SD	0,8255	0,6983
RSD	16,6739	12,1125
% inibição	14,1252	---

SD = Desvio Padrão

RSD = Desvio Padrão Relativo

A solução de pectina adicionada parece apresentar alguma atividade inibitória contra o fungo simbiote, alcançando até 20% de inibição. Esse resultado indica que a pectina, além de sua função como biopolímero encapsulante, pode influenciar o crescimento do fungo, possivelmente por mecanismos físicos ou químicos que interferem em seu desenvolvimento. Essa observação é relevante para a formulação, pois sugere que a presença da pectina pode contribuir parcialmente para a eficácia do sistema no controle do fungo.

Um provável fator para inibição observada pode estar relacionada ao pH da solução de pectina, que possui valores entre 3,1 e 3,2. Essa faixa de pH é conhecida na cosmética natural por dificultar o crescimento fúngico, possivelmente criando um ambiente menos favorável à proliferação do fungo simbiote. O caráter ácido da solução pode ter afetado diretamente a viabilidade do fungo ou alterado a

disponibilidade de nutrientes essenciais para seu desenvolvimento. Esse achado reforça a importância do ajuste de pH na formulação, podendo ser um fator adicional na sua eficácia. A seguir as tabelas resumidas nos meios de cultura com a adição da formulação (TABELA 14)

TABELA 14: cinética de crescimento com formulação.

Ensaio (Réplicas)	Formulação 7 dias	Controle 7 dias
1	0,4775	0,5538
2	0,5024	0,5806
3	0,4069	0,6358
4	0,47756	0,6079
5	---	---
Média	0,4661	0,5945
SD	0,0411	0,0353
RSD	8,8291	5,9320
% inibição	21,6002	---

Ensaio (Réplicas)	Formulação 14 dias	Controle 14 dias
1	0,4776	1,4095
2	0,5024	1,1304
3	0,4069	1,2861
4	0,4776	1,3266
5	---	---
Média	0,4661	1,2881
SD	0,0411	0,1170
RSD	8,8291	9,0871
% inibição	63,8147	---

Ensaio (Réplicas)	Formulação 21 dias	Controle 21 dias
1	0,5806	2,6001
2	0,5278	2,0096
3	0,4776	2,3223
4	0,4534	2,2156
5	---	---
Média	0,5098	2,2869
SD	0,0564	0,2459
RSD	11,0673	10,7528
% inibição	77,7057	---

Ensaio (Réplicas)	Formulação 28 dias	Controle 28 dias
1	0,7234	2,7158
2	0,6358	3,3962
3	0,5539	3,9388
4	0,7234	3,3962
5	---	---
Média	0,6591	3,3617
SD	0,0814	0,5009
RSD	12,3533	14,8994
% inibição	80,3923	---

Ensaio (Réplicas)	Formulação 35 dias	Controle 35 dias
1	0,8820	4,9062
2	1,2463	4,6736
3	0,8167	3,9388
4	1,0930	5,8077
5	---	---
Média	1,0095	4,8316
SD	0,1970	0,7704
RSD	19,5165	15,9447
% inibição	79,1061	---

SD = Desvio Padrão

RSD = Desvio Padrão Relativo

Os meios de cultura que receberam a formulação apresentaram um percentual de inibição do crescimento fúngico de aproximadamente 80%, um valor consideravelmente superior ao observado na solução de pectina (FIGURA 28). Esse resultado sugere que, além do possível efeito inibitório do pH ácido da pectina, a formulação testada possui compostos ativos capazes de interferir diretamente no desenvolvimento do fungo simbiote. O alto índice de inibição indica que o óleo essencial de melaleuca presente na formulação demonstrou uma ação antifúngica significativa, impedindo o crescimento do micélio ao longo do período experimental. Esses dados reforçam o potencial do uso da formulação como um agente inibidor eficaz contra o fungo, podendo ter aplicações futuras no controle biológico de formigas cortadeiras, abaixo o gráfico de comparação entre a formulação e a solução de pectina.

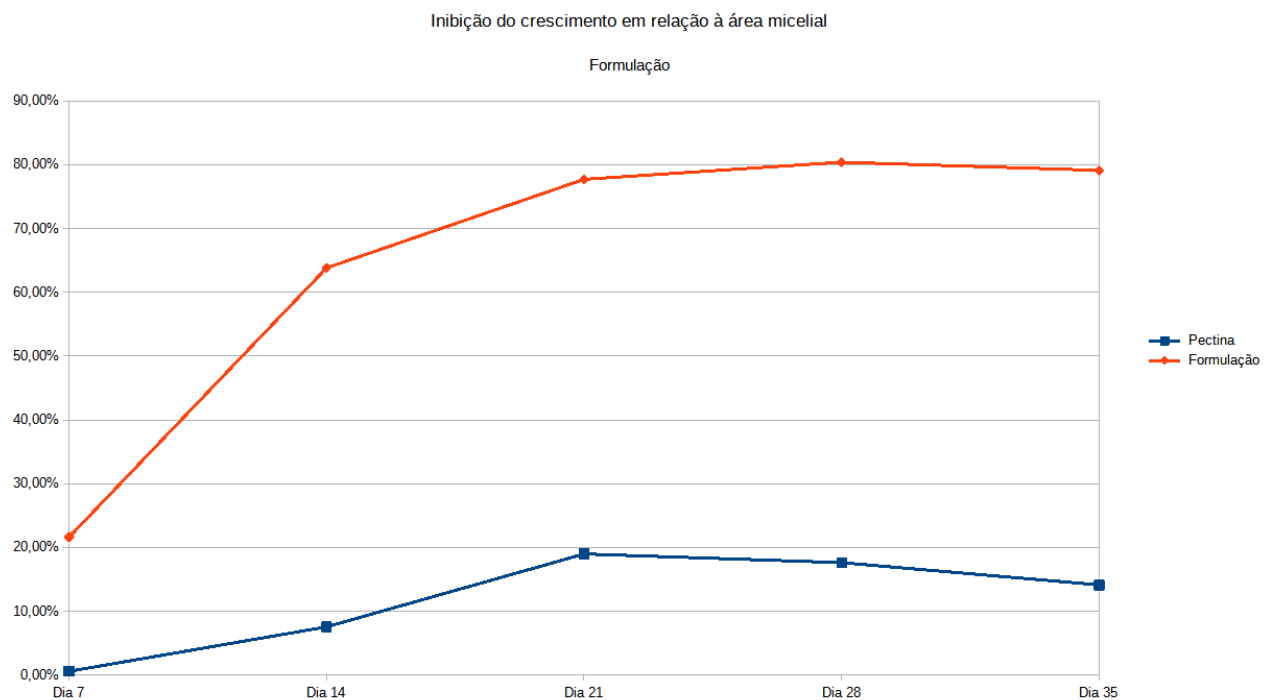


FIGURA 28: Inibição de crescimento em relação da área micelial da formulação e solução de pectina cítrica.

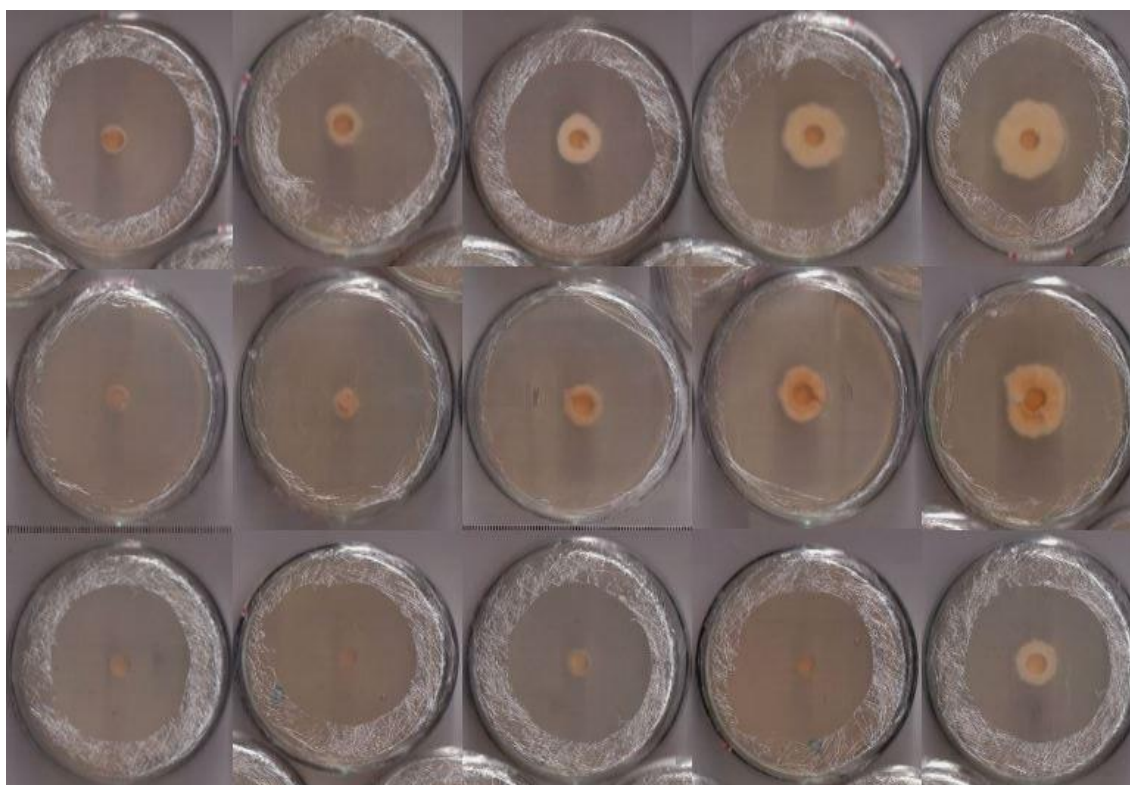


FIGURA 29: Crescimento do micelial ao decorrer de 35 dias, a primeira linha corresponde ao controle, a segunda linha a solução de pectina e a terceira a formulação, cada coluna corresponde um dia, a primeira a 7 dias, a segunda a 14 dias assim sucessivamente.

A adição da formulação ao meio de cultura pode ter influenciado a liberação dos compostos voláteis, possivelmente dificultando ou até mesmo reduzindo sua volatilização. Para investigar melhor esse efeito, outros experimentos poderiam ter sido realizados. Uma alternativa seria a aplicação da formulação na tampa de um tubo *Eppendorf* dentro da placa de Petri, permitindo a liberação gradual dos voláteis. No entanto, essa abordagem poderia resultar em uma concentração muito baixa dos compostos ativos, devido à alta quantidade de água presente na formulação, o que limitaria sua eficácia. Outra possibilidade seria despejar a formulação diretamente sobre o meio de cultura, mas essa estratégia criaria uma barreira física entre o fungo e o substrato, impedindo a absorção de nutrientes. Nesse caso, não seria possível distinguir se o efeito inibitório foi devido à ação química da formulação ou apenas à restrição física do acesso aos nutrientes.

4.4.3 Ensaio Biológico de Contaminação da Formulação

O objetivo deste experimento foi avaliar a contaminação microbiana em duas condições: uma placa contendo solução de pectina em água a 5% m/m e outra com a formulação proposta com maior rendimento, que inclui óleo essencial de melaleuca. As placas foram monitoradas por meio de fotografias diárias durante um período de 30 dias (FIGURA 30).

A placa com solução de pectina apresentou crescimento microbiano a partir do quarto dia de exposição, com a contaminação continuando a se expandir até se estabilizar. No entanto, não houve sinais de morte microbiana durante o período de observação. Esse comportamento sugere que, embora a pectina tenha oferecido um ambiente propício para o crescimento de fungos e bactérias, ela não forneceu os fatores necessários para um crescimento saudável dos microorganismos. A pectina, nesse caso, atuou apenas como substrato, sem qualquer ação inibitória sobre o crescimento microbiano.

Em contraste, a placa com a formulação contendo o óleo essencial não apresentou nenhum crescimento microbiano visível ao longo de 30 dias, indicando a presença de uma ação antimicrobiana eficaz. Este resultado está alinhado com a literatura, que relata a eficácia do óleo essencial de melaleuca na inibição do crescimento de diversas espécies microbianas. A ausência de contaminação

microbiana na formulação sugere que os componentes ativos do óleo essencial, impediram a colonização da superfície da placa.

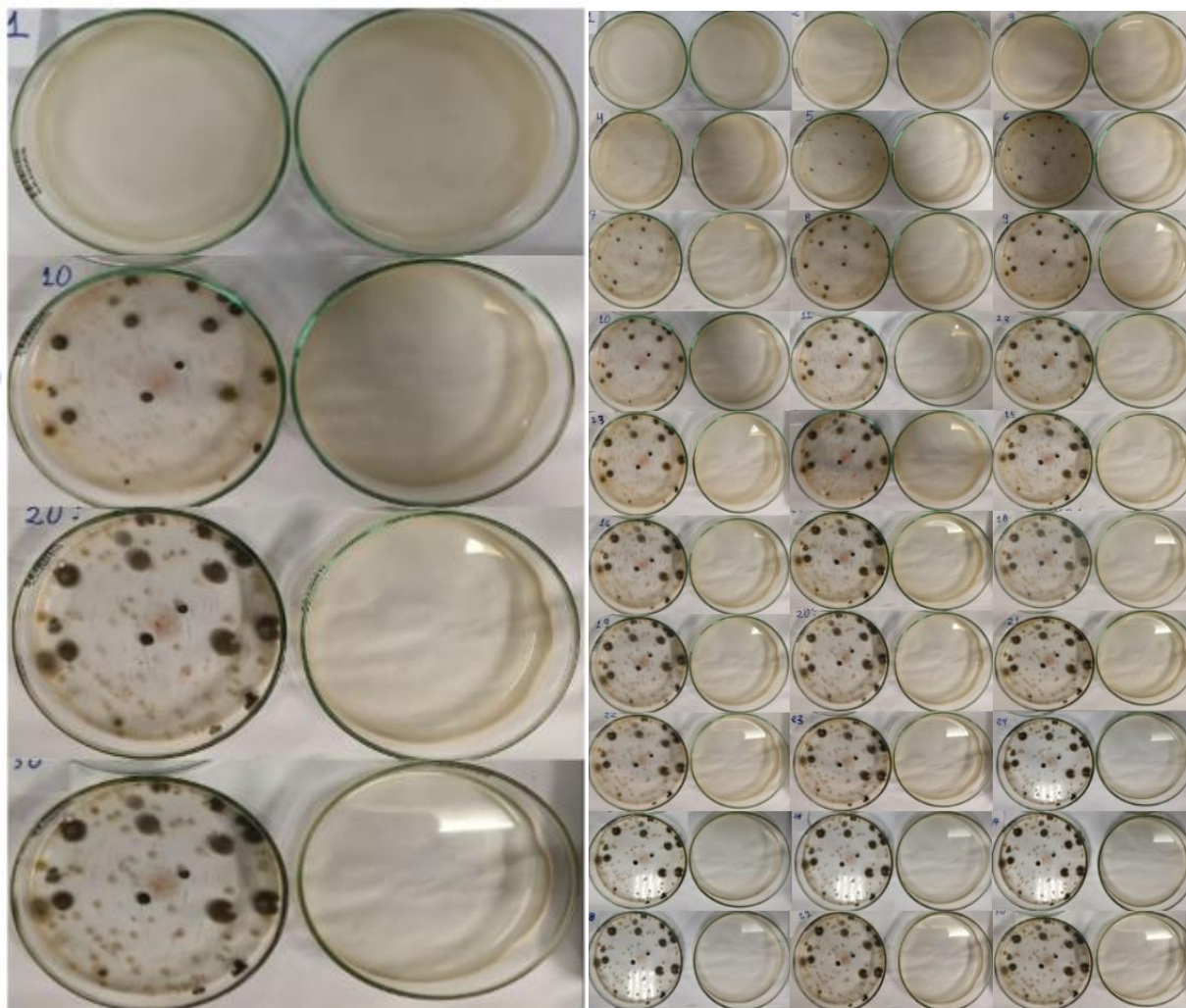


FIGURA 30: Comparação do crescimento microbiano nas placas com solução de pectina e com a formulação contendo óleo essencial. a primeira figura apresenta as placas nos dias 1, 10, 20 e 30, mostrando o desenvolvimento progressivo de contaminação na placa com pectina, enquanto a placa com a formulação permanece sem crescimento microbiano. a segunda figura mostra as placas fotografadas diariamente durante 30 dias, evidenciando a ausência de contaminação na placa com a formulação e o crescimento estabilizado de microorganismos na placa com pectina ao longo do período.

Os resultados demonstram o potencial antimicrobiano da formulação proposta, evidenciado pela ausência de crescimento microbiano na presença do óleo essencial. Esses achados sugerem que a formulação poderia ser utilizada como um agente antimicrobiano eficiente em aplicações que demandam controle de microorganismos. A pectina, por sua vez, serviu como um controle que evidenciou as propriedades da formulação.

Uma possível limitação deste estudo foi a falta de uma análise mais aprofundada sobre os microrganismos que cresceram no controle. Uma investigação adicional sobre esses microrganismos poderia fornecer informações valiosas sobre quais outros organismos podem ser inibidos pela formulação, além do *Leucoagaricus gongilophorus*. Essa análise poderia ajudar a entender melhor o espectro de ação antimicrobiana da solução e possibilitar a identificação de outros patógenos ou microrganismos sensíveis à formulação.

5 Conclusão

O estudo demonstrou a viabilidade do encapsulamento do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* em pectina cítrica como uma alternativa promissora para o controle de formigas cortadeiras. A formulação desenvolvida apresentou uma alta taxa de inibição do crescimento do fungo simbiote *L. gongylophorus*, destacando seu potencial antifúngico. Além disso, os bons resultados obtidos no rendimento de encapsulamento e na atividade antifúngica reforçam a viabilidade da formulação para aplicação prática.

A caracterização das formulações revelou que o método de secagem por aspersão resultou em partículas homogêneas e esféricas, o que pode ser vantajoso para sua aplicação agrícola. Contudo, os estudos de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) indicaram que o tamanho das partículas foi maior do que o esperado para nanopartículas, sugerindo a necessidade de otimizações futuras para redução de seu tamanho. Além disso, os ensaios de secagem mostraram uma certa perda de óleo essencial, o que pode limitar sua eficácia e aplicação, sublinhando a importância de ajustes no processo de produção.

A escolha da pectina cítrica como biopolímero encapsulante demonstrou ser vantajosa, pois é um material biodegradável e sustentável, contribuindo para a redução de resíduos da indústria de produtos cítricos. Assim, a formulação desenvolvida pode representar uma alternativa sustentável e eficiente em relação aos compostos químicos tradicionais utilizados no manejo de formigas cortadeiras.

Futuros estudos podem aprofundar a avaliação da formulação em diferentes contextos, como testes de interação com formigas em ambiente controlado, ensaios em campo com plantas e formigueiros, e análises reológicas. Além disso, o escalonamento do processo pode permitir melhorias tanto no rendimento quanto no tamanho das partículas. Outras aplicações potenciais incluem o uso da formulação como biofilme para conservação e controle de contaminação em alimentos ou sementes, além de possíveis aplicações tópicas no controle de infecções fúngicas em pele e unhas.

6. Referências Bibliográficas

AGUSTINA, S. E.; KHOLIFAH, L. S. Prospect of Essential Oil Industrial Waste as Energy Resources for Essential Oil Production Process. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, v. 1116, p. 012039, 2022. DOI: 10.1088/1755-1315/1116/1/012039.

ALMEIDA, Manoela Enger; TEIXEIRA, Helder Ferreira; KOESTER, Letícia Scherer. Preparação de emulsões submicrométricas: aspectos teóricos sobre os métodos empregados na atualidade. Latin American Journal of Pharmacy (Acta Farmacéutica Bonaerense), v. 27, n. 5, p. 780-788, 2008.

ALMEIDA, R.; PEÑAFLORES, M.; SIMOTE, S.; BUENO, O.; HEBLING, M.; PAGNOCCA, F.; SILVA, M. da. Toxicity of substances isolated from *Helietta puberula* RE Fr. (Rutaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. BioAssay, v. 2, 2009. <https://doi.org/10.14295/BA.v2.0.53>.

ALVES, O.; BANDEIRA, O.; BORGES, A.; PRADO, R.; PASQUALLETTO, A. Biotecnologias de remediação de solos contaminados com agroquímicos. Agrarian Academy, v. 3, n. 05. Disponível em: <https://conhecer.org.br/ojs/index.php/agrarian/article/view/5170>. Acesso em: [data de acesso].

ANANDAKUMAR, P.; KAMARAJ, S.; VANITHA, M. K. D-limonene: A multifunctional compound with potent therapeutic effects. Journal of Food Biochemistry, 2020. doi:10.1111/jfbc.13566.

BAKER, G. R.; LOWE, R. F.; SOUTHWELL, I. A. Comparison of Oil Recovered from Tea Tree Leaf by Ethanol Extraction and Steam Distillation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 48, n. 9, p. 4041–4043, 2000. doi:10.1021/jf0004356.

BECK, H.T.; ORTIZ, A. Proyecto etnobotánico de la comunidad Awá en el Ecuador. In: RIOS, M.; PEDERSEN, H.B. (Ed.). Uso y Manejo de Recursos Vegetales: Memorias del II Simposio Ecuatoriano de Etnobotánica y Botánica Económica, Quito, 1997. p. 159-176.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 139-152.

BETTIOL, Wagner; GHINI, Raquel. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: MÉTODOS ALTERNATIVOS DE CONTROLE FITOSSANITÁRIO. p. 80-95, [ano de publicação].

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. Química Nova, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. *Série Técnica IPEF*, n. 11, p. 31–46, 1997.

BORBA, R. da S.; LOECK, A. E.; BANDEIRA, J. de M.; MORAES, C. L.; CENTENARO, E. D. Crescimento do fungo simbiote de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* em meios de cultura com diferentes extratos. *Ciência Rural*, v. 36, n. 3, p. 725–730, 2006. doi:10.1590/s0103-84782006000300002.

BRANDÃO, E. M.; ANDRADE, C. T. Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação. *Polímeros*, v. 9, n. 3, p. 38–44, 1999. doi:10.1590/s0104-14281999000300008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Sanidade Vegetal e Insumos Agrícolas. Coordenação-Geral de Proteção de Plantas. Hierarquização de pragas de maior risco fitossanitário do Brasil. Brasília, 25 abr. 2022.

CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. de P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. *Polímeros*, v. 22, n. 2, p. 149–157, 2012. doi:10.1590/s0104-14282012005000024.

Cantú, Marcelo Delmar, et al. "Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático." *Química Nova* 31 (2008): 669-675.

CARREÑO-MELÉNDEZ, Fermín; VÁSQUEZ-GONZÁLEZ, Alicia Yaneth; VÁSQUEZ GONZÁLEZ, Gabriel. Problemas sociales y ambientales por el uso de agroquímicos en Tenancingo, México. *Tlatemoani: revista académica de investigación*, v. 10, n. 31, p. 1-25, 2019. ISSN-e 1989-9300.

CHEEL, Edwin. Notes on *Melaleuca*, with descriptions of two new species and a new variety. *Journal and Proceedings of the Royal Society of New South Wales*, v. 58, p. 189-197, 1924.

COUTINHO, C. F. B. et al. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxicidade. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 15, 2005. DOI: 10.5380/pes.v15i0.4469.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J.L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, n. 3, p. 492-497, 2001. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01406.x. PMID: 11556915.

CRAVEN, L.A.; LEPSCHI, B.J. Enumeration of the species and intraspecific taxa of *Melaleuca* (Myrtaceae) occurring in Australia and Tasmania. *Australian Systematic Botany*, v. 12, p. 819–928, 1999. doi:10.1071/SB98019.

DA COSTA GONÇALVES, Dalila et al. Use of *Melaleuca alternifolia* essential oil as an efficient strategy to extend the shelf life of banana fruits. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 108, p. 104641, 2023. 10.1016/j.bse.2023.104641

DONGRE, P.; DOIFODE, C.; CHOUDHARY, S.; SHARMA, N. Botanical description, chemical composition, traditional uses and pharmacology of *Citrus sinensis*: An updated review. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, v. 8, p. 100272, 2023. ISSN 2667-1425. <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2023.100272>.

EALIA, Anu Mary S.; SARAVANAKUMAR, M. P. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, v. 263, p. 032019, 2017. DOI: 10.1088/1757-899x/263/3/032019.

ESTRADA, A. F.; BERROUET, M. C.; GIRALDO, J. A. Toxicidad por neonicotinoides: revisión de tema y reporte de dos casos. *Med U.P.B.*, v. 35, n. 1, p. 41-46, 2016. DOI: 10.18566/medupb.v35n1.a06.

FAVELA-HERNÁNDEZ, J.; GONZÁLEZ-SANTIAGO, O.; RAMÍREZ-CABRERA, M.; ESQUIVEL-FERRIÑO, P.; CAMACHO-CORONA, M. Chemistry and Pharmacology of *Citrus sinensis*. *Molecules*, v. 21, n. 2, p. 247, 2016. doi:10.3390/molecules21020247.

Ferreira, Márcia Miguel Castro. "Quimiometria III-Revisitando a análise exploratória dos dados multivariados." *Química Nova* 45.10 (2022): 1251-1264.

FERREIRA, Patricia Garcia et al. Nicotina e a Origem dos Neonicotinoides: Problemas ou Soluções? *Revista Virtual de Química*, v. 14, n. 3, 2022.

FONTANA, Raphael Luiz Macêdo; COSTA, Sylvania Santana; SILVA, José Adailton Barroso da; RODRIGUES, Auro de Jesus. Teorias Demográficas e o Crescimento Populacional no Mundo. *Ciências Humanas e Sociais Unit*, v. 2, n. 3, p. 113-124, mar. 2015. ISSN 1980-1785 (impresso), ISSN 2316-3143 (eletrônico). Disponível em: periodicos.set.edu.br.

FONTANA, Raphael Luiz Macêdo; COSTA, Sylvania Santana; SILVA, José Adailton Barroso da; RODRIGUES, Auro de Jesus. Teorias Demográficas e o Crescimento Populacional no Mundo. *Ciências Humanas e Sociais Unit*, v. 2, n. 3, p. 113-124, mar. 2015. ISSN 1980-1785 (impresso), ISSN 2316-3143 (eletrônico). Disponível em: periodicos.set.edu.br.

Franzol, A., & Rezende, M. C. (2015). Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. *Polímeros*, 25(spe), 1–9. doi:10.1590/0104-1428.1669

GALLART-MATEU, D.; RODRIGUEZ-SOJO, S.; DE LA GUARDIA, M. Determination of tea tree oil terpenes by headspace gas chromatography mass spectrometry. *Analytical Methods*, v. 8, n. 26, p. 5336-5342, 2016. doi:10.1039/c6ay00923a.

GEDANKEN, A. Doping nanoparticles into polymers and ceramics using ultrasound radiation. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 14, n. 4, p. 418–430, 2007. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2006.08.005.

GROARK, K. P. The Angel in the Gourd: Ritual, Therapeutic, and Protective Uses of Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Among the Tzeltal and Tzotzil Maya of Chiapas, Mexico. *Journal of Ethnobiology*, v. 30, n. 1, p. 5–30, 2010. DOI: 10.2993/0278-0771-30.1.5.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 50, p. 195-199, 2002.

HUMPHERY, E. M. A new Australian germicide. *Medical Journal of Australia*, v. 1, p. 417-418, 1930.

JARDIM, M.A.G.; ANDERSON, A.B. Manejo de populações nativas de açazeiro no estuário amazônico (resultados preliminares). *Boletim de Pesquisa Florestal*, Colombo, n. 15, p. 1-18, 1987.

KNIGHT, T. E.; HAUSEN, B.M. *Melaleuca* oil (tea tree oil) dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 30, n. 3, p. 423-427, 1994. ISSN 0190-9622.

KOOIJ, P. W.; ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; HOFFMANN, D.; ROEPSTORFF, P.; BOOMSMA, J. J.; SCHIØTT, M. *Leucoagaricus gongylophorus* uses leaf-cutting ants to vector proteolytic enzymes towards new plant substrate. *The ISME Journal*, v. 8, n. 5, p. 1032–1040, 2014. doi:10.1038/ismej.2013.231.

LANGENHEIM, J.H. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*, v. 20, p. 1223–1280, 1994.

LIMA, A. F.; SILVA, E. G. A.; IWATA, B. F. Agriculturas e agricultura familiar no Brasil: uma revisão de literatura. *Revista Retratos de Assentamentos*, v. 22, n. 1, p. [incluir páginas], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.25059/2527-2594/retratosdeassentamentos/2019.v22i1.332>.

LOW, L. E. et al. Principles and potential applications of cavitation technology for nano-foods. In: HEBBAR, U.; RANJAN, S.; DASGUPTA, N.; KUMAR MISHRA, R. (eds). *Nano-food Engineering*. Food Engineering Series. Springer, Cham, 2020. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-44552-2_5.

Lyra, W. da S., Silva, E. C. da, Araújo, M. C. U. de, Fragoso, W. D., & Veras, G. (2010). Classificação periódica: um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais. *Química Nova*, 33(7), 1594–1597. doi:10.1590/s0100-40422010000700030

MAGIORKINIS, E.; BELOUKAS, A.; DIAMANTIS, A. Scurvy: Past, present and future. *European Journal of Internal Medicine*, v. 22, n. 2, p. 147–152, 2011. doi:10.1016/j.ejim.2010.10.006.

MCMURRY, J. *Química Orgânica - Combo*. 7. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2011. 1344 p.

Mohammed, A., & Abdullah, A. (2018). Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review. Proceedings of the 2018 International Conference on Hydraulics and Pneumatics - HERVEX, 77. ISSN 1454-8003. Băile Govora, Romania, November 7-9.

MURRAY, M. T.; PIZZORNO, J. E. Chapter 96 - Melaleuca alternifolia (tea tree). In: PIZZORNO, J. E.; MURRAY, M. T. (Eds.). Textbook of Natural Medicine. 2. ed. v. 2. Churchill Livingstone, 1999.

MURRAY, Michael. Melaleuca Alternifolia (Tea Tree). In: Textbook of Natural Medicine, 5. ed. 2020.

NOCELLI, R. C.; ROAT, T. C.; ZACARIN, E. C. S.; MALASPINA, O. Riscos de pesticidas sobre as abelhas. Semana dos Polinizadores, v. 3, p. 196-212, 2012.

OFOEDUM, A. F. et al. Primary and Secondary Metabolites as Products of Microbial Metabolism: Uses and Application in Foods, Pharmaceutical and Allied Industries. A Review. European Journal of Applied Science, Engineering and Technology, v. 2, n. 2, p. 4–16, 2024. DOI: 10.59324/ejaset.2024.2(2).01.

OMER, Abdeen Mustafa. Sustainable development of bioenergy from agriculture residues and environment. JNNCE Journal of Engineering & Management (JJEM), v. 2, n. 2, p. 19, 2018.

ORMOND, José Geraldo Pacheco et al. Agricultura orgânica: quando o passado é futuro. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 15, p. 3-34, mar. 2002.

PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. Department of Virology and Immunology, Institute of Microbiology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, Lublin, Poland, 2007.

Pereira, L. J. B., & Garcia-Rojas, E. E. (2015). Emulsões múltiplas: formação e aplicação em microencapsulamento de componentes bioativos. Ciência Rural, 45(1), 155–162. doi:10.1590/0103-8478cr20140315

Peres, Terezinha Bonanho. "Noções básicas de cromatografia." Biológico, São Paulo 64.2 (2002): 227-229.

PICKETT, Elizabeth J. et al. Pollen-based reconstructions of biome distributions for Australia, Southeast Asia and the Pacific (SEAPAC region) at 0, 6000 and 18,000 14C yr BP. Journal of Biogeography, v. 31, n. 9, p. 1381-1444, 2004.

PRIMAVESI, Ana. Revisão do conceito de agricultura orgânica: conservação do solo e seu efeito sobre a água. Biológico, São Paulo, v. 65, n. 1/2, p. 69-73, jan./dez. 2003. Sindicato Rural de Itaipava (SINDAI).

QUINN, F.C.; BARLOW, B.A. Contribution to a review of *Melaleuca* (Myrtaceae). Unpublished report. Australian National Herbarium, Division of Plant Industry, CSIRO, Canberra, 1989.

REIS FILHO, W.; PORFÍRIO-DA-SILVA, V.; NICKELE, M. A.; MARTINS, M. F. O. Formigas cortadeiras em sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta - iLPF: fundamentos para o controle. Comunicado, ISSN 1980-3982, Colombo, PR, dez. 2013.

RIQUINHO, Deise Lisboa; HENNINGTON, Élide Azevedo. Cultivo do tabaco no sul do Brasil: doença da folha verde e outros agravos à saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 19, n. 12, p. 4797–4808, 2014. doi:10.1590/1413-812320141912.19372013.

SAITO, Maria Lucia; LUCCHINI, Franco. Substâncias do metabolismo secundário de plantas no controle de pragas agrícolas. *LECTA*, Bragança Paulista, v. 15, n. 1/2, p. 211-245, 1997.

SANTIN, C. K.; ROCHA, T. L. A. de C.; GEHM, G. O. S.; SCHWADE, P. V. Produção de tinta com resíduos de casca de laranja e poliestireno expandido (EPS). *REVISTA DELOS*, v. 16, n. 47, p. 2705–2718, 2023. <https://doi.org/10.55905/rdelosv16.n47-011>.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 1999. p. 323-354.

SAUTER, C.; EMIN, M. A.; SCHUCHMANN, H. P.; TAVMAN, S. Influence of hydrostatic pressure and sound amplitude on the ultrasound induced dispersion and de-agglomeration of nanoparticles. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 15, n. 4, p. 517–523, 2008. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2007.08.010.

SILVEIRA, J.C.; BUSATO, N.; COSTA, A.; COSTA JUNIOR, E. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. *Enciclopédia Biosfera*, v. 8, n. 15, 2012. Recuperado de: <https://conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/3767>.

SKENDŽIĆ, S. et al. The Impact of Climate Change on Agricultural Insect Pests. *Insects*, v. 12, n. 5, p. 440, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects12050440>. Disponível em: MDPI – Insects.

Snow, N. H., & Slack, G. C. (2002). Head-space analysis in modern gas chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(9-10), 608–617. doi:10.1016/s0165-9936(02)00802-6

SOSA-CALVO, J.; JEŠOVNIK, A.; LOPES, C. T.; RODRIGUES, A.; RABELING, C.; BACCI, M.; SCHULTZ, T. R. Biology of the relict fungus-farming ant *Apterostigma*

megacephala Lattke, including descriptions of the male, gyne, and larva. *Insectes Sociaux*, v. 64, n. 3, p. 329–346, 2017. doi:10.1007/s00040-017-0550-2.

SOUZA, M. D. de; PERES FILHO, O.; CALDEIRA, S. F.; DORVAL, A.; SOUSA, N. J. Desenvolvimento in vitro do fungo simbiote de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) em meio de cultura com diferentes extratos vegetais. *Ciência Rural*, v. 42, n. 9, p. 1603–1609, 2012. doi:10.1590/s0103-84782012005000058.

SUN, J. D-limonene: safety and clinical applications. *Altern Med Rev*, v. 12, n. 3, p. 259-264, 2007.

SWORDS, G.; HUNTER, G. L. K. *J. Agric. Food Chem.*, v. 26, n. 3, p. 734–737, 2006.

VALENTIM, João A.; SOARES, Elane C. Extração de óleos essenciais por arraste a vapor: um kit experimental para o ensino de química. *Química Nova na Escola*, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 297-301, 2018.

ZANUNCIO JUNIOR, José Salazar et al. Manejo agroecológico de pragas: alternativas para uma agricultura sustentável. *Revista Científica Intellecto, Venda Nova do Imigrante, ES, Brasil*, v. 3, n. 3, p. 18-34, 2018. ISSN 2525-9075. Disponível em: [site da revista].

Zhou, W., Apkarian, R., Wang, Z. L., & Joy, D. (2006). Fundamentals of Scanning Electron Microscopy (SEM). *Scanning Microscopy for Nanotechnology*, 1–40. doi:10.1007/978-0-387-39620-0_1

7. Apêndices

7.1. Apêndice A

Cinética de crescimento com limoneno.

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (5 µL) 7 dias	Controle 7 dias
1	0,3629	0,5539
2	0,5539	0,5278
3	0,5806	0,5278
4	0,5806	---
5	0,5278	---
Média	0,5212	0,5365
SD	0,0911	0,0150
RSD	17,4801	2,8045
% inibição	2,8599	---
Ensaio (Réplicas)	Limoneno (5 µL) 14 dias	Controle 14 dias
1	0,6936	1,6733
2	1,0202	1,5829
3	1,0930	1,7195
4	1,0930	---
5	---	---
Média	0,9749	1,6585
SD	0,1907	0,0695
RSD	19,5576	4,1892
% inibição	41,2154	---
Ensaio (Réplicas)	Limoneno (5 µL) 21 dias	Controle 21 dias
1	2,8938	3,3962
2	1,9104	3,4618
3	2,4872	3,1400
4	2,3223	---
5	---	---
Média	2,4034	3,3327
SD	0,4071	0,1701
RSD	16,9381	5,1031
% inibição	27,8831	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (5 µL) 28 dias	Controle 28 dias
1	4,4465	4,5216
2	3,2031	5,1446
3	3,7306	5,2253
4	3,6625	---
5	4,4465	---
Média	3,7607	4,9638
SD	0,5137	0,3851
RSD	13,6613	7,7579
% inibição	24,2377	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (5 µL) 35 dias	Controle 35 dias
1	6,6932	8,6526
2	5,4711	7,7398
3	7,1595	8,6526
4	7,4468	---
5	6,6932	---
Média	6,6927	8,3483
SD	0,87156	0,5270
RSD	13,0225	6,3127
% inibição	19,8321	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (10 µL) 7 dias	Controle 7 dias
1	0,6079	0,5539
2	0,4299	0,5278
3	0,4776	0,5278
4	---	---
5	---	---
Média	0,5051	0,5365
SD	0,0921	0,0150
RSD	18,2443	2,8045
% inibição	5,85251	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (10 µL) 14 dias	Controle 14 dias
1	0,5024	1,6733
2	0,5539	1,5829
3	0,5539	1,7195
4	---	---
5	---	---
Média	0,5367	1,6585
SD	0,0297	0,0695
RSD	5,5393	4,1892
% inibição	67,6385	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (10 µL) 21 dias	Controle 21 dias
1	1,8617	3,3962
2	1,7195	3,4618
3	1,6278	3,1400
4	---	---
5	---	---
Média	1,7363	3,3327
SD	0,1179	0,1701
RSD	6,7887	5,1031
% inibição	47,9005	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (10 µL) 28 dias	Controle 28 dias
1	2,4316	4,5216
2	2,5434	5,1446
3	3,2031	5,2253
4	---	---
5	---	---
Média	2,7260	4,9638
SD	0,4169	0,3851
RSD	15,2939	7,7579
% inibição	45,0817	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (10 µL) 35 dias	Controle 35 dias
1	4,5216	8,6526
2	4,9062	7,7398
3	5,3885	8,6526
4	---	---
5	---	---
Média	4,9388	8,3483
SD	0,4344	0,5270
RSD	8,7955	6,3127
% inibição	40,8408	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (15 µL) 7 dias	Controle 7 dias
1	0,5806	0,5539
2	0,4069	0,5278
3	0,4298	0,5278
4	0,5024	---
5	0,4299	---
Média	0,4699	0,5365
SD	0,0715	0,0150
RSD	15,2252	2,8045
% inibição	12,4112	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (15 µL) 14 dias	Controle 14 dias
1	1,0563	1,6733
2	0,9156	1,5829
3	0,6936	1,7195
4	1,0563	---
5	0,6936	---
Média	0,8831	1,6585
SD	0,1822	0,0695
RSD	20,6370	4,1892
% inibição	46,7550	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (15 µL) 21 dias	Controle 21 dias
1	2,5434	3,3962
2	1,9104	3,4618
3	1,6733	3,1400
4	2,2687	---
5	2,4316	---
Média	2,1655	3,3327
SD	0,3645	0,1701
RSD	16,8350	5,1031
% inibição	35,0234	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (15 µL) 28 dias	Controle 28 dias
1	2,7158	4,5216
2	3,6625	5,1446
3	3,2668	5,2253
4	3,7306	---
5	4,2252	---
Média	3,5202	4,9638
SD	0,5641	0,3851
RSD	16,0245	7,7579
% inibição	29,0829	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (15 µL) 35 dias	Controle 35 dias
1	5,2253	8,6526
2	5,3885	7,7398
3	5,3885	8,6526
4	5,6381	---
5	6,5111	---
Média	5,6303	8,3483
SD	0,5140	0,5270
RSD	9,1293	6,3127
% inibição	32,5573	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (25 µL) 7 dias	Controle 7 dias
1	0,5278	0,5024
2	0,4534	0,6644
3	0,4069	0,5806
4	0,5278	0,6358
5	0,3846	0,5806
Média	0,4601	0,5928
SD	0,0666	0,0621
RSD	14,4725	10,4858
% inibição	22,3752	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (25 µL) 14 dias	Controle 14 dias
1	1,3678	1,8617
2	0,8820	1,6278
3	1,4095	1,6278
4	1,1304	1,7195
5	1,0201	1,3266
Média	1,1619	1,6327
SD	0,2253	0,1960
RSD	19,3930	12,0057
% inibição	28,8291	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (25 µL) 21 dias	Controle 21 dias
1	2,6577	3,8688
2	2,1113	4,0807
3	2,5434	3,7994
4	2,2156	3,7994
5	3,14	3,6624
Média	2,5336	3,8422
SD	0,4070	0,1529
RSD	16,0648	3,9807
% inibição	34,05795	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (25 µL) 28 dias	Controle 28 dias
1	4,0095	5,5543
2	3,5950	5,8935
3	3,8688	6,1544
4	4,4465	6,1544
5	3,8688	5,9798
Média	3,9577	5,9473
SD	0,3119	0,2470
RSD	7,8798	4,1541
% inibição	33,4533	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (25 µL) 35 dias	Controle 35 dias
1	5,9798	7,3504
2	5,6382	7,2546
3	6,6018	8,5486
4	5,3066	8,4453
5	6,9711	9,0746
Média	6,0995	8,1347
SD	0,6833	0,7970
RSD	11,2034	9,7975
% inibição	25,01891	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (50 µL) 7 dias	Controle 7 dias
1	0,4069	0,5024
2	0,4298	0,6644
3	0,5539	0,5806
4	---	0,6358
5	---	0,5806
Média	0,4636	0,5928
SD	0,0790	0,0621
RSD	17,0548	10,4858
% inibição	21,7960	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (50 µL) 14 dias	Controle 14 dias
1	0,6079	1,8617
2	0,7234	1,6278
3	0,5024	1,6278
4	---	1,7195
5	---	1,3266
Média	0,6112	1,6327
SD	0,1106	0,1960
RSD	18,0884	12,0057
% inibição	62,5612	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (50 µL) 21 dias	Controle 21 dias
1	0,9498	3,8688
2	1,0930	4,0807
3	1,4519	3,7994
4	---	3,7994
5	---	3,6624
Média	1,1649	3,8422
SD	0,25865	0,1529
RSD	22,2029	3,9807
% inibição	69,6801	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (50 µL) 28 dias	Controle 28 dias
1	2,0096	5,5543
2	2,1113	5,8935
3	2,7745	6,1544
4	---	6,1544
5	---	5,9798
Média	2,2984	5,9473
SD	0,4154	0,2470
RSD	18,0717	4,1541
% inibição	61,3524	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (50 µL) 35 dias	Controle 35 dias
1	4,5216	7,3504
2	3,0775	7,2546
3	3,5949	8,5486
4	---	8,4453
5	---	9,0746
Média	3,7314	8,1347
SD	0,7316	0,7970
RSD	19,6078	9,7975
% inibição	54,1304	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (75 µL) 7 dias	Controle 7 dias
1	0,4069	0,5024
2	0,4069	0,6644
3	0,5278	0,5806
4	0,4776	0,6358
5	0,4534	0,5806
Média	0,4545	0,5928
SD	0,0511	0,0621
RSD	11,2369	10,4858
% inibição	23,3181	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (75 µL) 14 dias	Controle 14 dias
1	0,5539	1,8617
2	0,4534	1,6278
3	0,5024	1,6278
4	0,6079	1,7195
5	0,4776	1,3266
Média	0,5190	1,6327
SD	0,0621	0,1960
RSD	11,9594	12,0057
% inibição	68,2091	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (75 µL) 21 dias	Controle 21 dias
1	0,7539	3,8688
2	1,1304	4,0807
3	1,2861	3,7994
4	1,2462	3,7994
5	1,2861	3,6624
Média	1,1406	3,8422
SD	0,2254	0,1529
RSD	19,7591	3,9807
% inibição	70,3143	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (75 µL) 28 dias	Controle 28 dias
1	2,5434	5,5543
2	2,3223	5,8935
3	2,1113	6,1544
4	2,8938	6,1544
5	2,8338	5,9798
Média	2,5409	5,9473
SD	0,3327	0,2470
RSD	13,0923	4,1541
% inibição	57,2754	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (75 µL) 35 dias	Controle 35 dias
1	3,3312	7,3504
2	4,3721	7,2546
3	3,2031	8,5486
4	3,7994	8,4453
5	4,5216	9,0746
Média	3,8455	8,1347
SD	0,5945	0,7970
RSD	15,4596	9,7975
% inibição	52,7275	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (100 µL) 7 dias	Controle 7 dias
1	0,3629	0,5539
2	0,5024	0,5278
3	0,47759	0,5278
4	---	---
5	---	---
Média	0,4476	0,5365
SD	0,0744	0,0150
RSD	16,6136	2,8045
% inibição	16,5626	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (100 µL) 14 dias	Controle 14 dias
1	0,5024	1,6733
2	0,5805	1,5829
3	0,5024	1,7195
4	---	---
5	---	---
Média	0,5285	1,6585
SD	0,0451	0,0695
RSD	8,5419	4,1892
% inibição	68,1371	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (100 µL) 21 dias	Controle 21 dias
1	0,9498	3,3962
2	0,6936	3,4618
3	0,7234	3,1400
4	---	---
5	---	---
Média	0,7890	3,3327
SD	0,1401	0,1701
RSD	17,7592	5,1031
% inibição	76,3261	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (100 µL) 28 dias	Controle 28 dias
1	1,9104	4,5216
2	1,5829	5,1446
3	1,4519	5,2253
4	---	---
5	---	---
Média	1,6483	4,9638
SD	0,2361	0,3851
RSD	14,3254	7,7579
% inibição	66,7918	---

Ensaio (Réplicas)	Limoneno (100 µL) 35 dias	Controle 35 dias
1	2,9544	8,6526
2	4,0807	7,7398
3	2,9544	8,6526
4	---	---
5	---	---
Média	3,3299	8,3483
SD	0,6503	0,5270
RSD	19,5287	6,3127
% inibição	60,1133	---

SD = Desvio Padrão

RSD = Desvio Padrão Relativo

Cinética de crescimento com óleo essencial de melaleuca

Ensaio (Réplicas)	Melaleuca 1 µL 7 dias	Controle 7 dias
1	0,3846	0,5539
2	0,3846	0,5278
3	0,3846	0,5278
4	0,3846	0,5278
5	0,3846	---
Média	0,3846	0,5343
SD	0	0,0130
RSD	0	2,43867
% inibição	28,0153	---

Ensaio (Réplicas)	Melaleuca 1 µL 14 dias	Controle 14 dias
1	1,8617	1,0930
2	1,6278	0,9498
3	1,2861	0,9847
4	1,4949	1,2463
5	1,7662	---
Média	1,6074	1,0685
SD	0,2270	0,1333
RSD	14,1243	12,4754
% inibição	21,5458	---

Ensaio (Réplicas)	Melaleuca 1 µL 21 dias	Controle 21 dias
1	3,8687	2,7158
2	2,6577	2,0096
3	2,4872	2,4872
4	2,9544	2,4316
5	3,5281	---
Média	3,0992	2,4111
SD	0,5845	0,2945
RSD	18,8602	12,2159
% inibição	32,0912	---

Ensaio (Réplicas)	Melaleuca 1 µL 28 dias	Controle 28 dias
1	3,8688	4,7505
2	2,6577	4,0807
3	2,4872	4,6736
4	2,9544	4,7505
5	3,5281	---
Média	3,0992	4,5633
SD	0,5845	0,3241
RSD	18,8601	7,1014
% inibição	32,0912	---

Ensaio (Réplicas)	Melaleuca 1 µL 35 dias	Controle 35 dias
1	5,4711	6,3314
2	4,2983	7,6415
3	5,5543	6,7852
4	4,2983	6,4209
5	5,8077	---
Média	5,08598	6,7948
SD	0,7296	0,5976
RSD	14,3457	8,7949
% inibição	25,1489	---

Ensaio (Réplicas)	Melaleuca 5 µL 7 dias	Controle 7 dias
1	0,3846	0,5539
2	0,3846	0,5278
3	0,3846	0,5278
4	0,3846	---
5	0,3846	---
Média	0,3846	0,5365
SD	0	0,0150
RSD	0	2,8045
% inibição	28,3067	---

Ensaio (Réplicas)	Melaleuca 5 µL 14 dias	Controle 14 dias
1	0,3846	1,6733
2	0,3846	1,5829
3	0,3846	1,7195
4	0,3846	---
5	0,3846	---
Média	0,3846	1,6585
SD	0	0,0695
RSD	0	4,1892
% inibição	76,8080	---

Ensaio (Réplicas)	Melaleuca 5 µL 21 dias	Controle 21 dias
1	0,3846	3,3962
2	0,3846	3,4618
3	0,3846	3,1400
4	0,3846	---
5	0,3846	---
Média	0,3846	3,3327
SD	0	0,1701
RSD	0	5,1031
% inibição	88,4583	---

Ensaio (Réplicas)	Melaleuca 5 µL 28 dias	Controle 28 dias
1	0,4069	4,5216
2	0,5278	5,1446
3	0,3846	5,2253
4	---	---
5	---	---
Média	0,4398	4,9638
SD	0,0770	0,3851
RSD	17,5172	7,7579
% inibição	91,1397	---

Ensaio (Réplicas)	Melaleuca 5 µL 35 dias	Controle 35 dias
1	0,7850	8,6526
2	1,05629	7,7398
3	1,1304	8,6526
4	---	---
5	---	---
Média	0,9906	8,3483
SD	0,1818	0,5270
RSD	18,3572	6,3127
% inibição	88,1345	---

Ensaio (Réplicas)	Melaleuca 10 µL 7 dias	Controle 7 dias
1	0,3846	0,6936
2	0,3846	0,5805
3	0,3846	0,6358
4	0,3846	0,5805
5	0,3846	0,6079
Média	0,3846	0,6367
SD	0	0,0565
RSD	0	8,8779
% inibição	39,5857	---

Ensaio (Rélicas)	Melaleuca 10 µL 14 dias	Controle 14 dias
1	0,3846	1,1684
2	0,3846	1,2070
3	0,3846	1,6278
4	0,3846	1,2861
5	0,3846	1,4949
Média	0,3846	1,3344
SD	0	0,2548
RSD	0	19,09538
% inibição	71,1742	---

Ensaio (Rélicas)	Melaleuca 10 µL 21 dias	Controle 21 dias
1	0,3846	3,7994
2	0,3846	3,9388
3	0,3846	3,8687
4	0,3846	3,5949
5	0,3846	3,5281
Média	0,3846	3,8690
SD	0	0,0697
RSD	0	1,8017
% inibição	90,0582	---

Ensaio (Rélicas)	Melaleuca 10 µL 28 dias	Controle 28 dias
1	1,1077	6,1544
2	1,1611	5,6381
3	1,6334	6,9711
4	---	5,8077
5	---	6,7852
Média	1,3001	6,2545
SD	0,2893	0,6721
RSD	22,2402	10,7455
% inibição	79,2024	---

Ensaio (Rélicas)	Melaleuca 10 µL 35 dias	Controle 35 dias
1	1,2717	8,5486
2	4,2226	7,9382
3	2,4925	10,2869
4	---	9,0746
5	---	9,0746
Média	2,6623	8,9246
SD	1,4828	1,2186
RSD	55,6959	13,6550
% inibição	70,1689	---

Ensaio (Rélicas)	Melaleuca 15 µL 7 dias	Controle 7 dias
1	0	0,5539
2	0	0,5278
3	0	0,5278
4	0	---
5	0	---
Média	0	0,5365
SD	0	0,0150
RSD	0	2,8045
% inibição	100	---

Ensaio (Rélicas)	Melaleuca 15 µL 14 dias	Controle 14 dias
1	0	1,6733
2	0	1,5829
3	0	1,7195
4	0	---
5	0	---
Média	0	1,6585
SD	0	0,0695
RSD	0	4,1892
% inibição	100	---

Ensaio (Réplicas)	Melaleuca 15 µL 21 dias	Controle 21 dias
1	0	3,3962
2	0	3,4618
3	0	3,1400
4	0	---
5	0	---
Média	0	3,3327
SD	0	0,1701
RSD	0	5,1031
% inibição	100	---

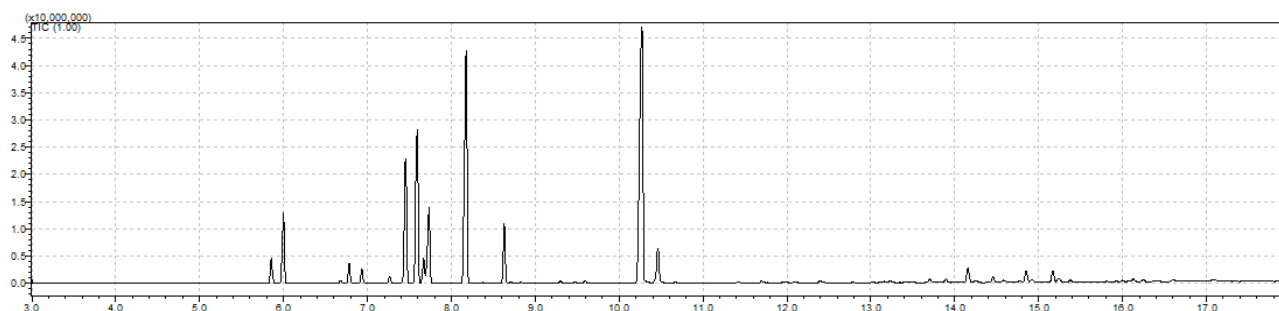
Ensaio (Réplicas)	Melaleuca 15 µL 28 dias	Controle 28 dias
1	0	4,5216
2	0	5,1446
3	0	5,2253
4	0	---
5	0	---
Média	0	4,9638
SD	0	0,3851
RSD	0	7,7579
% inibição	100	---

Ensaio (Réplicas)	Melaleuca 15 µL 35 dias	Controle 35 dias
1	0	8,6526
2	0	7,7398
3	0	8,6526
4	0	---
5	0	---
Média	0	8,3483
SD	0	0,5270
RSD	0	6,3127
% inibição	100	---

SD = Desvio Padrão

RSD = Desvio Padrão Relativo

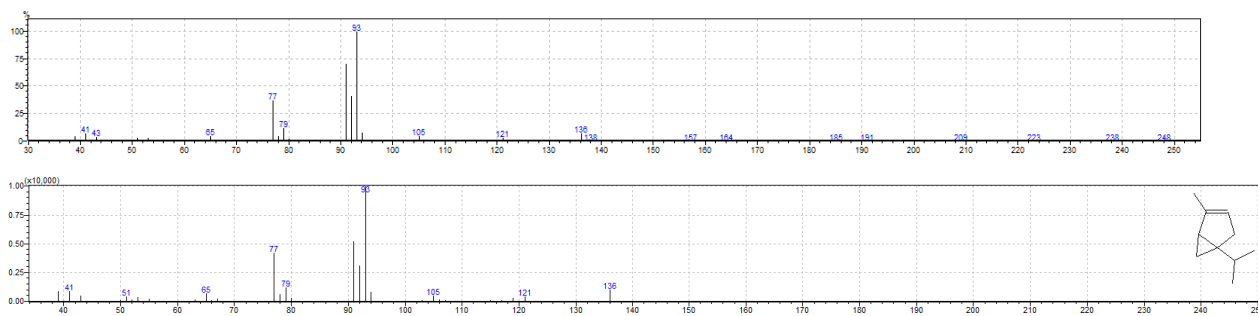
7.2. Apêndice B



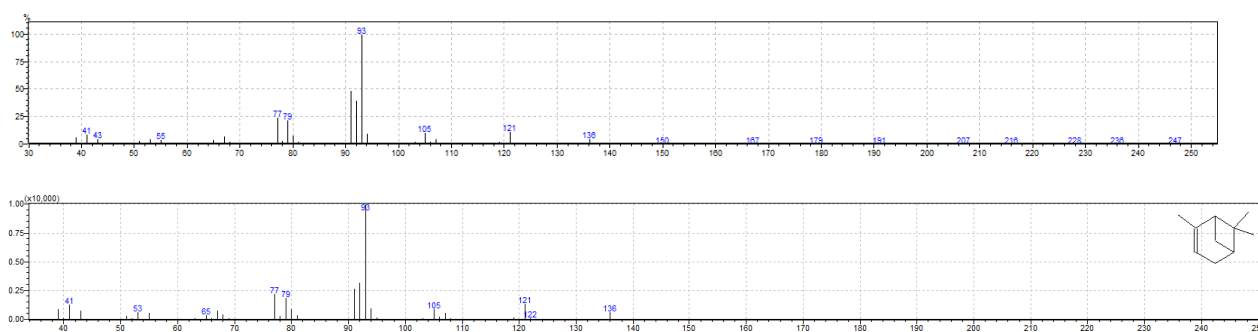
Peak	Ret tm	Start tm	End tm	m/z	Area	Area %	Height	Heitgh %	A/H	Mark
1	5,86	5,8	5,91	TIC	7449716	1,81	4557188	2,3	1,63	MI
2	6	5,93	6,08	TIC	22345263	5,43	12943849	6,54	1,73	MI
3	6,78	6,75	6,82	TIC	5967407	1,45	3562760	1,8	1,67	MI
4	7,45	7,4	7,53	TIC	40477545	9,84	22887192	11,56	1,77	MI
5	7,59	7,53	7,64	TIC	54777050	13,32	28163713	14,23	1,94	MI
6	7,67	7,64	7,69	TIC	5190059	1,26	3595850	1,82	1,44	MI
7	7,73	7,69	7,78	TIC	21542130	5,24	12910532	6,52	1,67	MI
8	8,18	8,08	8,24	TIC	90848197	22,09	42756784	21,6	2,12	MI
9	8,63	8,57	8,68	TIC	18542815	4,51	10886132	5,5	1,7	MI
10	10,27	10,17	10,37	TIC	127087188	30,9	46904178	23,71	2,71	MI
11	10,46	10,36	10,54	TIC	12366067	3,01	6290561	3,18	1,97	MI
12	14,16	14,1	14, 230	TIC	4702742	1,14	2461370	1,24	1,91	MI

Peak	Principais componentes	Similarity
1	.alpha.-Thujene	95%
2	a-pinene	95%
3	L-.beta.-Pinene	94%
4	a-terpinene	94%
5	p-Cimeno	92%
6	Limonene	95%
7	Eucalyptol	95%
8	y-terpinene	95%
9	Terpinoleno	94%
10	Terpinen-4-ol	94%
11	a-terpineol	95%
12	Aromandendreno	94%

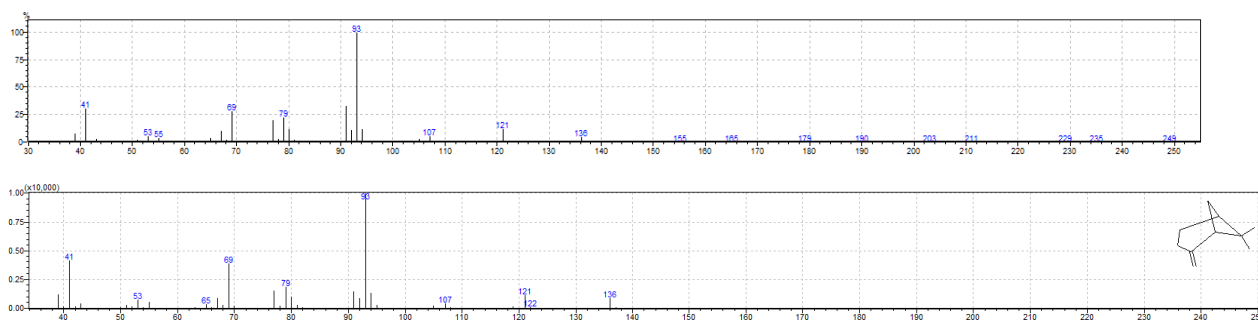
Peak 1



Peak 2

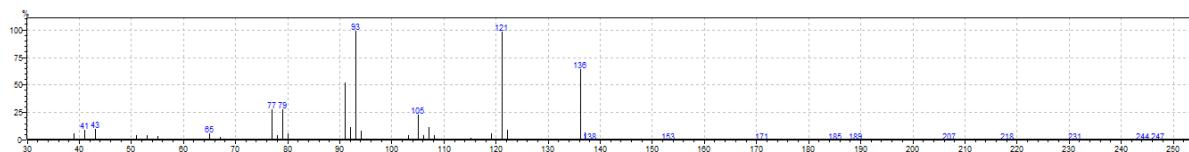


Peak 3

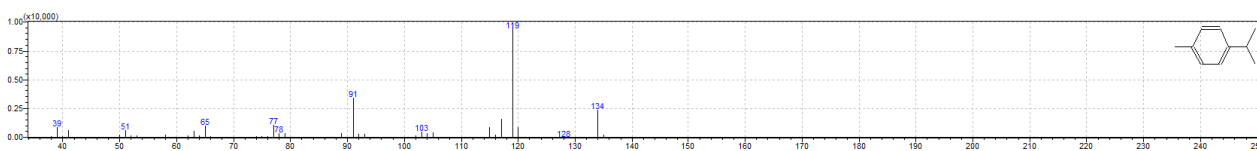
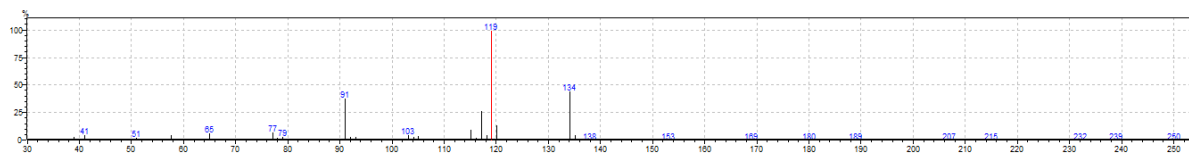


Peak 4

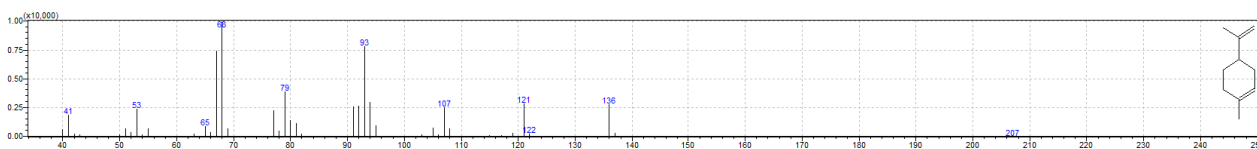
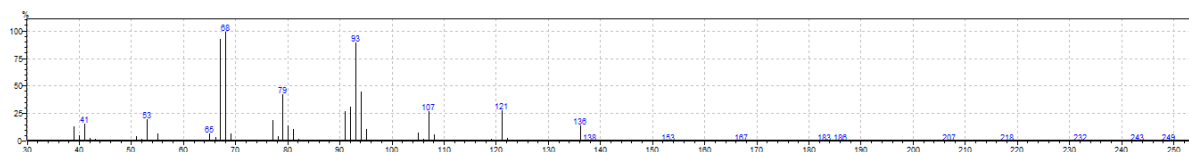




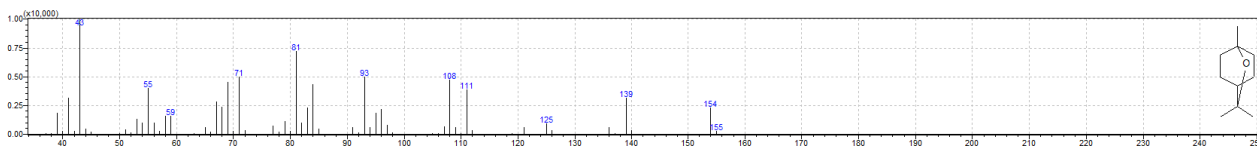
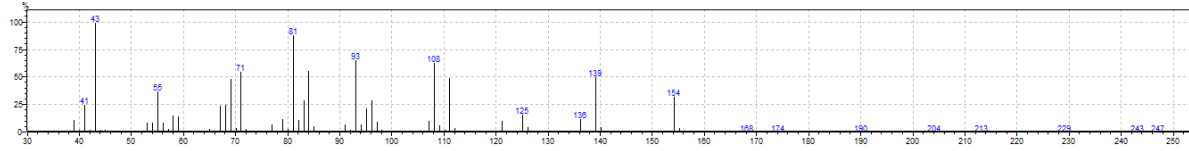
Peak 5



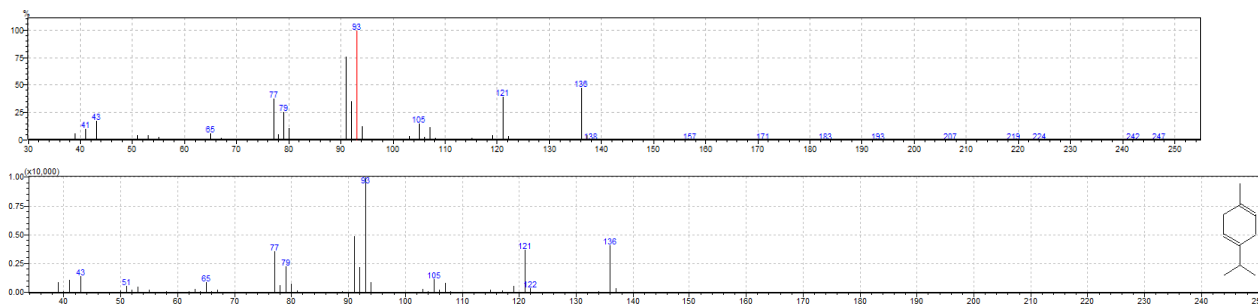
Peak 6



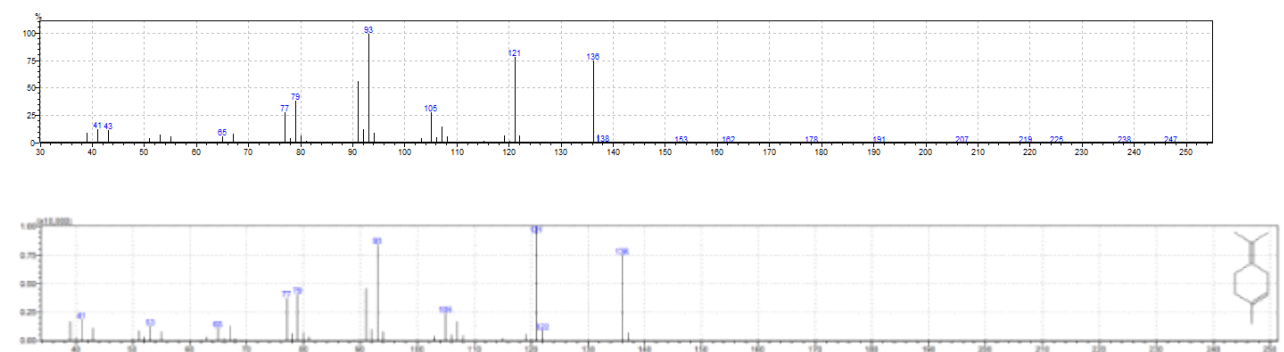
Peak 7



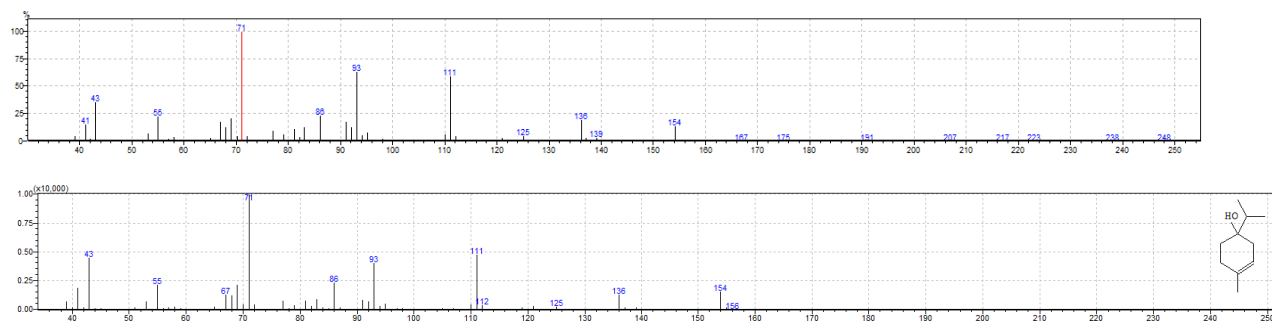
Peak 8



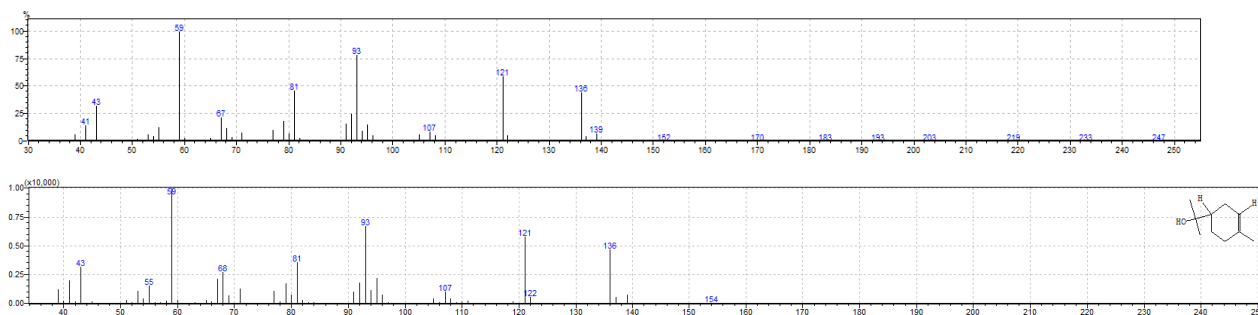
Peak 9



Peak 10



Peak 11



Peak 12

