



VALIDAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA COM TÉCNICA DE MICROENCAPSULAÇÃO POR COACERVAÇÃO COMPLEXA PARA A APLICABILIDADE NA AGRICULTURA

Giovana Gomes Moraes

Lucas Pedroso Santos

Sofia Calixto Barreto

Thyrso Beckmann Burmann

Orientado pela Prof^a Bianca de Oliveira

RESUMO

O projeto avalia a capacidade inibitória do óleo da *Melaleuca alternifolia* no desenvolvimento de microorganismos, mais especificamente fungos, por meio de testes microbiológicos no fungo *Saccharomyces cerevisiae meyen*, também conhecido como fermento biológico e a partir dos resultados obtidos implementa a este composto orgânico no meio agrícola, como meio alternativo aos agrotóxicos. Devido a alta volatilidade do óleo, fez-se necessária a utilização da técnica de microencapsulação por coacervação complexa, a qual possibilitou a formação de uma película que se degrada lentamente para a liberação gradual do óleo.

Palavras-chaves: antifúngico, microencapsulação, *Melaleuca alternifolia*

ABSTRACT

The project aims to evaluate the inhibitory capacity of *Melaleuca alternifolia* oil on the development of microorganisms, more specifically fungi, through microbiological tests on the fungus *Saccharomyces cerevisiae meyen*, also known as biological yeast, and based on the results obtained, evaluate the possibility of implementation of this organic compound in the agricultural environment. Due to the high volatility of the oil, it was necessary to use the complex coacervation microencapsulation technique, which allowed the formation of a film that degrades slowly for the gradual release of the oil.

Keywords: antifungal, microencapsulation, *Melaleuca alternifolia*

¹ Curso Técnico em Química – ETEC Irmã Agostina
Av. Feliciano Correa s/n – Jardim Satélite - CEP 04815-240 - São Paulo – Brasil
giovana.moraes13@etec.sp.gov.br

Recebido em: 27/06/2024

Apresentado à banca em: 19/06/2024

1. INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são produtos extremamente eficazes no setor agrícola para a inibição e exterminação de micro-organismos, além de muitos serem catalisadores no processo de crescimento dos alimentos, portanto é notório o importante papel que desempenham na sociedade, otimizando o crescimento vegetal, reduzindo a quantidade de produtos estragados e a maturação de frutos. A revista Cadernos de Saúde Pública (2014) afirma que na última década o mercado brasileiro destes químicos expandiu rapidamente levando o país a liderar o ranking mundial de maior consumidor destes agroquímicos. Com este salto exponencial no uso de agrotóxicos são desencadeados diversos danos a saúde humana e animal, como também na preservação ambiental, de forma que as contaminações por estes produtos estão relacionadas com o aumento de doenças de caráter crônico e agudo nos seres humanos, mutações genéticas, intoxicação de animais silvestres e contaminação ambiental (Cadernos de Saúde Pública, 2021).

De acordo com a Organização Internacional do Trabalho (OIT) há no mínimo 70 mil intoxicações agudas e crônicas por ano causadas por substâncias químicas usadas em plantações.

Um homem de 49 anos chamado John McKivision, foi diagnosticado com linfoma não Hodgkin (LNH), que culpou a empresa farmacêutica Bayer e a empresa de agricultura Monsanto, alegando que

desenvolveu câncer após usar o agrotóxico Roundup em sua propriedade durante duas décadas. McKivision decidiu então processar ambas as empresas no valor de 2,5 bilhões de dólares, ao final do processo, o júri decidiu de forma unânime que as empresas deveriam pagar 2 bilhões de dólares para McKivision, a empresa Monsanto recebeu também uma condenação de 50 anos por má conduta. (SYLLA et al.).

Em vista destes óbices, é indispensável a urgência de um meio alternativo que solucione estes problemas.

Em meio a diversas pesquisas, foi identificada a presença de agentes fungicidas no óleo essencial de *Melaleuca*, como o Terpien-4-ol, nos dando a possibilidade de desenvolver um fungicida agrícola utilizando este óleo como base visando a inibição de apenas um agente patógeno (Enciclopédia Biosfera, 2019; AOUDOU, 2010).

Com isso, iniciou-se uma série de buscas a fim de pôr este trabalho em prática.

2. METODOLOGIA

2.1. MATERIAIS

Tabela 1: Produtos e reagentes

Produtos	Quantidade
Água destilada	-
Béqueres 250mL (UNIGLAS)	3
Agitador magnético (MYLABOR)	1
Barra magnética (KASVI)	3
Gelatina (-)	1
Goma arábica (SYNTH)	1
Bagueta 10mmX300mm (LABORGLAS)	1
Tubo de ensaio (LABORGLAS)	8
Bico de Bunsen (METALIC)	1

Incubadora (SOLIDSTEEL)	1
Placas de Petri (MYLABOR)	2
Ágar (KASVI)	1
Termômetro (INCOTERM)	1
Autoclave (Generalmed)	1

2.2. MÉTODOS

Inicialmente, foi preparada uma solução de óleo a 16%, e a partir desta, foram feitas diluições de 8%, 4%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, 0,125% e 0,0625%, a fim de testar e determinar uma proporção eficaz entre óleo e água, a qual fosse suficiente para inibir o desenvolvimento do fungo escolhido e que não tivesse uma alta concentração, assim não prejudicando a planta em que esse fungicida viesse a ser aplicado.

Para realizar a diluição do óleo essencial e atingir as concentrações desejadas utiliza-se a seguinte equação:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Onde:

C_i = concentração inicial da solução (mg/mL)

C_f = concentração final da solução (mg/mL)

V_i = volume inicial da solução (mL)

V_f = volume final da solução (mL)

Devido as polaridades das substâncias, fez se necessária a utilização de um emulsificante para impedir a separação do óleo e água e conseqüentemente criar uma solução estável, foi utilizado o Tween 80 (Synth). Essa parte é importante pois comprometeria a concentração de óleo no teste, visto que não haveria como afirmar a distância das dispersões, tendo um resultado impreciso.

Utilizando uma pipeta automática,

pipetou-se em um balão volumétrico de 10 mL 1,6 mL do óleo de Melaleuca e 1 mL do emulsificante Tween 80, o balão foi preenchido até o menisco com água destilada, resultando na solução inicial de óleo de Melaleuca com a concentração de 16%. (Yuri W. Cavalcanti, Leopoldina F. D. Almeida, Wilton W. N. Padilha, 2011.).

Foram recolhidos 5 mL da solução de 16%, esses 5 mL foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL e preenchido até o menisco com água destilada, com o objetivo de diluir o óleo pela metade, resultando na diluição A, com concentração de 8%. Esse processo se repetiu até a diluição H.

Tabela 2: Proporção em porcentagem e mg/mL das diluições

Linhas	Concentração (%)	Concentração (mg/mL)
A	8	72,0
B	4	36,0
C	2	18,0
D	1	9,0
E	0,5	4,5
F	0,25	2,25
G	0,125	1,125
H	0,0625	0,5625

Fonte: Yuri W. Cavalcanti, Leopoldina F. D. Almeida, Wilton W. N. Padilha, 2011.

As diluições foram armazenadas na geladeira com a finalidade de criar uma esfera inibidora de proliferação biológica juntamente a solução inicial. Após duas semanas, iniciaram-se os testes de encapsulação por coacervação complexa.

O objetivo inicial era realizar a encapsulação das diluições, porém após

alguns testes de encapsulação não obtivemos resultados satisfatórios, foi então encontrada outra metodologia de referência que apresentava resultados mais eficazes com o óleo puro, mudando a aplicação das diluições apenas para a determinação de uma proporção das cápsulas concentradas e a água na aplicação agrícola.

Para o método da microencapsulação por coacervação complexa é necessário a utilização de dois polímeros de cargas opostas, portanto escolhemos a goma arábica e a gelatina devido a baixa periculosidade de ambas e custo benefício. Com isso foram preparadas 2 soluções a 1%, uma de gelatina e uma de goma arábica, cada uma com 100mL. No preparo da solução de gelatina foi necessário o aquecimento, devido a solubilidade da gelatina, a qual em seguida foi resfriada para iniciar sua aplicação.

De acordo com o artigo da Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, foi preparada uma solução a partir das soluções 1% de goma arábica e gelatina a 1:1, ou seja, utilizando o mesmo volume das duas soluções para a produção da solução de encapsulamento, sendo recolhidos 20mL de cada, acertando o pH para 4,8 a 5, conforme o ponto isoelétrico que o artigo indicava, para possibilitar a repelição das partículas de gelatina e atração das partículas de goma arábica necessárias na formação das microcápsulas conforme menciona

Dinger, para o nosso tipo de gelatina utilizado (tipo B), com HCl 0,1mol/L e um pHmetro digital calibrado para maior precisão. Com a solução ácida pronta foi adicionado 2mL do óleo sob agitação leve de 200rpm formando assim uma solução aquosa com as cápsulas suspensas.

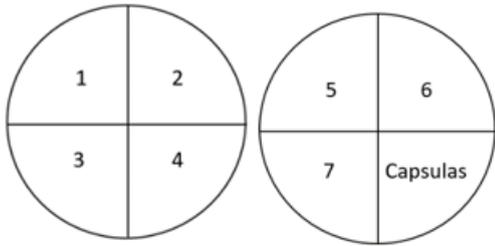
Imagem 1: Solução aquosas com as cápsulas de de melaleuca suspensas



Em seguida, com as diluições e as cápsulas prontas foi preparado o ágar conforme a embalagem do fornecedor (Synth) e dado início aos testes microbiológicos.

Foram preparadas 4 placas de petri, sendo 2 estéreis por meio de autoclavação, para observar o comportamento com o *Saccharomyces cerevisiae meyen*, e duas outras apenas higienizadas, com o objetivo de observar o comportamento do fungicida com diferentes tipos de microrganismos, os chamados fatores externos.

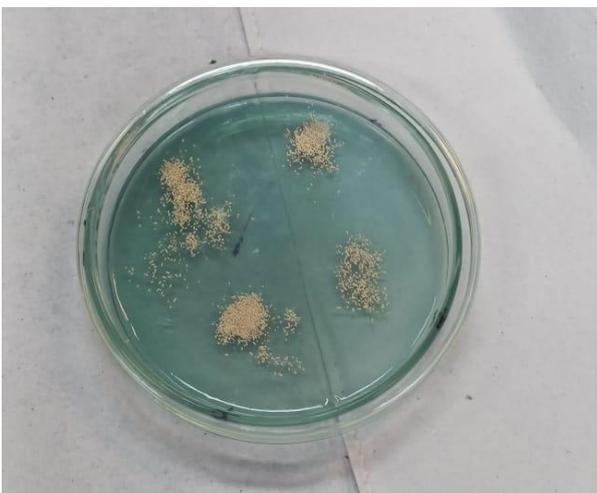
Imagem 2: Organização das placas



Observação: trocamos o A, B, C, D, E, F, G e cápsulas respectivamente por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e cáp.

Após a divisão nas placas, foi depositado em cada espaço o fungo, o *Saccharomyces cerevisiae meyen* também conhecido como fermento biológico, seguido de 4 gotas de cada diluição, e 4 cápsulas em seus respectivos espaços.

Imagem 3: Placa antes de ir á estufa microbiológica



Após o preparo, as placas foram levadas á estufa microbiológica sob 40°C por 24h conforme Tárício Enrico em 2017.

No início do desenvolvimento da pesquisa, foram plantadas sementes de Alface Lisa em um solo apropriadamente adubado, com o objetivo de realizar apenas o teste de avaliação visual da folhagem, visto que o laboratório utilizado não possuía equipamentos para análises mais específicas. Foram coletadas duas

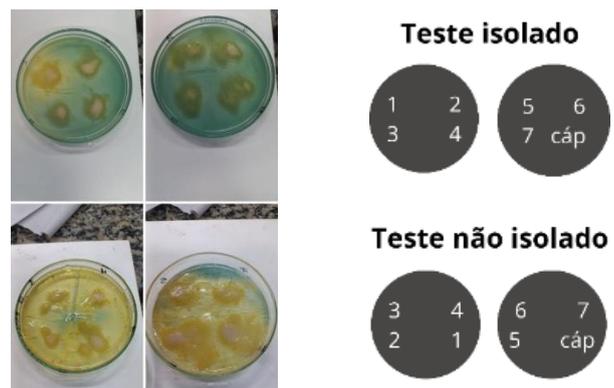
5 mudas para servirem como amostras, com o diâmetro entre 4 mm a 8mm, tendo de três a quatro folhas, para dois béqueres esterilizados e adicionados 50g de terra do mesmo local de onde foi retirada a Alface Lisa (RODRIGO, 2022).

Após a transferência das mudas para os béqueres, foram adicionadas as medidas de 2 mL da solução 1% no primeiro béquer, no segundo béquer foram adicionados 2 mL da solução com as microcápsulas. As escolhas dessas diluições tinham objetivo comparativo, a partir da discrepância entre as suas concentrações e possíveis diferenças dos potenciais fungicidas do óleo de melaleuca, além de no segundo a liberação do princípio ser gradativa conforme a degradação das cápsulas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir dos dados experimentais obtidos foi possível obter uma perspectiva analítica acerca dos resultados, de modo que a concentração mínima inibitória (CMI) aplicáveis as condições em que os ensaios foram realizados apresentou mudanças observáveis na diluição (1%)

Imagem 4: Testes microbiológicos



Portanto determinamos que a proporção de 10mL da solução de

cápsulas para o preparo de 1L de antifúngico é o ideal para a aplicação agrícola.

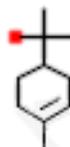
Imagem 5: Teste de visibilidade



Foram realizados testes organolépticos, baseado no teste com aplicação da diluição de 1% e das cápsulas após uma semana com as soluções nos respectivos béqueres e mudas de alface, onde a diluição de 1%, devido à ausência de encapsulação, teve uma liberação elevada do princípio ativo antifúngico, levando as folhas a ficarem murças e apresentando listras marrons no sistema vascular. Já o segundo béquer com a encapsulação não apresentou nenhum desses fatores visuais (organolépticos) negativos (VILAR, 2022).

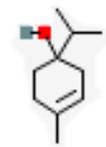
Obtendo tais resultados, junto com análises, os terpenoides dispostos na literatura (AOU DOU, 2010) sendo o α -terpinoleno e seu isômero, *Terpinen-4-ol*, possuem características antifúngicas e bactericidas, sendo possível analisar os testes organolépticos.

α -terpinoleno



Fonte:PubChem

Terpinen-4-ol



Fonte:PubChem

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido ao fator tempo e número de testes realizados, não foi possível confirmar a capacidade antifúngica do óleo essencial da *Melaleuca alternifolia*. Considerando os resultados dos testes microbiológicos, as diluições mais concentradas do TTO (Tea Tree Oil) inibiram o crescimento do fungo.

As cápsulas cumpriram com o objetivo de liberar gradativamente os princípios ativos do óleo, de acordo com a Imagem 4, porém ainda se torna necessário o aprofundamento de testes que visem determinar o tempo que as cápsulas demoram para se degradar, para assim o conhecimento sobre o tempo necessário para reaplicação seja identificado, com isso, finalizamos este projeto e o deixamos como perspectiva para futuros grupos que desejarem prosseguir com seu desenvolvimento.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos primeiramente a Deus que nos sustentou até aqui, a todos os docentes do Curso Técnico em Química da instituição Etec Irmã Agostina, em especial a professora orientadora deste trabalho Bianca de Oliveira, ao professor que

esteve conosco durante as práticas Fabio Rizzo e ao profº Alexandre de Jesus que nos auxiliou na técnica de microencapsulação por coacervação complexa, e também as nossas famílias que nos apoiaram durante esse período.

REFERÊNCIAS

AOUDOU, Yaouba et al. **Antifungal properties of essential oils and some constituents to reduce foodborne pathogen.** Yeast Fungal Res, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2010.

CAVALCANTI, Yuri Wanderley; DE ALMEIDA, Leopoldina de Fátima Dantas; PADILHA, Wilton Wilney Nascimento. **Atividade antifúngica de três óleos essenciais sobre cepas de Candida.** Revista Odontológica do Brasil Central, v. 20, n. 52, 2011.

DINGER, Dennis. Medidas de pontos isoelétricos sem o uso de analisador de potencial zeta. **Cerâmica Industrial**, v. 11, n. 3, p. 23-24, 2006.

FROTA, Maria Tereza Borges Araujo; SIQUEIRA, Carlos Eduardo. **Agrotóxicos: os venenos ocultos na nossa mesa.** Cadernos de Saúde Pública, v. 37, p. 00004321, 2021

MUHOZA, Bertrand et al. **Microencapsulation of essential oils by complex coacervation method: Preparation, thermal stability, release properties and applications.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 62, n. 5, p. 1363-1382, 2022.

RIGOTTO, Raquel Maria; VASCONCELOS, Dayse Paixão; ROCHA, Mayara Melo. **Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública.** Cadernos de Saúde Pública, v. 30, p. 1360 -1362, 2014.

SAVOLDI, Tarcio Enrico et al. **Microencapsulação de Saccharomyces boulardii por spray-drying com diferentes proteínas combinadas com maltodextrina.** 2017.

STEFFEN, Gerusa et al. **Controle de Sclerotinia sclerotiorum e Fusarium sp. com óleo essencial de melaleuca.** Enciclopédia Biosfera, v. 16, n. 30, 2019.

SYLLA, Z.; WOLFE, E. **Bayer é condenada a pagar US\$ 2,25 bi por agrotóxico que teria causado câncer.** CNN. 2024.

VILAR, Daniel. **Doenças no alface causadas por fungos.** Portal agrícola, 2022.

RODRIGO, Nuno Madeira. **Transplante de mudas.** Embrapa Hortaliças, 2022