



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA



**SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE
ALECRIM NO CONTROLE DA PODRIDÃO CINZENTA E NA QUALIDADE DE
MORANGOS**

Eduardo Gainete Ramos

Orientador: Robson M. Di Piero

FLORIANÓPOLIS, SANTA CATARINA

Fevereiro, 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**Sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de alecrim no controle da podridão
cinzenta e na qualidade de morangos**

Mestrando: Eduardo Gainete Ramos

Orientador: Prof. Robson Marcelo Di Piero

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

FLORIANÓPOLIS, SANTA CATARINA

Fevereiro, 2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ramos, Eduardo

SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE
ALECRIM NO CONTROLE DA PODRIDÃO CINZENTA E NA QUALIDADE DE
MORANGOS / Eduardo Ramos ; orientador, Robson Di Piero,
2022.

68 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis,
2022.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Controle de doença.
3. Mofo em morango. 4. Qualidade de frutos. 5.
Nanoformulações. I. Di Piero, Robson. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Eduardo Gainete Ramos

Sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de alecrim no controle da podridão cinzenta e na qualidade de morangos

O presente trabalho a nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr.(a): Leticia Mazzarino
NanoScoping®

Prof. Dr.(a): Patrícia Cia
Instituto Agronômico de Campinas

Prof. Dr.: Marciel J. Stadnik
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que está é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Ciências com ênfase em Recursos Genéticos Vegetais.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero
Orientador (a)

Florianópolis, 2022

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me permitido a dádiva da vida e ter me dado toda a vontade e disposição para o ingresso, execução e conclusão desta etapa, diante de todas as dificuldades impostas, para que eu tenha conseguido chegar até aqui.

Agradeço a meus pais e minha irmã pelo apoio durante todo o período, tendo me dado as condições necessárias para todo esse período acadêmico, auxiliando a superar as dificuldades físicas e psicológicas que ocorrem nessa caminhada.

Agradeço a todos os familiares que se fizeram presentes e deram algum tipo de suporte, dando força, apoio e também momentos de alívio para que pudesse seguir em frente.

Agradeço a minha cachorrinha Rakely que, por mais simples que pareça, destilava o amor mais simples e puro a todo momento, dando energia em momentos inesperados.

Agradeço ao meu orientador Robson Marcelo Di Piero primeiramente por ter me aceito como orientado e também por todo o suporte prático e técnico, até as inúmeras sugestões e correções realizadas ao longo de um período de 6 anos, desde a graduação.

Agradeço a todos os colegas de faculdade e laboratório, pelos momentos difíceis vividos durante a pós-graduação, horas e noites de estudos, compartilhando de ideias e vontades para alcançar o objetivo maior, estando sempre ao lado como suporte para a realização de ensaios e também momentos mais leves, de descontração, para que se pudesse ter calma e seguir em frente.

Agradeço aos membros da banca, Dra. Letícia Mazzarino, Prof. Dra. Patrícia Cia, Prof. Dr. Marciel J. Stadnik, por aceitarem participar como banca final da etapa de conclusão do mestrado, bem como a Dra. Beatriz Veleirinho e a Prof. Drag. Rosete Pescador, com suas constatações e sugestões na etapa de defesa de projeto, auxiliando em uma melhor organização das ideias inseridas no projeto.

Agradeço a CAPES pelo auxílio através de bolsa de fomento, que permitiram meu sustento e vivência ao longo destes anos de mestrado.

Agradeço imensamente a UFSC e ao CCA, por toda a condição dada desde o início da formação na graduação, onde adquiri todo conhecimento para minha formação, bem como tive como segunda casa, onde fiz meus contatos com diversos professores que levo para vida, além de amigos e colegas que logo serão grandes profissionais responsáveis.

RESUMO

O morango é um pseudofruto pequeno e frágil que é acometido por diversas doenças, principalmente no final da cadeia produtiva, no pós-colheita, destacando-se a podridão cinzenta (*Botrytis cinerea*). Apresentam-se como possíveis formas de controle alternativo aos fungicidas, os óleos essenciais extraídos de plantas, a quitosana, polissacarídeo presente nas carapaças de crustáceos e associação destes às nanoformulações com o objetivo de otimizar seus efeitos. Desta forma, o objetivo deste projeto foi avaliar o potencial antimicrobiano e mecanismo de ação destes produtos contra o *Botrytis cinerea* e também verificar como afetam as características dos frutos de morango. Foram avaliadas diferentes dosagens e diferentes formas de aplicação *in vivo* de três sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de alecrim: nanoemulsão (OE de alecrim + água); carreador lipídico nanoestruturado (OE de alecrim + óleo de côco); e nanocápsula (OE de alecrim + quitosana) contra o *Botrytis cinerea*. Foi avaliado o potencial das formulações *in vitro* de redução de crescimento micelial e inibição de germinação de esporos do fitopatógeno. Foram realizados ensaios para observar a interação entre os produtos testados com a parede celular, integridade de membrana e atividade relacionada a espécies reativas de oxigênio (EROs) dos esporos do patógeno. Também foram realizados testes físico-químicos de determinação de peso fresco, firmeza, pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais, antocianinas e ácido ascórbico, para avaliar se o tratamento modificou a estrutura do fruto. Nos bioensaios foi verificado que a nanoemulsão, a 2%, por imersão (NEI) promoveu mais de 30% de redução na incidência e cerca de 70% de redução de severidade da doença, enquanto nanocápsula e carreador lipídico nanoestruturado por aspersão reduziram em 20 e 30% a incidência, respectivamente, e aproximadamente 40% da severidade da doença nos morangos. A nanoemulsão também promoveu um prolongamento de vida de prateleira dos frutos, com menor perda de peso e manutenção dos demais parâmetros físico-químicos avaliados. Todas as nanoformulações a 0,5% apresentaram mais de 95% de inibição de germinação de esporos e mais de 30% de diminuição do crescimento micelial. Assim, concluiu-se que dentre os sistemas avaliados a nanoemulsão a 2%, aplicada por imersão, é quem apresenta maior potencial de uso como controle alternativo de podridão cinzenta causada por *Botrytis cinerea* na cadeia de pós-colheita do morango.

Palavras-chave: Alecrim, Controle alternativo, Físico-químico, Mofo, Nanopartículas, Pós-Colheita.

ABSTRACT

Strawberry is a small and fragile pseudo fruit that can be affected by many diseases, especially in postharvest, standing out gray mold (*Botrytis cinerea*). As an alternative control we have the essential oils extracted from plants, the chitosan, a polysaccharide present on shells of crustaceans, and the their association with nanoformulations aiming to optimize their effects. Thus, this project has the purpose to evaluate the antimicrobial potential and the mechanism of action of these products against *Botrytis cinerea* and also verify their effects on strawberry fruits quality. The rosemary essential oil (rosemary EO) in three distinct nanoformulations were evaluated against *Botrytis cinerea*: nanoemulsion (rosemary EO + water); solid lipidic nanoparticle (rosemary EO + coconut oil); and nanocapsule (rosemary EO + chitosan). The nanoformulations were utilized at different concentrations and ways of application. Assays on mycelial growth and spore germination were also realized to test the nanoformulation potential *in vitro*. The interaction of the product with the cell wall, membrane integrity of the pathogen spore and the activity of reactive oxygens species (ROS) were evaluated too. In order to observe de physicochemical qualities of strawberries, fruits were exposed to the different nanoformulations to assess fresh weight, pH, titratable acid, total soluble solids, anthocyanins and ascorbic acid were observed to evaluate the modifications on fruit structure caused by the products. Bioassays showed the nanoemulsions, applied on immersion (NEI) and at 2%, promoted more than 30% incidence reduction and 70% less severity, while nanocapsule and nanostructured lipid carriers by aspersion, promoted 20 and 30% of incidence reduction, respectively, and near to 40% of severity reduction of grey mold on strawberry fruits. Nanoemulsion also extended fruit shelflife due to their effects on quality tests, with less fresh weight loss and maintaining the other parameters evaluated. All nanoformulations at 0,5% inhibited more than 95% the spore germination and by 30% the mycelial growth. So, it can be concluded that nanoemulsion at 2% by immersion has potential use as an alternative control to gray mold caused by *Botrytis cinerea* on postharvest chain of strawberry fruits.

Keywords: Alternative control, Mold, Nanoparticles, Physicochemical, Postharvest, Rosemary.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Disposição da unidade experimental. | 30 |
| Figura 2. Representação visual de severidade para 0 e 100% de podridão cinzenta em morangos tratados. | 31 |
| Figura 3. Incidência de mofo cinzento em morangos cv. San Andreas tratados com carreador lipídico nanoestruturado de OE de alecrim-óleo de côco a 0,5% por aspersão (CLNA), por imersão (CLNI) e por volatilização (CLNV), suas respectivas testemunhas (TA, TI e TV)) e controle (CO) sem nenhuma forma de aplicação, em diferentes tempos de avaliação. Letras indicam diferença significativa entre tratamentos no tempo (Tukey, $p < 0,05$). | 38 |
| Figura 4. Incidência de mofo cinzento em morangos cv. San Andreas tratados com nanoemulsão de OE de alecrim-água a 0,5% por aspersão (NEA), por imersão (NEI) e por volatilização (NEV) e suas respectivas testemunhas (TA, TI e TV), em diferentes tempos de avaliação. Letras indicam diferença significativa entre tratamentos no tempo (Tukey, $p < 0,05$). | 39 |
| Figura 5. Incidência de mofo cinzento em morangos cv. San Andreas tratados com nanocápsula de OE de alecrim-quitosana a 0,5% por aspersão (NCA), por imersão (NCI) e por volatilização (NCV), suas respectivas testemunhas (TA, TI e TV) sem nenhuma forma de aplicação, em diferentes tempos de avaliação. Letras indicam diferença significativa entre tratamentos no tempo (Tukey, $p < 0,05$). | 40 |
| Figura 6. Incidência de mofo cinzento em morangos cv. San Andreas tratados com nanoemulsão de óleo essencial de alecrim-água (NE) carreador lipídico nanoestruturado de óleo essencial de alecrim-óleo de côco (CLN) e nanocápsula de OE de alecrim-quitosana (NC) a 1% e água por imersão, em diferentes tempos de avaliação. Letras indicam diferença significativa entre tratamentos no tempo (Tukey, $p < 0,05$). | 41 |
| Figura 7. Incidência de mofo cinzento em morangos cv. San Andreas tratados com nanoemulsão de óleo essencial de alecrim-água (NE), carreador lipídico nanoestruturado de óleo essencial de alecrim-óleo de côco (CLN) e nanocápsula de OE de alecrim-quitosana (NC) a 1% e água por aspersão, em diferentes tempos de avaliação. Letras indicam diferença significativa entre tratamentos no tempo (Tukey, $p < 0,05$). | 41 |
| Figura 8. Avaliação de incidência de mofo cinzento em morangos cv. San Andreas tratados com nanoemulsão de óleo essencial de alecrim-água (NE) carreador lipídico nanoestruturado de óleo essencial de alecrim-óleo de côco (CLN) e nanocápsula de OE de alecrim-quitosana | |

(NC) a 2% e água por imersão (..I) e por aspersão (..A), em diferentes tempos de avaliação. Letras indicam diferença significativa entre tratamentos no tempo (Tukey, $p < 0,05$)..... 42

Figura 9. Avaliação de severidade de mofo cinzento em morangos cv. San Andreas tratados com nanoemulsão de óleo essencial de alecrim-água (NE), carreador lipídico nanoestruturado de óleo essencial de alecrim-óleo de côco (CLN) e nanocápsula de OE de alecrim-quitosana (NC) a 2% e água por imersão (..I) e por aspersão (..A), em diferentes tempos de avaliação. Letras indicam diferença significativa entre tratamentos no tempo (Tukey, $p < 0,05$)..... 43

Figura 10. Regressão referente a porcentagem de germinação de esporos de *Botrytis cinerea* em contato com diferentes nanoformulações: nanoemulsão (NE), carreador lipídico nanoestruturado (CLN) e Nanocápsula (NC) de óleo essencial de alecrim, em diferentes concentrações de cada formulação (0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1%)..... 46

Figura 11. Diâmetro de crescimento micelial de *Botrytis cinerea* em contato com diferentes nanoformulações: nanoemulsão (NE), carreador lipídico nanoestruturado (CLN) e Nanocápsula (NC) de óleo essencial de alecrim, em diferentes concentrações de cada formulação (0; 0,5; e 1%) ao longo de 6 dias de avaliação. Letras indicam diferença significativa entre tratamentos no tempo (Tukey, $p < 0,05$)..... 47

Figura 12. Efeito de nanoemulsão (NE), carreador lipídico nanoestruturado (CLN) e nanocápsula (NC) de óleo essencial de alecrim a 2% na integridade de parede celular do *Botrytis cinerea* sob diferentes tempos de exposição. A quantidade de asteriscos indica diferença significativa entre tratamentos no tempo (Tukey, $p < 0,05$)..... 48

Figura 13. Efeito de nanoemulsão (NE), carreador lipídico nanoestruturado (CLN) e nanocápsula (NC) de óleo essencial de alecrim a 2% na integridade de membrana plasmática do *Botrytis cinerea* sob diferentes tempos de exposição. Letras indicam diferença significativa entre tratamentos no tempo (Tukey, $p < 0,05$). 48

Figura 14. Efeito de nanoemulsão (NE), carreador lipídico nanoestruturado (CLN) e nanocápsula (NC) de óleo essencial de alecrim a 2% na liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) do *Botrytis cinerea* sob diferentes tempos de exposição. Letras indicam diferença significativa entre tratamentos no tempo (Tukey, $p < 0,05$)..... 49

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Caracterização da nanoemulsão (NE), carreador lipídico nanoestruturado (CLN) e nanocápsula de quitosana (NC) no dia da sua formulação (dia 0) e no último dia de avaliação a 40°C (dia 60) quanto a tamanho de partículas (nm), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (+/-) e pH..... | 37 |
| Tabela 2. Médias de perda de massa em morangos cv. San Andreas tratados com nanoemulsão (NE.), carreador nanoestruturado (CLN.) e nanocápsula (NC.) de óleo essencial de alecrim a 2% por imersão (..I) e por aspersão (..A) durante seis dias após o tratamento (DAT)..... | 44 |
| Tabela 3. Médias de sólidos solúveis totais (SST) em morangos cv. San Andreas tratados com nanoemulsão (NE.), carreador lipídico nanoestruturado (CLN.) e nanocápsula (NC.) de óleo essencial de alecrim a 2% por imersão (..I) e por aspersão (..A) durante seis dias após o tratamento (DAT). | 44 |
| Tabela 4. Médias de acidez titulável total (ATT) em morangos cv. San Andreas tratados com nanoemulsão (NE.), carreador lipídico nanoestruturado (CLN.) e nanocápsula (NC.) de óleo essencial de alecrim a 2% por imersão (..I) e por aspersão (..A) durante seis dias após o tratamento (DAT). | 45 |
| Tabela 5. Médias de pH em morangos cv. San Andreas tratados com nanoemulsão (NE.), carreador lipídico nanoestruturado (CLN.) e nanocápsula (NC.) de óleo essencial de alecrim a 2% por imersão (..I) e por aspersão (..A) durante seis dias após o tratamento (DAT)..... | 45 |
| Tabela 6. Médias de antocianinas em morangos cv. San Andreas tratados com nanoemulsão (NE.), carreador lipídico nanoestruturado (CLN.) e nanocápsula (NC.) de óleo essencial de alecrim a 2% por imersão (..I) e por aspersão (..A) durante seis dias após o tratamento (DAT). | 45 |
| Tabela 7. Médias de ácido ascórbico em morangos cv. San Andreas tratados com nanoemulsão (NE.), carreador lipídico nanoestruturado (CLN.) e nanocápsula (NC.) de óleo essencial de alecrim a 2% por imersão (..I) e por aspersão (..A) durante seis dias após o tratamento (DAT). | 46 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- ASE – Área superficial específica;
- BDA – Batata dextrose ágar;
- CCA – Centro de Ciências Agrárias;
- CLN – Carreador Lipídico Nanoestruturado;
- DAR – Dias após a repicagem;
- DAT – Dias após o tratamento;
- DCFI – 2,6-diclorofenol indofenol;
- EROs – Espécies reativas de oxigênio;
- FDA – Federal drug administration;
- GRAS – Generally regarded as safe;
- HCl – Ácido clorídrico;
- LABFITOP – Laboratório de Fitopatologia
- MAPA – Ministério da Agricultura e Pecuária;
- NANOBIOMAT – Laboratório de liberação de nanofibras bioativas de compostos naturais;
- NC – Nanocápsula
- NE – Nanoemulsão
- OE – Óleo essencial;
- PET – Polietileno de tereftalato;
- PDI – Índice de polidispersão;
- RPM – Rotações por minuto;
- UFR – Unidade de fluorescência relativa;
- UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina.

Sumário

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA..... | 14 |
| 2. OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 17 |
| 2.2 Objetivos específicos | 17 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 18 |
| 3.1 Cultura do morango | 18 |
| 3.2 Podridão cinzenta do morango | 20 |
| 3.3 Controle alternativo..... | 22 |
| 3.3.1 Óleos essenciais | 22 |
| 3.3.2 Quitosana | 23 |
| 3.3.3 Nanopartículas..... | 24 |
| 3.3.4 Nanopartículas na agricultura | 26 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 28 |
| 4.1 Obtenção de material vegetal..... | 28 |
| 4.2 Obtenção do fitopatógeno | 28 |
| 4.3 Obtenção e caracterização dos sistemas nanoestruturados | 28 |
| 4.3.1 pH, tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão..... | 29 |
| 4.3.2 Avaliação de estabilidade da nanopartícula | 29 |
| 4.4 Efeito das nanoformulações na incidência e severidade de <i>Botrytis cinerea</i> | 30 |
| 4.5 Análises físico-químicas..... | 31 |
| 4.5.1 Perda de massa | 31 |
| 4.5.2 Sólidos solúveis totais (SST) | 32 |
| 4.5.3 pH..... | 32 |
| 4.5.4 Acidez titulável (AT) | 32 |
| 4.5.5 Ácido ascórbico (Vitamina C) | 32 |
| 4.5.6 Antocianinas | 33 |

| | |
|---|----|
| 4.6 Efeito das nanopartículas <i>in vitro</i> contra o <i>Botrytis cinerea</i> | 33 |
| 4.6.1 Efeito sobre a germinação de esporos | 34 |
| 4.6.2 Efeito dos produtos sobre o crescimento micelial | 34 |
| 4.7 Mecanismo de ação das nanoformulações contra o <i>Botrytis cinerea</i> | 34 |
| 4.7.1 Integridade da parede celular | 35 |
| 4.7.2 Integridade e danos na membrana | 35 |
| 4.7.3 Acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) | 35 |
| 4.8 Análises estatísticas | 36 |
| 5. RESULTADOS | 37 |
| 5.1 Obtenção e caracterização das nanoformulações | 37 |
| 5.2 Efeito das nanoformulações na incidência e severidade de <i>Botrytis cinerea</i> em morangos..... | 37 |
| 5.3 Análises físico-químicas..... | 43 |
| 5.4 Ensaios de inibição de germinação e de crescimento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> .. | 46 |
| 5.5 Mecanismo de ação das nanopartículas contra o <i>B. cinerea</i> | 47 |
| 6. DISCUSSÃO | 50 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 58 |
| 8. REFERÊNCIAS | 59 |

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) é um pseudofruto carnoso originado do receptáculo floral, suculento e rico em vitamina C (CHITARRA; CHITARRA, 2005; GARGARO, 2009). A produção mundial deste fruto ultrapassou 8,8 milhões de toneladas em 2020 (FAOSTAT, 2020), sendo Minas Gerais o principal produtor brasileiro, com produção de aproximadamente 120 mil toneladas (FAOSTAT, 2020, ANTUNES et al., 2019). A cultura apresenta alguns problemas na sua fase pós-colheita, devido a sua fragilidade, mostrando-se suscetível a lesões e ao ataque de patógenos, como *Botrytis cinerea*, que pode levar a altas perdas de produtividade (WASHINGTON et al., 1999; PETRASCH et al., 2019).

A podridão cinzenta, causada por *Botrytis cinerea*, pode afetar a parte vegetativa, mas os danos maiores ocorrem nos frutos, onde aparecem inicialmente lesões castanhas e circulares, evoluindo para um mofo esbranquiçado, que ao esporular torna-se acinzentado. O fungo pode penetrar não apenas na presença de ferimentos, mas também pode se manter de forma quiescente, isto é, pode infectar os frutos ainda durante o cultivo, manifestando os sintomas apenas nos períodos de transporte e armazenamento (KIMATI, 2005).

Atualmente são utilizados fungicidas para controlar essa doença em morango (SFAGRO, 2017; BRASIL, 2018). De acordo com as pesquisas realizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2016), no Brasil, o morango está entre os líderes no ranking de alimentos com maior percentual de resíduos de agrotóxicos após a colheita, ficando atrás apenas do pimentão. Além do efeito negativo sobre a saúde humana e o ambiente, o uso destes fungicidas leva à seleção de isolados resistentes dos fitopatógenos, acarretando na inefetividade dos produtos, tornando-se necessário o aumento das doses. Desta forma, deve-se intensificar a busca por alternativas de controle (FILLINGER; ELAD, 2016), como os óleos essenciais, quitosanas e seus nanoencapsulados.

Os óleos essenciais são produtos originários do metabolismo secundário de plantas, presentes em todos os órgãos vegetais. São utilizados atualmente na indústria medicinal e de cosméticos. Possuem maior atividade antimicrobiana através de seus compostos voláteis, constituintes majoritários dos óleos (MAGGIO; ROSSELLI; BRUNO, 2016; GONZALES-MAS et al., 2019), dando-se destaque para aqueles da família dos terpenos, pinenos e o 1,8-cineol (PORTE; GODOY, 2001). O óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), considerado seguro para a alimentação humana (GRAS) quanto a sua toxicidade (FDA, 2018), possui atividade antimicrobiana bem descrita para uma gama de fitopatógenos, principalmente os que prevalecem em pós-colheita, como o *B. cinerea* e o *Colletotrichum* sp. (PORTE;

GODOY, 2001; BARRERA-NECHA et al., 2008; SOYLU; KURT; SOYLU, 2010; SERVILI; FELIZIANI; ROMANAZZI, 2017).

A quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação da quitina, presente na carapaça de crustáceos. É um produto biodegradável e de baixa toxicidade para seres humanos, e não apresenta problemas para o ambiente. Acredita-se que seu efeito possa ser exercido pelas cargas negativas oriundas da desacetilação que reagem com as cargas presentes na membrana plasmática das células fúngicas (TAKETA et al., 2018). A quitosana também pode atuar como indutor de resistência, variando conforme o seu nível de desacetilação (JAIL et al., 2014; NOSHIRVANI et al., 2017).

A nanotecnologia surge como uma ferramenta para carregar e proteger produtos de forma controlada (MAZZARINO et al., 2017). As suspensões de nanopartículas são emulsões com partículas de tamanho nano, formadas através da dispersão de líquidos, como óleo ou água, em suspensões de natureza oposta, com o auxílio de surfactantes e quebra mecânica através de aparelhos de alta pressão. (SUTRADHAR; AMIN, 2013; ALOUI et al., 2014; CHRISTOFOLI et al., 2015; NURUZZAMAN et al., 2016). As nanopartículas devem apresentar diâmetro entre 50 e 200 nm (WAN et al., 2019), resultantes da quebra de seus constituintes com o auxílio de surfactantes (Tween, Triton, DMSO) e força mecânica (ultraturrax, ultrassom, homogenizador de alta pressão), permitindo que o agente encapsulante, consiga envolver as partículas do produto de interesse (TADROS et al., 2004; SUTRADHAR; AMIN, 2013; ALOUI et al., 2014; MUNHUWEYI et al., 2017; RIBES et al., 2018; ZHANG; MCCLEMENTS, 2018). Estes produtos de tamanho menor, por possuírem uma menor área superficial específica (ASE), são capazes de penetrar na parede celular dos patógenos, além de reduzirem a degradação dos agentes utilizados (MCCLEMENTS; DECKER, 2000; TADROS et al., 2004; FENG et al., 2016). Essas nanopartículas possuem diferentes nomenclaturas de acordo com os produtos utilizados para encapsular o produto de interesse. Nanoemulsão, nanocápsula e carreador lipídico nanoestruturado são as suspensões formadas a partir do envolvimento do óleo essencial por água, quitosana e lipídios, respectivamente (CHRISTOFOLI et al., 2015; NURUZZAMAN et al., 2016; NAKASATO et al., 2017; ZHANG; MCCLEMENTS, 2018; MARZUKI; WAHAB; HAMID, 2019).

A combinação do uso de ingredientes ativos com diferentes mecanismos de ação, através do preparo de suspensões de nanopartículas, tem como objetivo o aumento da eficiência de proteção contra a podridão cinzenta, colocando-se como uma alternativa aos métodos atualmente empregados na cadeia produtiva do morango (TADROS et al., 2004; ALOUI et al., 2014; KAH; HOFMANN, 2014; RIBES et al., 2018; WAN et al., 2019).

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do óleo essencial de alecrim em três sistemas nanoestruturados, sob diferentes formas de aplicação contra o *B. cinerea in vitro* e *in vivo*, no controle da podridão cinzenta e seus efeitos nas qualidades físico-químicas de frutos de morangueiro.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar as nanopartículas de óleo essencial de alecrim e avaliar seu efeito sobre o fitopatógeno *B. cinerea* e no controle da podridão cinzenta em frutos de morangueiro.

2.2 Objetivos específicos

- Encontrar a formulação mais eficiente e estável de encapsulamento do óleo essencial de alecrim;
- Avaliar o efeito de concentrações da nanopartícula sobre a germinação de esporos e crescimento micelial, além de verificar como afeta a integridade da parede celular e membrana plasmática de *B. cinerea*;
- Analisar o nível de controle exercido pela suspensão de nanopartícula sobre a podridão cinzenta e determinar seu efeito nas qualidades físico-químicas em bioensaios realizados de frutos de morangueiro;
- Caracterizar 3 diferentes sistemas nanoestruturados: nanoemulsão, sistema carreador lipídico nanoestruturado e nanocápsula, quanto a tamanho de partícula, pH, índice de polidispersão e potencial zeta;
- Verificar a estabilidade de nanopartículas contendo óleo essencial de alecrim durante 2 meses, sob diferentes condições de armazenamento;
- Investigar a melhor forma de aplicação das nanopartículas para o controle da podridão cinzenta do morangueiro.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cultura do morango

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) é um pseudofruto oriundo de planta herbácea, porte rasteiro e perene, mas que é usualmente plantado como anual (FILGUEIRA, 2007). Possui pseudofrutos carnosos originados do receptáculo, tendo como frutos verdadeiros os pequenos aquênios, que carregam as sementes, sendo uma cultura de alto valor nutritivo, suculento e rico em vitamina C (CHITARRA; CHITARRA, 2005; GARGARO, 2009). Pode ser propagado por sementes, mas comumente sua reprodução é feita através da emissão de estolões (SANHUEZA et al., 2005).

As cultivares são diferenciadas principalmente pelo fotoperíodo, podendo ser de dias curtos, neutros ou longos (DIEL et al., 2017), mas também é levado em conta a produtividade, qualidade e distribuição de produção ao longo do ciclo. No Brasil, há um predomínio de cultivares de dias curtos, mas atualmente vem sendo utilizadas também plantas de dias neutros, buscando estender a colheita até os meses de fevereiro (Dias et al., 2014). As cultivares de dias curtos mais plantadas no Brasil são Oso Grande, Camarosa, Camino Real, Festival; enquanto que para as de dias neutros, temos Albion, San Andreas, Monterrey, Portola, Aromas, Cristal como as mais cultivadas (VIDAL; SANTOS, 2017).

Compostos antioxidantes, vitamina C e compostos fenólicos são altamente recomendados para o consumo humano e as diversas variedades existentes de morango são ricas nestes nutrientes e como é um fruto de boa aceitação de mercado, torna-se importantíssimo nas dietas diárias, devido ao seu amplo espectro de benefícios. Dentre os compostos fenólicos, destacam-se as antocianinas, que além de conferir a coloração ao fruto, possuem alta atividade antioxidante, e os derivados de ácido elágico, um dos compostos majoritários do morango, que possui alta atividade antimicrobiana e também possui atividade contra espécies reativas de oxigênio, demonstrando sua ação antioxidante (PINTO, 2008).

A maior parte da produção acontece através do cultivo protegido (ANTUNES, 2013) e a colheita ocorre cerca de 60 a 80 dias após o plantio, para cultivares de dias curtos e de dias neutros (DIEL et al., 2017), geralmente com produção anual, com a retirada das plantas e a inserção de novas mudas de ano a ano. A colheita deve ser feita com cuidado, pois os frutos são frágeis e deve ocorrer nas horas mais frescas do dia. Estes devem ter sua maturidade observada e ser colhidos conforme seu destino, seja para consumo *in natura* (mais doces) ou para a indústria (mais ácidos) (DIEL et al., 2017), necessitando de refrigeração imediata para serem transportados e armazenados (GALEGÁRIO et al., 2005).

A cor vermelha do fruto, que o torna atrativo, é oriunda das ligações entre açúcares e antocianinas presentes em sua composição, fatores também importantes para se avaliar a maturidade do fruto (PINTO; LAJOLO; GENOVESE, 2008). Os fatores de influência no conteúdo desses compostos, bem como sobre a cor do fruto, estão relacionados, principalmente, as condições de cultivo. Além das questões genéticas da planta, deve-se levar em conta as condições de fotoperíodo, umidade relativa do ar e, principalmente, temperatura (SERÇE; HANCOCK, 2005). Baixas temperaturas são necessárias para a indução de floração, enquanto temperaturas mais elevadas, acima de 32°C, podem promover o aborto da floração (DIEL et al., 2017). Os frutos são comercializados *in natura*, congelados ou como polpa desidratada. No panorama mundial, alcançou-se aproximadamente 8,8 milhões de toneladas de frutos produzidos (FAOSTAT, 2020), com os Estados Unidos dominando o comércio, tendo pouco mais de 1.400.000 toneladas anuais, seguido por China, Japão e Espanha, segundo a FAOSTAT (2016), junto a outros nove países, que detém cerca de 85% da produção mundial, totalizando pouco mais de 4,5 milhões de toneladas anuais (PLUBEE, 2013).

No Brasil, a produção total foi de 218 mil toneladas (FAOSTAT, 2020). Os estados produtores incluem São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Espírito Santo e Distrito Federal. Destaca-se o estado de Minas Gerais, com produção próxima a 120 mil toneladas, tendo como destaque os municípios de Pouso Alegre (38.111 t), Bom Repouso (15.444 t), Estiva (8.241 t), Bueno Brandão (8.216 t), e Senador Amaral (6.069 t) (IBGE, 2017). Os períodos de maior produção ocorrem entre agosto e setembro, apresentando a partir destas datas preços mais elevados (REISSER JUNIOR et al., 2015; ANTUNES et al., 2019).

Em Santa Catarina, 5484 toneladas foram produzidas em 2017. Pode-se destacar a produção por parte de pequenos produtores, principalmente da região de Rancho Queimado, sendo o principal município produtor, além de Angelina, Águas Mornas, também mais ao sul com Criciúma e Içara e na serra com Lages, São Joaquim e Fraiburgo (IBGE, 2017).

O grande entrave da cultura está principalmente no pós-colheita, nos processos de colheita, transporte e armazenamento, quando os frutos, pequenos e frágeis, são muito suscetíveis a lesões. Mesmo com todo o cuidado, estes acabam por receber ferimentos, tornando-se mais expostos a doenças. Dentre as causas de perdas em pós-colheita, destaca-se o ataque de fungos fitopatogênicos, como *B. cinerea*, agente causal da podridão cinzenta, que junto com *Rhizopus stolonifer* causam as maiores perdas na cultura (WASHINGTON et al., 1999; PETRASCH et al., 2019).

3.2 Podridão cinzenta do morango

O fungo *Botrytis cinerea* é o causador da doença conhecida como podridão cinzenta, a doença que mais acomete frutos de morango em pós-colheita (PETRASCH et al., 2019) e também conhecido como o segundo fitopatógeno mais importante nas doenças pré e pós colheita quanto à deterioração e qualidade do fruto em casa de vegetação, campo aberto e armazenamento (ABUQAMAR; MOUSTAFA; TRAN, 2017). Este patógeno pode atacar uma vasta gama de hospedeiros de importância econômica, atingindo frutíferas, oleráceas e ornamentais, como: tomate, pimentão, alface, morango, cebola, uva, maçã, tulipa, entre outros, causando prejuízos estéticos, quantitativos e qualitativos (TOFOLI et al., 2011).

B. cinerea está classificado na ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae (AGRIOS, 2005). É um fungo necrotrófico que atinge diversos órgãos da planta, em especial, a parte peduncular e os frutos, sendo responsável por grandes danos e perda econômica. É composto por hifas e conidióforos com conídios ovoides e acinzentados no ápice. Esses esporos podem ser disseminados sob condições de alta umidade e vento. Os conídios depositados sobre a superfície dos órgãos vegetais se aderem e emitem um tubo germinativo que penetra a cutícula do hospedeiro, levando à formação do apressório. Após a infecção, o patógeno pode permanecer de forma quiescente entre as células do hospedeiro, que se trata do estabelecimento do patógeno no interior das células até que as defesas do hospedeiro estejam enfraquecidas e o fungo consiga retomar seu desenvolvimento, resultando em lesão e apodrecimento do órgão infectado, com consequente esporulação do fungo. Este tipo de infecção geralmente ocorre no campo, mas tem sua manifestação apenas nas etapas de pós-colheita. Em um hospedeiro já em estado de maturidade ideal, com suas defesas menos ativas, o patógeno pode concluir seu ciclo de infecção, colonização e disseminação sem período de quiescência ainda no campo (VAN KAN, 2005; TOFOLI et al, 2011). O patógeno pode também produzir escleródios, que permanecem por muito tempo no solo, sendo o mecanismo de resistência mais longo deste fungo e também, sob condições ideais, pode produzir apotécios, dando origem aos ascósporos (TOFOLI et al, 2011).

Nos frutos, os sintomas iniciais são lesões castanhas e úmidas, seguido de desenvolvimento micelial branco e esporulação acinzentada, dando significado ao nome pelo qual é conhecida a doença. Nos folíolos e em outros órgãos da planta, áreas nas quais é menos impactante, seus sintomas podem ser de manchas anelares, enquanto nos caules, as lesões apresentam coloração bege ou castanha, dando características de cancro (KIMATI, 2005).

O patógeno produz um elevado número de esporos, que se disseminam através do vento e, ao entrar em contato com qualquer órgão da planta, inicia seu processo de penetração e

colonização. O fungo coloniza o tecido vegetal intra e intercelularmente, provocando a degradação e consequente desintegração do interior da planta, levando ao apodrecimento total do tecido. O *Botrytis* se manifesta mais em pós-colheita, devido às defesas estruturais naturais dos órgãos reprodutivos serem menos eficazes, uma vez que suas paredes são menos espessas, possuem mais açúcares disponíveis e os compostos fenólicos tendem a estar mais degradados. A estes fatos se atribui o caráter quiescente do patógeno, que pode penetrar na planta ainda no período vegetativo, não só por lesões, mas também por aberturas naturais, e manifestar seus sintomas apenas no fruto maduro, geralmente durante transporte e armazenamento. Além disso, possui capacidade de formar escleródios, permanecendo nos solos por muitos anos, e mantendo também atividade saprofítica, sobrevivendo em tecidos senescentes da cultura (KIMATI, 2005).

O manejo desta doença é feito geralmente com a aplicação de diversos métodos, desde a produção até o pós-colheita. No controle da podridão, os ingredientes ativos mais utilizados são: boscalida, iprodiona + pirimetanil, pirimetanil, procimidona, iprodiona e tiofanato-metílico, com o patógeno já apresentando certa resistência aos três últimos (SFAGRO, 2017). Com base nesses ingredientes ativos, são utilizados principalmente os fungicidas: Cantus, Cercobin 700 WP, Certus, Collis, Meltitiofan, Mythos, Rovral SC, Sialex 500, Sonata, Sumilex 500 WP, Timorex Gold, Topsin 500 SC e Topsin 700, estando todos registrados no AGROFIT e vinculados ao MAPA (BRASIL, 2018). Além dos fungicidas, também é estudado o uso de agentes de controle biológico, como o *Gliocladium roseum* (SIMON; MENEGUZZO; CALGARO, 2005). Sabe-se do efeito negativo dos agrotóxicos na saúde humana, existindo um interesse cada vez maior na busca de medidas alternativas viáveis que possam reduzir esses danos (FILLINGER; ELAD, 2016). Além dos efeitos sobre o ambiente, especula-se que há um gasto enorme com fungicidas sintéticos, podendo atingir 500 milhões de euros, representando cerca de 10% dos custos de fungicidas totais (DEAN et al., 2012).

Como é uma doença de extrema agressividade após sua infecção, torna-se ainda mais importante os cuidados durante a condução dos morangueiros, através de práticas culturais ainda no campo para que se evite a chegada deste patógeno. Evitar que sejam acometidos durante seu cultivo reduz drasticamente as perdas tanto no campo quanto no pós-colheita, uma vez que podem ser infectados ainda no pé, mas ter a manifestação de sintomas apenas no pós-colheita, devido ao caráter quiescente que a infecção pode ter. O principal método adotado, além do uso de fungicidas, é a utilização de mudas saudáveis. O sistema de plantio utilizado também auxilia na prevenção da entrada do patógeno, buscando evitar métodos de plantio em que os frutos permaneçam em contato com o solo enquanto amadurecem, com a adoção de

técnicas de plantio suspenso, utilização de lonas plásticas no solo, quando conduzidas ao chão e utilização de sistema hidropônico. O uso de túneis, cobertos com plástico sobre os canteiros, bem como o cultivo em casa de vegetação, também ajudam na prevenção, impedindo o deslocamento e a entrada de conídios pelo vento. A escolha dos cultivares é um método que visa buscar plantas que possuam mais resistência ao patógeno, embora haja dificuldade de se encontrar plantas totalmente resistentes a podridões pós-colheita. Apesar de ser uma planta perene, o cultivo do morangueiro como anual também atua como uma forma de manejo da doença, permitindo a sua rotação com outras culturas, diminuindo o inóculo na área. A retirada de restos culturais após o fim da safra e o manejo de retirada de folhas e outros órgãos que apresentem sintomas da doença, também são métodos utilizados para dificultar a permanência de inóculo na área. Cuidados com a limpeza de equipamentos e qualidade de água de irrigação, espaçamento entre plantas e nutrição, também são importantes. Durante a colheita, cuidados devem ser tomados para não se danificar e causar lesões nos frutos, que devem ser imediatamente refrigerados após a colheita e durante o transporte, evitando que se tornem ainda mais suscetíveis ao ataque de patógenos (SIMON; MENEGUZZO; CALGARO, 2005; KIMATI, 2005; BALBINO, 2006).

3.3 Controle alternativo

3.3.1 Óleos essenciais

Óleos essenciais são produtos extraídos de todos os órgãos de plantas, oriundos do metabolismo secundário. São conhecidos cerca de três mil óleos essenciais, muito utilizados na indústria medicinal e de cosméticos, principalmente na área da aromaterapia (ALI et al., 2015; WAN et al., 2019), e mais recentemente vem sendo empregados na indústria alimentícia devido a sua elevada atividade antimicrobiana (FU et al., 2007). Seus compostos são mais ativos na forma volátil, isto é, através da fase de vapor do produto (MIRESMAILLI; BRADBURY; ISMAN, 2006; SOYLU, KURT; SOYLU, 2010).

Ao longo da evolução humana, plantas aromáticas vêm sendo utilizadas como temperos, devido às suas características de conservação e de conferir sabor e odor. Mas apenas após a idade média, com a descoberta dos processos de destilação, começaram a ser utilizadas na indústria farmacêutica e, assim, foi descoberto seu potencial antimicrobiano, através da volatilização, em experimentos ocorridos no século XVIII (GOMES, 2003; TUREK; STINTZING, 2013).

Os óleos essenciais também exercem controle através de sua atividade antioxidante (OJEDA-SANA et al., 2013), por atuar sobre a síntese da parede celular do fungo (RASOOLI

et al., 2006), proporcionam a diminuição da germinação de esporos, redução no crescimento micelial e no alongamento do tubo germinativo, além de degradar as hifas, e suprimir a carga de esporos (SOYLU, KURT & SOYLU, 2010). A ação dos óleos essenciais se mostra efetiva devido às suas diferentes características constitutivas, dada a sua composição muito diversificada, com a presença de diversos compostos antimicrobianos conhecidos com modos de ação diferentes. Essa variação química, tanto em tipos de compostos quanto em quantidade deles em um óleo, irá determinar a intensidade de seu efeito. Compostos já bem conhecidos como os terpenos e terpenóides, carvacrol, além de outros compostos aromáticos, abrangem uma alta gama de alvos atingidos, visto que cada composto possui um modo de ação diferente, mas todos com seu melhor desempenho na fase de vapor (SOYLU, KURT; SOYLU, 2010; CABRAL et al., 2013).

O óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) é considerado seguro para a alimentação humana, conforme lista do FDA (2018) e se enquadra nos produtos conhecidos como *Generally Recognized As Safety* (GRAS). Este OE tem como compostos majoritários a canfora e o 1,8 cineol, mas também em quantidade relevante α e β pinenos, canfeno e terpineol, todos com ação antimicrobiana já descrita (BOUTEKEDJIRET et al., 2003; JIANG et al., 2011). Além disso, este óleo já foi descrito por suas atividades antifúngicas, contra *B. cinerea*, promovendo redução de incidência e severidade em uvas (SERVILI; FELIZIANI; ROMANAZZI, 2017), inibindo crescimento micelial de *C. gloeosporioides* na cultura do mamoeiro (BARRERA-NECHA et al., 2008) e contra *B. cinerea* em tomate (SOYLU; KURT; SOYLU, 2010).

3.3.2 Quitosana

Com o uso exacerbado de agrotóxicos, surge a necessidade de formas alternativas de controle de doenças, que afetem com menos intensidade o ambiente e o ser humano, utilizando-se de produtos que promovam efeitos similares sobre as doenças alvo, mas que sejam menos agressivos. Desta forma, buscam-se produtos oriundos de fontes naturais ou renováveis, como por exemplo a quitosana, que tem sua origem na carapaça de crustáceos e também na parede celular de fungos, possuindo baixa fitotoxicidade, baixa a moderada toxicidade ao ser humano e tem seu custo reduzido, já que pode ser obtida a partir da carapaça de crustáceos residual de restaurantes (PAULA JUNIOR et al., 2016; BARIKLOO; AHMADI, 2018).

A quitosana pode ser utilizada recobrando frutos, funcionando como um revestimento protetor para frutas e legumes processados, permitindo uma alteração nos níveis de trocas gasosas. Este modo de ação a torna importante na indústria de alimentos, sendo utilizada como

recobrimento biodegradável comestível, auxiliando na preservação de alimentos quanto a sua deterioração natural, bem como sua função de proteção contra o ataque de microrganismos causadores de podridões (CHEN et al., 2016; MUNHUWEYI et al., 2017). Esse emprego é devido às suas propriedades antifúngicas e antibacterianas, que podem ocorrer devido às suas cargas positivas que reagem com cargas negativas da membrana plasmática das células fúngicas, além de poderem atuar como elicitores na ativação das defesas vegetais (LOPES, 2011; NOSHIRVANI et al., 2017; TAKETA et al., 2018).

O efeito da quitosana muda conforme seu nível de desacetilação, que irá resultar em diferentes conformações da molécula, gerando diferença de densidade (JAIL et al., 2014). As quitosanas de alta densidade geralmente possuem efeito direto sobre o fitopatógeno, enquanto as de baixa densidade podem induzir resistência, promovendo a ação de mecanismos de defesa como a lignificação, síntese de calose, de fitoalexinas e peróxido de hidrogênio, entre outros (BERGER et al., 2011; JAIL et al., 2014).

Estudos na área agrícola apontam que a quitosana vem ganhando espaço devido a sua atividade antimicrobiana confirmada, como no atraso do crescimento micelial e diminuição de germinação através da alteração dos tubos germinativos em algumas espécies fitopatogênicas (LIU et al., 2007). Experimentos utilizando feijão comum inoculado com *C. lindemuthianum* demonstraram que a quitosana possui atividade antifúngica e também pode atuar como indutora de resistência neste patossistema (DI PIERO; GARDA, 2008). É reportado um efeito de controle de podridões de pós-colheita por ação da quitosana em morango (MIRANDA-CASTRO, 2016) e framboesa (JAQUELINE et al., 2014), além da manutenção de firmeza e dos índices de acidez titulável. Também é relatado o efeito do recobrimento de frutos por quitosana como um moderador de trocas gasosas, permitindo um armazenamento de frutas por mais tempo, por diminuir a atuação de etileno, oxigênio e aumentar o conteúdo interno de gás carbônico (LAZARIDOU; BILIADERIS, 2002).

3.3.3 Nanopartículas

A utilização de óleos essenciais, apesar de seu ótimo efeito antimicrobiano, possui alguns entraves, dependendo da sua forma de uso. Sua aplicação no campo é dificultada pela sua principal forma de ação, volatilidade, e também por possuir baixa solubilidade em água (SOYLU, KURT; SOYLU, 2010). Quanto ao pós-colheita, há a questão residual dos óleos essenciais, quanto a odor e sabor, além de poderem causar fitotoxidez aos frutos. Desta forma, faz-se necessária a busca por alternativas de exploração dos efeitos do óleo sem que estas promovam perdas em sua atividade ou mesmo tornem-se um problema para o produto final.

A nanotecnologia surge como opção de controle alternativo através da formulação de nanopartículas, como forma de mitigar as problemáticas do uso de óleos essenciais isoladamente (RIBES et al., 2018; WAN et al., 2019; TADROS et al., 2004; KAH; HOFMANN, 2014). De modo geral, as nanopartículas são obtidas a partir do recobrimento de um material em outro de composição diferente, através do uso de surfactantes e força mecânica para a quebra das partículas (SUTRADHAR; AMIN, 2013; NURUZZAMAN et al., 2016), como por exemplo as nanocápsulas, que consistem na combinação de dois produtos, por meio da quebra de suas partículas, visando permitir o encapsulamento de uma fração pela outra, podendo ser uma fração oleosa (óleo essencial) incorporada a uma fração polimérica aquosa (suspensão de quitosana), que irá atuar como revestimento (ALLOUI et al. 2014; MUNHUWEYI et al., 2017; FENG et al., 2016. OLIVEIRA, 2017). Para ser considerada uma nanoformulação, a suspensão deve possuir partículas com tamanho inferior a 200 nm (WAN et al., 2019), ocorrendo a incorporação de substâncias de características diferentes, podendo receber outras nomenclaturas também, como emulsão submicrometro, miniemulsões, emulsões ultrafinas, emulsóides, microemulsões instáveis, entre outros (TADROS et al., 2004; CHRISTOFOLI et al. 2015; FENG et al., 2016; PAVONI et al., 2020), de acordo com o tamanho de partículas obtido. Tadros et al. (2004) mostraram que o pequeno tamanho das gotículas permite uma redução de degradação química dos ingredientes ativos utilizados, assim como a manutenção do sistema disperso, além de conferir maior área superficial específica (ASE), permitindo uma maior capacidade de penetração nos microrganismos (MCCLEMENTS; DECKER, 2000; FENG et al., 2016; OLVEIRA, 2017; CHRISTOFOLI et al. 2015).

Dentre os materiais produzidos através da aplicação desse tipo de nanotecnologia, pode-se destacar: nanoemulsão; nanocápsula; e carreador lipídico nanoestruturado. As nanoemulsões consistem geralmente na combinação entre duas substâncias que não se misturam, onde uma substância oleosa é dispersa na forma de pequenas gotículas em outra substância líquida, ocorrendo de forma mais comum a emulsão de óleo em água (ZHANG; MCCLEMENTS, 2018; MARZUKI; WAHAB; HAMID, 2019). Quando um material polimérico é utilizado para revestir uma fase oleosa, a suspensão recebe o nome de nanocápsula, onde tanto o agente encapsulante quanto a matriz encapsulada podem possuir efeito antimicrobiano (CHRISTOFOLI et al., 2015; NURUZZAMAN et al., 2016). O carreador lipídico nanoestruturado possui sua diferença também no material de revestimento do conteúdo oleoso, sendo composta por produtos de origem lipídica, atuando apenas como veículo protetor do ingrediente ativo (NAKASATO et al., 2017; NURUZZAMAN et al., 2016).

O processo de preparo das suspensões de nanopartículas ocorre a partir da quebra das moléculas por processos mecânicos, como a utilização de ultraturrax (MUNHUWEYI et al. 2017), o uso de ultrassom, entre outros (TADROS et al., 2004; LUIZ et al., 2017), quando utilizados métodos de alta energia ou alta pressão (OLIVEIRA, 2017). No caso do primeiro aparelho citado, as misturas com os componentes aquoso, oleoso e surfactantes, são submetidas à trituração em agitação constante, com 15.000 a 20.000 rotações por minuto (rpm). Já para o ultrassom, o processo se baseia na redução da mistura através de sua condução por orifícios de diâmetro reduzido, submetido à pressão e levado até uma lâmina vibratória, que produz ondas ultrassônicas capazes de cortar as pequenas partículas em partículas ainda menores. Também podem ser utilizados homogenizadores de alta pressão que possuem pequenas microtubulações, nos quais as partículas da suspensão passam em ciclos de tempo e quebram-se em tamanhos menores que permitam um melhor englobamento dos materiais ali presentes (TADROS et al., 2004). Os métodos de baixa energia ou baixa pressão são realizados com a aplicação de surfactantes, que permitem a dissolução dos compostos oleosos na fase aquosa espontaneamente, sem a necessidade de quebra mecânica das partículas (OLIVEIRA, 2017).

3.3.4 Nanopartículas na agricultura

Sistemas nanoestruturados já são empregados na indústria farmacêutica, como descrito por Xu et al. (2018), que demonstraram que uma nanocápsula utilizando óleo essencial de cravo com quitosana e goma arábica inibiu *Escherichia coli*. Grillo, Rosa e Fraceto (2014) mostraram que nanocápsulas a base de poli caprolactona e quitosana apresentam-se como uma opção no envolvimento do herbicida *atrazine*, tornando-o mais efetivo ao longo do tempo, devido à eficiência de encapsulamento alcançada na formulação proposta. As formulações de nanocápsulas propostas por Oliveira et al., (2018), utilizando quitosana ou goma arábica, também foram eficientes no envolvimento de geraniol, um composto volátil presente em diversos óleos essenciais, possuindo uma boa eficiência de encapsulamento, além de apresentarem elevada atividade de atração de mosca branca, tornando-se uma potencial armadilha. Nakasato et al. (2017) testaram partículas carreadoras lipídicas nanoestruturadas na germinação e desenvolvimento de raiz e parte aérea de ervilha (*Pisum sativum*), milho (*Zea mays*) e nabo (*Brassica rapa*), apresentando melhores índices em ambos os parâmetros testados em comparação a nanopartículas de quitosana/tripolifosfato, bem como ausência de fitotoxicidade.

Estudos utilizando nanoemulsões contra patógenos em plantas ainda são escassos, visto que é uma tecnologia relativamente nova, mas vem crescendo, já que esta técnica possui um

ótimo potencial. Nanocápsulas de polissacarídeos de babosa (*aloe vera*) e óleos essenciais de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) ou palmarosa (*Cymbopogon martinii*) promoveram maiores reduções na severidade da mancha angular (*Xanthomonas fragariae*) em cultivares de morango em comparação aos agentes utilizados individualmente (LUIZ et al, 2017). Com ação direta em pós-colheita, Oliveira (2017) mostrou que o óleo essencial de cravo, quando aplicado em nanoemulsão utilizando Tween 80, controlou o patógeno *Glomerella cingulata*, agente causal de podridão de uvas. Ainda em pós-colheita, Zahid et a. (2012) demonstraram o efeito de proteção de banana e mamão contra antracnose, utilizando-se microcápsulas de quitosana. Nanocápsulas envolvendo quitosana e óleos essenciais de cravo, limão e orégano reduziram significativamente a severidade das três doenças avaliadas (*Botrytis* sp., *Penicillium* sp. e *Pileidiella granati*) em romã (MUNHUWEYI et al., 2017).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina (LABFITOP/CCA-UFSC) e no Laboratório NANOBIOMAT (*Bioactive Nanofibers for Natural Compounds Delivery Laboratory*) do Parque Universitário Cidade das Abelhas - UFSC. A condução dos experimentos ocorreu entre os meses de março de 2019 e novembro de 2021.

4.1 Obtenção de material vegetal

Os frutos de morango da variedade San Andreas foram utilizados, oriundos de uma propriedade da região de Águas Mornas-SC, localizado a latitude 27°45'18.3" ao sul 48°59'29.5" a oeste. A condução da cultura foi feita através de cultivo suspenso em estufas, com a colheita feita quando os frutos atingiram mais de 75% da superfície avermelhada. Após a colheita, os frutos foram levados a empresa Devile[®] que efetuou o transporte refrigerado até o Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias (CCA).

4.2 Obtenção do fitopatógeno

Foi utilizado em todos os experimentos o isolado de *Botrytis cinerea* obtido a partir de um fruto sintomático com podridão cinzenta, submetido aos Postulados de Koch, previamente visualizado microscopicamente e confirmado morfológicamente. O fungo foi mantido em conservação sob o método Castellani, método do papel filtro e em morangos.

Para preparar a suspensão de esporos, foi feita a raspagem do micélio contendo conídios do isolado fúngico. O material coletado foi adicionado à solução de dextrose a 2% (testes *in vitro*) ou água destilada (testes com frutos) e, após filtragem da suspensão em gaze foi quantificada em câmara de Neubauer, para o ajuste da concentração de esporos a 1×10^5 esporos.ml⁻¹ (Adaptado de DA ROCHA NETO et al., 2019).

4.3 Obtenção e caracterização dos sistemas nanoestruturados

O óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) fornecido pela empresa Destilaria Bauru[®] foi obtido através de destilação por arraste, enquanto a quitosana de alto grau de desacetilação e alta densidade, com 90% e 0,85 g/cm³, respectivamente, e o óleo de côco foram fornecidos pela empresa NanoScoping[®]. O óleo essencial de alecrim e a quitosana foram utilizados neste trabalho devido a bons resultados obtidos em experimentos prévios (em processo de publicação), enquanto o óleo de côco foi escolhido devido ao seu emprego já conhecido na área. A partir destes produtos foram preparadas três formulações de

nanopartículas: nanoemulsão, nanocápsula e carreador lipídico nanoestruturado, a partir do envolvimento do óleo essencial de alecrim por água, quitosana e óleo de côco, respectivamente.

As nanoformulações foram preparadas através do método de homogeneização por alta pressão (MAZZARINO et al., 2017). Para preparar cada formulação, o óleo essencial de alecrim foi adicionado a uma solução contendo Tween 20 a 0,1%, além dos produtos encapsulantes utilizados: água, quitosana e óleo de côco, para formar a nanoemulsão, a nanocápsula e a carreador lipídico nanoestruturado, respectivamente. Posteriormente foram submetidos a três ciclos a 500 bar de pressão, em homogenizador de alta pressão, para que ocorresse a quebra e conseqüente englobamento das partículas da suspensão. As nanoformulações resultantes possuíam 5% do OE de alecrim, mas para a realização dos ensaios foram realizadas diluições em água destilada estéril conforme cada experimento, sendo diluídas de 2,5 a 100 vezes, para se obter as diferentes concentrações que abrangeram de 2 a 0,05% do OE de alecrim presente na nanoformulação.

4.3.1 pH, tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão

A determinação de pH, tamanho de partícula e potencial zeta foi realizada logo após o preparo dos sistemas nanoestruturados, conforme adaptações das metodologias de Grillo, Rosa e Fraceto (2014) e Christofoli et al. (2015). O pH foi determinado com o auxílio de um pHmetro digital previamente calibrado em soluções tampão com pH 4,0 e 7,0. Para a obtenção do tamanho de partícula, do índice de polidispersão e do potencial zeta da suspensão de nanopartícula foi feita a diluição desta com água deionizada (1:100 v/v), em 25 ± 2 °C de temperatura e através de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e anemometria laser-doppler, com aparelho analisador de partícula Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

4.3.2 Avaliação de estabilidade da nanopartícula

A estabilidade dos sistemas nanoestruturados foi determinada de acordo com metodologia de Grillo, Rosa e Fraceto (2014) com adaptações, a partir da avaliação de diversos parâmetros físico-químicos ao longo do tempo, sob diferentes condições de temperatura com o objetivo de simular seu envelhecimento acelerado. Foram medidos o tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das nanoformulações ao longo de dois meses (aos 0, 15, 30, 45, 60 dias após o preparo), sob diferentes condições de temperatura (25°, 30° e 40°C) e no escuro.

4.4 Efeito das nanoformulações na incidência e severidade de *Botrytis cinerea*

No bioensaio *in vivo* foram utilizados morangos da cultivar San Andreas, submetidos a assepsia, utilizando álcool 70%, hipoclorito (0,5%) e água destilada estéril, todos por 20 segundos, e por fim, secos a temperatura ambiente. Os frutos foram colocados em caixas de plástico de polietileno de tereftalato (PET), com volume de aproximadamente 850 ml. Posteriormente estes morangos foram inoculados com alíquotas de 50 μ l de suspensão contendo 10^5 esporos. ml^{-1} de *B. cinerea*, depositadas sobre a superfície dos frutos sem ferimentos. Passadas duas horas, as suspensões de nanopartículas foram aplicadas através de aspersão, imersão por 5 segundos ou volatilização (através de sua deposição em tampa de microtubos), em concentrações de 2; 1; 0,5; 0,25; 0,1 e 0% do OE de alecrim na nanoformulação (originalmente com 5% do óleo essencial), para determinar a melhor forma de aplicação. A testemunha foi composta por morangos inoculados onde água destilada estéril foi aplicada nas três formas supracitadas. Foram realizadas 5 repetições por tratamento, e a unidade experimental foi constituída por uma caixa com 10 a 15 frutos, de acordo com o experimento (figura 1).



Figura 1. Disposição da unidade experimental.

Fonte: Acervo pessoal.

Os frutos foram incubados em local escuro, com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A avaliação foi realizada a cada dois dias, a partir da identificação de sintomas de podridão cinzenta, sendo considerada a incidência da caixa em porcentagem, relativa ao número de morangos sintomáticos, enquanto para a severidade, foi aferida visualmente a porcentagem de superfície do fruto tomada pela doença, como demonstrado na figura 2.



Figura 2. Representação visual de severidade para 0 e 100% de podridão cinzenta em morangos tratados.

4.5 Análises físico-químicas

Os sistemas nanoestruturados na dose e modo de aplicação que resultaram em maior redução de podridão nos ensaios prévios foram avaliados quanto a sua influência sobre os atributos físico-químicos dos morangos. Para tal, frutos previamente desinfestados foram submetidos à nanoemulsão, à nanocápsula e o carreador lipídico nanoestruturado a 2% ou água destilada estéril (controle), aplicados por imersão ou aspersão, realizando-se seis repetições por tratamento, constituídas por caixas de plástico PET de 1L contendo 12 frutos cada. Cada caixa representou uma unidade experimental. Os morangos tratados foram incubados no escuro a $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, com quatro frutos por repetição retirados aos 2, 4 e 6 dias após o tratamento. Foram utilizados 4 lotes de 5 frutos para caracterização inicial (padrão), para possibilitar a comparação entre o dia inicial do tratamento e os dias de avaliação.

4.5.1 Perda de massa

Para a avaliação de perda de massa dos frutos foi realizada a pesagem dos morangos antes da aplicação dos produtos e após as datas de coleta, com o auxílio de balança semi-analítica. A diferença de medidas entre estes dois momentos foi considerada como a perda de massa. Os resultados foram expressos em porcentagem.

4.5.2 Sólidos solúveis totais (SST)

Para as análises de sólidos solúveis totais, os frutos foram macerados com água destilada estéril, na proporção de 1:1 (m/v). Uma alíquota da amostra macerada foi depositada em refratômetro óptico, com a leitura dos açúcares presentes na solução em ° Brix (DHITAL et al., 2018).

4.5.3 pH

Os valores de pH foram obtidos com o auxílio de pHmetro eletrônico previamente calibrado em soluções tampão com pH 4,0 e 7,0 (DHITAL et al., 2018).

4.5.4 Acidez titulável (AT)

Os mesmos macerados utilizados para as análises de SST foram diluídos dez vezes com água destilada, adicionando-se 0,1% de fenolftaleína, para corar a amostra e permitir a verificação visual do seu ponto de virada. Com o auxílio de uma bureta analítica e pHmetro, foi adicionado NaOH 0,1 N até ocorrer a mudança de coloração da amostra e esta atingir o pH 8,1. Os valores encontrados com a titulação de NaOH foram anotados e aplicados na seguinte fórmula para a quantificação de acidez titulável total nas amostras de morango:

$$mg \text{ de ácido cítrico} | 100 \text{ g de amostra} = \frac{ml \text{ de NaOH} * f * 0,1 * eqg * 100}{massa \text{ da amostra} * 1000}$$

Onde:

ml de NaOH = volume da base titulada;

f = fator de correção da solução de NaOH;

0,1 = concentração da solução de NaOH;

eqg = equivalente em gramas do ácido predominante na amostra analisada;

m = massa ou volume da amostra titulada na titulação.

Todos os resultados encontrados foram submetidos as fórmulas e os valores encontrados foram expressos em g de ácido cítrico/100g de polpa (adaptado de MAZARO et al., 2008; VILAPLANA; PÉREZ-REVELO; VALENCIA-CHAMORRO, 2018).

4.5.5 Ácido ascórbico (Vitamina C)

O ácido ascórbico foi determinado a partir do método de Tilmans, descrito por Zenebon, Pascuet e Tiglea (2008). Para a quantificação, foi adicionado o corante 2,6-diclorofenol indofenol (DCFI) em uma solução de ácido ascórbico 1%. A coloração do DCFI muda conforme o nível de acidez e o ponto final da titulação foi aferido conforme o ponto visual de virada da solução, de incolor para a coloração rosa. Com a finalidade de padronizar a coloração do DCFI, 10 ml de solução padrão de ácido ascórbico a 1% foram pipetadas em béquer contendo 50 ml de ácido oxálico 0,5 M para ser observada a oxidação e mudança de cor padrão da reação. Posteriormente, realizou-se a titulação de DCFI até que a solução apresentasse coloração rosada constante ao longo de 15 segundos. Padronizada a solução, amostras de 10 g de frutos de morango foram pesadas e misturadas com 25 ml de ácido oxálico, sendo então levadas à titulação com DCFI, sob agitação constante, até a mudança de coloração conforme feito com a solução padrão. O volume gasto com a titulação de DCFI para que a reação ocorresse foi anotado e aplicado na fórmula para a quantificação de ácido ascórbico total da amostra:

$$mg \text{ de ácido ascórbico} | 100 \text{ g de amostra} = \frac{ml \text{ de DCFI} * f * 100}{massa \text{ da amostra}}$$

Onde:

- ml de DCFI = volume aplicado de DCFI na solução para reação
- f = constante 1,02
- massa da amostra = 10 mg

Resultados encontrados para equação de Tilmans, após convertidos, foram expressos em mg de ácido ascórbico/100g de fruto fresco (ZENEBOON; PASCUET E TIGLEA, 2008).

4.5.6 Antocianinas

Para as análises de antocianinas totais foram utilizados 2g da amostra de morango em cada tempo de coleta (2, 4 e 6 dias após o tratamento) e submetidas à maceração com 20 mL de metanol em HCl a 1%. Posteriormente este macerado foi submetida a centrifugação a 1000 x g por 20 min e então coletado o sobrenadante para aferir a absorbância a 530 nm. Os resultados foram expressos em miligramas de pelagornidin-3-glucoside/100g de fruto fresco (adaptado de DHITAL et al., 2018).

4.6 Efeito das nanopartículas *in vitro* contra o *Botrytis cinerea*

4.6.1 Efeito sobre a germinação de esporos

Para a realização dos ensaios de efeito de concentração da nanopartícula sobre o fitopatógeno foram seguidas as metodologias descritas por Da Rocha Neto et al. (2019) e Shao et al. (2013). Foram pipetados 40 μL da suspensão contendo 10^5 esporos. ml^{-1} de *B. cinerea* em cada poço de lâminas escavadas depositadas no interior de placas de Petri, sob alta umidade relativa e temperatura constante de $25\pm 2^\circ\text{C}$. Para verificar o efeito do produto por contato, 40 μL de diferentes diluições da suspensão de nanopartícula (1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05 e 0%) foram adicionados sobre a suspensão de esporos, enquanto seu efeito volátil, para as mesmas diluições, foi testado a partir da aplicação deste em discos de papel filtro de 8 mm de diâmetro acoplados a parte superior e interna da tampa da placa de petri que abriga a lâmina escavada. Foram realizadas 5 repetições por tratamento, sendo cada lâmina com dois poços uma unidade experimental. A avaliação de germinação foi feita após 20 horas de incubação das lâminas a $25^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 12 horas, sendo avaliados 100 esporos por cavidade.

4.6.2 Efeito dos produtos sobre o crescimento micelial

Foram realizados ensaios de incorporação da nanoemulsão, nanocápsula e carreador lipídico nanoestruturado nas concentrações de 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05 e 0% de OE de alecrim em meio de cultura BDA depositado em placas de Petri. Discos de 8 mm de diâmetro contendo micélio de *B. cinerea* cultivados por 14 dias foram colocados no centro das placas. As testemunhas foram compostas por placas de petri contendo apenas meio BDA. Foram feitas 5 repetições, sendo cada uma delas uma placa contendo meio e disco micelial. A avaliação foi realizada a cada 2 dias, com a medição do diâmetro de crescimento do patógeno no meio de cultura (LIU et al., 2007).

4.7 Mecanismo de ação das nanoformulações contra o *Botrytis cinerea*

Foram realizados ensaios *in vitro* para verificar os mecanismos de ação da nanopartícula selecionada sobre os conídios do patógeno. Inicialmente foi preparada uma suspensão de esporos de *B. cinerea* em água destilada (10^6 esporos. ml^{-1}) que foi utilizada nos testes de integridade de parede celular, integridade de membrana e acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Foram depositados 10 mL da suspensão de esporos em placas de petri de vidro, sob agitação constante (80 rpm), contendo 10 ml de água, como controle, ou 10 ml de uma das nanoformulações (nanoemulsão, nanocápsula ou carreador lipídico nanoestruturado a 2%). Para cada análise foram realizadas 4 repetições, sendo uma unidade experimental um poço da microplaca contendo a suspensão e corantes.

4.7.1 Integridade da parede celular

Os ensaios de integridade da parede celular de conídios de *B. cinerea* expostos a suspensão de nanopartícula foram realizados de acordo com a metodologia de Cerioni et al. (2010), com algumas adaptações. Amostras de 1 mL foram coletadas após 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h de contato dos esporos com os produtos, centrifugadas (8000 g, 5 min, 4°C), lavadas com solução tampão de fosfato de sódio (50 mM, pH 7), submetidas a nova centrifugação (8000 g, 5 min, 4°C) e então o pellet resultante foi ressuspense em água destilada a uma concentração de 10^5 esporos.ml⁻¹. Alíquotas de 120 µL foram depositadas em microplacas com a adição de 40 µL de corante calcofluor (0,05 g.l⁻¹), que se liga à quitina da parede celular de fungos e possibilita a quantificação do conteúdo celular extravasado através das lesões causadas pelos produtos, e 40 µL de hidróxido de potássio (10%). As microplacas foram incubadas por 15 min e os danos na parede celular foram avaliados a 395 nm (excitação) e 440 nm (emissão) em leitor de microplacas. Os resultados obtidos foram expressos em unidades de fluorescência relativa (UFR), sendo que valores maiores significam maiores danos a parede celular.

4.7.2 Integridade e danos na membrana

Os testes de integridade e danos na membrana foram realizados conforme metodologia proposta por Liu et al. (2010) com adaptações. Para tal, amostras de 1 mL foram coletadas após 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h de contato e coloridas com iodeto de propídio (0,01 g.L⁻¹), corante que se liga ao DNA no interior do núcleo de células mortas, por 5 min a 30°C. Esta mistura foi centrifugada (8000 g, 5 min, 4°C), submetida a dupla lavagem com tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7), centrifugada novamente (8000 g, 5 min, 4°C) e então o pellet foi coletado e ressuspense em água destilada na concentração de 10^5 esporos.ml⁻¹. Alíquotas de 300 µL da suspensão final de conídios foram depositadas em poços de microplacas e os danos na membrana foram observados a 546 nm (excitação) e 608 nm (emissão) em leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em unidades de fluorescência relativa (UFR), onde valores maiores significam maiores danos à membrana.

4.7.3 Acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Os ensaios de acúmulo de EROs em conídios de *Botrytis cinerea* expostos a suspensão de nanopartícula de óleo essencial de alecrim com quitosana seguiram a metodologia de Li et al. (2017) com algumas adaptações. As amostras foram coletadas após 1, 2, 3, 4, 5 e 6h de contato e submetidas ao mesmo processo de centrifugação e lavagem do item 4.4.2,

modificando apenas o corante para diacetato de fluoresceína, que na presença de EROs é oxidada e emite fluorescência, podendo ser medida por espectrofotometria. Alíquotas de 300 μL da suspensão final de conídios foram depositadas em poços de microplacas e o acúmulo de EROs foi observado a 495 nm (excitação) e 527 nm (emissão) em leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em unidades de fluorescência relativa (UFR).

4.8 Análises estatísticas

Foi utilizado o programa Excel[®] para calcular as medidas de dispersão e análise de regressão, que foi aplicado para os ensaios *in vitro* de dosagens de óleo essencial e de tempo de exposição. Para todos os bioensaios, foi aplicado um teste de análise de variância e posteriormente os dados foram submetidos ao teste de Tukey ($p < 0,05$) para a separação de médias, com o auxílio do programa Sisvar[®] versão 5.6. O Software Zetasizer[®] foi utilizado para realização dos experimentos e coletas de dados envolvendo as caracterizações de nanopartículas.

5. RESULTADOS

5.1 Obtenção e caracterização das nanoformulações

Os sistemas nanoestruturados propostos neste trabalho atenderam às especificações da literatura para serem considerados “nanopartículas”, com tamanho de partículas inferiores a 200 nm e índice de polidispersão (PDI) inferiores a 0,3 (tabela 1). Mesmo avaliados sob temperaturas mais elevadas (40°C) após 60 dias, todos os índices mantiveram seus valores em patamares similares ao do dia em que foram formulados, confirmando sua estabilidade (tabela 1).

Tabela 1. Caracterização da nanoemulsão (NE), carreador lipídico nanoestruturado (CLN) e nanocápsula de quitosana (NC) no dia da sua formulação (dia 0) e no último dia de avaliação a 40°C (dia 60) quanto a tamanho de partículas (nm), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (+/-) e pH.

| Característica | Dia 0 | | | Dia 60 | | |
|-------------------------------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|
| | NE | CLN | NC | NE | CLN | NC |
| Tamanho de partícula (nm) | 141,7 | 136,6 | 141,3 | 147,2 | 141,2 | 147,1 |
| Índice de polidispersão (PDI) | 0,121 | 0,156 | 0,098 | 0,168 | 0,161 | 0,187 |
| Potencial Zeta (mV) | -27,9 | -17,7 | +21,2 | -20,4 | -19,7 | +17,7 |
| pH | 5,04 | 5,09 | 4,88 | 5,22 | 5,46 | 4,98 |

5.2 Efeito das nanoformulações na incidência e severidade de *Botrytis cinerea* em morangos

Em bioensaios com morangos, a formulação de carreador lipídico nanoestruturado (OE de alecrim emulsionado por óleo de côco) a 0,5% reduziu significativamente a incidência de mofo cinzento, quando aplicada através de volatilização, com aproximadamente 40% de inibição 4 dias após o tratamento dos frutos, não se diferenciando estatisticamente da aplicação por imersão. Aos 2 dias após o tratamento, não foi verificada nenhuma diferença estatística entre os tratamentos (figura 3).

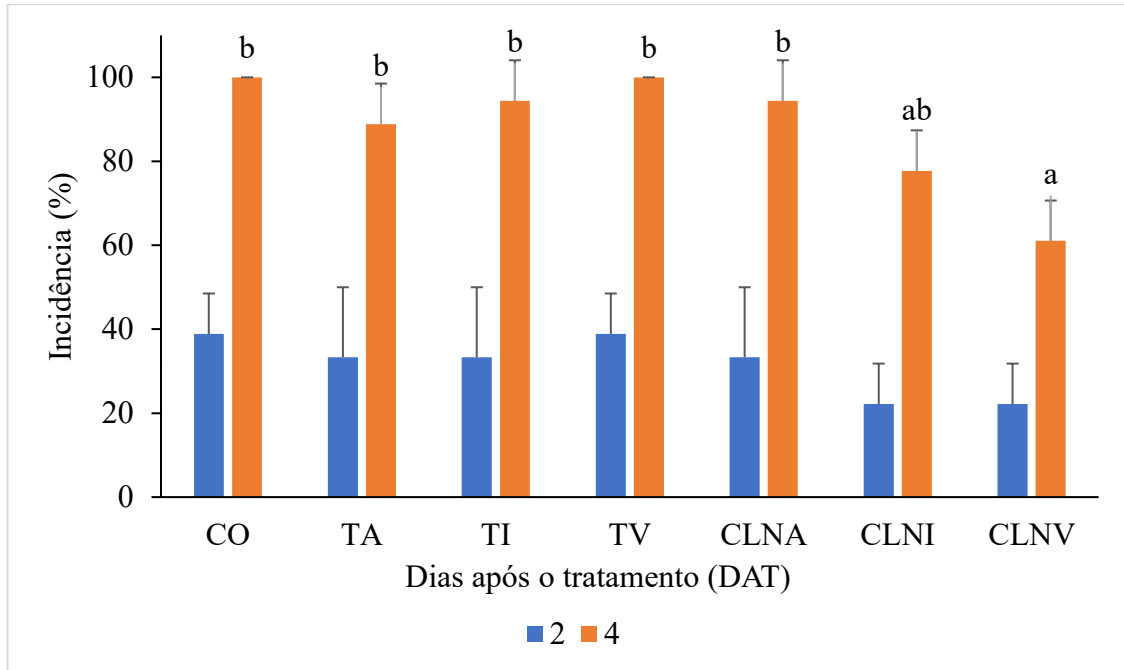


Figura 3. Incidência de mofo cinzento em morangos cv. San Andreas tratados com carreador lipídico nanoestruturado de OE de alecrim-óleo de côco a 0,5% por aspersão (CLNA), por imersão (CLNI) e por volatilização (CLNV), suas respectivas testemunhas (TA, TI e TV) e controle (CO) sem nenhuma forma de aplicação, em diferentes tempos de avaliação. Letras indicam diferença significativa entre tratamentos no tempo (Tukey, $p < 0,05$).

Para a nanoemulsão a 0,5%, verificou-se que a aplicação por aspersão reduziu em aproximadamente 80% a incidência de mofo cinzento no segundo DAT, diferenciando-se estatisticamente das testemunhas (Figura 4). As demais formas de aplicação, apesar de não se diferenciarem da aspersão, também se mantiveram estatisticamente iguais às testemunhas em todos os tempos de avaliação. No quarto DAT, a aplicação por aspersão se manteve como a mais eficiente, com inibição de 30% de incidência do mofo cinzento. Não houve diferença estatística para o último dia de avaliação.

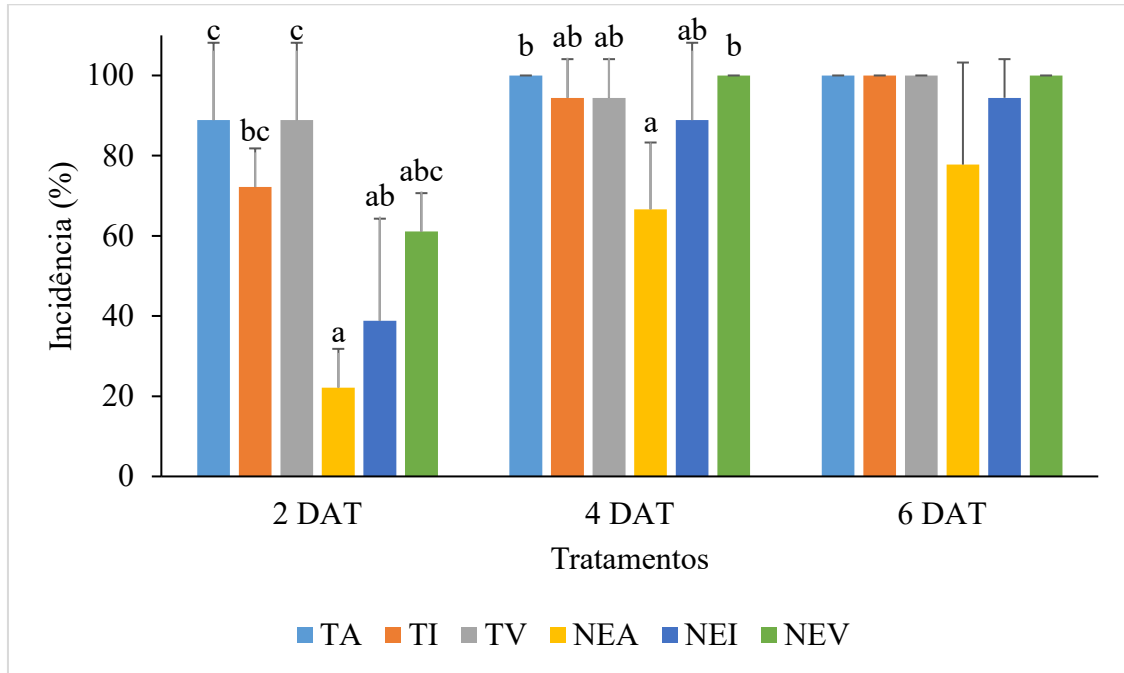


Figura 4. Incidência de mofo cinzento em morangos cv. San Andreas tratados com nanoemulsão de OE de alecrim-água a 0,5% por aspersão (NEA), por imersão (NEI) e por volatilização (NEV) e suas respectivas testemunhas (TA, TI e TV), em diferentes tempos de avaliação. Letras indicam diferença significativa entre tratamentos no tempo (Tukey, $p < 0,05$).

Já para a nanocápsula de OE de alecrim-quitosana a 0,5%, o modo de aplicação mais efetivo na redução de *B. cinerea* foi a imersão, inibindo aproximadamente 50% a incidência da doença no segundo dia após o tratamento (2 DAT) em relação a testemunha. No quarto dia após o tratamento (4 DAT), foi possível observar redução da incidência utilizando-se este tratamento, com aproximadamente 25% de inibição (figura 5).

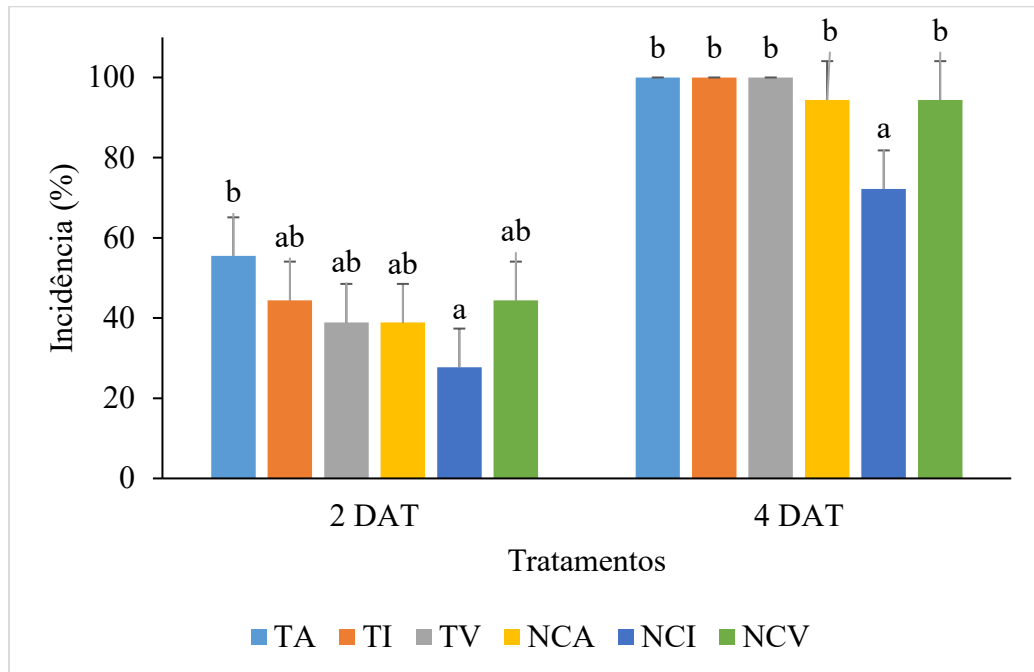


Figura 5. Incidência de mofo cinzento em morangos cv. San Andreas tratados com nanocápsula de OE de alecrim-quitosana a 0,5% por aspersão (NCA), por imersão (NCI) e por volatilização (NCV), suas respectivas testemunhas (TA, TI e TV) sem nenhuma forma de aplicação, em diferentes tempos de avaliação. Letras indicam diferença significativa entre tratamentos no tempo (Tukey, $p < 0,05$).

Aumentada a dose utilizada para 1%, foi possível observar maior eficiência dos produtos. Em frutos submetidos à imersão nos diferentes nanofarmacêuticos, a nanoemulsão e a nanocápsula reduziram a incidência em 55 e 50%, respectivamente, diferenciando-se estatisticamente da testemunha, aos 4 dias após o tratamento (figura 6). No sexto DAT, a nanoemulsão manteve-se efetiva. Em frutos submetidos aos nanoproductos por aspersão (figura 7) houve redução significativa nos morangos tratados por todos os produtos no segundo DAT, com aproximadamente 25% de incidência, constatando-se 50% de incidência para a testemunha.

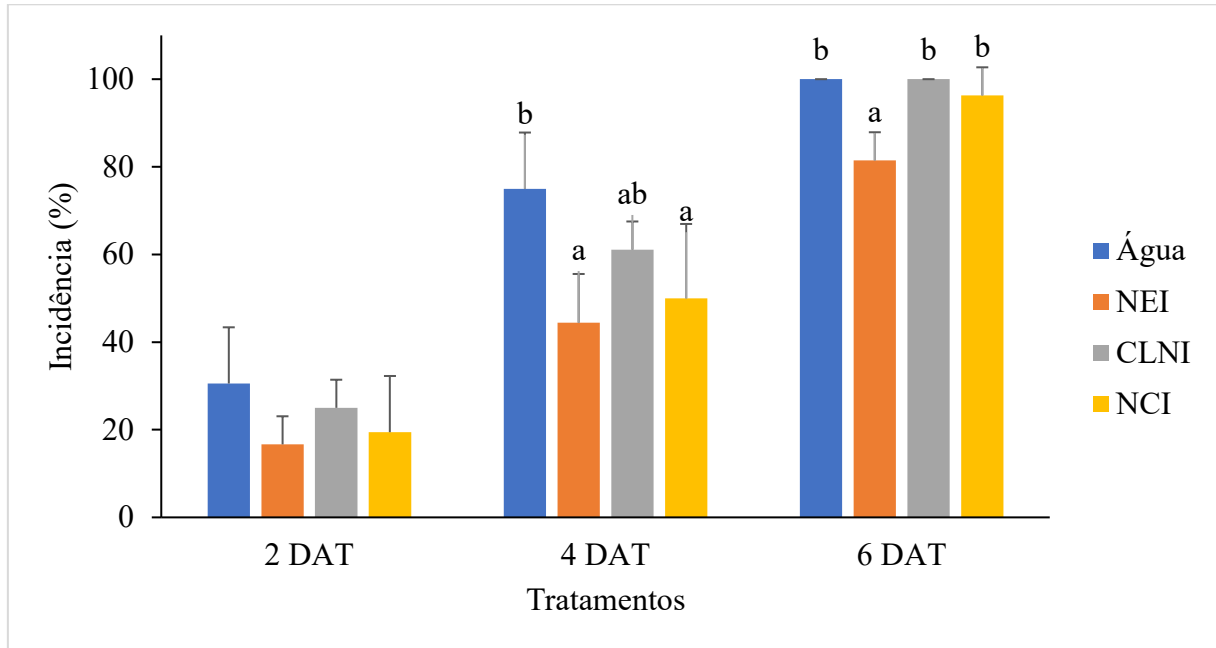


Figura 6. Incidência de mofo cinzento em morangos cv. San Andreas tratados com nanoemulsão de óleo essencial de alecrim-água (NE) carreador lipídico nanoestruturado de óleo essencial de alecrim-óleo de côco (CLN) e nanocápsula de OE de alecrim-quitosana (NC) a 1% e água por imersão, em diferentes tempos de avaliação. Letras indicam diferença significativa entre tratamentos no tempo (Tukey, $p < 0,05$).

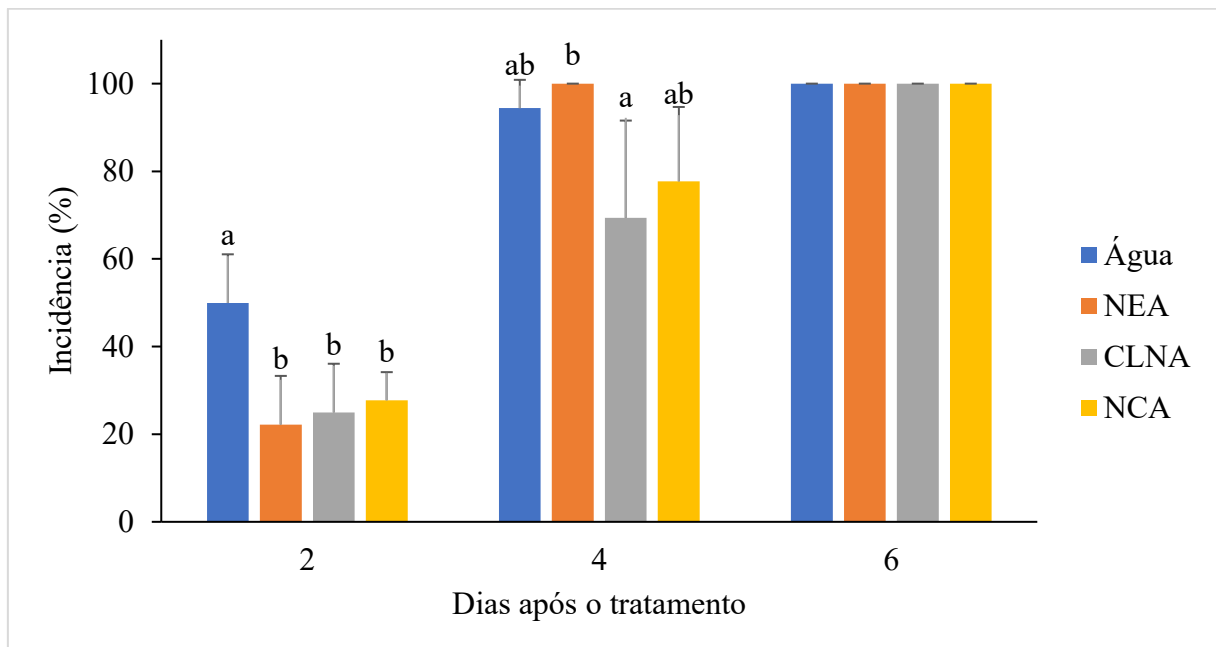


Figura 7. Incidência de mofo cinzento em morangos cv. San Andreas tratados com nanoemulsão de óleo essencial de alecrim-água (NE), carreador lipídico nanoestruturado de óleo essencial de alecrim-óleo de côco (CLN) e nanocápsula de OE de alecrim-quitosana (NC) a 1% e água por aspersão, em diferentes tempos de avaliação. Letras indicam diferença significativa entre tratamentos no tempo (Tukey, $p < 0,05$).

Em formulações contendo 2% de óleo essencial, pode-se observar que aos 4 DAT, a nanoemulsão e o carreador lipídico nanoestruturado reduziram a incidência da doença em mais de 50% em relação à testemunha, independente da forma de aplicação (imersão ou aspersão), enquanto a nanocápsula promoveu esse efeito apenas quando aplicada por aspersão (figura 8). Os tratamentos NEI e CLNA reduziram a incidência no sexto dia, com 40% de redução por ambas as formulações, além do tratamento NEA, com 25% de redução. Não houve diferença estatística para os demais tratamentos em relação às testemunhas. Nos testes de severidade, a formulação NEI também teve um bom desempenho no 6 DAT, com apenas 30% de severidade (figura 9), enquanto frutos tratados com NEA e CLNA, alcançaram em torno de 50 e 40% de severidade, respectivamente, ainda superiores aos demais tratamentos e testemunha, que apresentou aproximadamente 88% de severidade nos frutos.

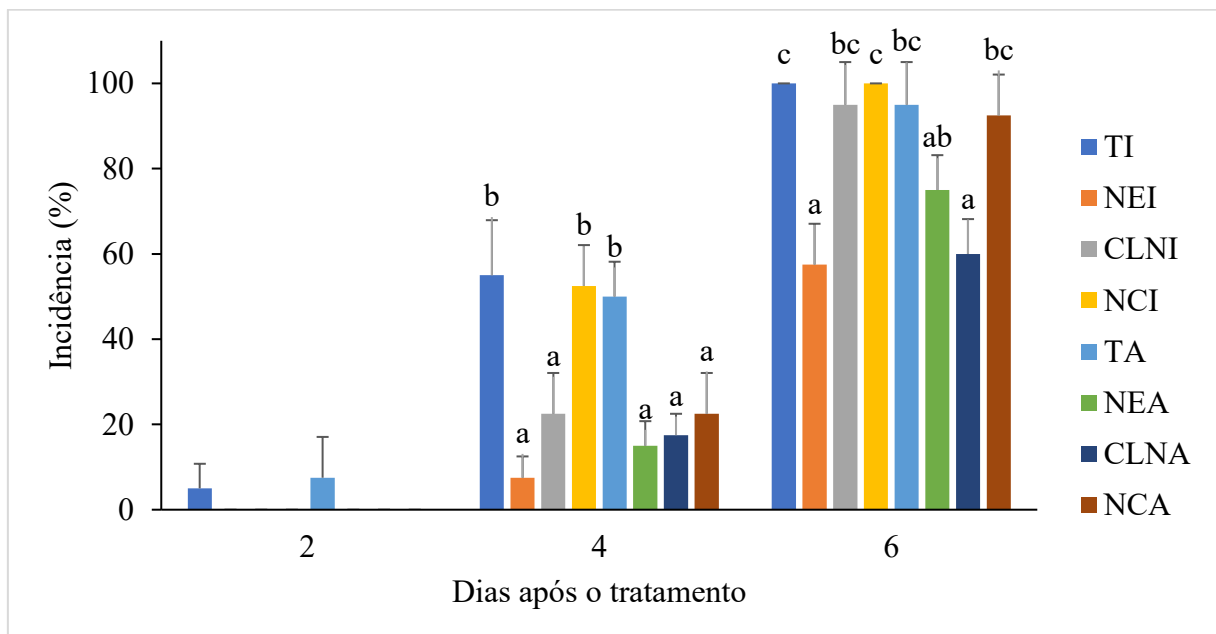


Figura 8. Avaliação de incidência de mofo cinzento em morangos cv. San Andreas tratados com nanoemulsão de óleo essencial de alecrim-água (NE) carreador lipídico nanoestruturado de óleo essencial de alecrim-óleo de côco (CLN) e nanocápsula de OE de alecrim-quitosana (NC) a 2% e água por imersão (..I) e por aspersão (..A), em diferentes tempos de avaliação. Letras indicam diferença significativa entre tratamentos no tempo (Tukey, $p < 0,05$).

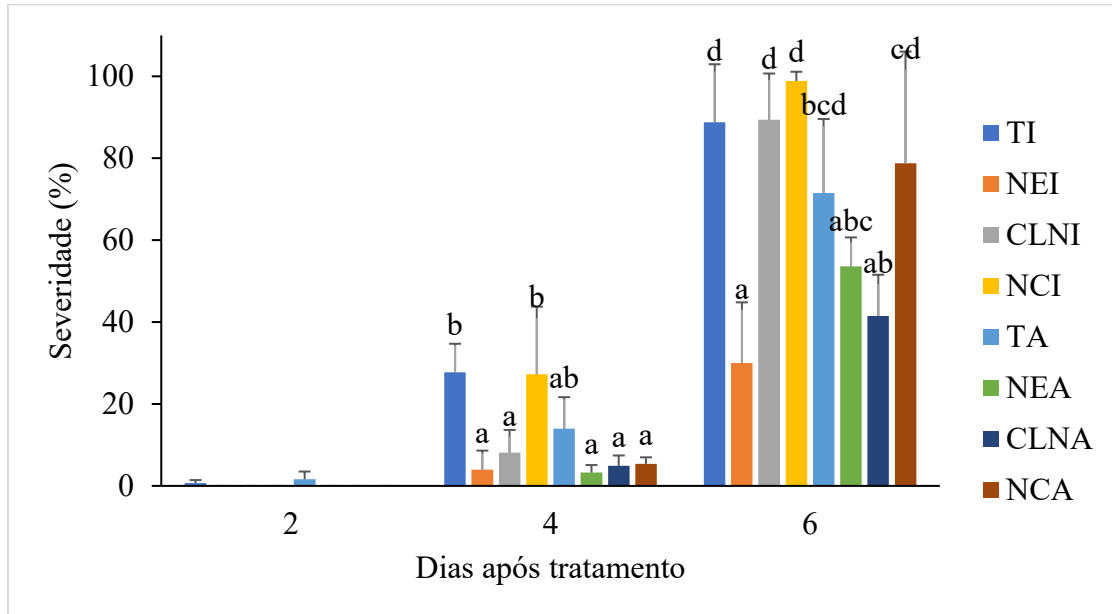


Figura 9. Avaliação de severidade de mofo cinzento em morangos cv. San Andreas tratados com nanoemulsão de óleo essencial de alecrim-água (NE), carreador lipídico nanoestruturado de óleo essencial de alecrim-óleo de côco (CLN) e nanocápsula de OE de alecrim-quitosana (NC) a 2% e água por imersão (..I) e por aspersão (..A), em diferentes tempos de avaliação. Letras indicam diferença significativa entre tratamentos no tempo (Tukey, $p < 0,05$).

5.3 Análises físico-químicas

Frutos submetidos à imersão em nanoemulsão, nanocápsula e carreador lipídico nanoestruturado após 6 dias do tratamento apresentaram redução de perda de peso em relação a testemunha, com 4,33, 5,54 e 6,11%, respectivamente, quando comparados à testemunha, com 8,74%. Já por aspersão, todos os frutos submetidos às formulações com nanopartículas sofreram perdas de massa próximas a 5,20%, com redução de pouco mais de 56% em relação à testemunha, com 9,19% de perda de massa (tabela 2).

Para teores de sólidos solúveis totais (°Brix), a nanoemulsão foi a que promoveu níveis mais elevados de açúcares nos frutos, com 5,55° por imersão e 5,2° brix por aspersão, sendo a única formulação a diferir significativamente da testemunha (tabela 3). Já na análise de acidez titulável, destacou-se a aplicação por imersão, onde todas as nanoformulações alcançaram valores de ATT próximas ao valor da caracterização inicial de 0,91, sendo a nanoemulsão a mais próxima com 0,87 g de ác. cítrico/100 ml, enquanto os demais tratamentos e testemunha alcançaram índices maiores de 1,08g (tabela 4). Já nos tratamentos aplicados por aspersão ocorreu uma expressão menor desses ácidos, com valores entre 0,50 e 0,60g no sexto dia de avaliação (tabela 4). Para pH não houve alterações no sexto dia após o tratamento quando aplicados por imersão, no entanto para aspersão pode-se observar um teor maior de acidez nos frutos tratados com todas as nanoformulações (tabela 5).

Na avaliação de antocianinas, frutos tratados com nanoemulsão apresentaram os maiores teores desses compostos. ou seja 20,42 mg de pelagornidin-3-glucoside/100g no sexto dia após o tratamento por imersão (NEI), próximo aos 21,4 mg da avaliação inicial, enquanto que frutos aspergidos com nanoemulsão (NEA) exibiram índices mais baixos, ou seja 18,85 mg (tabela 6).

Analisando as avaliações de ácido ascórbico foi possível observar um incremento inicial em seus índices, com o tratamento controle chegando 0,55 mg no 2 DAT, enquanto as nanoformulações por imersão alcançaram 0,27 mg, decaindo para 0,18 e 0,21 mg, a nanoemulsão e o carreador lipídico nanoestruturado, respectivamente, superiores a nanocápsula e testemunha com 0,15 mg de ácido ascórbico (tabela 7), enquanto quando aplicadas por aspersão os índices de frutos submetidos à todas as nanoformulações foram reduzidos de forma similar, de aproximadamente 0,32 para 0,15 mg de ácido ascórbico (tabela 7).

Tabela 2. Médias de perda de massa em morangos cv. San Andreas tratados com nanoemulsão (NE.), carreador nanoestruturado (CLN.) e nanocápsula (NC.) de óleo essencial de alecrim a 2% por imersão (..I) e por aspersão (..A) durante seis dias após o tratamento (DAT).

| Perda de Peso (%) | Tratamentos | | | | | | | |
|-------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Água | Experimento 1 Imersão | | | NCI | Experimento 2 Aspersão | | |
| | | NEI | CLNI | Água | | NEA | CLNA | NCA |
| 2DAT | 0,82±0,18 ^b | 0,42±0,15 ^a | 0,66±0,23 ^{ab} | 0,68±0,39 ^{ab} | 0,60±0,07 ^a | 0,55±0,22 ^{ab} | 0,76±0,07 ^b | 0,72±0,41 ^{ab} |
| 4DAT | 4,18±1,03 ^b | 2,26±0,72 ^a | 3,20±1,12 ^{ab} | 3,10±0,81 ^{ab} | 3,83±0,52 ^{ns} | 3,06±0,77 ^{ns} | 3,42±0,60 ^{ns} | 3,84±0,68 ^{ns} |
| 6DAT | 8,74±1,32 ^b | 4,33±1,32 ^a | 6,11±1,29 ^a | 5,54±0,98 ^a | 9,16±0,81 ^b | 5,19±1,15 ^a | 5,29±1,73 ^a | 5,11±1,57 ^a |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas indicam que não houve diferença significativa entre tratamentos (Tukey, $p < 0,05$).

*ns = não houve diferença significativa para nenhum tratamento.

Tabela 3. Médias de sólidos solúveis totais (SST) em morangos cv. San Andreas tratados com nanoemulsão (NE.), carreador lipídico nanoestruturado (CLN.) e nanocápsula (NC.) de óleo essencial de alecrim a 2% por imersão (..I) e por aspersão (..A) durante seis dias após o tratamento (DAT).

| SST (°Brix) | Av. inicial | Tratamentos | | | | | | | |
|-------------|-------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | Água | Experimento 1 Imersão | | | NCI | Experimento 2 Aspersão | | |
| | | NEI | CLNI | Água | NEA | | CLNA | NCA | |
| 2DAT | | 6,25±0,62 ^b | 7,62±0,36 ^a | 6,35±0,26 ^b | 6,47±0,36 ^b | 8,2±0,2 ^{ns} | 8,0±0,2 ^{ns} | 8,0±0,1 ^{ns} | 7,9±0,2 ^{ns} |
| 4DAT | 7,9±0,34 | 4,45±0,45 ^b | 6,22±0,23 ^a | 4,7±0,33 ^b | 4,87±0,15 ^b | 4,4±0,4 ^c | 6,9±0,3 ^a | 4,4±0,3 ^c | 5,1±0,3 ^b |
| 6DAT | | 4,3±0,24 ^b | 5,55±0,31 ^a | 3,82±0,26 ^b | 3,9±0,21 ^b | 4,1±0,3 ^b | 5,2±0,1 ^a | 4,1±0,2 ^b | 4,4±0,2 ^b |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas indicam que não houve diferença significativa entre tratamentos (Tukey, $p < 0,05$).

*ns = não houve diferença significativa para nenhum tratamento.

Tabela 4. Médias de acidez titulável total (ATT) em morangos cv. San Andreas tratados com nanoemulsão (NE.), carreador lipídico nanoestruturado (CLN.) e nanocápsula (NC.) de óleo essencial de alecrim a 2% por imersão (..I) e por aspersão (..A) durante seis dias após o tratamento (DAT).

| ATT (g ác. cítrico/100 ml) | Av. inicial | Tratamentos | | | | | | | |
|----------------------------|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | Água | Experimento 1 Imersão | | | Experimento 2 Aspersão | | | |
| | | | NEI | CLNI | NCI | Água | NEA | CLNA | NCA |
| 2DAT | | 0,72±0,11 ^{ns} | 0,84±0,09 ^{ns} | 0,72±0,03 ^{ns} | 0,76±0,03 ^{ns} | 0,73±0,04 ^a | 0,51±0,03 ^b | 0,47±0,07 ^b | 0,78±0,04 ^a |
| 4DAT | 0,91±0,1 | 0,84±0,09 ^{bc} | 0,62±0,14 ^c | 0,85±0,08 ^b | 1,03±0,05 ^a | 0,68±0,04 ^{ab} | 0,66±0,02 ^b | 0,74±0,03 ^a | 0,68±0,03 ^{ab} |
| 6DAT | | 1,07±0,16 ^{ab} | 0,87±0,06 ^b | 1,08±0,08 ^a | 1,07±0,09 ^a | 0,54±0,07 ^{ns} | 0,61±0,10 ^{ns} | 0,50±0,02 ^{ns} | 0,60±0,09 ^{ns} |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas indicam que não houve diferença significativa entre tratamentos (Tukey, $p < 0,05$).

*ns = não houve diferença significativa para nenhum tratamento.

Tabela 5. Médias de pH em morangos cv. San Andreas tratados com nanoemulsão (NE.), carreador lipídico nanoestruturado (CLN.) e nanocápsula (NC.) de óleo essencial de alecrim a 2% por imersão (..I) e por aspersão (..A) durante seis dias após o tratamento (DAT).

| pH | Av. inicial | Tratamentos | | | | | | | |
|------|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | Água | Experimento 1 Imersão | | | Experimento 2 Aspersão | | | |
| | | | NEI | CLNI | NCI | Água | NEA | CLNA | NCA |
| 2DAT | | 3,35±0,03 ^{ns} | 3,36±0,04 ^{ns} | 3,32±0,05 ^{ns} | 3,41±0,11 ^{ns} | 3,39±0,02 ^a | 3,34±0,01 ^b | 3,34±0,02 ^b | 3,36±0,02 ^{ab} |
| 4DAT | 3,43±0,03 | 3,55±0,08 ^{ns} | 3,44±0,07 ^{ns} | 3,43±0,08 ^{ns} | 3,55±0,13 ^{ns} | 3,29±0,06 ^c | 3,41±0,03 ^b | 3,49±0,05 ^{ab} | 3,49±0,01 ^a |
| 6DAT | | 3,54±0,05 ^{ns} | 3,48±0,09 ^{ns} | 3,56±0,08 ^{ns} | 3,58±0,18 ^{ns} | 3,24±0,04 ^b | 3,51±0,05 ^a | 3,54±0,04 ^a | 3,49±0,04 ^a |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas indicam que não houve diferença significativa entre tratamentos (Tukey, $p < 0,05$).

*ns = não houve diferença significativa para nenhum tratamento.

Tabela 6. Médias de antocianinas em morangos cv. San Andreas tratados com nanoemulsão (NE.), carreador lipídico nanoestruturado (CLN.) e nanocápsula (NC.) de óleo essencial de alecrim a 2% por imersão (..I) e por aspersão (..A) durante seis dias após o tratamento (DAT).

| Antocianinas | Av. inicial | Tratamentos | | | | | | | |
|--------------|-------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | Água | Experimento 1 Imersão | | | Experimento 2 Aspersão | | | |
| | | | NEI | CLNI | NCI | Água | NEA | CLNA | NCA |
| 2DAT | | 21,98±0,67 ^a | 23,32±1,21 ^a | 22,51±0,98 ^a | 18,44±1,12 ^b | 20,52±0,67 ^{ab} | 21,59±0,73 ^a | 19,16±0,84 ^b | 19,01±0,99 ^b |
| 4DAT | 21,4±0,58 | 20,73±0,78 ^a | 22,19±0,82 ^a | 19,51±1,52 ^a | 17,31±0,92 ^b | 19,22±0,47 ^b | 20,28±0,42 ^a | 17,8±1,08 ^b | 17,64±1,16 ^b |
| 6DAT | | 19,64±0,69 ^{ab} | 20,42±1,17 ^a | 18,42±0,92 ^{ab} | 16,49±1,23 ^b | 17,34±0,72 ^b | 18,85±0,73 ^a | 17,37±0,46 ^b | 16,09±1,23 ^b |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas indicam que não houve diferença significativa entre tratamentos (Tukey, $p < 0,05$).

*ns = não houve diferença significativa para nenhum tratamento.

Tabela 7. Médias de ácido ascórbico em morangos cv. San Andreas tratados com nanoemulsão (NE.), carreador lipídico nanoestruturado (CLN.) e nanocápsula (NC.) de óleo essencial de alecrim a 2% por imersão (..I) e por aspersão (..A) durante seis dias após o tratamento (DAT).

| Ácido ascórbico (mg) | Av. inicial | Tratamentos | | | | | | | |
|----------------------|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | Experimento 1 Imersão | | | | Experimento 2 Aspersão | | | |
| | Água | NEI | CLNI | NCI | Água | NEA | CLNA | NCA | |
| 2DAT | | 0,55±0,03 ^a | 0,27±0,07 ^b | 0,24±0,02 ^b | 0,26±0,07 ^b | 0,33±0,04 ^{ns} | 0,24±0,05 ^{ns} | 0,32±0,08 ^{ns} | 0,29±0,07 ^{ns} |
| 4DAT | 0,32±0,02 | 0,10±0,02 ^{ns} | 0,11±0,02 ^{ns} | 0,09±0,01 ^{ns} | 0,10±0,02 ^{ns} | 0,14±0,01 ^{ns} | 0,12±0,01 ^{ns} | 0,12±0,03 ^{ns} | 0,14±0,02 ^{ns} |
| 6DAT | | 0,15±0,01 ^b | 0,18±0,01 ^a | 0,21±0,02 ^a | 0,15±0,1 ^b | 0,14±0,01 ^{ns} | 0,14±0,01 ^{ns} | 0,15±0,01 ^{ns} | 0,14±0,01 ^{ns} |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas indicam que não houve diferença significativa entre tratamentos (Tukey, $p < 0,05$).

*ns = não houve diferença significativa para nenhum tratamento.

5.4 Ensaios de inibição de germinação e de crescimento micelial de *Botrytis cinerea*

Nas análises *in vitro*, com a concentração de 0,2% de óleo essencial no produto, foi possível observar que todas as formulações reduziram em mais de 50% a germinação dos esporos, inibindo-a totalmente na concentração de 1% (Figura 10). Nos testes de crescimento micelial pode-se observar redução para todos os produtos e doses testados de pelo menos 30%, com maior destaque para NE e CLN a 1%, reduzindo em mais de 60% o crescimento micelial em relação a testemunha (Figura 11).

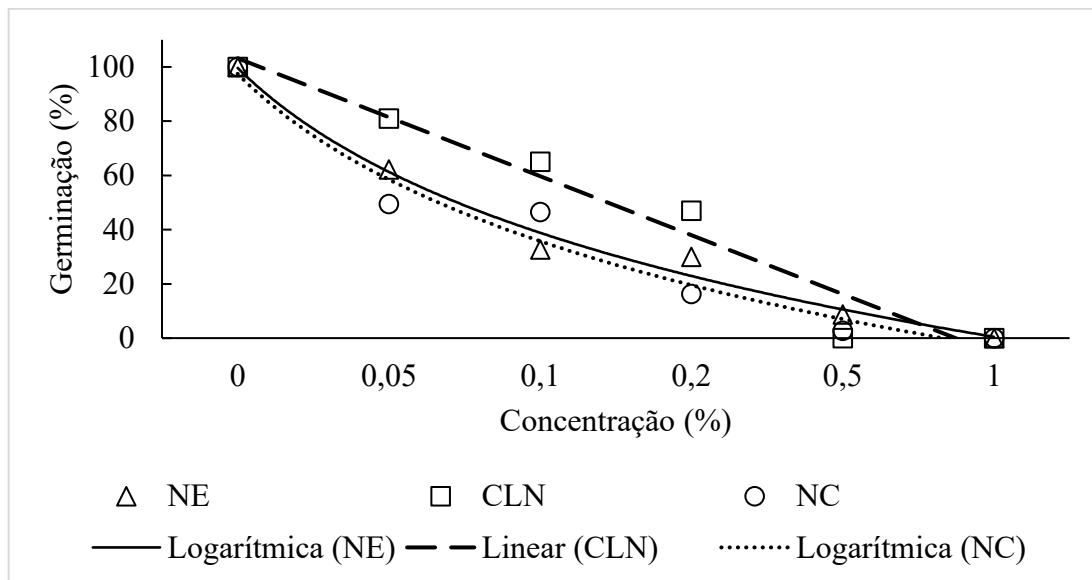


Figura 10. Regressão referente a porcentagem de germinação de esporos de *Botrytis cinerea* em contato com diferentes nanoformulações: nanoemulsão (NE), carreador lipídico nanoestruturado (CLN) e Nanocápsula (NC) de óleo essencial de alecrim, em diferentes concentrações de cada formulação (0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1%).

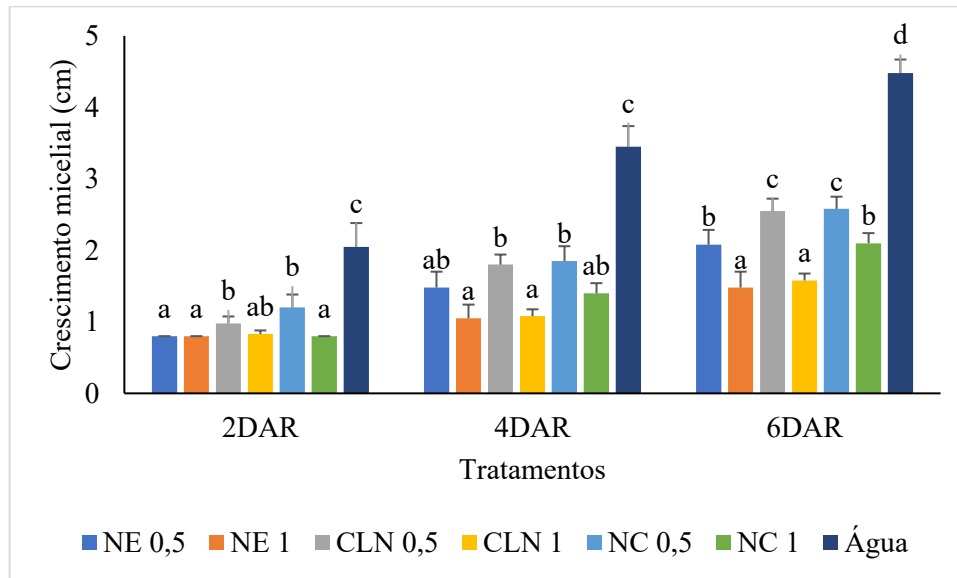


Figura 11. Diâmetro de crescimento micelial de *Botrytis cinerea* em contato com diferentes nanoformulações: nanoemulsão (NE), carreador lipídico nanoestruturado (CLN) e Nanocápsula (NC) de óleo essencial de alecrim, em diferentes concentrações de cada formulação (0; 0,5; e 1%) ao longo de 6 dias de avaliação. Letras indicam diferença significativa entre tratamentos no tempo (Tukey, $p < 0,05$).

5.5 Mecanismo de ação das nanopartículas contra o *B. cinerea*

Avaliações sobre o efeito das nanopartículas sobre a estrutura dos esporos e micélios do patógeno também foram realizados e todas as formulações demonstraram ação destrutiva sobre a estrutura de *B. cinerea*, com a nanoemulsão se sobressaindo, promovendo maiores taxas de RFU do que os demais tratamentos e testemunha, mostrando que houve uma maior liberação de conteúdo interno do patógeno, isto é, maiores danos foram causados pela nanoemulsão do que as demais formulações sobre a integridade da parede celular e membrana plasmática (figuras 12 e 13). Também foi observado um incremento no conteúdo de EROs para nanoemulsão, assim como para carreador lipídico nanoestruturado (figura 14).

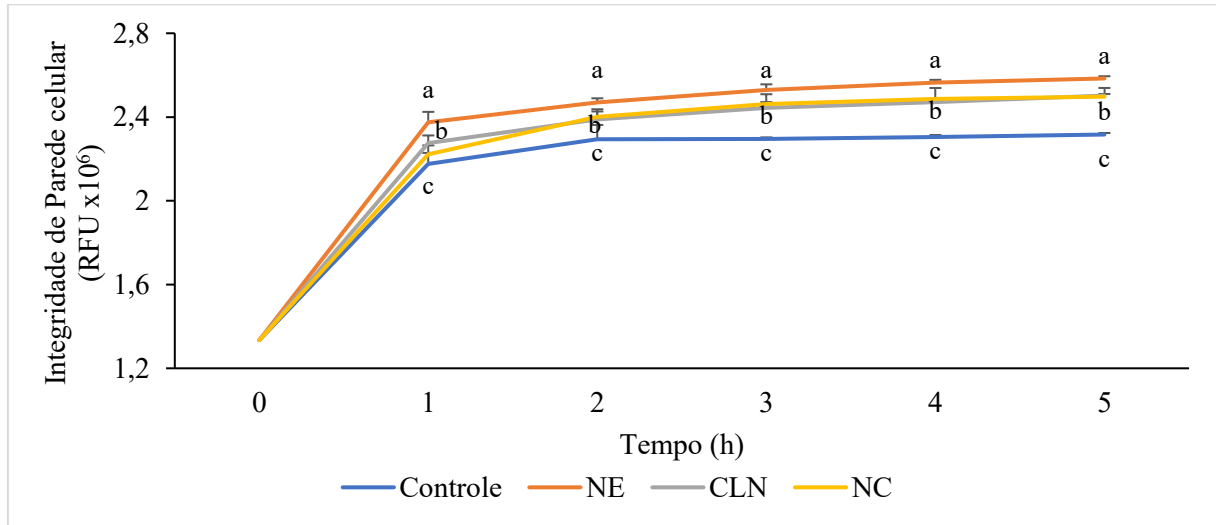


Figura 12. Efeito de nanoemulsão (NE), carreador lipídico nanoestruturado (CLN) e nanocápsula (NC) de óleo essencial de alecrim a 2% na integridade de parede celular do *Botrytis cinerea* sob diferentes tempos de exposição. Letras indicam diferença significativa entre tratamentos no tempo (Tukey, $p < 0,05$).

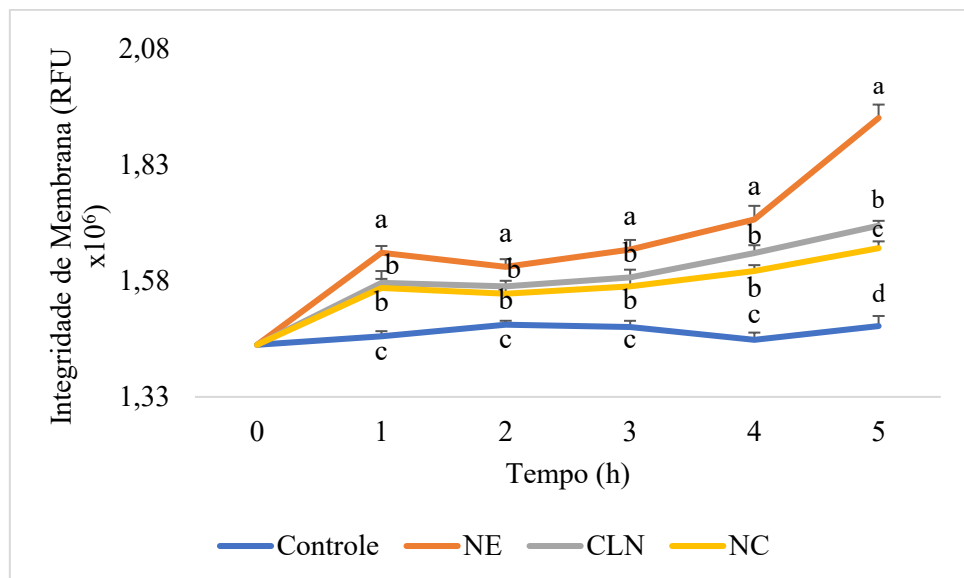


Figura 13. Efeito de nanoemulsão (NE), carreador lipídico nanoestruturado (CLN) e nanocápsula (NC) de óleo essencial de alecrim a 2% na integridade de membrana plasmática do *Botrytis cinerea* sob diferentes tempos de exposição. Letras indicam diferença significativa entre tratamentos no tempo (Tukey, $p < 0,05$).

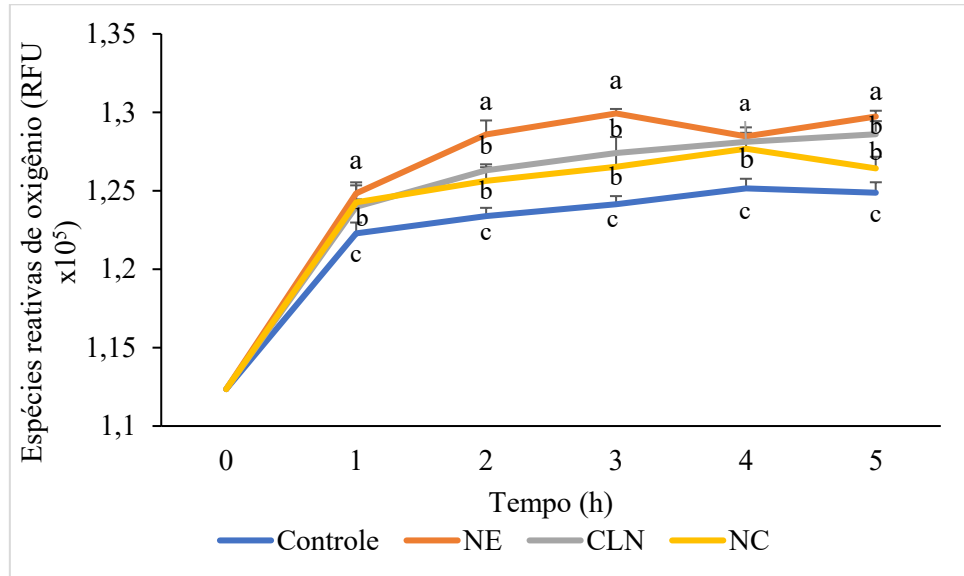


Figura 14. Efeito de nanoemulsão (NE), carreador lipídico nanoestruturado (CLN) e nanocápsula (NC) de óleo essencial de alecrim a 2% na liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) do *Botrytis cinerea* sob diferentes tempos de exposição. Letras indicam diferença significativa entre tratamentos no tempo (Tukey, $p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

O morango é uma das frutas mais consumidas por todo mundo devido a sua aparência, gosto e valores nutritivos (CHITARRA; CHITARRA, 2005; GARGARO, 2009). Tem como principal problema o acometimento por doenças, como a podridão cinzenta causada por *B. cinerea*, que pode causar alta perda de produtividade (WASHINGTON et al., 1999; PETRASCH et al., 2019). Possui como principal método de disseminação a dispersão pelo vento e alta umidade, mas também pelo seu micélio, pensando no contato entre os frutos durante o transporte e armazenamento (KIMATI, 2005; TOFOLI et al., 2011).

Como formas de controle a aplicação de agrotóxicos é o método mais utilizado atualmente, no entanto sabe-se do seu efeito negativo para o ambiente e para a saúde humana, surgindo a necessidade de formas alternativa de controle (FILLINGER; ELAD, 2016), como o uso de óleos essenciais, substâncias naturais extraídas do metabolismo secundários de plantas (MIRESMAILLI; BRADBURY; ISMAN, 2006; SOYLU, KURT; SOYLU, 2010). No entanto, são relativamente frágeis devido a sua deterioração quando expostos a luz, dispersos a temperatura ambiente e deixam odor residual, o que os desfavorece quanto a sua utilização em frutos. Como forma de mitigação desses problemas, este estudo buscou utilizar-se do óleo essencial de alecrim tendo seu efeito otimizado através do seu encapsulamento por diferentes substâncias: água, formando nanoemulsão, quitosana, formando nanocápsula e óleo de côco, formando uma partícula carreadora lipídica nanoestruturada. Essas nanoformulações são produzidas a partir da adição de um líquido de fase oleosa ou aquosa em outra suspensão de fase oposta, através da aplicação de alta pressão e exposição a diferentes surfactantes, gerando partículas de tamanhos inferiores a 200 nm e tem como objetivo manter as características e compostos constituintes do OE de alecrim, promovendo sua proteção contra os fatores externos e permitindo que mantenha suas características antimicrobianas (TADROS et al., 2004; SUTRADHAR; AMIN, 2013; KAH; HOFMANN, 2014; RIBES et al., 2018; WAN et al., 2019;).

Segundo McClements (2012) as maneiras pelas quais uma partícula é exposta a diferentes modos de aplicação de pressão, na presença de diferentes surfactantes, geram diferentes tamanhos e formas de nanopartículas, levando então a diferentes conformações, tamanhos e modos de ação. Existem padrões nos quais as formulações devem estar enquadradas para que sejam consideradas “nano”, sendo necessário respeitar o tamanho final de partículas obtidas após o processamento, o índice de polidispersão (PDI), referente a sua homogeneidade, o potencial zeta, relativo às cargas presentes no nanoformulado, e também o pH, que indica a natureza ácida da nanopartícula, fazendo com que seja possível identificar suas reações com

diferentes organismos (TADROS et al., 2004; MCCLEMENTS, 2012; SUTRADHAR; AMIN, 2013; MAZZARINO et al., 2017).

As nanopartículas estudadas neste trabalho estão todas de acordo com a literatura, como demonstrado na tabela 1, apresentando diâmetros inferiores a 200 nm, valores de polidispersão (PDI) menores que 0,3 (TADROS et al., 2004; MCCLEMENTS, 2012; GRILLO; ROSA & FRACETO, 2013; MUNHUWEYI et al., 2017; WAN et al., 2019) e cargas adequadas de acordo com a literatura para cada tipo de agente encapsulante empregado, sendo positivas para a nanocápsula, devido à quitosana, e negativa para as demais formulações (SUTRADHAR; AMIN, 2013; ALOUI et al. 2014; MUNHUWEYI et al., 2017; FENG et al., 2016. OLIVEIRA, 2017). As cargas livres estão ligadas à estabilização dos nanoformulados devido ao efeito repulsivo que estas cargas geram entre as gotículas de óleo, tornando mais difícil a desestabilização e agregação das partículas. Valores acima de 30 mV (independente da carga) são considerados indicadores para que a suspensão seja considerada altamente estável (MAZZARINO et al., 2017). No presente estudo, nenhum nanoformulado chegou acima dos valores ideais, no entanto o potencial zeta de todas ficou próximo e a utilização do teste de estabilidade ao longo do tempo mostrou que não houve instabilidade nos sistemas ao longo do tempo, confirmando a eficácia e estabilidade das suspensões (SUTRADHAR; AMIN, 2013; JADHAV; KATE; PAYGHAN, 2014). Além dos efeitos sobre a estabilidade das nanopartículas, as cargas livres também têm relação de interação com os patógenos, pois a presença de mais cargas positivas em sua superfície leva a um maior efeito de interação com fitopatógenos, uma vez que estes possuem cargas negativas em sua parede celular (TAKETA et al., 2018).

Llinares et al. (2018) obtiveram nanopartículas de OE de alecrim com diâmetros inferiores a 40 nm, utilizando mais ciclos de processamento no homogenizador de alta pressão, chegando a 12 ciclos em comparação com o presente estudo (3 ciclos), mostrando que há possibilidades de diminuir mais ainda a partícula, possibilitando maior ASE e, por consequência, mais facilidade de penetrar no patógeno. No entanto, Gago et al. (2019) obtiveram nanoformulações de diferentes tamanhos para OE de cravo e OE de capim limão, mostrando que a quantidade de OE tende a ser inversamente proporcional ao tamanho de partículas alcançados. Quando utilizaram concentrações de 0,12%, partículas com mais de 250nm foram obtidas, frente a partículas de 40-50 nm para concentrações superiores a 0,8%. Desta forma, estudos de otimização da nanoformulação podem ser interessantes para se encontrar a dosagem com efeito que alcance partículas de tamanhos menores e, assim, se obter um efeito ainda maior por parte das nanopartículas.

Além de se apresentarem inicialmente dentro dos padrões encontrados na literatura quanto a características de uma nanopartícula, todas as nanoformulações se mostraram estáveis ao longo do tempo, mesmo nas condições de maiores temperaturas (40°C) após 60 dias, não saindo dos limites de tamanho e índice de polidispersão e também mantendo suas características de pH e cargas. O mesmo ocorreu para Gago et al. (2019) em testes envolvendo emulsão de OE de capim limão e canela, apontando também para estabilidade da nanopartícula formada ao longo de 6 meses, apenas com alterações no tamanho de partículas relacionados à concentração inicial do OE incorporado, algo esperado de acordo com os estudos supracitados de Llinares et al. (2018).

Observando a estabilidade das nanopartículas, foram realizados bioensaios para verificar sua atividade contra a podridão cinzenta em morangos. Com base nos resultados apresentados da figura 3 a 9 foi possível observar um efeito superior da nanoemulsão, principalmente quando aplicada por imersão, a partir de 1% de óleo essencial no produto, sobre a incidência e a severidade de podridão cinzenta em morangos. O carreador lipídico nanoestruturado e a nanocápsula por aspersão também reduziram a incidência e severidade da podridão cinzenta quanto utilizadas a 2%.

A sinergia entre os componentes antimicrobianos presentes no óleo essencial de alecrim, como o 1,8 cineol, terpineol e canfora (BOUTEKEDJIRET et al., 2003; JIANG et al., 2011), é fator chave para o seu efeito (SOYLU, KURT; SOYLU, 2010; CABRAL et al., 2013). No entanto, quando utilizado isoladamente, uma série de problemas, como degradação de seus compostos e odor residual fazem com que seja mais difícil a utilização destes produtos naturais em pós-colheita. Sua incorporação em agentes encapsulantes para a formulação de nanopartículas conseguiu mitigar estes problemas, mantendo a sua ação antimicrobiana (RIBES et al., 2018; WAN et al., 2019; TADROS et al., 2004; KAH; HOFMANN, 2014).

O carreador lipídico nanoestruturado mostrou potencial de efeito apenas nos dias iniciais dos tratamentos na concentração maior, mas não conseguiu manter seu efeito para o último dia de avaliação nos experimentos de concentração inferiores, demonstrando maior efeito a partir das dosagens de 2% de óleo essencial de alecrim no nanoformulado. Desta formulação esperava-se também um efeito similar ao da nanoemulsão, visto que a ideia de ambos os agentes encapsulantes era formar uma boa barreira protetora e de ação de liberação controlada do produto ativo encapsulado (SUTRADHAR; AMIN, 2013; NURUZZAMAN et al., 2016; NAKASATO et al., 2017). No entanto, as propriedades físicas do óleo de côco podem ter feito com que a liberação de seu ativo fosse mais dificultada do que a da nanoemulsão, promovendo menos efeito sobre o patógeno.

Já para a nanocápsula, efeito um pouco menos expressivo de controle foi encontrado nos testes efetuados, principalmente em concentrações de 1% ou inferiores. Uma vez que a quitosana (CHEN et al., 2016; MUNHUWEYI et al., 2017; LOPES, 2011; NOSHIRVANI et al., 2017; TAKETA et al., 2018), assim como o OE de alecrim (GOMES, 2003; TUREK; STINTZING, 2013) possui efeito bem descrito na literatura, esperava-se uma ação conjunta e sinérgica entre estes dois produtos (MCCLEMENTS; DECKER, 2000; FENG et al., 2016; CHRISTOFOLI et al. 2015), como ocorrido nos estudos de Mohammadi, Hashemi e Hosseini (2015), que obtiveram redução na incidência e aumento no tempo de vida dos frutos quanto utilizado nanocápsula de quitosana envolvendo OE de *Zataria multiflora* na concentração de 1,5%. Similar ao ocorrido no carreador lipídico nanoestruturado, ao invés de promover uma liberação facilitada pelo agente encapsulante, as propriedades físicas da quitosana podem ter dificultado a ação do OE de alecrim e, sua atuação isolada, não foi suficiente para exercer nenhum tipo de controle sobre o patógeno.

Não ocorreu uma predominância entre modos de aplicação, tendo a nanoemulsão mais efeito por imersão, enquanto carreador lipídico nanoestruturado e nanocápsula foram mais efetivos por aspersão. A volatilização foi excluída após o primeiro teste devido a uma maior dificuldade de aplicação deste modo na cadeia pós-colheita do morango, uma vez que, por serem produtos de alta volatilização, seriam necessários recipientes apropriados para a contenção do óleo essencial em ação direta nos frutos. Quanto aos outros dois métodos, há uma maior facilidade de aplicação e também economia de produto quando utilizado a aspersão, já que em uma escala industrial ou a nível de campo, seria necessária uma quantidade maior para que fosse possível imergir uma quantidade grande de frutos. Desta forma, realizar mais experimentos focados nos modos de aplicação, utilizando cada sistema nanoestruturado que teve seu efeito demonstrado nesse estudo, pode ser a chave para encontrar a forma de aplicação ideal de nanotecnologia na cadeia pós-colheita do morango (RODGERS et al., 2004; HIRAYAMA et al., 2014).

Não apenas seu efeito sobre os patógenos foi verificado, mas o presente trabalho também analisou como esses agentes atuam sobre o fruto e sua qualidade, observando as alterações que as nanoformulações podem causar nos parâmetros físico-químicos. A manutenção de qualidade de frutos corresponde às características físicas e químicas dos frutos, sendo assim, mantê-las ao longo do tempo significa prolongar a vida do fruto (CHITARRA & CHITARRA, 2005). Os resultados mostraram que os tratamentos nanoemulsão e nanocápsula tem potencial para prolongar a vida de prateleira de frutos de morango, uma vez que mantiveram os índices de sólidos solúveis totais e pH próximos a avaliação inicial, observados

na tabela 3 e 5, além de uma menor perda de massa em relação a testemunha (tabela 2) e teores de ácido ascórbico superiores a testemunha no último dia de avaliação (tabela 7). Mostrou também que estes tratamentos não foram efetivos para acidez titulável (tabela 4), mas que a nanoemulsão conseguiu manter os níveis mais elevados de antocianinas (tabela 6), o que indica que conseguiu reduzir a acelerada maturação e consequente deterioração dos frutos ao longo do tempo de avaliação (ZENEBO; PASCUET & TIGLEA, 2008), além de estes atributos estarem ligados a aroma e sabor, mantendo assim seu poder atrativo ao consumidor (LIU et al., 2018).

O estudo de Gundewadi et al. (2018) apresentou uma perda de peso 30% menor em relação a testemunha quando aplicada uma nanoformulação a base de alginato e OE de manjerição, similar ao carreador lipídico nanoestruturado, em frutos de quiabo. Apesar de ser um fruto diferente, era esperado que uma formulação similar, promovesse resultados semelhantes no prolongamento de vida de frutos de morango, com a formação de uma barreira protetora e ação controlada do OE encapsulado. Já Robledo et al. (2018) encontraram uma redução de 40% na incidência de podridão em morangos tratados com nanocápsula a base de quitosana e quinoa envolvendo OE de timol contra *B. cinerea*, podendo ter ocorrido um melhor encapsulamento pela combinação das duas matrizes polissacarídicas, enquanto no presente estudo a quitosana não obteve a permeabilidade necessária para que o OE de alecrim fosse liberado a ponto de exercer seu efeito.

Chien, Sheu e Yang (2007), assim como Kerch et al. (2011), obtiveram manutenção e até incremento no conteúdo de ácido ascórbico em mangas tratadas com filme de quitosana, podendo esta diferença ser atribuída ao ácido utilizado na dissolução da quitosana, onde no presente estudo se utilizou ácido clorídrico, frente ao ácido acético utilizado pelos autores. Kerch et al. (2011) também encontraram o mesmo padrão de efeito sobre o conteúdo de antocianinas, mostrando que a quitosana atuando sozinha consegue de fato formar uma barreira protetora e retardar os processos de maturação dos frutos, processos estes que estão atrelados ao incremento gradativo de antocianinas e ácido ascórbico durante o armazenamento de frutos (NOSHIRVANI et al., 2017; TAKETA et al., 2018). Ainda que possa ser mais efetivo, sabe-se do forte odor que o ácido acético usado pelos autores supracitados possui e, para frutos pequenos e frágeis, acabam por não serem tão aceitos comercialmente, diferente da manga, que a casca é retirada anteriormente ao seu consumo. Resultados similares foram encontrados por Chu et al. (2020), utilizando o polímero pululano como encapsulante de OE de canela, com mais de 50% de redução da podridão.

Resultados similares ao presente estudo foram encontrados para nanoemulsão, como demonstrados por Pandey et al. (2020), utilizando nanoemulsão de OE de hortelã-pimenta no controle de *Alternaria solani*. Naserzadeh et al. (2019) também encontraram um maior controle para nanoemulsão de OE de canela contra *B. cinerea* e *Rhizopus stolonifer* quando comparado com a testemunha e emulsões de tamanho de partículas maiores, possivelmente pelo seu incremento na capacidade de penetração do produto e maior interação com os patógenos.

As alterações nos frutos podem ter ocorrido tanto pela presença do patógeno *B. cinerea* (KIMATI, 2005; CHITARRA & CHITARRA, 2005) quanto pela interação das nanoformulações (DE MOURA et al., 2021), uma vez que o morango é um fruto frágil e está sujeito a sofrer alterações com qualquer coisa que tenha contato (GARGARO, 2009). Assim, é possível observar que as nanoformulações conseguiram retardar a maturação dos frutos, levando a uma menor deterioração, em comparação com o controle. Destaque especial para a nanoemulsão que manteve índices mais próximos a avaliação inicial obtida no tempo 0, mostrando assim uma qualidade e potencial para o uso no pós-colheita.

Estes fatores de manutenção das características físico-químicas dos frutos ocorreram devido a barreira protetora física formada pelas nanoformulações, dificultando o acesso do patógeno ao fruto, atrasando assim sua colonização e assim retardando seu processo infeccioso sobre o mesmo (CHEN et al., 2016). Outro fator positivo desta barreira física pode ter sido a diminuição de trocas gasosas, fazendo com que o metabolismo do fruto fosse diminuído, retardando seu processo de senescência, prolongando sua vida de prateleira (MUNHUWEYI et al., 2017).

Além de saber como interagem com o fruto e suas características físico-químicas, também foi verificado como as nanoformulações interagem diretamente sobre a estrutura do *B.cinerea*, para possibilitar melhor entendimento de sua atuação sobre este patossistema. Assim, verificou-se que há um alto grau de inibição das nanoformulações sobre o *B. cinerea*, podendo ser observado na figura 10, com efeitos de 50% de redução na germinação já para concentrações de 0,2% do óleo, o equivalente a uma diluição de 25x do produto original (na concentração de 5% de óleo essencial). Estes fatores ocorrem pela natureza do OE de alecrim que possui componentes de alta toxicidade para patógenos (FU et al., 2007; OJEDA-SANA et al., 2013), com a presença de compostos majoritários como terpenos, carvacrol, entre outros (SOYLU, KURT; SOYLU, 2010). O OE de alecrim possui também ação direta sobre os esporos, suprimindo sua germinação e atacando a parede celular (RASOOLI et al., 2006). A incorporação deste óleo nos diferentes agentes encapsulantes potencializou seu efeito por contato, uma vez que os níveis de controle foram elevados já em doses baixas, diferente do que

ocorre naturalmente, onde a maioria dos óleos essenciais tem seu maior nível de efeito por volatilização (SOYLU, KURT; SOYLU, 2010; CABRAL et al., 2013), mostrando que a incorporação do OE foi efetiva para a finalidade proposta de diminuição e controle da podridão cinzenta. Provavelmente estes efeitos ocorreram pela mitigação dos problemas que os OEs possuem ao serem utilizados de forma isolada, sofrendo degradação sob temperatura ambiente, exposição a luz solar e mesmo a volatilização de seus compostos de alta ação antimicrobiana, mantendo seus princípios de ação protegidos para que tenham sua ação intensificada ao contato com o patógeno (TADROS et al., 2004; KAH; HOFMANN, 2014; RIBES et al., 2018).

Nos testes de crescimento micelial, todas as nanopartículas promoveram algum nível de inibição em todos os dias de avaliação, com destaque para o último dia com mais de 30% de redução de crescimento micelial em comparação a testemunha. Sernaite et al. (2020) encontraram inibição de *B. cinerea* alta também para o OE de alecrim desde 1% até 0,2%, alcançando mais de 80% de inibição, além de testá-los em misturas envolvendo OE de cravo e extratos de ambas as plantas, concordando com a eficácia do óleo essencial *per si*. Estudos de Samara et al. (2021) divergem quanto ao seu efeito, tendo encontrado apenas 30% de inibição, testado na concentração de 0,5% para esta doença, sendo mais efetiva contra outros fitopatógenos.

Apesar dos níveis de inibição de crescimento micelial e de germinação de esporos encontrados, esperava-se efeitos iguais ou superiores às demais para o tratamento com nanocápsula de quitosana, uma vez que produtos à base de quitosana tendem a ter mais efeito direto (CHEN et al., 2016; MUNHUWEYI et al., 2017) sobre o micélio dos patógenos através do estrangulamento micelial, por causar porosidade, decorrente de lesões na parede e membrana celular dos patógenos (MAZARO et al., 2008; MIRANDA-CASTRO, 2016; MAREI; RABEA & BADAWY, 2019). A quitosana consegue atuar sobre os tubos germinativos dos fungos fitopatogênicos através da sua supressão e estrangulamento, impedindo com que este se desenvolva e colonize o fruto (LIU et al., 2007). No entanto, seu efeito pode ter sido suprimido nos processos de formação da nanocápsula, atuando mais como revestimento do que em combinação com o OE de alecrim encapsulado. Os cerca de 60% de redução de germinação por parte da nanoemulsão confirmam os efeitos apresentados anteriormente nos ensaios *in vivo* com frutos e também nos de característica físico-químicas, nos quais foi a nanoformulação de maior efeito, indicando que seus efeitos podem ser tanto de proteção física (CHEN et al., 2016), com a formação de barreiras, como também um efeito direto sobre a anatomia do patógeno, através da ação direta de seus compostos (SOYLU, KURT; SOYLU, 2010).

Nanoemulsão e carreador lipídico nanoestruturado mostraram um efeito maior sobre a integridade de parede celular e de membrana, além de elevar a liberação de EROs com o passar do tempo. Os índices mais elevados de UFR apresentados nas figuras 11 e 12 sugerem que, houve maior liberação de quitina e de DNA de células mortas para o exterior dos esporos, isto é, que houve uma fragmentação maior da parede celular e da membrana plasmática do esporo do fungo na presença destas nanoformulações. Os óleos essenciais, devido a sua característica lipofílica, tendem a interagir com a membrana de microorganismos, modificando sua permeabilidade fluidez, causando distúrbios a ponto de provocar expansão desregular e rompimento, levando a liberação do seu conteúdo interior (FADLI et al., 2012; TAO, JIA & ZHOU, 2015; LIU et al., 2016). Latifah-Munirah et al. (2015) e Liu et al. (2016) sugerem que componentes dos óleos essenciais como o eugenol e os pinenos tem a capacidade de causar distúrbios na parede celular alterando sua permeabilidade de fluidez, levando a uma desestruturação externa do patógeno, tornando-o mais frágil e sensível a lesões e morte celular.

Os fatores supracitados sugerem que estas formulações estejam armazenando adequadamente o óleo essencial no seu interior, permitindo sua liberação prolongada e controlada, evitando uma degradação do OE alecrim, mitigando o principal problema desses produtos (TADROS et al., 2004). Outro fator seria o aumento da área superficial específica que as nanopartículas fornecem para a penetração dos produtos no patógeno (DECKER, 2000; FENG et al., 2016).

De modo geral as espécies reativas de oxigênio são consideradas como sinalizadores metabólicos relacionados a desordens fisiológicas em um organismo, sendo sua síntese desencadeada após a identificação de alguma forma de estresse e também naturalmente, com o processo de maturação (BENELOUJAEPHAJRI et al., 2013; SILVA et al., 2017; AGHDAN; FLORES & SEDEGHATI, 2021). A formação de EROs em frutos diz respeito a um prolongamento maior de sua vida, atrasando sua senescência natural, levando a uma maior tolerância ao ataque de fitopatógenos e a consequente podridão (AGHDAN; FLORES & SEDEGHATI, 2021). Estas espécies têm por função causar toxicidade ao fungo através de sua oxidação, com acúmulo de O_2^- e H_2O_2 , promovendo a deterioração de proteínas e rompimento estrutural (PÉREZ-ALFONSO et al., 2012; ZNINI et al., 2013; AGHDAN; FLORES & SEDEGHATI, 2021). Isso pode ser observado no estudo de Silva et al. (2017) que verificaram que em testes com goiabeira a quitosana promovia o acúmulo de EROs, contribuindo para a proteção da fruta contra diferentes doenças, diferente do que ocorreu tanto nas avaliações *in vivo* quanto nos resultados referentes ao acúmulo de EROs para os tratamentos de nanocápsula. Todavia, quando produzidas em excesso, podem causar danos nas células externas e reduzir a

qualidade de frutos e vegetais (SILVA et al., 2018), ou até mesmo matar as células tornando-as mais suscetíveis a patógenos necrotróficos (CHOQUER et al., 2007).

Já em patógenos, principalmente os necrotróficos (HERRERA-TÉLLEZ et al., 2019), a produção de EROs está envolvida nos processos de infecção, geralmente ligada a patógenos filamentosos, tendo uma liberação maior durante a germinação dos conídios, junto ao desenvolvimento das hifas (SEMIGHINI & HARRIS, 2008). Patógenos necrotróficos utilizam-se dessa produção de EROs para matar as células e assim colonizá-la, fazendo com que a planta que tente se defender também através da síntese de EROs acabe auxiliando no seu ataque (CHOQUER et al., 2007). Assim, um balanço adequado entre estímulo da síntese de EROs pela planta e diminuição da produção pelo patógeno deve ser buscado, como no estudo de Herrera-Téllez et al. (2019), que utilizou *Trichoderma asperellum* na inibição dessa produção e verificou que, com o patógeno produzindo menores teores de EROs, o dano foi menor em folhas de tomateiro. Assim, pode-se observar que na presença das nanoformulações houve um incremento nos teores de EROs (figura 13), o que pode acabar sendo algo negativo para os frutos de morango quanto ao ataque do *B. cinerea*, um patógeno necrotrófico que pode aproveitar da morte celular causada pelo acúmulo de EROs.

7. CONCLUSÃO

Todas as nanoformulações, com destaque para a nanoemulsão a partir de 1% de concentração de óleo essencial em sua composição, quando aplicada por imersão, mostraram redução de podridão cinzenta e manutenção das características físico-químicas dos frutos, além de atuarem diretamente sobre o patógeno, se mostrando promissora como uma forma alternativa de controle do mofo cinzento.

8. REFERÊNCIAS

- ABUQMAR, S., MOUSTAFA, K., & Tran, L. S. (2017). **Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea***. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37, 262–274.
- AGHDAN, Morteza S.; FLORES, Francisco B.; SEDEGHATI, Benham. Exogenous phytosulfokine α (PSK α) application delays senescence and relieves decay in strawberry fruit during cold storage by triggering extracellular ATP signaling and improving ROS scavenging system activity. 2021, p. 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109906>.
- AGRIOS, G.N. *Plant pathology*. 5.ed. Elsevier: Academic Press, 2005. 919p.
- ALI, Babar et al. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**, [s.l.], v. 5, n. 8, p.601-611, ago. 2015. Medknow. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.007>.
- ALOUI, H., Khwaldia, K., Licciardello, F., Mazzaglia, A., Muratore, G., Hamdi, M., Restuccia, C., 2014. Efficacy of the combined application of chitosan and Locust Bean Gum with different citrus essential oils to control postharvest spoilage caused by *Aspergillus flavus* in dates. **Int. J. Food Microbiol.** 170, 21–28.
- ANTUNES, Luis Eduardo Corrêa. PEQUENAS FRUTAS: ESTRATÉGIAS PARA O DESENVOLVIMENTO. **Embrapa Clima Temperado**, Fraiburgo, v. 3, n. 1, p.115-122, jun. 2013. ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 13.
- ANTUNES, Luis Eduardo Correa *et al.* **MORANGO CRESCIMENTO CONSTANTE EM ÁREA E PRODUÇÃO**. 2020. Revista Campo & Negócios - p. 5 - Anuário HF 2020. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1122535/1/Anuario-HF-2020-LEC-Antunes.pdf>.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **PROGRAMA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS (PARA): RELATÓRIO DAS ANÁLISES DE AMOSTRAS MONITORADAS NO PERÍODO DE 2013 A 2015**. Brasília: Anvisa, 2016. 246 p. Gerência-Geral de Toxicologia. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+PARA+2013-2015+VERS%C3%83O-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8>.
- BALBINO, José Mauro de Souza. **Tecnologias para a Produção, Colheita e Pós-Colheita de Morangueiro**. 2. ed. Vitória, Es: Incaper, 2006. 80 p. Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural.
- BARIKLOO, Hossein; AHMADI, Ebrahim. Shelf life extension of strawberry by temperatures conditioning, chitosan coating, modified atmosphere, and clay and silica nanocomposite packaging. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 240, p.496-508, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.012>.
- BARRERA-NECHA, Laura Leticia et al. Efficacy of Essential Oils on the Conidial Germination, Growth of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc and Control of Postharvest Diseases in Papaya (*Carica papaya* L.). **Plant Pathology Journal**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.174-178, 1 fev. 2008. Science Alert. <http://dx.doi.org/10.3923/ppj.2008.174.178>.
- BENELOUJAEPHAJRI, Emna, et al. Production of reactive oxygen species and wound-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Botrytis cinerea* are preceded and depend on

a burst of calcium. **BioMed Central Plant Pathology**. v. 160. P. 1-10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-160>.

BERGER, LRR, Stamford TCM, Stamford NP (2011) Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 12:195-215.

BOUTEKEDJIRET, C. et al. Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. **Flavour and Fragrance Journal**. 2003. v18, p. 481-484. <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.1226>.

BRASIL, **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT)**. Consulta de Praga: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2018. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.

CABRAL, L.C., PINTO, V.F., PATRIARCA, A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. **International Journal of Food Microbiology**. v. 166, p. 1-14, 2013.

CERIONI, L., Volentini, S. I., Prado, F. E., Rapisarda, V. A., & Rodriguez-Montelongo, L. (2010). Cellular damage induced by a sequential oxidative treatment on *Penicillium digitatum*. **Journal of Applied Microbiology**, 109, 1441–1449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04775.x>.

CHEN, Huanle et al. Preparation, characterization, and properties of chitosan films with cinnamaldehyde nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 61, p.662-671, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.034>.

CHIEN, Po-Jung; SHEU, Fuu; YANG, Feng-Hsu. Effects of edible coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. **Journal of Food Engineering**. 2007. v. 78, p. 225-229. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.09.022>.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. rev. e ampl. Lavras: UFLA, 2005.

CHOQUER, Mathias, et al. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. **FEMS Microbiol. Lett.**2007. v. 277, p. 1-10. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00930.x>.

CHRISTOFOLI, Marcela et al. Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae) in *Bemisia tabaci* populations. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 70, p.301-308, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.025>.

DA ROCHA NETO, Argus Cezar et al. Antifungal activity of palmarosa (*Cymbopogon martinii*), tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and star anise (*Illicium verum*) essential oils against *Penicillium expansum* and their mechanisms of action. **Lwt**, [s.l.], v. 105, p.385-392, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.060>.

DE MOURA, Ginaini G. D. et al. Endophytic bacteria from strawberry plants control gray mold in fruits via production of antifungal compounds against *Botrytis cinerea* L. **Microbiological research**. 2021, v. 251 <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126793>.

DEAN, R.; Van Kan, J. A. L.; Pretorius, Z. A.; Hammond-Ko sack, K. E.; Di Pietro ,A.; Spanu, P. D.; Rudd, J. J.; Dickman, M. ; Kahmann, R. ; Ellis, J. and Foster, G. D. 2012. **The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology**. Mol. Plant Pathol. 13(4):414-430.

DHITAL, Rajiv et al. Efficacy of limonene nano coatings on post-harvest shelf life of strawberries. *Lwt*, [s.l.], v. 97, p.124-134, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.038>.

DI PIERO, Robson Marcelo; GARDA, Marcos Venicius. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 9, p.1121-1128, set. 2008.

DIEL, M. I.; PINHEIRO, MARCOS VINICIUS MARQUES; COCCO, C. ; THIESEN, LEONARDO ANTÔNIO ; ALTISSIMO, B. S. ; FONTANA, DANIELE CRISTINA ; CARON, B. O. ; TESTA, V. ; SCHMIDT, DENISE . **Artificial vernalization in strawberry plants: phyllochron, production and quality**. AUSTRALIAN JOURNAL OF CROP SCIENCE (ONLINE), v. 11, p. 1315-1319, 2017.

FADLI, Mariam, et al. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection – bacteria and their synergistic potential with antibiotics. **Phytomedicine**. 2012. v. 15, p. 464-471. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.12.003>.

FAOSTAT. **CROPS: Strawberry**. 2020. Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO - FAOSTAT. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.

FENG, J. et al. **Effect of emulsifying process on stability of pesticide nanoemulsions**. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 497, p. 286–292, 2016.

FDA, U. S. Food And Drug Administration. **CFR - Code of Federal Regulations Title 21**. 2019. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.20>.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3ªed. Viçosa, Ed. UFV, 421p. il., 2007.

FILLINGER, S.; ELAD, Y. (Ed.). **Botrytis - the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural systems**. Switzerland: Springer, 2016.

FU, Y.J.; Zu, Y.G.; Chen, L.Y.; Shi, X.G.; Wang, Z.; Sun, S.; Efferth, T. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytother. Res.** 2007, 21, 989–994.

GALEGÁRIO, Fagoni Faver. et al. **Sistema de Produção de Morango para Mesa na Região da Serra Gaúcha e Encosta Superior do Nordeste: Colheita e Pós-colheita**. 2005. Embrapa Uva e Vinho. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MesaSerraGaucha/colheita.htm>.

GARGARO, A. **Transformazione genetica e flusso genico in fragola: ereditarietà ed espressione dei transgeni**. (Tese de Doutorado), Corso di Dottorato di Ricerca in Ortoflorotofrutticoltura. Università Degli Studi Della Tuscia, 126p., 2009.

GOMES, Fabiana. **ESTUDO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO ALECRIM UTILIZANDO AS TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME), HIDRODESTILAÇÃO E EXTRAÇÃO COM FLUÍDO SUPERCÍTRICO (SFE)**. 2003. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Química Inorgânica e Analítica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

GONZALEZ-MAS, M. Carmen. et al. Volatile Compounds in Citrus Essential Oils: A Comprehensive Review. **Frontiers In Plant Science**, [s.l.], v. 10, p.1-18, 5 fev. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.00012>.

GRILLO, R.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F.. Poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules carrying the herbicide atrazine: effect of chitosan-coating agent on physico-chemical stability and herbicide release profile. **International Journal Of Environmental Science And Technology**, [s.l.], v. 11, n. 6, p.1691-1700, 29 ago. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13762-013-0358-1>.

HERRERA-TÉLLEZ, Verónica I. et al. The protective effect of *Trichoderma asperellum* on tomato plants against *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea* diseases involves inhibition of reactive oxygen species production. **International Journal of Molecular Sciences**. 2019. v. 20, p. 1-13. <https://doi.org/10.3390/ijms20082007>.

HIRAYAMA, Yoshihiko, et al. A practical method for forecasting strawberry anthracnose caused by *Glomerella cingulata* using an ethanol-spray treatment in Nara Prefecture, in Japan. **Ann. Rept. Kansai Pl. Prot.** 2015. V. 57 p. 25-29. <https://doi.org/10.4165/kapps.57.25>.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **CENSO AGROPECUÁRIO**. 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6619>.

JADHAV, Chitali; KATE, Vaishali; PAYGHAN, Santosh A. Investigation of effect of non-ionic surfactant on preparation of griseofuvin non-aqueous nanoemulsion. **Journal of Nanostructure in Chemistry**. 5, 107-113, 2014. <https://doi.org/10.1007/s40097-014-0141-y>.

JAIL, Nathalie Garbelotti de et al. High-density chitosan reduces the severity of bacterial spot and activates the defense mechanisms of tomato plants. **Tropical Plant Pathology**, [s.l.], v. 39, n. 6, p.434-441, dez. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1982-56762014000600003>.

JIANG, Yang, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 2011. v.32, p.63-68. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.03.011>.

KAH, Melanie; HOFMANN, Thilo. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. **Environment International**, [s.l.], v. 63, p.224-235, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2013.11.015>.

KERCH, Garry et al. Effect of chitosan and chitoooligosaccharide on vitamin C and polyphenols contents in cherries and strawberries during refrigerated storage. **European Food Research and Technology**. 2011, v. 233, p. 351-358. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-011-1525-6>.

KIMATI, Hiroshi et al (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Doenças Das Plantas Cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda., 2005. 663 p.

LARAZIDOU, A., BILIADERIS, C.G. **Thermophysical properties of chitosan, chitosan–starch and chitosan–pullulan films near the glass transition** Carbohydrate Polym, 48 (2002), pp. 179-190.

LATIFAH-MUNIRAH, B. et al. Eugenol, an essential oil of clove, causes disruption to the cell wall of *Candida albicans* (ATCC 14053). **Frontiers in Life Science**. 2015. v. 8, p. 231-240. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1045628>.

LI, J., LEI, H., SONG, H., LAI, T., XU, X., & SHI, X. (2017). 1-methylcyclopropene (1-MCP) suppressed postharvest blue mold of apple fruit by inhibiting the growth of *Penicillium expansum*. **Postharvest Biology and Technology**, 125, 59-64. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.11.005>.

LIU, Jia et al. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Postharvest Biology And Technology**, [s.l.], v. 44, n. 3, p.300-306, jun. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.12.019>.

LIU, Shumin, et al. *Solidago canadensis* L. Essential Oil Vapor Effectively Inhibits *Botrytis cinerea* Growth and Preserves Postharvest Quality of Strawberry as a Food Model System. **Frontiers in Microbiology**. 2016. v. 7, p.1179. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01179>.

LLINARES, Rubén; SANTOS, Jenifer; TRUJILLO-CAYADO, Luis A.; RAMÍREZ, Pablo; MUNOZ, José. Enhancing Rosemary oil-in-water microfluidized nanoemulsion properties through formulation optimization by response surface methodology. **LWT**. (2018), v. 97 p. 370-375. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.033>.

LOPES, Ueder Pedro. **Podridões pós-colheita em morango: Etiologia e efeito de produtos alternativos**. 2011. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Fitopatologia - Agronomia, Universidade Federal de Viçosa - Ufv, Viçosa, Mg, 2011.

LORENZETTI, E.r. et al. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 13, n. , p.619-627, 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-05722011000500019>.

LUIZ, CAROLINE; DA ROCHA NETO, ARGUS CEZAR; FRANCO, PEDRO OMETTO ; DI PIERO, ROBSON MARCELO. **Emulsions of essential oils and aloe polysaccharides: Antimicrobial activity and resistance inducer potential against *Xanthomonas fragariae***. Tropical Plant Pathology, v. 3, p. 1-12, 2017.

MAGGIO, Antonella; ROSSELLI, Sergio; BRUNO, Maurizio. Essential Oils and Pure Volatile Compounds as Potential Drugs in Alzheimer's Disease Therapy: An Updated Review of the Literature. **Current Pharmaceutical Design**, [s.l.], v. 22, n. 26, p.4011-4027, 1 ago. 2016. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612822666160607065917>.

MAREI, Gehan I. KH.; RABEA, Entsar I.; BADAWY, Mohamed E. I. Preparation and characterizations of Chitosan/Citral Nanoemulsions and their Antimicrobial Activity. **Applied Food Biotechnology**. 2018, v. 5, p. 69-78. <https://doi.org/10.22037/afb.v5i2.19005>.

MARZUKI, Nur Haziqah Che; WAHAB, Roswanira Abdul; HAMID, Mariani Abdul. An overview of nanoemulsion: concepts of development and cosmeceutical applications. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, [s.l.], v. 33, n. 1, p.779-797, 1 jan. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2019.1620124>.

MAZARO, Sergio Miguel, et al. COMPORTAMENTO PÓS-COLHEITA DE FRUTOS DE MORANGUEIRO APÓS A APLICAÇÃO PRÉ-COLHEITA DE QUITOSANA E ACIBENZOLAR-S-METIL. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, Sp, v. 30, n. 1, p.185-190, mar. 2008.

MAZZARINO, Letícia, et al. Jaboticaba (*Plinia peruviana*) extract nanoemulsions: development, stability, and *in vitro* antioxidant activity. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. 2017. v. 44, p. 643-651. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1405976>.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. **Journal Food Science**. v. 65, p. 1270–1282, 2000.

MCCLEMENTS, D.J., 2012. **Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities**. *Soft Matter* 8, 1719–1729.

MIRANDA-CASTRO, Susana Patricia. Application of Chitosan in Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables. **Chitosan In The Preservation Of Agricultural Commodities**, [s.l.], p.67-113, 2016. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-802735-6.00003-3>.

MIRESMAILLI, Saber; BRADBURY, Rod; ISMAN, Murray B. Comparative toxicity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and blends of its major constituents against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on two different host plants. **Pest Management Science**, [s.l.], v. 62, n. 4, p.366-371, 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.1157>.

MOHAMMADI, Ali; HASEMI, Maryam; HOSSEINI, Seyed M. Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease. **Innovative Food Science & emerging technologies**. (2015), v. 28, p. 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.12.011>.

MUNHUWEYI, Karen et al. In vitro and in vivo antifungal activity of chitosan-essential oils against pomegranate fruit pathogens. **Postharvest Biology And Technology**, [s.l.], v. 129, p.9-22, jul. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.03.002>.

NAKASATO, Daniele Y. et al. Evaluation of the effects of polymeric chitosan/tripolyphosphate and solid lipid nanoparticles on germination of *Zea mays*, *Brassica rapa* and *Pisum sativum*. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [s.l.], v. 142, p.369-374, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.033>.

NASERZADEH, Yousef et al. Antipathogenic effects of nanoemulsion of cinnamon essential oil against *Rhizopus* rot and grey mold on strawberry fruits. **Foods and raw materials**. 2019, v 7, n 1, 210-216. <http://dx.doi.org/10.21603/2308-4057-2019-1-210-216>.

NOSHIRVANI, Nooshin et al. Cinnamon and ginger essential oils to improve antifungal, physical and mechanical properties of chitosan-carboxymethyl cellulose films. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 70, p.36-45, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.015>.

NURUZZAMAN, Md. et al. Nanoencapsulation, Nano-guard for Pesticides: A New Window for Safe Application. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 64, n. 7, p.1447-

1483, 15 fev. 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05214>.

OJEDA-SANA, Adriana M. et al. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. **Food Control**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.189-195, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.022>.

OLIVEIRA, D. A. D. **Desenvolvimento, caracterização e atividade antifúngica frente à *glomerella cingulata* de nanoemulsões contendo mancozebe e eugenol**. 2017. 52f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Nanociências) - Centro Universitário Franciscano, Santa Maria - RS.

OLIVEIRA, Jhones Luiz de et al. Geraniol Encapsulated in Chitosan/Gum Arabic Nanoparticles: A Promising System for Pest Management in Sustainable Agriculture. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 66, n. 21, p.5325-5334, 7 maio 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00331>.

PAULA JUNIOR, T.J.; MORANDI, A.B.; VEZON, M. **Manejo Integrado de Doenças e Pragas utilizando o controle biológico**. IN: DE ALMEIDA HALFELD-VIEIRA, Bernardo et al. *Defensivos Agrícolas Naturais: uso e perspectivas*. Brasília, DF: Embrapa, 2016.

PAVONI, Lucia et al. An Overview of Micro- and Nanoemulsions as Vehicles for Essential Oils: Formulation, Preparation and Stability. **Nanomaterials**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.135-159, 12 jan. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nano10010135>.

PÉREZ-ALFONSO, C. O. et al. The effects of essential oils carvacrol and thymol on growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* involved in lemon decay. **International Journal of Food Microbiology**. 2012, v. 158, p.101-106. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.002>.

PETRASCH, Stefan; KNAPP, Steven J.; VAN KAN, Jan A. L.; BLANCO-ULATE, Barbara. Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant Pathology**, [s.l.], v. 20, n. 6, p.877-892, 4 abr. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/mpp.12794>.

PINTO, Marcia da Silva; LAJOLO, Franco Maria; GENOVESE, Maria Inés. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Food Chemistry**, [s.l.], v. 107, n. 4, p.1629-1635, abr. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.038>.

PLUBEE. **Morangos – fruto, cultivo, benefícios e produção mundial**. 2013. PLUBEE. Disponível em: <http://www.plubee.com/morangos/>.

RASOOLI, Iraj. et al. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. **Food Control**, [s.l.], v. 17, n. 5, p.359-364, maio 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.12.002>.

REISSER JUNIOR, Carlos et al. **Panorama do cultivo de morangos no Brasil**. 2015. Campo & Negocio. Disponível em: <http://www.revistacampoenegocios.com.br/panorama-do-cultivo-de-morangos-no-brasil/>.

ROBLEDO, Nancy et al. Effects of Antimicrobial Edible Coating of Thymol Nanoemulsion/Quinoa Protein/Chitosan on the Safety, Sensorial Properties, and Quality of

Refrigerated Strawberries (*Fragaria* × *ananassa*) Under Commercial Storage Environment. **Food and Bioprocess Technology**. 2018, v 11, p. 1566-1574. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2124-3>.

RIBES, Susana et al. Combination of different antifungal agents in oil-in-water emulsions to control strawberry jam spoilage. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 239, p.704-711, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.002>.

SANHUEZA, Rosa Maria Valdebenito et al. **Sistema de Produção de Morango para Mesa na Região da Serra Gaúcha e Encosta Superior do Nordeste: Importância da Cultura**. 2005. EMBRAPA Uva e Vinho. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MesaSerraGaucha/importancia.htm>.

SANTAMARINA, M. Pilar et al. Commercial *Laurus nobilis* L. and *Syzygium aromaticum* L. Merr. & Perry essential oils against post-harvest phytopathogenic fungi on rice. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 65, p.325-332, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.040>.

SERÇE, S. and HANCOCK, J. F. (2005). The temperature and photoperiod regulation of flowering and runnering in the strawberries *Fragaria chiloensis*, *F. virginiana*, and *F. ananassa*. **Scientia Horticulturae**, **167**, 167–177.

ŠERNAITĚ, Lina et al. Biocontrol of strawberry pathogen *Botrytis cinerea* using plant extracts and essential oils. **Zemdirbyst agriculture**. 2020, v.107, n2, p. 147-152. <http://dx.doi.org/10.13080/z-a.2020.107.019>.

SERVILI, Andrea; FELIZIANI, Erica; ROMANAZZI, Gianfranco. Exposure to volatiles of essential oils alone or under hypobaric treatment to control postharvest gray mold of table grapes. **Postharvest Biology And Technology**, [s.l.], v. 133, p.36-40, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.06.007>.

SFAgro. **Morango: Fungicidas não são eficazes contra mofo-cinzento nas plantações**. 2017. ESALQ/USP. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/cprural/noticias/mostra/4732/morango-fungicidas-nao-sao-eficazes-contramofo-cinzento-nas-plantacoes.html>.

SIMON, N.; MENEGUZZO, A; CALGARO, A. **Doenças causadas por fungos e bactérias**. Sistema de Produção de Morango para Mesa na Região da Serra Gaúcha e Encosta Superior do Nordeste. Embrapa Uva e Vinho Sistema de Produção, 6 ISSN 1678-8761

SOYLU, Emine Mine; KURT, Şener; SOYLU, Soner. In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 143, n. 3, p.183-189, 15 out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.015>.

RODGERS, L. Stephanie, et al. A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. **J. Food Prot.** 2004. v. 67, n 4, p. 721-731. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.4.721>.

Sutradhar, Kumar Bishwajit and Amin, Md. Lutful. Nanoemulsions: increasing possibilities in drug delivery. **European Journal of Nanomedicine**, vol. 5, no. 2, 2013, pp. 97-110. <https://doi.org/10.1515/ejnm-2013-0001>.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, 2004.

TAKETA, Thiago B. et al. Investigation of the Internal Chemical Composition of Chitosan-Based LbL Films by Depth-Profiling X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) Analysis. **Langmuir**, [s.l.], v. 34, n. 4, p.1429-1440, 19 jan. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b04104>.

TAO, Nengguo; JIA, Lei; ZHOU, Haien. Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. **Food Chemistry**. 2013. v. 153, p. 265-271. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.070>.

TOFOLI, J.G.; Ferrari, J.T.; Domingues, R.J.; Nogueira, E.M.C. *Botrytis* sp. em espécies hortícolas: hospedeiros, sintomas e manejo. **Biológico**, São Paulo, v.73, n.1, p.11-20, 2011.

TUREK, C., STINTZING, F.C. **Stability of essential oils: A review**. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 12, p. 40-53, 2013.

van Kan, J.A.L. (2005). INFECTION STRATEGIES OF *BOTRYTIS CINEREA*. **Acta Hort.** 669, 77-90. DOI: 10.17660/ActaHortic.2005.669.9.

VIDAL, Hugo Reis; SANTOS, Marli de Jesus dos. VARIEDADES DE MORANGO PARA CULTIVO NO VERÃO. **Campo & Negócio**, Curitiba, v. 1, n. 1, p.1-21, mar. 2017.

VILAPLANA, Rosa; PÉREZ-REVELO, Karla; VALENCIA-CHAMORRO, Silvia. Essential oils as an alternative postharvest treatment to control fusariosis, caused by *Fusarium verticillioides*, in fresh pineapples (*Ananas comosus*). **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 238, p.255-263, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.052>.

WAN, Jing et al. Enhancement of antifungal and mycotoxin inhibitory activities of food-grade thyme oil nanoemulsions with natural emulsifiers. **Food Control**, [s.l.], v. 106, p.1-18, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106709>.

WASHINGTON, W. S. et al. Effect of fungicides, seaweed extracts, tea tree oil, and fungal agents on fruit rot and yield in strawberry. **Australian Journal Of Experimental Agriculture**, [s.l.], v. 39, n. 4, p.487-493, 1999. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/ea98164>.

XU, Tian et al. Retention and release properties of cinnamon essential oil in antimicrobial films based on chitosan and gum arabic. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 84, p.84-92, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.003>.

ZAHID, N. et al. Potential of chitosan-loaded nanoemulsions to control different *Colletotrichum* spp. and maintain quality of tropical fruits during cold storage. **Journal of Applied Microbiology**. v. 113, n. 4, p. 925–939, 2012.

ZENEON, O.; PASCUET, N. S; TIGLEA, P. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008 p. 1020.

ZHANG, Zipei; MCCLEMENTS, David J. Overview of Nanoemulsion Properties: Stability, Rheology, and Appearance. **Nanoemulsions**, [s.l.], p.21-49, 2018. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-811838-2.00002-3>.