

**GISELE DE CAMPOS FERREIRA**

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOLÓGICA DE  
NANOSSISTEMA CONTENDO ZEÍNA E LIGNINA COMO CARREADOR PARA  
GEOPRÓPOLIS**

Sorocaba  
2023

**GISELE DE CAMPOS FERREIRA**

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOLÓGICA DE  
NANOSSISTEMA CONTENDO ZEÍNA E LIGNINA COMO CARREADOR PARA  
GEOPRÓPOLIS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na Área de Concentração Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto

Sorocaba  
2023

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

ciências  
ambientais

unesp  
Sorocaba

F383d	<p>Ferreira, Gisele de Campos Desenvolvimento, caracterização e aplicação biológica de nanossistema contendo zeína e lignina como carreador para geoprópolis / Gisele de Campos Ferreira. -- Sorocaba, 2023 89 p. : il., tabs., fotos</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba Orientador: Leonardo Fernandes Fraceto</p> <p>1. Nanotecnologia. 2. Nanopartículas. 3. Geoprópolis. 4. Pesticidas naturais. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**Câmpus de Sorocaba**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação Biológica de Nanossistema Contendo Zeína e Lignina como Carreador para Geoprópolis

**AUTORA: GISELE DE CAMPOS FERREIRA**

**ORIENTADOR: LEONARDO FERNANDES FRACETO**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Ambientais, área: Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LEONARDO FERNANDES FRACETO (Participação Virtual)  
Engenharia Ambiental / Unesp ICT Sorocaba

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. DANIELE RIBEIRO DE ARAUJO (Participação Virtual)  
Centro de Ciências Naturais e Humanas / Universidade Federal do ABC

Profa. Dra. ESTEFANÍA BAIGORRIA (Participação Virtual)  
Engenharia Ambiental / ICTS Unesp

Sorocaba, 02 de fevereiro de 2023

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família por estar sempre ao meu lado, especialmente, à minha mãe pelo apoio incondicional.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” por disponibilizar estrutura física e materiais, assim como corpo docente especializado e competente. Assevero o meu reconhecimento ao ensino público de qualidade e pelo papel cumprido por esta universidade.

Aos servidores que atuam como facilitadores da jornada acadêmica e transformam a universidade em um lugar de bom convívio para todos.

Ao meu orientador Leonardo Fernandes Fraceto pelas boas conversas.

Aos colegas do Laboratório de Nanotecnologia Ambiental pelo convívio, aprendizados e risadas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Busca-se ampliar as aplicações naturais que possuam atividade eficiente contra fitopatógenos que tragam maior produtividade aos cultivos agrícolas, uma vez que o cenário de pragas resistentes e monocultura tornam o controle de pragas e doenças um dos maiores desafios da atualidade. Destaca-se a própolis como um produto natural com potencial de aplicação para pesticida, no entanto, sua baixa solubilidade em água e fitotoxicidade associada ao tempo de exposição e altas concentrações, representam um impasse. Neste sentido, o encapsulamento de própolis em nanopartículas compostas por biopolímeros melhoram tanto a solubilidade em água dos componentes ativos quanto à liberação destes componentes em dosagens menores, por mais tempo e, além disso, contribui com a gama de aplicações nanotecnológicas eco-amigáveis, por se tratar de uma formulação que é composta somente por materiais renováveis. A obtenção de um tipo de extrato de própolis brasileira, geoprópolis, e a avaliação de aspectos sobre a sua caracterização e estabilidade química ao longo de oitenta e cinco dias foram incluídas neste estudo. Para a aplicação biológica, foram preparadas nanopartículas a partir de zeína e lignina contendo geoprópolis de abelhas Mandacaiá (*Melipona quadrifasciata*), por meio do método de precipitação por antissolvente, que foram caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial Zeta, pH, calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia na região do infra-vermelho (FTIR) e microscopia de força atômica (AFM). Aplicou-se as formulações de nanopartículas e extratos de geoprópolis, utilizando água como controle, em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) e tomate (*Solanum lycopersicum*), estas foram avaliadas quanto à taxa de germinação (%) e comprimento das plântulas, após 5 dias de incubação, e os resultados demonstraram que os tratamentos à base de extrato de geoprópolis e as nanoformulações não causaram efeitos deletérios na germinação das sementes avaliadas. Apesar disso, os resultados obtidos para o efeito biológico são inconclusivos. Já as formulações produzidas apresentaram características de estabilidade físico-químicas estáveis ao longo de 85 dias, dentre estas, duas demonstraram características de tamanho e índice de polidispersão que foram favorecidas com o tempo. Todas as amostras apresentaram excelentes índices de encapsulação (> 99%), enquanto que os resultados obtidos em FTIR de duas das formulações assim como seus componentes separadamente demonstraram interações químicas entre os componentes das formulações, bem como de grupamentos químicos específicos utilizados para a produção. Por fim, formulação sem ativo e formulações com os extratos F e G foram analisadas por meio de imagens obtidas por AFM e estas demonstraram que todas as formulações apresentaram nanopartículas esféricas e com maior frequência de tamanho entre 40 e 60 nm para as formulações contendo geoprópolis em comparação com a formulação sem geoprópolis (80 – 100 nm). Todos os resultados sugerem que a combinação proposta é adequada para a aplicação efetuada, entretanto, estudos que avaliem outros nanossistemas e dosagens com ação eficiente contra fitopatógenos comuns em agricultura são necessários e bem-vindos, assim como os estudos que considerem os aspectos de nutrição e fisiologia vegetais com a utilização de geoprópolis, seja sob a forma de extrato etanólico ou como componente em nanoformulações.

**Palavras-chave:** Produtos naturais. Abelha sem ferrão. Nanotecnologia. Germinação.

## ABSTRACT

The aim is to expand the natural applications that have efficient activity against phytopathogens that bring greater productivity to agricultural crops, since the scenario of resistant pests and monoculture makes the control of pests and diseases one of the greatest challenges today. Propolis stands out as a natural product with potential for application as a pesticide, however, its low solubility in water and phytotoxicity associated with exposure time and high concentrations represent an impasse. In this sense, the encapsulation of propolis in nanoparticles composed of biopolymers improves both the solubility in water of the active components and the release of these components in smaller dosages, for a longer period of time and, in addition, contributes to the range of eco-friendly nanotechnological applications, for it is a formulation that is composed only of renewable materials. Obtaining a type of Brazilian propolis extract, geopropolis, and evaluating aspects of its characterization and chemical stability over eighty-five days were included in this study. For biological application, nanoparticles were prepared from zein and lignin containing geopropolis from Mandaçaia bees (*Melipona quadrifasciata*), using the antisolvent precipitation method, which were characterized by dynamic light scattering (DLS), zeta potential, pH, calorimetry (DSC), infrared spectroscopy (FTIR) and atomic force microscopy (AFM). The formulations of nanoparticles and geopropolis extracts, using water as a control, were applied to bean (*Phaseolus vulgaris*) and tomato (*Solanum lycopersicum*) seeds, these were evaluated for germination rate (%) and seedling length, after 5 days of incubation, and the results showed that treatments based on geopropolis extract and nanoformulations did not cause deleterious effects on the germination of the evaluated seeds. Despite this, the results obtained for the biological effect are inconclusive. The formulations produced showed stable physicochemical stability characteristics over 85 days, among these, two showed characteristics of size and polydispersion index that were favored with time. All samples showed excellent encapsulation rates (> 99%), while the results obtained in FTIR of two of the formulations as well as their components separately showed chemical interactions between the components of the formulations, as well as of groups specific chemicals used for production. Finally, formulation without active and formulations with F and G extracts were analyzed using images obtained by AFM and these demonstrated that all formulations presented spherical nanoparticles and with greater frequency of size between 40 and 60 nm for formulations containing geopropolis in comparison with the formulation without geopropolis (80 – 100 nm). All results suggest that the proposed combination is suitable for the application performed, however, studies that evaluate other nanosystems and dosages with efficient action against common phytopathogens in agriculture are necessary and welcome, as well as studies that consider aspects of nutrition and plant physiology with the use of geopropolis, either in the form of an ethanolic extract or as a component in nanoformulations.

**Keywords:** Natural products. Stingless bee. Nanotechnology. Germination.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Nanocarriers systems for propolis, nanoparticles preparation and characterization	34
<b>Figura 2</b> - Biological activity of propolis nanoparticles.....	37
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática da nanopartícula formada por zeína, geoprópolis e lignina.....	46
<b>Figura 4</b> - Extratos hidroalcoólicos de própolis e geoprópolis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão alocadas na região de Itapetininga (Tabela 1).....	52
<b>Figura 5</b> - Espectros de absorção na região UV-vis nas seis amostras de geoprópolis de Mandaçaia ao longo de 85 dias.....	54
<b>Figura 6</b> - Gráfico de tamanho das nanopartículas (nm).....	59
<b>Figura 7</b> - Gráfico do índice de polidispersão ao longo do tempo.....	60
<b>Figura 8</b> - Gráfico dos valores obtidos para o potencial zeta em seis formulações com ativos e controle sem ativo em t0, t1 e t2.....	62
<b>Figura 9</b> - Gráfico de pH das nanoformulações mais o controle sem ativo, em t0, t1 e t2.....	63
<b>Figura 10</b> - Termogramas DSC para as amostras de zeína, lignina, nanopartícula sem ativo, nanopartícula com extrato F, extrato F e Mistura física com extrato F.....	65
<b>Figura 11</b> - Espectros de infravermelho das amostras de zeína, lignina e nanopartícula de zeína e lignina.....	67
<b>Figura 12</b> - Espectros de infravermelho dos extratos de geoprópolis F e G, formulações com geoprópolis F e G e as misturas físicas F e G.....	69
<b>Figura 13</b> - AFM de amostras de formulação sem e com ativos F e G.....	70
<b>Figura 14</b> - Distribuição de tamanho das formulações de nanopartículas sem e com geoprópolis.....	71
<b>Figura 15</b> - Gráfico do teste de germinação de sementes de feijão ( <i>P. vulgaris</i> ) submetidas aos diferentes tratamentos (n = 50) / 5 dias.....	72
<b>Figura 16</b> - Gráfico da taxa de germinação de sementes de tomate cereja ( <i>S.lycopersicum</i> ) submetidas aos diferentes tratamentos (n = 50) / 5 dias.....	74
<b>Figura 17</b> - Gráfico do comprimento (cm) de plântulas de feijão ( <i>P. vulgaris</i> ) submetidas aos diferentes tratamentos em diferentes concentrações após 5 dias de incubação.....	75

**Figura 18** - Gráfico de comprimento (cm) de plântulas de tomate-cereja (*S. lycopersicum*) submetidas aos diferentes tratamentos em diferentes concentrações após incubação por 5 dias..... 76

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Methodologies for the preparation of nanoparticles containing propolis and other bees products .....	32
<b>Tabela 2</b> - Identificação, nome, espécie, datas e locais de coleta das amostras de geoprópolis bruto .....	47
<b>Tabela 3</b> - Identificação das amostras e resultados do resíduo seco .....	53
<b>Tabela 4</b> - Compostos detectados por espectroscopia de absorção no UV-Vis.....	55
<b>Tabela 5</b> - Identificação das amostras, comprimento de onda e eficiência de encapsulação (%) .....	57
<b>Tabela 6</b> - Resultados para diâmetro hidrodinâmico (nm), índice de polidispersão (IP), potencial zeta (mV) e pH das NP de zeína e lignina contendo diferentes extratos de própolis e das nanopartículas vazias ao longo de t0 (1º dia), t1 (35º dia) e t2 (85º dia) .....	58
<b>Tabela 7</b> - Taxa de germinação de feijão e tomate em porcentagem (%) .....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AFM</b>	= Microscopia de Força Atômica
<b>CO</b>	= Formulação Controle Sem Ativo
<b>DNA</b>	= Ácido Desoxirribonucleico
<b>DLS</b>	= Espalhamento Dinâmico de Luz
<b>DSC</b>	= Calorimetria Exploratória Diferencial
<b>E. E.</b>	= Eficiência de Encapsulação
<b>ETOH</b>	= Solução Etanólica
<b>E6</b>	= Extrato de Geoprópolis F
<b>E7</b>	= Extrato de Geoprópolis G
<b>FAO</b>	= Organização para a Alimentação e Agricultura
<b>FTIR</b>	= Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
<b>F6</b>	= Formulação de Nanopartículas com Ativo F
<b>F7</b>	= Formulação de Nanopartículas com Ativo G
<b>IBGE</b>	= Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas
<b>IP</b>	= Índice de Poldispersão
<b>MF</b>	= Mistura Física
<b>MV</b>	= Milivolts
<b>NP</b>	= Nanopartículas
<b>ONU</b>	= Organização das Nações Unidas
<b>PCL</b>	= Policaprolactona
<b>PH</b>	= Potencial Hidrogeniônico
<b>ROS</b>	= Espécies Reativas de Oxigênio
<b>RPM</b>	= Rotações Por Minuto
<b>SDA</b>	= Secretaria de Defesa Agropecuária
<b>SOFI</b>	= O Estado da Insegurança Alimentar e Nutrição no Mundo
<b>UV</b>	= Ultravioleta

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
2.1 Objetivo geral .....	20
2.2 Objetivos específicos .....	20
<b>CHAPTER I.....</b>	<b>21</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>22</b>
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>23</b>
1.1 A step back, a future ahead: Ecological farming .....	25
<b>2. A NEW INSIGHT FOR AGROECOLOGICAL SOLUTION .....</b>	<b>26</b>
<b>3. FROM PLANTS TO PLANTS: AGRICULTURAL APPLICATION OF PROPOLIS .....</b>	<b>28</b>
<b>4. USES OF NANOCARRIERS SYSTEMS FOR PROPOLIS .....</b>	<b>29</b>
4.1 Biological activity improved by nanocarrier systems .....	36
<b>5. TRENDS, GAPS AND OBSTACLES .....</b>	<b>39</b>
<b>6. CONCLUSIONS .....</b>	<b>40</b>
<b>7. ACKNOWLEDGMENTS .....</b>	<b>40</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>41</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>42</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>43</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
2.1. Amostras.....	47
2.2 Métodos .....	48
2.2.1 Extração hidroalcoólica.....	48
2.2.2 Quantificação de geoprópolis no extrato hidroalcoólico.....	48
2.2.3 Análise espectrofotométrica na região do UV-vis.....	48
2.2.4 Preparo dos sistemas nanocarreadores .....	48
2.2.5 Eficiência da encapsulação.....	49
2.2.6 Dynamic Light Scattering .....	49
2.2.7 Potencial Zeta.....	49
2.2.8 Potencial hidrogeniônico (pH) .....	50
2.2.9 Estabilidade .....	50

2.2.10	Calorimetria.....	50
2.2.11	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	50
2.2.12	Microscopia de Força Atômica .....	51
2.2.13	Índice de Germinação.....	51
2.2.14	Análise estatística .....	52
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>3.1.</b>	<b>Estabilidade química e encapsulação dos extratos .....</b>	<b>52</b>
<b>3.2.</b>	<b>Caracterização dos nanossistemas e estabilidade .....</b>	<b>57</b>
3.2.1.	Calorimetria.....	64
3.2.2.	Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier .....	66
3.2.3.	Microscopia de Força Atômica .....	70
<b>3.3.</b>	<b>Teste de germinação “<i>in vitro</i>” .....</b>	<b>71</b>
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>78</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>79</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um dos principais países produtores de alimentos do mundo e a tendência crescente de utilização de agroquímicos aliado a uma legislação mais permissiva representam um risco socioambiental iminente (OLIVEIRA et al., 2015; FREITAS; BOMBARDI, 2018; BOMBARDI, 2019)

A expansão de monocultivos em território brasileiro nos últimos anos e a intensa utilização de agrotóxicos associados a esses cultivos têm afetado negativamente a saúde da população e o equilíbrio do meio ambiente de maneira severa (BOMBARDI, 2019). O total da soma de áreas cultivadas somente com soja, cana-de-açúcar e eucalipto no Brasil, que são *commodities*, é o equivalente a 1,5 do território da Alemanha ou 5,5 do território de Portugal. Enquanto que as áreas cultivadas com arroz, feijão, trigo e mandioca, que fazem parte da alimentação tradicional, são muito menores e vêm diminuindo (BOMBARDI, 2019).

Contrapõe-se com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas (IBGE), que mostra que a alimentação que chega a mesa da população brasileira tem significativa parcela representada pela agricultura familiar e é produzida em propriedades de pequeno porte (IBGE, 2017). Em modelos de propriedades familiares que desenvolvem agricultura há maior diversidade de alimentos produzidos, bem como a utilização de técnicas, como roteamento de culturas, conservação de sementes, entre outros métodos para o controle de pragas (LIMA et al., 2020).

Dentre os principais desafios para produzir alimentos orgânicos no Brasil podem ser citados fatores limitantes, tais quais o tempo para a conversão de terras de cultivo convencional para um sistema de cultivo orgânico, a diversificação de produção agrícola, pragas e doenças, a obtenção e conservação das sementes crioulas, além de investimentos em pesquisas que possibilitem o desenvolvimento de técnicas que considere os princípios da produção orgânica (LIMA et al., 2020).

Para o combate de pragas em agricultura se utiliza, há centenas de anos, inúmeras substâncias e técnicas, tais quais: a cobertura de vegetação morta, queimadas, óleos, caldas e outras técnicas de controle de pragas. Por volta de 200 dC, 267 espécies de plantas eram conhecidas por atividade pesticida na China (DAYAN et al., 2009).

A utilização e busca por produtos naturais que possam ser utilizados como biopesticidas com segurança é crescente, entretanto, é necessário que estes produtos sejam eficientes frente aos organismos e microrganismos resistentes aos pesticidas convencionais (DAYAN et al., 2009), além disso, estudos recentes têm incluído a utilização de metabólitos secundários de organismos oriundos de ambientes marinhos com potencial para aplicações no combate de pragas agrícolas (SONG et al., 2021).

De maneira semelhante, a busca por produtos naturais que possuam atividade bactericida, fungicida, virucida é aplicada também em setores da saúde, na prevenção de doenças infecciosas, aplicando a mesma lógica, faz parte das soluções da próxima geração, juntamente com as recentes tecnologias (EL-SAADONY et al., 2021; SONG et al., 2021).

Própolis é um composto natural com vasta aplicação em saúde desde a antiguidade e que possui excelente eficiência frente aos fungos e bactérias patogênicas. Ainda que a utilização de própolis seja recente em agricultura, já foi verificada uma gama de aplicações possíveis para extrato de própolis (CARVALHO; SODRÉ, 2021), senão vejamos.

Considerando que a antracnose é a principal doença que causa perdas em culturas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), foi verificado que o extrato etanólico de própolis 4% reduziu a severidade da antracnose em 63% e causou aumento de 33% na produtividade do feijoeiro (PEREIRA; MATTE; VENÂNCIO, 2016).

Vieira e colegas (2010) observaram os efeitos do extrato de própolis sobre a qualidade sanitária e fisiológica de sementes de feijão. Encontraram que o extrato de própolis nas concentrações entre 2 a 16% não prejudicou a germinação de sementes e controlou os fungos, ainda que com menor eficiência se comparado ao fungicida convencional.

Extrato de própolis também foi utilizado para o controle de oídio (*Sphaerotheca fuliginea*) em cultura de pepino, os autores demonstraram que a própolis em concentração de 8% foi eficiente no controle do oídio e ainda induziu ao aumento os níveis de fitoalexina produzida pelas plantas (GUGINSKI-PIVA et al., 2015).

Já em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), Abo-Elyousr et al. (2017) avaliaram a efetividade do extrato de própolis egípsia para combater a murcha bacteriana do tomate, causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* e os resultados demonstraram

controle de 76% da doença, além do aumento de produtividade/planta na dose de 100 mg mL<sup>-1</sup>.

Em conjunto com outros produtos, tem-se que a própolis mais sabão de potássio foi eficaz em controlar pulgões em pomar de pêssegos (*Prunus persica*) (ANTONELLI et al., 1998). Aplicações foliares de ácido salicílico e própolis causaram melhoras nos parâmetros de crescimento de tomateiros, assim como o incremento em defesas antioxidantes das plantas. Os melhores resultados foram provenientes da combinação de 1,5 mM de ácido salicílico mais 10 mg mL<sup>-1</sup> de própolis (EL-HADY et al., 2021).

Somam-se a isto os estudos que avaliaram o efeito da própolis na mitigação dos efeitos do estresse salino, com bons resultados em plantas de trigo (*Triticum*) (MERWAD, 2020), em feijão (SEMIDA; RADY, 2014) e espinafre (*Spinacea oleracea*) cultivados em solo salino (EL-YAZAL, 2019).

Bons resultados foram obtidos com a utilização de extrato de própolis. No entanto, algumas características naturais da própolis podem limitar sua aplicação em plantas, como a insolubilidade da maioria dos componentes de própolis em água (CARVALHO; SODRÉ, 2021). Este fato pode reduzir a disponibilidade dos componentes ativos para os organismos alvo.

Para melhorar a solubilidade de própolis em água, assim como a eficiência na entrega de ativos, a nanotecnologia é uma aliada. Especialmente, em agricultura observou-se que concentrações de ingredientes ativos quando encapsulados em sistemas biopoliméricos tiveram a eficiência melhoradas em aplicações com dosagem dez vezes menores, quando comparada à versão comercial da substância ativa (OLIVEIRA et al., 2015; BOMBO et al., 2019). Com a diminuição na escala de tamanho, as nanopartículas têm um incremento considerável em sua área superficial, tornam-se mais reativas e sofrem modificações das propriedades físico-químicas, ópticas, mecânicas e magnéticas (OLIVEIRA et al., 2015).

No sentido de aliar a nanotecnologia com própolis, e com o intuito de melhorar a biodisponibilidade, assim como a entrega de componentes ativos de própolis em plantas, uma possibilidade é a encapsulação deste em uma matriz biopolimérica (PEREIRA et al., 2019).

Muitos são os biopolímeros que podem ser utilizados para a encapsulação de própolis, como amidos, caseína, gomas, quitosana, etc. (DO NASCIMENTO et al., 2016). A zeína tem destaque, principalmente, por suas propriedades tecnológicas e de solubilidade, pois é eficiente em encapsular compostos hidrofóbicos. Além disso, melhora a liberação de substâncias lipossolúveis e promove proteção contra raios ultravioletas (UV) de compostos bioativos suscetíveis a fotodegradação (WANG et al., 2022).

Considerada uma proteína segura para o consumo humano, o que sugere sua aplicação no encapsulamento de alimentos e nutrientes (KASAAI, 2018). A zeína é uma proteína (prolamina) amplamente encontrada como resíduo industrial na produção de amido e etanol (LI et al., 2019). Consiste na principal proteína de armazenamento do milho (*Zea mays*) e é formada por quatro frações (HU; MCCLEMENTS, 2014b; WANG ET AL., 2022). Juntas,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -zeína representam 50% ou mais das proteínas endospermicas (GUO et al., 2005).

Quimicamente, os resíduos de aminoácidos de zeína, em sua maioria, são apolares e a automontagem da proteína é baseada em anfifilicidade (PATEL et al., 2012). Muitos aminoácidos são sulfurados e formam ligações dissulfeto intermoleculares (GUO et al., 2005). Por se tratar de uma prolamina apresenta solubilidade em soluções aquosas de etanol, mas em água não. Suas características elétricas são positivas em pH baixo e negativa em pH alto.

Ainda que a zeína possa ser facilmente convertida em nanopartículas coloidais esféricas (SUN et al., 2019), de acordo com Hu e McClements (2014) a carga elétrica não é suficiente para garantir sua estabilidade.

Li e colaboradores (2013) melhoraram aspectos de fragilidade natural do filme de zeína com Pluronic F127, este demonstrou excelente capacidade como agente estabilizador. Partículas coloidais de zeína foram preparadas por nanoprecipitação, contendo caseinato de sódio no meio precipitante, resultou em carga superficial negativa devido à adsorção de uma camada de caseinato de sódio (PATEL et al., 2012).

A zeína possui a capacidade natural de agregação devido às interações hidrofóbicas e já foi sugerido por Wang e seus colegas (2022) que para superar esta limitação é necessário que se complexa a zeína com macromoléculas hidrofílicas, por meio de interações não covalentes.

A lignina foi escolhida como estabilizador da suspensão coloidal formada por zeína e extrato de própolis, uma vez que pode reagir com componentes hidrofílicos e hidrofóbicos, tanto da zeína quanto da própolis, por sua natureza anfifílica (NI et al., 2022).

Um dos biopolímeros mais abundantes no planeta (SHARMA et al., 2022), a lignina possui estrutura química que varia de acordo com a origem da matéria-prima. Responsável pelos atributos rigidez e suporte mecânico, a lignina também fornece resistência às plantas frente aos fitopatógenos e participa do sistema de transporte de água e nutrientes (PEREIRA et al., 2022). Quimicamente, ligninas são biopolímeros tridimensionais e amorfos com ramificações e possui o fenilpropano como unidade básica. Estes são unidos por ligações do tipo éter (C-O-C) e carbono-carbono (C-C) (PEREIRA et al., 2013).

Uma excelente maneira de valorizar a lignina, que é atualmente um resíduo industrial, é a produção de nano ligninas, que tem como objetivo obter formulações por sínteses verdes (SHARMA et al., 2022). Como esperado, as nanopartículas de lignina aumentam a área de superfície da lignina (WANG et al., 2019). Já foi verificado que nanopartículas de lignina apresentam capacidade antioxidante superior à lignina em tamanho original (NI et al., 2022).

Pesquisas utilizando nanoligninas encontram-se em estágio inicial (SHARMA et al., 2022) e poderão ser utilizadas para o nano encapsulamento, cicatrização de feridas, nano cola, remediação ambiental, substâncias ativas biocidas, formulações de revestimento, como substância bioadsorvente, entre muitas outras aplicações (LIU et al., 2019; WANG et al., 2019; PEREIRA et al., 2022). Chama atenção ao fato de ligninas e, principalmente, nanoligninas possuírem excelente ação de proteção de raios UV, o que tem sugerido sua aplicação farmacêutica para protetores solares (WANG et al., 2019; SHARMA et al., 2022).

Contribui para a aplicação desta pesquisa o fato de nanoligninas possuírem a característica de alto potencial zeta negativo, este fator pode melhorar a absorção e translocação de nutrientes nas plantas, tornando-os mais biodisponíveis. Foi sugerido por Pereira et al. (2022) que nanopartículas de lignina podem atravessar o tegumento das plantas, ocasionando o movimento de hormônios, biocidas e inseticidas em baixas concentrações.

O presente trabalho consiste em duas partes. A primeira denominada capítulo 1, intitulado: “*Potential in use of propolis extracts in association to nanotechnology to organic agriculture*”. Este capítulo traz um breve histórico da agricultura e sua relação com fatores socioambientais e foi enfatizada a importância da agricultura biodiversa. A própolis foi apresentada como um material promissor para aplicação em plantas devido à sua rica composição, além disso, apresentou-se uma variedade de estudos de nanoencapsulação de própolis.

O segundo capítulo, intitulado “Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de zeína, lignina e geoprópolis de Mandaçaia (*M. quadrifasciata*) visando aplicação biológica *in vitro* em sementes de feijão (*P. vulgaris*) e tomate (*S. lycopersicum*)”, foi estruturado em introdução, materiais e métodos, resultados e discussão e, conclusão. Apresentaram-se estudos sobre a caracterização química e atividade biológica de geoprópolis e foram descritos os métodos para obtenção dos extratos, desenvolvimento dos nanossistemas, bem como a caracterização (tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, calorimetria (DSC), microscopia na região do infravermelho (FTIR), eficiência de encapsulação e microscopia de força atômica (AFM) .

Foram relatados os resultados da caracterização tanto dos extratos de geoprópolis quanto das nanopartículas baseadas em zeína e lignina contendo geoprópolis. Avaliou-se, além disso, a estabilidade dos nanossistemas e dos extratos de geoprópolis obtidos ao longo de 85 dias. A aplicação biológica foi verificada por testes de germinação *in vitro* em sementes de feijão (*P. vulgaris*) e tomate-cereja (*S. lycopersicum*), comparando os tratamentos (extratos, nanopartículas contendo extrato, nano sem ativo) em três diferentes concentrações (0,01%, 01% e 1%) com o tratamento controle (água).

Desta forma, a hipótese deste trabalho é que o nanossistema ora proposto apresente ação no tratamento de sementes germinadas *in vitro*. Por fim, a nanoformulação ora sugerida combina os bioativos provenientes da biodiversidade brasileira (geoprópolis de Mandaçaia) aos materiais renováveis e biodegradáveis (zeína e lignina). Pode representar um produto eco-amigável para futura aplicação em agricultura, com a finalidade de combater pragas e doenças comuns em culturas alimentares.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar sistema nanocarreador para geoprópolis, com base nos biopolímeros zeína e lignina, assim como avaliar a estabilidade química tanto dos extratos obtidos quanto dos nanossistemas, em diferentes tempos, além de aplicar diferentes tratamentos em sementes, por meio de testes de germinação *in vitro*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Aplicar método de extração sólido-líquido em seis amostras de geoprópolis bruto de *Melipona quadrifasciata*;
- Quantificar os extratos de geoprópolis obtidos;
- Avaliar a estabilidade dos extratos de geoprópolis;
- Preparar sistemas nanocarreadores utilizando zeína e lignina para liberar geoprópolis;
- Caracterizar os sistemas nanocarreadores quanto às características tamanho da partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH;
- Avaliar a estabilidade dos parâmetros tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e pH em função do tempo (1, 35 e 85 dias);
- Avaliar a eficiência de encapsulação de extratos de geoprópolis por nanossistema à base zeína e lignina;
- Avaliar as características térmicas dos nanossistemas e seus componentes por calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- Identificar os grupos funcionais dos nanossistemas, bem como de seus componentes pelo emprego de técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);
- Analisar tanto o formato quanto o tamanho das nanopartículas formadas nos nanossistemas por imagens obtidas com o emprego da técnica de microscopia de força atômica (AFM);
- Por meio de ensaio de germinação *in vitro*, avaliar a bioatividade dos extratos de geoprópolis e dos nanossistemas contendo geoprópolis quanto à taxa de germinação (%) (m/m) e comprimento de plântulas de feijão Mulatinho e tomate-cereja.

## CHAPTER I

### Potential in use of propolis extracts in association to nanotechnology to organic agriculture

FERREIRA, G. C; PEREIRA, A. E. S.; FRACETO, L. F. Potential in use of propolis extracts in association to nanotechnology to organic agriculture.

Capítulo submetido para o livro **BioFertilizers: Advances in Bio-inoculants Volume-III: Application in Horticultural Crops** – Elsevier.

## ABSTRACT

Currently, agriculture is facing many challenges involving climate changes, biotic and abiotic stress and the reduction of natural resources. The conventional agriculture after the Green Revolution result in many side effects, as environment contamination and destruction of several ecosystems. Nowadays, organic and agroecological agriculture are sustainable management for food production, once they respect the environment, do not used chemical fertilizers or pesticides, with that, protected the ecosystem and producing food free-chemical residues. By the way, many challenges are faced by the farmers to control pests or even to reduce biological stress. As strategy are used natural compounds with biological activity for crop managements. A product with potential of application is the propolis, in its composition there are several compounds with antimicrobial and virucide activity, moreover antioxidant compounds and minerals that can be used to avoid plant stress or stimulate plant growth. Aiming agricultural application, the use of nanocarriers systems is a great strategy to improve the propolis physicochemical characteristics, improving the chemical stability, biological activity and the bioavailability for the plants. Many of this system can be developed without organic solvent or surfactants. The application of this systems may be used as new natural nanopesticide or nanofertilizers for organic and agroecological agriculture promoting sustainability and respecting the environment.

**Keywords:** Biopesticide. Sustainability. Agriculture.

## 1. INTRODUCTION

The development of agriculture has always been linked to climate conditions, becoming possible only after the end of the last glacial period on the planet, between 12.000 and 9.000 years ago. It's marked the sedentarism lifestyle period of the man, who started to produce food, but without completely let hunting and gathering activities. Over these millennium, plant and animal species were domesticated, selected and improved, were spread, carried by migrating populations and through trade, and provided the basis for human nutrition (CLEMENT et al., 2021; MARIANI et al., 2021; MCCOOK, 2008). Below, is cited aquotation from the myth of the agriculture origin according to the indigenous Brazilian cosmology of the Mundurucu ethnic group, reported in the book "Do Mel as Cinzas - Mythological Collection 2" (2005) by Lévi-Strauss, originally published in 1967:

“In the past, the Mundurucu did not know about hunting and cultivated plants. They fed on wild tubers and mushrooms that grew on trees. It was then that Karuebak arrived, the mother of manioc, who taught to the men the art of preparing it. One day, she ordered her nephew to cut down a part of the forest and announced that bananas, cotton, yams (*Dioscorea*), corn, the three kinds of cassava, watermelons, tobacco and sugar cane would soon be born there. She had a ditch dig in the cleared ground and ordered them to bury her there, but to be careful not to walk on top of it. In a few days, Karuebak's nephew found that, the plants his aunt listed were growing in the place where she lay, but, inadvertently, he walked on the consecrated ground. Immediately, the plants stopped growing. Thus, the size they have reached since then was fixed (...)”.

The myth mentioned above dates back to a time when the Mundurucus were unaware of agriculture and provides clues about the way of agriculture practiced by this and other Amazonian peoples, based on agrobiodiversity. It is known that the Amazon forest is not an untouched sanctuary and that it was managed by the Amerindians who populated that region. (PIPERNO et al., 2015; ALTIERI; NICHOLLS, 2017; THOMAZ et al., 2020).

Currently, there are several problems involving questions about environment and food production, as well as most of the consumer goods used by humanity, that come from agriculture. The way that human population are obtaining its products has accelerated degradation of the ecosystem (ELLIS et al., 2013).

In the panorama of environmental, energy and social crisis, the research for environmentally safe solutions becomes urgent (TALUKDER et al., 2021), especially those that look for the resilience of agricultural systems, once the Green Revolution has failed in its main objectives (ALTIERI; NICHOLLS, 2017; HARWOOD, 2020). After 70 years of the Green Revolution, approximately a tenth of the world population are facing hunger and almost thirty percent live in a situation of food and nutritional insecurity, in which they do not have access to adequate food, according to “*The State of Food Security and Nutrition in the World (SOFI)*” published by the United Nations (ONU) (FAO, 2021).

The technological package combined with the post-war period, started the industrial revolution, and brought large-scale environmental contamination, from industrial and agricultural process that, result of low inspection and permissive legislation from the government. For instance, in Brazil, are present throughout the biosphere, according to Brazilian geographer Larissa M. Bombardi in her work entitled: “*Geography of the Use of Pesticides in Brazil and Connections with the European Union*” (BOMBARDI, 2019).

Furthermore, the high consumption of natural resources as water and land by bigger agribusiness producers have dried up rivers and becoming the soil, unfertile (BENITES-LAZARO et al., 2020). The same natural systems that were used by traditional populations who practiced fishing and subsistence agriculture. These people have been losing their territories and according the expansion of the agricultural frontier advances, areas of forest have been destroyed and losing their ecosystem functions and being transformed into areas for agricultural cultivation or pastures (SIMMONS et al., 2007; BOMBARDI, 2019; THOMAZ et al., 2020; TALUKDER et al., 2021).

Of course, all of this is accompanied by the application of fertilizers and pesticides and increasingly specialized machinery, making practically impossible any type of competition in terms of price and volume of agricultural production, however, forcing urban populations to consume more and more food contaminated by chemical residues (BOMBARDI, 2011; FREITAS; BOMBARDI, 2018; THOMAZ ET AL., 2020).

The monoculture production model has affected the environmental equilibrium in several aspects. Pests are increasingly resistant, demanding ever higher doses of pesticides, and highly soluble synthetic chemical fertilizers are drained into water bodies, generating eutrophication. This, without considering soil degradation, changes in rainfall patterns,

losses of biodiversity and agrobiodiversity and, above all, the impact on human health (BOMBARDI, 2011; FREITAS; BOMBARDI, 2018; TALUKDER et al., 2021).

### **1.1 A step back, a future ahead: Ecological farming**

In agroecology, the use of synthetic chemical fertilizers and pesticides is dispensed. As one alternative, the focus is on providing plants with the ideal conditions for natural growth. Now, how to produce in a soil full of synthetic nutrients and added with all kinds of poisons? What has been happening in recent decades as a result of this conventional agriculture is soil depletion, followed by erosion and degradation. (ALTIERI; NICHOLLS, 2017).

The Agroforestry Systems has been successful implemented in terms of recovering degraded areas, restarting native vegetation to previously deforested areas, consequently, their ecosystem functions (CHATTERJEE et al., 2018; SAUVADET et al., 2020). In practice, this type of system combines food production with the replanting of forests. In addition, it provides an increase in food diversity for producers and a more acceptable place to work (SAUVADET et al., 2020). How bigger the diversity, it is better, this will reflect in the diversification of economic sources, as well as the reappearance of waters bodies.

In the Agroforestry Systems, it is considered which are the native forest species of the ecosystem, where the area is inserted and, which extracts they will occupy over time, until reaching maturity, that is, they are consortia based on natural succession and stratification of plant species. Then, crops of economic interest, such as short-cycle vegetables, annual-cycle grains, bi-, tri-annual and perennial fruit trees, are combined with leguminous improving biomass-producing species, these will be periodically pruned and deposited on the soil, configuring the syntropic agriculture. Biodiversity is, therefore, the guide in agroecological management, which includes the syntropy that has been widespread in Brazil since 1993, by Ernst Götsch (ANDRADE et al., 2020).

In ecologically diverse cropping systems, however, pest attacks occur at a lower intensity when compared to conventional cropping systems. (SCHROTH et al., 2000; ALTIERI; NICHOLLS, 2017).

From the perspective of an ecological production system, pests are indicators of inadequate management. The aim is, therefore, to monitor and reduce disease-causing

populations in crops (WUEST et al., 2021), using various management tools, such as crop rotation, use of insect baits, application of grouts and organic compounds of plant and/or animal origin - with or without the use of worms, biofertilizers, in addition to efficient microorganisms, biodynamic preparations and so many other agroecological solutions that shed light on soil nutrition, consequently, result in better plant nutrition, as a fundamental part of pest management practice, which generates a richer crop in foods with high biological value (TALUKDER et al., 2021).

## **2. A NEW INSIGHT FOR AGROECOLOGICAL SOLUTION**

Considering the topic above and, in order to contribute to the diversification of agroecological practices that can be inserted as a management option in organic agriculture, the bee propolis has the potential to act in several aspects for ecological management, but it has been little explored until the moment (PEREIRA et al., 2021).

Biological properties such as bactericide, fungicide, virucidal, acaricide, among others, have been attributed to different types of propolis (BANKOVA, 2005; BERRETTA et al., 2017; KUMAZAWA et al., 2004; SANTOS et al., 2020) and suggest its application in agriculture for pest management, both for seed treatment and for foliar applications at different times of cultivation (PEREIRA et al., 2021).

Propolis is composed of resinous, gummy and balsamic substances that are collected from shoots, flowers and plant exudates, added to salivary secretions, wax and pollen (PARK et al., 2002; KUMAZAWA et al., 2004; BANKOVA, 2005; BERRETTA et al., 2017; SANTOS et al., 2020). To obtain it, bees break resins with their jaws, manipulate them with their forepaws and transport them in their hind legs to the hive, where they will be mixed with bee saliva and partially hydrolyzed by enzymes, followed by deposition on the walls of the hive for use as needed by the colony (SANTOS et al., 2020). They building pieces, embalm invaders and, as a consequence, prevent the growth of microorganisms inside the colony. Propolis is also known as “bee glue” and has been used since ancient times (PARK et al., 2002; BANKOVA, 2005; SANTOS et al., 2020).

Just as example, in Brazil, there are 14 different types of propolis are classified, with distinct physicochemical characteristics, yellowish, brown, greenish, reddish, with

characteristic balsamic and resinous aromas, from mild balsamic to strong spicy flavor, and vary according to the botanical source (BERRETTA et al., 2017; SANTOS et al., 2020).

Chemically, Brazilian propolis has different compositions from European, Asian and North American propolis (PARK et al., 2002; BANKOVA, 2005; BERRETTA et al., 2017). However, a large study that characterized Cuban propolis, according to the class and secondary compounds identified, classified propolis as brown, red and yellow. (CUESTA-RUBIO et al., 2007; SANTOS et al., 2020). Cuban red propolis are characterized by the presence of isoflavonoids (CUESTA-RUBIO et al., 2007), such as Brazilian bees of the same type (CUESTA-RUBIO et al., 2007; BERRETTA et al., 2017). By the way, Brazilian green propolis, from botanical sources of the *Baccharis* genus, contains artepilin C, which is an important chemical marker for this type of propolis. (PARK et al., 2002; BERRETTA et al., 2017; SANTOS et al., 2020).

In its composition, propolis has a wide diversity of phenolic compounds, flavonoids, xanthenes and terpenes that are responsible for a range of known biological activities (KUMAZAWA et al., 2004; NANI et al., 2020). These activities differ according to the phytochemical composition, which, in turn, distinguishes between regions and available botanical resources, as well as varies with the genetics of the bees and the time of collection (KUMAZAWA et al., 2004; BANKOVA, 2005; BERRETTA et al., 2017; SANTOS et al., 2020).

The studies that have the chemical composition are extremely relevant, as they help to improve the standards quality of this important product, as well as its possible applications that provide information about environmental monitoring, as bees perform your collections in specific distance rays for each species (BANKOVA, 2005; FERREIRA et al., 2019; SAMPIETRO et al., 2020)

Some authors support the idea that the phytochemical composition also varies with the obstacles faced by the hive, as an example of bees collecting exudates from plants contaminated by fungal diseases. Furthermore, the synergistic action between the components of propolis seems to be responsible for a good part of the biological properties attributed (BANKOVA, 2005). Due to the presence of caffeic acid, tartaric acid, quercetin and gibberellins present in Brazilian organic propolis, which showed anti-fungal and anti-

inflammatory actions, it was suggested that propolis may contribute to the increase in plant resistance (NANI et al., 2020).

### **3. FROM PLANTS TO PLANTS: AGRICULTURAL APPLICATION OF PROPOLIS**

Many biological properties have been attributed to propolis from different species of bees, as scientific studies confirm antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, anti-inflammatory, fungicidal, antitumor, anticarcinogenic, antimolliculitis actions, among others (KUMAZAWA et al., 2004; BANKOVA, 2005; FERREIRA et al., 2019; LAVINAS et al., 2019; BARBOZA et al., 2020; SAMPIETRO et al., 2020; SANTOS et al., 2020).

Especially in agriculture, applications using propolis are recent and very promising. The anti-phytopathogenic action was demonstrated when testing green propolis extract against *Pythium aphanidermatum*, the study identified Artepillin C as the main compound in the bioactive ethanolic fraction. This cinnamic acid derivative showed concentration-dependent action, with a minimum inhibitory concentration of 750  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , for a period of 30 hours. (PAZIN et al., 2019)

Uses with propolis have inhibited seed germination and the growth of plant species, this phytotoxic potential points to applications aimed at controlling weeds, since the effects are selective between plants and treated parts, as well as with the doses used (PEREIRA et al., 2021).

The efficiency of propolis obtained in Argentina, with samples from different regions, was verified against the bacteria *Erwinia carotovora subsp.*, a bacteria associated with potato plantations worldwide. It was highlighted that propolis extracts with the highest concentrations of phenolics and flavonoids were the ones with the highest bactericidal activity (SAMPIETRO et al., 2020).

Another study tested several natural extracts from plants, algae and propolis observed 50% of increase in the yield of wheat plants, as well as an increase in the content of polyphenols, photosynthetic pigments and nutrient absorption by the roots (MERWAD, 2020).

A study applied to aquaculture, such as bioremediation, considered that the amounts of pesticides that inevitably reach fish breeding reservoirs could cause deleterious effects.

The authors tested the bee products to reverse the oxidative damage caused by pesticides in Jundiá catfish (*Rhamdia quelen*). Successfully, the levels of hydrogen peroxide and protein carbonyls observed in exposed fish were reversed or prevented when water inoculated with tebuconazole was supplemented with bee products (royal jelly, pollen, honey and propolis) (FERREIRA et al., 2013).

It is assumed that the inherent biological value of bee products has relevance for application in ecological agriculture, as propolis, in addition to contributing to the control of pathogens in plant, can also reduce the density and growth rate of unwanted plants in cultivation, which assists in the management. Furthermore, the perspectives regarding the action of propolis under the aspects of plant nutrition and physiology are positive.

Encouraging the production of propolis represents a positive socio-environmental impact, as it contributes to the continuous improvement of the apicicultures production chain, as well as aspects of conservation and rational management of bees.

In economic terms, Brazil is the third largest exporter of propolis in the world (SANTOS et al., 2020), being Japan the country that consumes the most production of Brazilian propolis (BERRETTA et al., 2017). China, is the largest producer of propolis and also holds almost 40% of the patent documents associated with the use of propolis, predominantly with uses related to human medicine and pharmacopoeia (SANTOS et al., 2020).

It is possible to practice environmental conservation together with the potential to expand the propolis production, since combined with research and development of new products, they can add value to this clean raw material and income for beekeepers. Different applications have been using propolis as a source of bioactive compounds, in the most varied sectors: food, pharmaceutical, human and veterinary medicine, agricultural etc. Aiming these applications, the use of nanotechnology can improve the biological activity of these compounds, enhance the chemical stability, and increase its application in many fields, being one highlight, the agriculture.

#### **4. USES OF NANOCARRIERS SYSTEMS FOR PROPOLIS**

Nanocarriers systems are a trend for encapsulation of bioactive compounds. (CAMPOS et al., 2019; BARROS; CASEY, 2020). The nanoscale proprieties as size,

surface area and charge, the possibilities do designer this system for became stimuli responsive or/and target specifics has call the attention of many industry fields, with highlight to pharmaceutical and agriculture (LUGANI; OBEROI; RATTU, 2021; SINGH et al., 2021).

Once, bioactive compounds are encapsulated by nanocarriers, they can be protected from physicochemical process as volatilization, photodegradation, hydrolysis that can reduce the biological active of these compounds. Furthermore, the nanoencapsulation can improve the solubility of hydrophobic compounds, improving its uptake in target organism, the bioavailability, by this way, improving the biological effects.

One of the strategies for the development of nanocarriers systems is to choose materials that can be provide from a renewable source, biodegradable, biocompatible and non-toxic, targeting to produce nanoformulation that no cause contamination and toxic effects to the environment, as example lignin, chitosan, cellulose, alginate, casein, arabic gum, zein among others (CAMPOS et al., 2015; ZHANG; ZHAN; TIAN, 2021; CASTRO; COSTA; CAMPOS, 2022).

These biopolymers have been used for encapsulate biological natural compounds as essential oils and plant extract aiming to improve not just the physicochemical proprieties, but as consequence, they biological activities as antimicrobial, antiparasitic, repellent, insecticide among others. (ARMENDÁRIZ-BARRAGÁN et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2019).

The combination of natural compounds with biopolymeric nanomaterial for the development of nanoformulations have emerged in the last years (ARMENDÁRIZ-BARRAGÁN et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2019). When, it is focusing in agriculture, these new nano-based pesticides to control agricultural pests without hazard materials, may to become a new approach to improve organic agriculture.

One example, is silica nanoparticles containing cinnamon essential oil. In the work, Bravo Cadena et al. (2018) improve the oil bactericidal activity in 90,000 folds in comparison the oil non-encapsulated aiming seeds protection.

As describe previous, propolis has great application for agriculture, and nano-based formulation can be a key step for optimize their use in the field. However, the propolis composition is a complex of chemical structures, that are present in waxes, resins and

volatiles, and these composition can change, according the harvesting time, geographical location and, species bees (BARBOSA et al., 2019; DO NASCIMENTO et al., 2016; SHALTOUKI et al., 2019). The resin, for instance have chemical structures as phenolic acids, esters, flavonoids, terpenes, aromatic aldehydes, and alcohols, fatty acids, stilbenes and b-steroids. There are more than 300 compounds, furthermore several minerals and vitamins (SHALTOUKI et al., 2019).

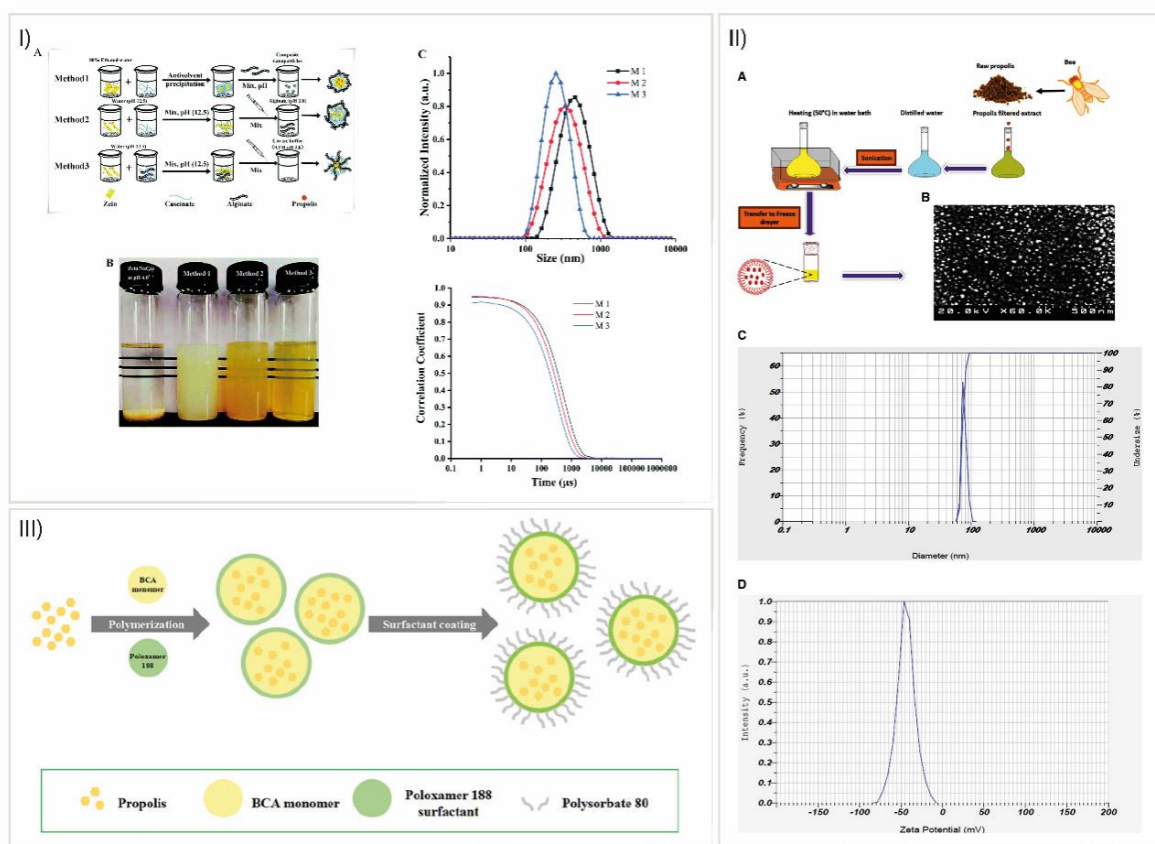
Several nanocarrier systems have been successfully developed for propolis (Table 1), based in different methodologies, using biopolymers as example chitosan, zein, alginate, poly- $\epsilon$ -caprolactone, lipids (caprylic/capric triglycerides and sesame), adsorbed by silica nanoparticles, or even to prepare biogenic nanoparticles (BARBOSA et al., 2019; CORREA et al., 2019; DO NASCIMENTO et al., 2016; MATEI et al., 2015; ZHANG et al., 2019), other methodologies as ultrasonication method describe that the propolis through sonication process can result in propolis nanoparticles (AFRASIABI et al., 2020).

**Tabela 1** - Methodologies for the preparation of nanoparticles containing propolis and other bees products

<i>Nanoparticles</i>	<i>Method of preparation/nanoparticles characteristics</i>	<i>Application and/or biological activity</i>	<i>Reference</i>
Beeswax nanoparticles	Method: nanoprecipitation. Nanoparticles around 200to500 nm. Propolis source: Sigma Aldrich.	Antimicrobial activity against <i>Escherichia coli</i>	Shaltouki et al. (2019)
Silica nanoparticles	Method: co-condensation method. Propolis source: Red propolis. Nanoparticles around 100 to 300nm with pore size of 3.63 nm. Encapsulation of 15%	Antimicrobial activity against <i>Staphylococcus aureus</i> .	Azevedo de M Oliveira et al. (2020)
Biogenic silver nanoparticles	Method: Biogenic process. Propolis source: Red propolis. Nanoparticles around 109 nm and, polydispersity of 0.3.	Antimicrobial activity against <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i> and <i>Cryptococcus neoformans</i> .	Barbosa et al. (2019)
Chitosan nanoparticles	Method: Ionic gelation method. Propolis source: Malaysian propolis. Factorial studies produced nanoparticles around 247 to 512 nm, polydispersity of 0.2 to 0.57 and, zeta potential of + 35 to +74 mV. Spherical shape.	Antimicrobial activity against <i>Enterococcus faecalis</i> .	Ong et al. (2017)
Nanostructured lipid carriers	Method: Emulsification method. Propolis source: Colombian propolis. Nanoparticles around 30 nm, polydispersity of 0.1 and zeta potential of + 2 mV.	Hypothetic application for pharmaceutical and cosmetics products. No biological evaluation.	Correa et al. (2019)
Propolis nanoparticles	Method: Solvent diffusion method. Propolis source: Brazilian propolis from Urupema-Santa Catarina. Nanoparticles around 192 nm, polydispersity < 0.2, and zeta potential of -22 to -30 mV.	Treatment for bovine mastitis. Antimicrobial activity against <i>Staphylococcus aureus</i> .	Pinheiro Machado et al. (2019)
Zein/Caseinate/alginate nanoparticles.	Method: anti-solvent precipitation and pH-driven method. Propolis source: from Bee Words Industry-China. Nanoparticles around 200 to 362 nm, polydispersity of 0.23 to 0.26 and, zeta potential of -26 to -31 mV.	Hypothetic application for foods, supplements and pharmaceutical.	Zhang et al. (2019)

	Encapsulation efficiency around 76 – 86.5%.		
Polycaprolactone (PCL) nanoparticles	Method: nanoprecipitation. Propolis source: Brazilian red propolis from Marechal Deodoro-Alagoas. Nanoparticles around 200 to 280 nm and, zeta potential of -20 to -26 mV. Encapsulation efficiency of 75%.	Treatment against <i>Leishmania (V) braziliensis</i> .	do Nascimento et al. (2016)
Zein/carboxymethyl chitosan nanoparticles	Method: Anti-solvent precipitation. Propolis source: from Bee Words Industry-China. Nanoparticles around 197 to 220 nm, polydispersity of 0.1 to 0.23 and, zeta potential of -18 to -21 mV. Encapsulation efficiency of 40%.	Improve antioxidant activity with potential application for foods, supplements and pharmaceutical	Zhang et al. (2018)
Propolis nanoparticles	Method: ultrasonic method. Propolis source: Propolis from Isfahan-Iran. Nanoparticles around 70 to 75 nm and zeta potential of -44 mV.	Antimicrobial activity against <i>Streptococcus mutans</i> aiming to remove deep care lesions.	Afrasiabi et al. (2020)
Chitosan/Propolis/silver nanoparticles	Method: Sonication method Propolis source: Propolis from Burgos-Spain. Nanoparticles around 24 to 35 nm.	Antimicrobial activity against <i>Diplodia fungi</i> .	Matei et al., (2015)
Poly(n-Butyl Cyanoacrylate) Nanoparticles	Method: in situ anionic emulsionpolymerization method. Propolis source: Bee Product Industry Co. Ltd., Lamphun, Thailand. Nanoparticles with 194 to 196 nm and, zeta potential of -8 to -9 mV. Encapsulation efficiency of 88%.	Potential application for treatment of cerebral cryptococcosis.	Thammasit et al. (2021)

The Figure 1 shows some methods and characterization of nanocarriers system for propolis (Figura 1). For example, in the Figure 1 I), Zhang et al. (2019) developed a stimuli responsive nanocarriers system based in zein, alginate and casein. The methodology showed great advantages, first for the easy methodology to prepare the nanoparticles and second, do not used organic solvents. The authors propose an alternative method to solubilize zein, increasing the pH to 11.3, by this way, it was not necessary add ethanol for solubilize the zein polymer, that is a normal protocol for prepare zein nanoparticles by anti-solvent method (HU; MCCLEMENTS, 2014; DE OLIVEIRA et al., 2019).



**Figura 1** - Nanocarriers systems for propolis, nanoparticles preparation and characterization. I) (A) Schematic illustration of propolis loaded zein/NaCas/alginate nanoparticle fabrication using three different encapsulating approaches. (B) Appearance of zein/NaCas without alginate and nanoparticles prepared using three different encapsulating approaches after incubation at pH 12.5 for 30 min followed by acidification to pH 4.0. (C) Size distributions and correlation coefficient of pH 4.1 dispersions prepared with three different encapsulation approaches, after storage at 4 °C for 30 days; II) Characterization of PNP. (A) Schematic representation of PNP preparation; (B) FE-SEM image of the PNP; (C) size distributions of the PNP; (D) the zeta potential of PNP. PNP propolis nanoparticle, and III) Schematics showing the preparation of propolis-loaded PBCA-NP by anionic emulsion polymerization. The images are reproduced with permission from Royal Society of Chemistry, Scientific Reports and Frontiers.

Briefly, at high pH zein is soluble and, sodium caseinate micelles are dissociate, and at this step, there are inter-chain hydrogen bonds between zein and sodio caseinate. The pH neutralization resulting in the formation of co-assembled nanoparticles. To improve the

stability of this nanoparticles, the authors proposed a coating with alginate polymer by electrostatic interaction, improving the steric repulsion between the nanoparticles, becoming the system more stable against aggregation process (ZHANG et al., 2019). For propolis, the system was able to have a encapsulation efficiency of 80% resulting in nanoparticles of 208 nm and zeta potential of -27 mV (ZHANG et al., 2019).

The Figure 1 II) showed the method proposed by Afrasiabi et al. (2020) by ultrasonic method, resulting in nanoparticles of 70 to 75 nm and zeta potential of - 44 mV. The Figure 1 III), the nanocarrier system proposed by Thammasit et al. (2021), the nanocarrier system proposed by, prepared by *in situ* anionic emulsion polymerization method. To prepare the systems the authors used polymer n-butyl cyanocrylate monomer and the surfactants polaxamer 188 and polysorbate 80, resulting in nanoparticles of 194 to 196 nm, zeta potential of - 8 mV and encapsulation efficiency of 88%.

Furthermore these methodes, Ong et al. (2017) proposed a chitosan nanocarrier system for propolis. Chitosan is a polysaccharide that in the last years have been extensively study aiming agricultural application. This biopolymer has antimicrobial activity, furthermore is able to improve the innate plant immune systems, that can result in resistance against biotic stress (CHANDRA et al., 2015; BAKSHI et al., 2020). However, one negative aspect is that this process for agricultural application is the sonication processes and the addition of surfactants as Tween 80, that became the process more expansive and less green.

Barbosa et al. (2019) describe a biogenic process for prepare silver nanoparticles using propolis. The presence of bioactive compounds can work as reducing agents and result in silver nanoparticles. The propolis has many phenolic compounds that have antibacterial activity, that can increase this properties ensemble with silver nanoparticles, resulting in synergetic effects (BARBOSA et al., 2019).

In conclusion, nowadays there are methodologies that can be used to developed nanocarriers systems for propolis. These systems showed great colloidal characteristics as well stability overtime. Moreover, propolis carried by nanoparticles can improve the propolis biological activity as antimicrobial agent, these properties may be used to control plant diseases caused by bacteria and fungal. However, aiming application in the organic agriculture, it is necessary to think about all production process, mainly given preference for methodologies that do not use surfactants, organic solvents, or even process that demand several process or high demand of energy. By this way, developed nanocarriers system by green process, do not generate hazard residues, resulting in eco-friendly formulations.

#### **4.1 Biological activity improved by nanocarrier systems**

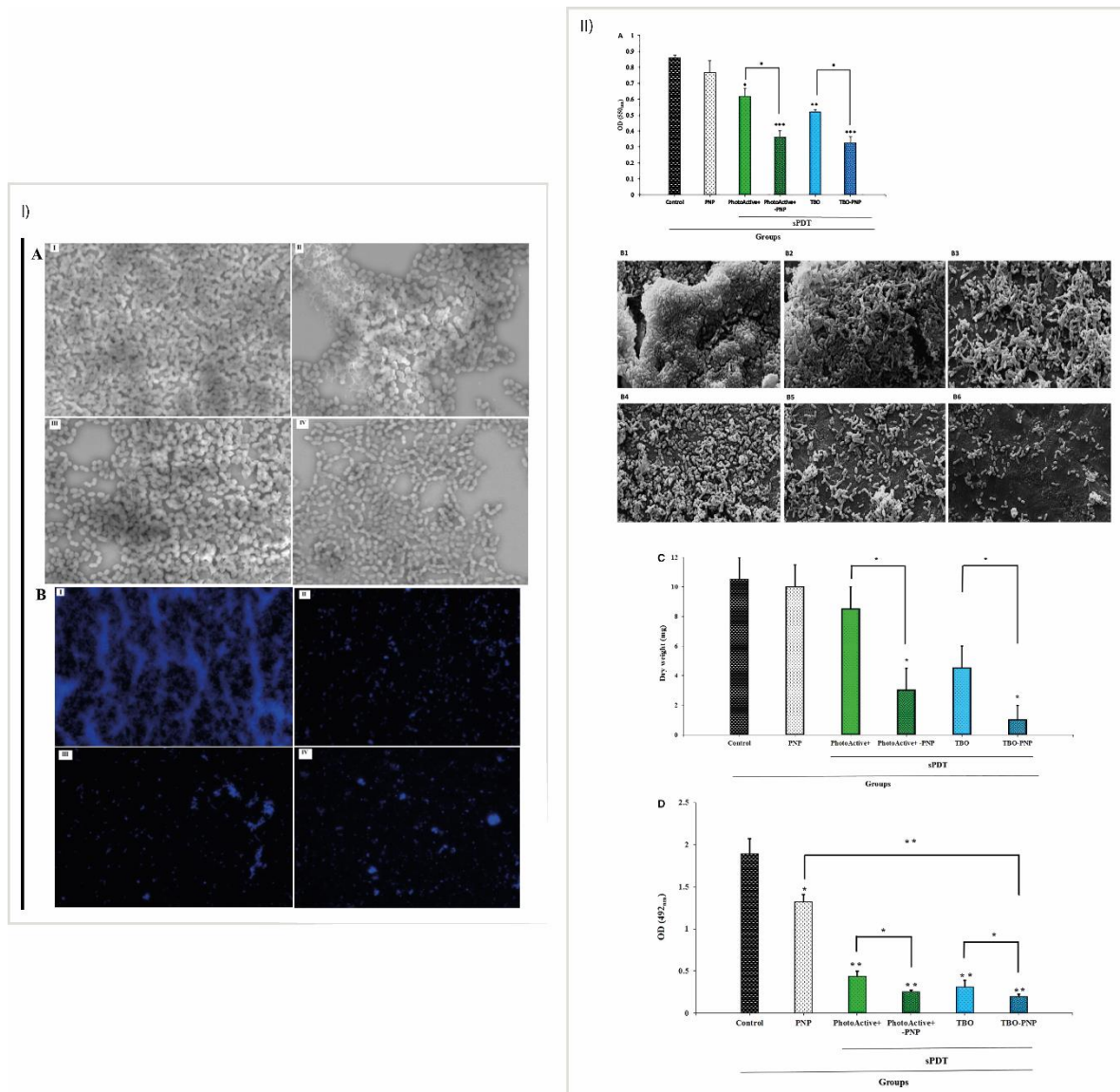
The propolis is known about pharmacological activities, for instance antimicrobial, antiviral, antiparasite, anti-inflammatory, even anticancer (DO NASCIMENTO et al., 2016; PINHEIRO MACHADO et al., 2019). However, one limitation is oxidative reaction of compounds as flavonoids, that reduce biological activity (DO NASCIMENTO et al., 2016). Other point that limited its application is the solubility, that reduce the bioavailability of propolis compounds (DO NASCIMENTO et al., 2016; ZHANG et al., 2019).

The use of nanocarriers systems is a great alternative to resolve these problems. Once, the encapsulation process can protect active compounds against degradation process and improve solubility (ZHANG et al., 2019).

Aiming agricultural application, the antimicrobial or virucide activity from propolis is an interesting propose for control several diseases caused by fungal, bacteria and virus. The phytopathogens are one of the mains problems for crop growth, resulting in loss of production and quality (ALI et al., 2021). In the agriculture, several pesticides as bactericides, fungicides and virucides are used to control phytopathogens, resulting in side effects for the environment and human health (RANI et al., 2021).

The propolis antimicrobial activity act by different mechanisms, for instance, the inhibition of nucleoside synthesis, DNA-gyrase, glucosyltransferase activity, cytoplasmic membrane and energy metabolism (HATUNOĞLU et al., 2014; BARBOSA et al., 2019). In addition, propolis composition have high content of phenol and flavonoids, these compounds are able to disrupt bacterial membrane, altering ion permeability, providing the inhibition of bacterial mobility (MATEI et al., 2015; ONG et al., 2017).

All the properties described above, may make the propolis a natural compound for plant disease control. Additionally, propolis nano-based formulation can improve these properties and result in nanoformulation free of surfactants or hazard materials (ZHANG et al., 2019), becoming an alternative solution for agriculture.



**Figure 2** - Biological activity of propolis nanoparticles. I) Scanning electron microscopy and calcofluor white fluorescent microscopy of bacterial biofilms. (A) Scanning electron microscopy picture depicting biofilm bacteria and (B) fluorescence microscopy picture depicting biofilm formation by (I) untreated control bacteria, (II) bacteria treated with Eth or (III) EA extracts of Malaysian propolis or (IV) chitosan-propolis nanoparticles and II) (A) The effect of the PNP, aPDT and aPDTplus on biofilm formation of *Streptococcus mutans* determined by crystal violet assay at 550 nm. Error bars represent standard deviation.  $p < 0.05$ ,  $< 0.01$  and  $< 0.001$  are shown by \*, \*\* and \*\*\*, respectively. (B1–B6). Imaging of *Streptococcus mutans* biofilms using Fe-SEM; (B1) Untreated biofilm control; (B2) biofilm treated with PNP; (B3) biofilm treated with Photo Active+aPDT; (B4) biofilm treated with TBO-aPDT; (B5) biofilm treated with PhotoActive+aPDTplus; (B6) biofilm treated with TBO-aPDTplus. Fe-SEM: field emission scanning electron microscopy; PNP: propolis nanoparticle; TBO: toluidine blue. Magnification, 3,000 x. (C) The effect of the PNP, aPDT and aPDTplus on the biomass (dry weight) in the *S. mutans* biofilm compared with control. Error bars represent standard deviation.  $p < 0.05$  and  $< 0.01$  are shown by \* and \*\*, respectively. PNP: propolis nanoparticle. (D) The effect of the PNP, aPDT and aPDTplus on the metabolic activity of *Streptococcus mutans* determined by XTT reduction assay at 492 nm. Error bars represent standard deviation.  $p < 0.05$  and  $< 0.01$  are shown by \* and \*\*, respectively. PNP propolis nanoparticle. The images are reproduced with permission from Plos One and Scientific Reports.

Some studies have demonstrated nanocarriers systems containing propolis against microorganisms (Figure 2). Ong et al. (2017), proposed chitosan nanoparticles as carrier

systems for propolis, aiming anti-biofilms formation, in this work the authors demonstrate a high antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis* around 90%, inhibiting biofilm formation (Figure 2 I). Afrasiabi et al. (2020) proposed an interesting system using propolis nanoparticles and the combination of photosensitizer (chlorophyllin-phycoerythrin mixture and toluidine blue) against virulence of *Streptococcus mutans* resulting in genes suppression involved in biofilm formation (Figure 2 II).

Machado et al. (2019), produced propolis nanoparticles using solvent diffusion method. The authors proposed these systems for treat bovine mastitis, the formulation showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* in low concentrations ( $156\text{-}310\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and no toxic effects for epithelial cells of bovine mammary gland.

Others studies have demonstrated different nanocarriers systems containing propolis as antimicrobial agent against bacteria as *Streptococcus mutans* and fungal as *Xylophagous fungi* (MATEI et al., 2015; AFRASIABI et al., 2020). That reinforce the potential of nanocarriers systems containing propolis as antimicrobial agents.

Besides the antimicrobial activity, the high content of phenol, flavonoids, proline among others compounds in the propolis can promote antioxidant effects (DONASCIMENTO et al., 2016; BARBOSA et al., 2019). Seeds and plants under stress condition (abiotic or biotic) can produce several amounts of reactive oxygen species (ROS), that result in the degradation of proteins, lipids, ácido desoxirribonucléico (DNA), to damage cell membrane resulting in cell death (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014). Consequently, formulation that can reduce ROS damage is important to face plant stress.

Some nanomaterials as biogenic nanoparticles have been showed potential to scavenge ROS into the cell, once that biological extract have in its composition antioxidant compounds (MAHAKHAM et al., 2017; GUHA et al., 2018; ACHARYA et al., 2019).

For propolis, Semida and Rady, (2014), showed that bean seeds, pre-soaking treatments with propolis showed potential to alleviate salinity stress (100 mM NaCl). The authors showed that the proline levels increase in the seeds after treatment with propolis, reducing the salinity stress, once proline is able to reduce singlet oxygen. This result showed that propolis is able to alleviate ROS damage, and one possibility, can be the development of nanocarriers systems containing propolis for alleviate plant stress under different conditions (salinity, drought, heavy metals and extreme temperatures).

In addition, propolis is rich in minerals (Mg, K, Ca, Cu, Zn, Fe, I, Na, Mn) and vitamins (B1, B2, B6, C and E) (SHALTOUKI et al., 2019). All these elements has potential

to be used as fertilizers or stimulants by the plants, showing other application for propolis in agriculture.

In our knowledge, we did not find in the literature a specific claim of nanoparticles containing propolis aiming agricultural applications. However, there are a great potential to be explore because the rich amounts of organic compounds that have biological activity in propolis composition, as well as the potential to be used as fertilizes by the plants. In conclusion, nanocarriers systems for propolis can have multiple effects in plants, for control phytopathogens, alleviate stress condition and provide nutrients and biostimulants for plants.

## **5. TRENDS, GAPS AND OBSTACLES**

The use of nanopesticides is a trend for agriculture (LOWRY; AVELLAN; GILBERTSON, 2019). They bring up a new promise for avoid the side effects caused by the pesticides developed in the Green Revolution (FRACETO et al., 2016; HOFMANN et al., 2020). These new formulations nano-based can improve biological efficacy and reduce environmental damage, moreover improve plant development, production and quality (MAHAKHAM et al., 2017; KAH et al., 2018; KAH; TUFENKJI; WHITE, 2019). Currently, agriculture needs these new technologies approaches for become resilient and sustainable, to face the current challenges as the reduction of natural resource and global climate changes (LOWRY; AVELLAN; GILBERTSON, 2019).

The use of natural compounds for the production of nanoformulations, that do not use organic solvents or surfactants in the production process is one of the main strategies for the development of ecofriendly nanopesticides or nanofertilizes (JIMÉNEZ-ARIAS et al., 2020). Because that, the use of nanoformulations containing propolis can have great perspectives once it has multiple proprieties (antimicrobial, antiviral and antioxidant) as well as fertilizer and biostimulant among others proprieties that are unknown for plants.

Some positive points about the use of propolis as nanoformulation is that most of methodologies has potential to be scale-up by the industry. Neither production nor the application will generate hazard material that can cause damage to the environment, or problems for human health. Moreover, to incentive the production chain of apiceuticals, promoting development and jobs in this fields. All these points correspond aspects proposed by the United Nations Sustainable Development Goals.

Some limitation, is the propolis purity, once propolis can contain pesticides in the composition (GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2017). In this case, it can compromise the

application for organic agriculture, been necessary chemical analyses that guarantee propolis free-pesticides. Besides that, many concerns are involved when the subjects are nanomaterials. Still is necessary regulations and safety concerns. To standard the nano definition for nanopesticides, and forms for evaluated their safety and fate in the environment. Another point is the consumer acceptance, that will define the success of nanoformulations in the market (HOFMANN et al., 2020).

## **6. CONCLUSIONS**

The use of propolis in the agriculture have great perspectives. The biological compounds as minerals present in it is composition can be used as fertilizers, bio stimulants and used as a natural pesticides. Moreover, propolis has many antioxidants compounds that can reduce environmental stress in plants. The use of nanocarriers systems using biopolymers is an alternative for a new generation of propolis formulation, increasing the physicochemical properties as well as biological activity. Aiming agricultural application nanoformulations containing propolis has as potential to promote pest controls or even stimulate plant growth by a sustainable way, respecting the fundamental rules of agroecology.

## **7. ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are grateful to the Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP, grants #2017/21004-5), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes. A.E.S.P is grateful for a post-doctoral grant provided by CAPES-Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES-PRINT project #88887.570381/2020-00).

## CAPÍTULO II

**Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de zeína, lignina e geoprópolis de Mandaçaia (*M. quadrifasciata*) visando aplicação biológica *in vitro* em sementes de feijão (*P. vulgaris*) e tomate (*S. lycopersicum*)**

## RESUMO

Geoprópolis é um composto de composição química complexa, consiste em uma mistura de terra, cera e própolis produzida por abelhas do gênero *Melipona*, sendo que muitas são as atividades biológicas atribuídas ao geoprópolis, sugerindo uma possível ação eficiente contra doenças e pragas agrícolas. O encapsulamento de geoprópolis em nanopartículas de biopolímeros melhora a solubilidade em água dos componentes de interesse, assim como a liberação dos componentes ativos durante um tempo maior e, por este motivo, foi proposto para este estudo desenvolver um sistema nanocarreador a base de zeína e lignina como sistema de transporte para ativos contidos em geoprópolis de Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*). Foram obtidos seis extratos hidroalcoólicos de geoprópolis de Mandaçaia, a partir de seis amostras de geoprópolis brutas da região de Itapetininga (São Paulo), que foram monitorados por 85 dias. As nanopartículas de zeína, lignina e geoprópolis foram produzidas pelo método de precipitação por antissolvente, sendo, posteriormente, caracterizadas por meio de potencial Zeta, dispersão dinâmica de luz (tamanho e índice de polidispersão), potencial hidrogeniônico (pH), eficiência de encapsulação, calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e microscopia de força atômica (AFM), uma vez que os resultados demonstraram que os extratos obtidos possuíam espectro de absorção na região do ultravioleta com picos característicos para própolis. As formulações produzidas apresentaram características de tamanho que variaram de 145 a 1281 nm, de 0,12 a 0,59 para o índice de polidispersão, de - 68 a - 40 mV para potencial Zeta e de 7,5 a 8,8 para o pH, dentre estas, duas demonstraram boas características de tamanho e estabilidade que foram favorecidas com o tempo. Excelentes índices de encapsulação de geoprópolis por biopolímeros de zeína-lignina (> 99%) foram observados para todas as amostras e os resultados obtidos com DSC e FTIR sugerem a interação química entre zeína, lignina e geoprópolis. Além disso, imagens obtidas por AFM sugerem menores partículas para nanoformulações contendo geoprópolis em comparação com a formulação controle. Avaliações em sementes demonstraram que os tratamentos testados não apresentaram efeitos deletérios na germinação de sementes de *Phaseolus vulgaris* e *Solanum lycopersicum*, estes achados contribuem para que o nanossistema de transporte baseado em zeína-lignina possa ser utilizado para liberar ativos de geoprópolis em plantas. Esta aplicação sugere uma possível ação antifúngica e antimicrobiana que tem como finalidade incrementar a gama de aplicações sustentáveis no combate de doenças na agricultura. Entretanto, outros estudos deverão ser conduzidos no sentido de identificar dosagens eficientes para aplicações específicas.

**Palavras-chave:** Liberação controlada. Abelhas sem ferrão. Nanotecnologia.

## ABSTRACT

Geopropolis is a compound of complex chemical composition, consisting of a mixture of earth, wax and propolis produced by bees of the genus *Melipona*, and many biological activities are attributed to geopropolis, suggesting a possible efficient action against diseases and agricultural pests. The encapsulation of geopropolis in biopolymer nanoparticles improves the water solubility of the components of interest, as well as the release of the active components for a longer time and, for this reason, it was proposed for this study to develop a nanocarrier system based on zein and lignin as a transport system for assets contained in Mandaçaia geopropolis (*Melipona quadrifasciata*). Six hydroalcoholic geopropolis extracts from Mandaçaia were obtained from six raw geopropolis samples from the Itapetininga region (São Paulo), which were monitored for 85 days. The zein, lignin and geopropolis nanoparticles were produced by the antisolvent precipitation method, and subsequently characterized by means of Zeta potential, dynamic light scattering (size and polydispersion index), hydrogen potential (pH), encapsulation efficiency, differential scanning calorimetry (DSC), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and atomic force microscopy (AFM), since the results showed that the extracts obtained had an absorption spectrum in the ultraviolet region with characteristic peaks for propolis. The formulations produced showed size characteristics ranging from 145 to 1281 nm, from 0.12 to 0.59 for the polydispersion index, from -68 to -40 mV for Zeta potential and from 7.5 to 8.8 for the pH, among these, two showed good characteristics of size and stability that were favored with time. Excellent encapsulation rates of geopropolis by zein-lignin biopolymers (> 99%) were observed for all samples and the results obtained with DSC and FTIR suggest the chemical interaction between zein, lignin and geopropolis. Furthermore, images obtained by AFM suggest smaller particles for nanoformulations containing geopropolis compared to the control formulation. Seed evaluations showed that the tested treatments did not have deleterious effects on *Phaseolus vulgaris* and *Solanum lycopersicum* seed germination, these findings contribute to the zein-lignin based transport nanosystem being used to release geopropolis actives in plants. This application suggests a possible antifungal and antimicrobial action that aims to increase the range of sustainable applications in combating diseases in agriculture. However, other studies should be conducted in order to identify efficient dosages for specific applications.

**Keywords:** Controlled release. Stingless bees. Nanotechnology.

## 1. INTRODUÇÃO

Com ação biológica eficiente contra fitopatógenos, a utilização de própolis em agricultura tem crescido nos últimos anos, abrindo um leque de possíveis aplicações e benefícios derivados desta combinação (VIEIRA et al., 2010; PEREIRA; MATTE; VENÂNCIO, 2016; CARVALHO; SODRÉ, 2021; EL-HADY et al., 2021).

A própolis produzida por abelhas *Apis mellifera* ou abelhas com ferrão, amplamente conhecidas, possui composição que varia de acordo com região geográfica, fontes botânicas e época de colheita (GHISALBERTI, 1979; DE SOUZA et al., 2018). Para além desta espécie de abelha existe uma enorme variedade de própolis que são produzidas por uma infinidade de espécies de abelhas que são nativas do Brasil (DE SOUZA et al., 2018). Estas são conhecidas como indígenas, nativas ou abelhas sem ferrão (*Hymenoptera, Apidae, Meliponinae*), infelizmente, pouco conhecidas, ainda que tenha sido popularizada a sua criação nos últimos anos. São abelhas com comportamento social e têm como característica o ferrão atrofiado (KERR; CARVALHO; DO NASCIMENTO, 1996; VILLAS-BÔAS, 2012; FERREIRA et al., 2019; LAVINAS et al., 2019).

De acordo com a classificação atual, dentro do filo dos artrópodes, as abelhas sem ferrão são insetos pertencentes à ordem *Hymenoptera*, família das *Apidae* e à subfamília *Apinae* (KERR; CARVALHO; DO NASCIMENTO, 1996; DUTRA et al., 2008; FERREIRA et al., 2019; LAVINAS et al., 2019). Além do território brasileiro, as abelhas sem ferrão podem ser observadas ao longo da zona tropical, nas regiões neotropical, afrotrópica, oriental e australiana (OLIVEIRA et al., 2019; LAVINAS et al., 2019; BILUCA et al., 2020).

Própolis é composto por resinas e ceras coletadas por abelhas e trazidas para o ninho para propósito de construção e saúde das abelhas (GHISALBERTI, 1979; LAVINAS et al., 2019). Ao passo que geoprópolis ocorre somente em abelhas do gênero *Melipona*, apresenta proporções variadas de cerume, barro, terra, areia, argila etc., que são utilizados de diferentes maneiras (KERR; CARVALHO; DO NASCIMENTO, 1996; DOS SANTOS et al., 2017; BONSUCESSO et al., 2021).

Uma gama de estudos vem abordando a bioatividade do geoprópolis, por meio da capacidade antioxidante, atividades antimicrobiana, antifúngica e antiinflamatória entre outras, bem como a sua caracterização química, com a identificação de componentes bioativos, que incluem os compostos fenólicos, voláteis e minerais no geoprópolis de abelhas sem ferrão, (DUTRA et al., 2008; LIBERIO et al., 2011; DOS SANTOS et al., 2017; FERREIRA et al., 2019; JUNIOR et al., 2019; HAMLÍ et al., 2021; GABRIEL et al., 2022).

Torres-Gonzales et al. (2016) identificaram 73 constituintes diferentes em geoprópolis produzido no México. Dentre os compostos voláteis, os terpenos foram os principais compostos detectados. Paes Leme de Mello Sousa et al. (2019) encontraram compostos fenólicos em geoprópolis de Jandaíra (*Melipona subnitida*) sendo 51 do grupo dos fenólicos e 12 são flavonoides. Em geoprópolis já foram encontrados, além dos compostos fenólicos, os ácidos fenólicos, taninos hidrolisáveis, ácidos graxos de cadeia longa etc. (DOS SANTOS et al., 2017).

Paes Leme de Mello Sousa et al. (2019) encontraram teores mais baixos de fenólicos totais em extrato de geoprópolis de Mandaçaia, comparado à legislação brasileira vigente para *Apis mellifera* (BRASIL, 2001). Já Dutra et al. (2008) encontraram valores de concentração para fenólicos superiores aos descritos para *A. mellifera* ao estudar geoprópolis de Tiúba (*Melipona fasciculata* Smith), do Maranhão, além de compostos da classe dos terpenos e saponinas.

Estes estudos reiteram a necessidade de mais pesquisas, tal qual legislação específica, importantes para garantir os aspectos de identidade e qualidade dos produtos e regulamentar a comercialização.

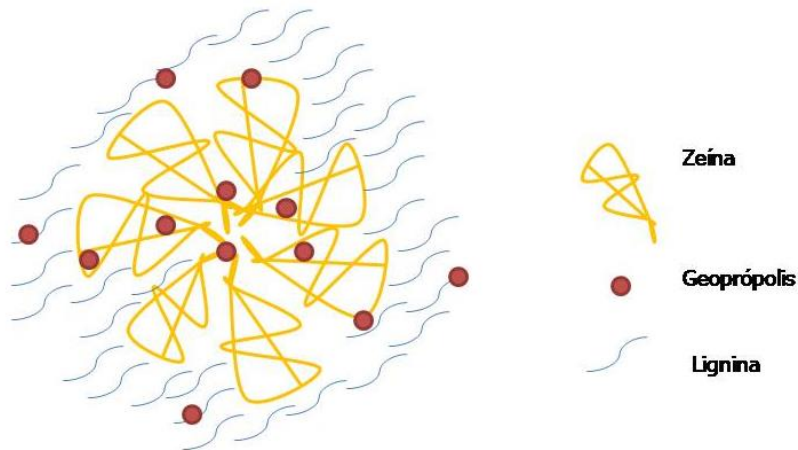
Em geoprópolis, devido às suas características, há um esforço em compreender quais os minerais presentes (FERREIRA et al., 2019) e, além disso, em buscar correlações com as características de solo da região, uma vez que a parcela de solo contribui com até 90% do geoprópolis bruto (BONSUCCESSO et al., 2021). Pant et al. (2022) encontraram altas concentrações de Ca, K, Fe e Mg em amostras de própolis indiana. FERREIRA et al. (2019) detectaram minerais essenciais (Cu, Fe, K, Mg, Na e Zn) em amostras de geoprópolis do sul do Brasil. Este estudo demonstrou que a maior variação nos teores dos minerais estava correlacionada com a região geográfica, ainda que o geoprópolis tivesse sido produzido por diferentes espécies de abelhas sem ferrão.

No presente estudo, geoprópolis é escolhido pela variedade de fitoquímicos e, principalmente, por ser um produto oriundo da biodiversidade brasileira. Já, a escolha por geoprópolis de Mandaçaia foi norteador por esta ser uma abelha comum em ampla faixa do território brasileiro (VALCANAIÁ et al., 2022), o que inclui o estado de São Paulo. Ademais, esta espécie é uma ótima produtora de geoprópolis e sua valorização pode incrementar a renda de meliponicultores e populações rurais e urbanas interessadas na criação, o que resultará em ampliação da área de polinização destas abelhas. Aliás, Mandaçaia é uma espécie com comportamento dócil e de fácil manejo.

Entre os fatores que limitam possíveis aplicações de geoprópolis em plantas, a baixa solubilidade em água pode ser considerada como principal (CARVALHO; SODRÉ, 2021). No sentido de obter melhores características de solubilidade em água, o presente estudo sugere a encapsulação de extrato geoprópolis em uma matriz biopolimérica, por meio da aplicação de técnica nanotecnológica (nanoprecipitação) (HU; MCCLEMENTS, 2014), visando sua aplicação em agricultura.

A nanoprecipitação consiste na mistura de um solvente contendo uma matriz de revestimento (polímero) mais o composto ativo hidrofóbico (neste caso, extrato de geoprópolis) com um antissolvente, podendo ser água com ou sem surfactante hidrofílico. O princípio deste método simples, barato e eficiente se sustenta no fato de que os dois solventes miscíveis (polímero + composto ativo) estão dissolvidos. No entanto, ao verter a água (com ou sem surfactante), polímero e composto ativo não se dissolvem na fase aquosa e formam-se as nanopartículas revestidas por polímero contendo composto ativo encapsulado. Em outras palavras, o processo ocorre por rápida dessolvatação do polímero quando em contato com a solução antissolvente (ANSARI, 2017).

**Figura 3** - Representação esquemática da nanopartícula formada por zeína, geoprópolis e lignina



**Fonte:** elaborada pela autora

Escolheu-se a zeína por suas propriedades químicas de solubilidade e, também, por se tratar de um material ambientalmente amigável, renovável e biodegradável (JIANG et al., 2021). A lignina, igualmente, por representar um material amigável ao meio ambiente e que possui características de solubilidade anfifílica desejáveis, e, deste modo, adicionado ao nanossistema de maneira a testar sua ação como estabilizante para a zeína.

O nanossistema ora proposto foi caracterizado, assim como os extratos de geoprópolis obtidos. Posteriormente, duas formulações (F e G) foram selecionadas, devido às suas boas

características de tamanho, índice de polidispersão, potencial Zeta e pH, sendo que estas foram caracterizadas também em DSC, FTIR e AFM. Finalmente, foram aplicadas *in vitro* para o tratamento de sementes de *Phaseolus vulgaris* e *Solanum lycopersicum* e verificou-se a taxa de germinação e comprimento (cm) das plântulas, em três diferentes concentrações dos extratos F e G, dos nanossistemas F e G e formulação sem ativo, além de solução hidroalcoólica 80% v/v, sendo estes tratamentos comparados ao tratamento controle (água).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e a água desionizada purificada por sistema Milli-Q, Millipore (Bedford, MA, EUA).

Foi utilizado álcool etílico absoluto próprio para análise (P.A.) e brometo de potássio (KBr) obtida de Labsynth. Os reagentes zeína e lignina álcali (low sulfonate) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

### 2.1. Amostras

Amostras de geoprópolis brutos de abelhas Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) foram obtidas com meliponicultores da região de Itapetininga, no estado de São Paulo. As amostras foram coletadas em agosto de 2021 e enviadas, sob refrigeração e protegidas de ar, luz e calor, ao laboratório de Nanotecnologia Ambiental do Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba (ICTS).

Na Tabela 2 estão os dados sobre a identificação, origem geográfica e data de coleta das amostras de geoprópolis de Mandaçaia.

**Tabela 2** - Identificação, nome, espécie, datas e locais de coleta das amostras de geoprópolis bruto

Identificação da Amostra	Nome	Espécie	Data	Localidade	Coordenadas geográficas
D	Mandaçaia	<i>Melipona quadrifasciata</i>	21/08/2021	Morro do Alto	-23.461090 -47.890839
E	Mandaçaia	<i>Melipona quadrifasciata</i>	21/08/2021	Morro do Alto	-23.461090 -47.890839
F	Mandaçaia	<i>Melipona quadrifasciata</i>	19/08/2021	Itapetininga	-23.58040 -48.02131
G	Mandaçaia	<i>Melipona quadrifasciata</i>	20/08/2021	Tatuí	-23.3454976 -47.8569958
H	Mandaçaia	<i>Melipona quadrifasciata</i>	20/08/2021	Tatuí	-23.3454976 -47.8569958
I	Mandaçaia	<i>Melipona quadrifasciata</i>	20/08/2021	Tatuí	-23.3454976 -47.8569958

**Fonte:** elaborada pela autora.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Extração hidroalcoólica

As amostras de geoprópolis foram extraídas com solução de álcool etílico 80% (PARK et al., 1998). Todas as amostras foram trituradas em gral com pistilo de porcelana e diluídas na proporção de 2 g de amostra para 25 mL de solução de álcool etílico 80%, durante 30 minutos, com agitação contínua, e sob temperatura de 70 °C, seguidas de centrifugação (11000 r.p.m. / 11 min). Após o processo, coletou-se o sobrenadante e todas as amostras foram armazenadas sob refrigeração (5 °C), ao abrigo de luz e oxigênio, para utilizações posteriores.

### 2.2.2 Quantificação de geoprópolis no extrato hidroalcoólico

Para determinar a concentração (% m/v) dos extratos obtidos foram realizadas determinações de extrato seco em todas as amostras, com modificações (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Para tal, 2 mL de extrato de geoprópolis foram submetidos ao aquecimento em estufa ( $102 \pm 2$  °C) por duas horas, o resíduo seco foi pesado e convertido para porcentagem (% m/v).

### 2.2.3 Análise espectrofotométrica na região do UV-vis

Em espectrofotômetro (Cary50/Agilent Technologies/EUA) foram obtidos espectros na região UV-Vis por varredura, intervalo entre 200 e 800 nm, utilizando cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm (PAES LEME DE MELLO SOUSA et al., 2019). Todas as amostras de extrato de geoprópolis foram diluídas na proporção de 1:200 para a leitura espectrofotométrica. Como branco foi utilizada solução hidroalcoólica 80% v/v.

### 2.2.4 Preparo dos sistemas nanocarreadores

Foi empregado o método de precipitação antissolvente (HU; MCCLEMENTS, 2014), com modificações. Para a formulação testada, misturou-se 12 mL de solução hidroalcoólica 80% v/v de zeína 2% m/v e 3 mL de extrato de própolis 10% m/v em béquer, sob agitação em agitador magnético, durante 15 minutos. Após, foram adicionados 30 mL de solução aquosa de lignina 1% m/v, em agitação constante por mais 30 minutos. Na sequência, o volume foi reduzido a 30 mL, utilizando rotaevaporador.

O preparo da solução de zeína 2% m/v incluiu a pesagem do reagente e sua dissolução em solução hidroalcoólica 80% v/v, sob agitação constante, *overnight*. Centrifugou-se (4500

rpm) durante trinta minutos e, na sequência, mantida sob temperatura de 75 °C, durante quinze minutos. Finalmente, filtrou-se em filtro de seringa (0,45 µm - Milipore).

### 2.2.5 Eficiência da encapsulação

A determinação da eficiência de encapsulação foi realizada indiretamente. Uma fração de 400 µL de cada formulação foi adicionada a um dispositivo de ultrafiltração (*Microcon – Millipore®*), contendo membrana de celulose regenerada com poro de exclusão no tamanho de 30 kDa. Após centrifugação, o filtrado foi coletado e analisado em espectrofotômetro (*Cary50/Agilent Technologies/EUA*). Importa ressaltar que este sistema de filtro permite a passagem somente de componentes não encapsulados. Ao considerar que o conteúdo total de componentes ativos é igual a cem por cento, o filtrado será a quantidade de componentes não encapsulados.

Paralelamente, foram construídas as curvas analíticas padrão para cada extrato, plotando massa (mg) e absorbância (A). Para isso os extratos foram diluídos e cinco concentrações diferentes relacionadas com os valores de absorbância. A partir da concentração do filtrado foi obtida a porcentagem de encapsulação, sendo a massa total de geoprópolis adicionados considerados como cem por cento, como descrito por (DE OLIVEIRA et al., 2019, adaptado).

Vale ressaltar que os comprimentos de onda utilizados para leitura de cada amostra seguiram de acordo com o comprimento de onda de absorção máxima obtidos com a varredura dos extratos de geoprópolis, resultados do item 2.2.3.

### 2.2.6 Dynamic Light Scattering

O tamanho (diâmetro hidrodinâmico) (nm) e o índice de polidispersão das nanopartículas foram obtidos por técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz em equipamento Zetasizer Nano da Malvern. As amostras das formulações com e sem geoprópolis foram diluídas em água ultra-pura na proporção de 1:100 e analisadas com um ângulo de espalhamento de luz de 90°, sob a temperatura de 25 °C.

### 2.2.7 Potencial Zeta

O potencial Zeta foi avaliado pela técnica de eletroforese. Em célula microeletroforética as amostras das formulações com e sem geoprópolis foram submetidas a um campo elétrico e a carga elétrica da superfície das NP medida, em equipamento Zetasizer Nano (Malvern ZS90), sob condições de temperatura de 25 °C e diluição em água (1:100).

Foram analisadas as seis formulações de nanopartículas contendo geoprópolis e a formulação sem ativo.

### 2.2.8 Potencial hidrogeniônico (pH)

As leituras de pH nas amostras das formulações de nanopartículas com e sem geoprópolis foram efetuadas em pHmetro digital de bancada (*Starter 2100*), sob condições de temperatura ambiente. Anteriormente, a calibração foi efetuada em dois pontos, utilizando solução tampão em pH 4 e 10.

### 2.2.9 Estabilidade

A avaliação da estabilidade dos polímeros foi verificada pelo monitoramento do potencial hidrogeniônico (pH) e dos parâmetros obtidos no DLS (tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta), ao longo do tempo, das formulações com e sem geoprópolis. Denominou-se t0, as medições obtidas no primeiro dia, t1 no 35º dia e t2 no 85º dia.

### 2.2.10 Calorimetria

Para obtenção de curvas calorimétricas das nanopartículas poliméricas carregadas com própolis foi utilizada a técnica de calorimetria exploratória diferencial. Como referência, um cadinho vazio de alumínio foi selado. A velocidade de aquecimento foi programada para 10 °C min<sup>-1</sup>, no intervalo entre 25 a 400 °C, sob atmosfera de nitrogênio (fluxo de 50 mL min<sup>-1</sup>). O equipamento utilizado DSC da (*TA Instruments, New Castle, EUA*).

Para aplicação da técnica de calorimetria diferencial de varredura foram preparadas amostras de lignina pura, zeína pura, nanopartícula sem ativo, nanopartícula com extrato F, nanopartícula com extrato G, extratos F e G puros e mistura física para os ativos F e G, que foram secos em estufa a 60 °C, seguido do esfriamento em dessecador. A Mistura física consistiu na mistura dos componentes zeína, lignina e geoprópolis pulverizados, com pistilo em gral, na proporção utilizada para a formação do nanossistema.

### 2.2.11 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros foram obtidos por transmitância na faixa espectral de 4000 - 400 cm<sup>-1</sup>, com 64 varreduras. Cada amostra foi preparada em pastilha de KBr a uma razão mássica de 99:1. Para este propósito, foram preparadas amostras de lignina pura, zeína pura, nanopartícula sem ativo, nanopartícula com extrato F, nanopartícula com extrato G, extratos F e G puros e mistura física para os ativos F e G, que foram secos em estufa a 60 °C, seguido do

esfriamento em dessecador. A Mistura física consistiu na mistura dos componentes zeína, lignina e geoprópolis pulverizados, com pistilo em gral, na proporção utilizada para a formulação do nanossistema.

### 2.2.12 Microscopia de Força Atômica

Foram obtidas imagens pela técnica de microscopia de força atômica, *Basic AFM (Nano surf, EasyScan2)*, com módulo de contato utilizando o *cantiléver* Tap A1G para o escaneamento das amostras. Para o preparo das amostras foi realizada uma diluição de 10.000 vezes das formulações preparadas, que foram pingadas sobre *grid* e secas a temperatura ambiente, em dessecador. Preparou-se amostras a partir da formulação sem ativos, formulação com ativo F e formulação com ativo G.

### 2.2.13 Índice de Germinação

O índice de germinação foi avaliado após o tratamento das sementes crioulas de feijão cultivar mulatinho (*P. vulgaris*) e tomate-cereja (*S. lycopersicum*) com nanopartículas contendo geoprópolis (F e G), nanopartículas sem geoprópolis, extrato hidroalcoólico de geoprópolis (F e G), álcool 80% v/v e água como controle.

Para cada tratamento utilizou-se um volume de 20 mL de solução de tratamento (feijão) e 10 mL (tomate) para 50 sementes de cada espécie. Durante o período de uma hora, sementes e solução estiveram em contato em agitação constante. Foram adicionados 21 mL de água sobre três folhas, retirando-se o excesso, enquanto a secagem das sementes foi realizada em estufa a 25 °C, sendo posteriormente, dispostas 50 sementes sobre duas folhas de papel de germinação e cobertas por uma terceira folha. Estas foram enroladas e alocadas em sacos plásticos individuais que foram selados, para a manutenção da umidade, fator determinante para o início do processo germinativo.

Em seguida, os pacotes plásticos foram incubados sob temperatura de 25°C em estufa DBO (COIMBRA et al., 2007). O tempo de germinação foi de 5 dias para sementes de feijão e de tomate, resultado de contagem única. Após, foi determinado o índice de germinação expresso em porcentagem, segundo a equação 1.

$$\% \text{ de germinação} = N \times 100 / TS \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde, N é o número de sementes germinadas, TS é igual ao número total de sementes utilizadas no ensaio.

O desenvolvimento das plântulas foi avaliado com base nos valores de comprimento das plântulas (cm) por meio de fotografias analisadas pelo software *Image J*.

#### 2.2.14 Análise estatística

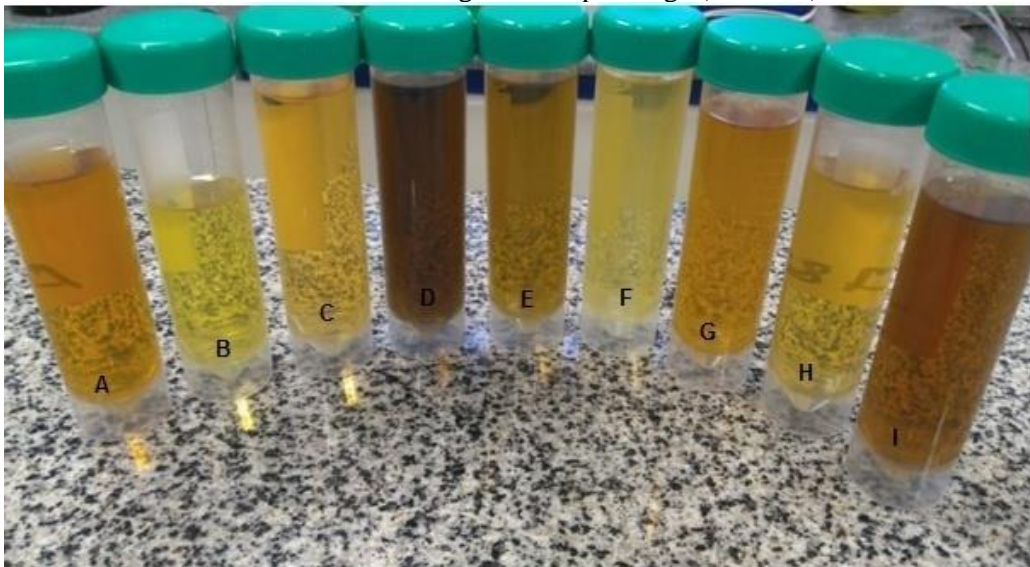
Os resultados obtidos estão expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão. Foi efetuada a análise de variância (ANOVA) complementada pelo teste de médias *Tukey*. A diferença foi considerada estatisticamente significativa se  $p < 0,05$ . O programa estatístico utilizado foi o SASM-Agri - Sistema para Análise e Separação de Médias em Experimentos Agrícolas (CANTERI et al., 2001) e os softwares Excel (Newark, DE, EUA) e Origin 8.5 (Wellesley, MA, EUA).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Estabilidade química e encapsulação dos extratos

Os extratos hidroalcoólicos de geoprópolis obtidos para utilização neste estudo estão ilustrados na Figura 4, entre outros.

**Figura 4** - Extratos hidroalcoólicos de própolis e geoprópolis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão alocadas na região de Itapetininga (Tabela 1)



Da esquerda para a direita, os extratos de própolis de Borá (*Tetragona clavipes*) (A), Mandaguari preta (*Scaptotrigona postica*) (B) e Tubuna (*Scaptotrigona bipunctata*) (C) e geoprópolis de Mandaçaia (*Melipona q.*) (D, E, F, G, H e I) de diferentes localidades. Para este estudo foram selecionados somente os extratos de geoprópolis de Mandaçaia. **Fonte:** a própria autora.

Observa-se na Figura 4 uma variação na cor dos extratos de própolis e geoprópolis, o que pode demonstrar a variação em suas composições químicas (CARDOZO et al., 2015;

PAES LEME DE MELLO SOUSA et al., 2019). Já era esperado, uma vez que o material bruto foi coletado e manipulado por abelhas de diferentes espécies, localizações geográficas e, conseqüentemente, distintas fontes botânicas. Este último fator é determinante no perfil de constituintes químicos bioativos presentes em própolis (GHISALBERTI, 1979; PARK et al., 2002; BANKOVA, 2005; RISTIVOJEVIĆ et al., 2015; MACHADO et al., 2016).

Na Tabela 3 as concentrações dos extratos obtidos por extração hidroalcoólica sólido-líquido que foram estimadas com base nos valores de rendimentos obtidos por extrato seco.

**Tabela 3** - Identificação das amostras e resultados do resíduo seco

Amostras	Resíduo seco (g mL <sup>-1</sup> )	Resíduo seco (%) (m/v)
<b>D</b>	0,0170 ± 0,0013	1,70
<b>E</b>	0,0058 ± 0,0004	0,58
<b>F</b>	0,0199 ± 0,0013	1,99
<b>G</b>	0,0206 ± 0,0004	2,06
<b>H</b>	0,0233 ± 0,0006	2,33
<b>I</b>	0,0137 ± 0,0008	1,37

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n = 2). **Fonte:** a própria autora.

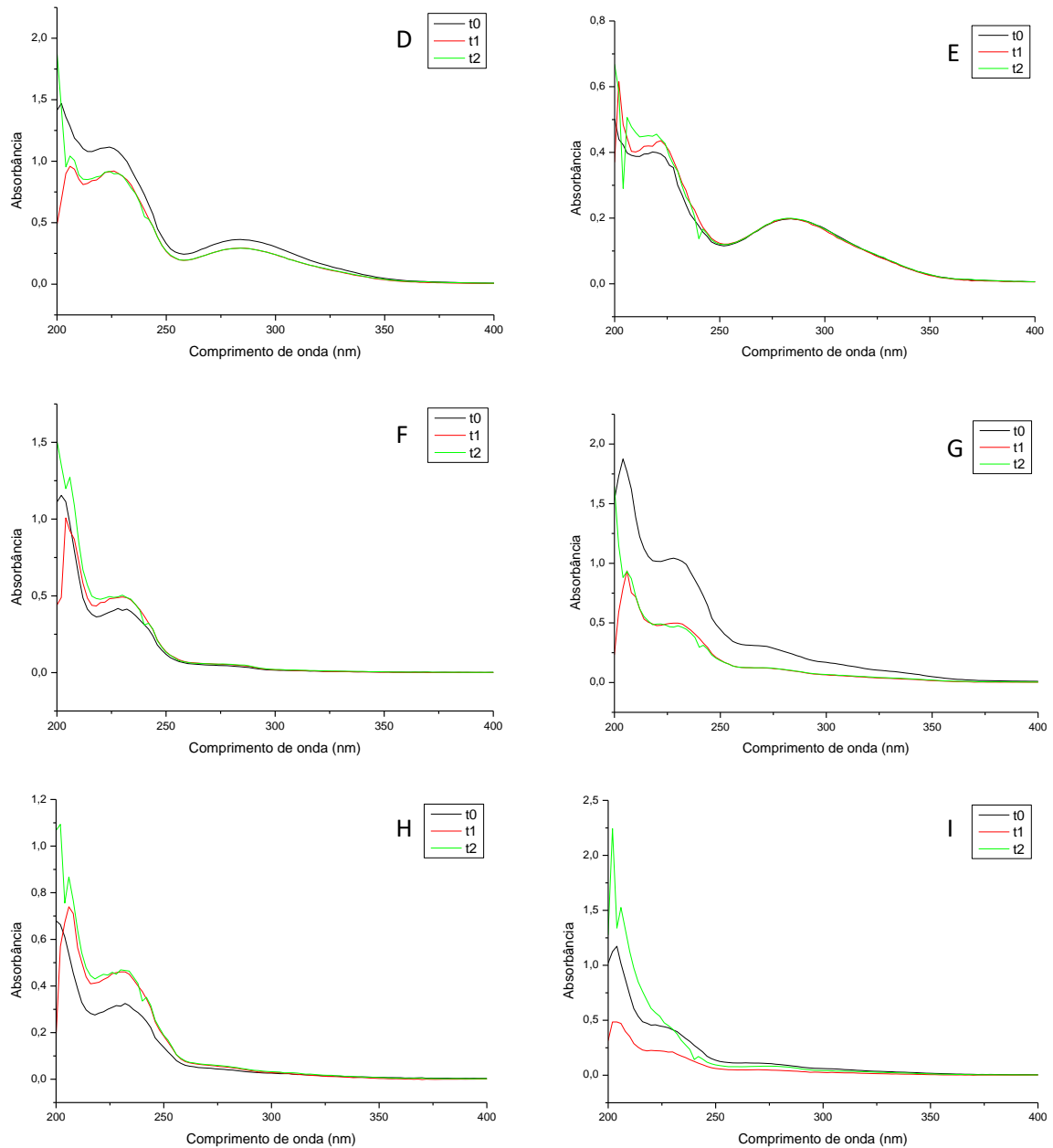
Os resultados variaram de 0,58 % para a amostra E até 2,33 % para a amostra H. Com os valores obtidos é possível supor que as extrações tiveram baixo rendimento, uma vez que a normativa para extrato de própolis preconiza o mínimo de 11% (m/v) para extrato seco, por exemplo, em extratos comercializados no país (BRASIL, 2001).

Os baixos rendimentos obtidos podem ser devido ao método empregado e, principalmente, ao tempo da extração (trinta minutos), quando comparado aos métodos tradicionais de preparo (maceração) que ocorrem durante um longo período, até 30 dias (CUNHA et al., 2004; FERREIRA et al., 2019), ou métodos mais eficientes como a extração por soxhlet (CUNHA et al., 2004) ou extração supercrítica (SCO<sub>2</sub>) (MACHADO et al., 2016), por exemplo.

Outros estudos demonstram valores semelhantes aos obtidos no presente estudo. Dutra et al. (2008) obtiveram valores que variaram de 1,1 a 5,8 % m/v, assim como Bankova et al. (1998) também obtiveram rendimento de 5 % m/v em extrato seco para amostras de extrato de geoprópolis. Para aplicação neste trabalho, todos os extratos foram concentrados em rotaevaporador e padronizados para a concentração de 10 % m/v.

Após as extrações, os seis extratos de geoprópolis foram avaliados quanto à estabilidade química no 1º, 35º e 85º dia, em espectrofotômetro na região do UV-vis. Os resultados são observados na Figura 5 e foram obtidos após diluição (1:200) dos extratos para as medições.

**Figura 5** - Espectros de absorção na região UV-vis nas seis amostras de geoprópolis de Mandaçaia ao longo de 85 dias



D, E, F, G, H e I são as diferentes amostras de geoprópolis de Mandaçaia avaliados quanto à estabilidade no primeiro dia (t0), em 35 e 85 dias, t1 e t2, respectivamente. **Fonte:** a própria autora.

É possível verificar que todas as amostras apresentaram picos característicos para própolis, entre 200 e 400 nm, como é preconizado pela Instrução Normativa SDA nº 03, de 19 de janeiro de 2001 - Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geleia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis (BRASIL, 2001). A sobreposição dos espectros demonstrou que todos os extratos apresentaram variação na absorção ao longo do tempo, na banda entre 200 e 400 nm.

Ao observar os valores de absorvância em cada extrato nas bandas de máxima absorvância, como resultado, no extrato D, a banda de 224 a 226 nm, apresentou valores que reduziram próximos a 1,12, 0,92 e 0,92, em t0, t1 e t2, respectivamente. Similarmente, a amostra G também apresentou valores de absorvância que reduziram ao longo do tempo analisado. Foram observados como valores de absorvância 1,04, 0,50 e 0,49 na banda de 222 a 228 nm

Em contraste, os extratos F e H apresentaram valores de absorvância que aumentaram ao passar do tempo. Ambos os extratos demonstraram absorvância máxima na mesma banda, 228 a 230 nm. O extrato F variou de 0,42, 0,49 e 0,50 e o extrato H de 0,32, 0,46 e 0,47 nos valores para absorvância, em t0, t1 e t2, respectivamente.

Entretanto, o extrato E manteve absorvância constante, próximo a 0,20, banda de 284 nm, durante os 85 dias. De modo diferente, o extrato I, banda próxima a 226 nm, apresentou valores de absorvância próximos a 0,44, 0,22 e 0,48, ao longo de t0, t1 e t2.

Considerando que todos os extratos estiveram armazenados sob as mesmas condições ambientais, as variações observadas podem ser atribuídas aos diferentes componentes químicos presentes em cada extrato, assim como às diferentes interações químicas que podem ocorrer durante o armazenamento.

Na Tabela 4 alguns exemplos de compostos detectados em amostras com absorvâncias máximas na região do ultravioleta.

**Tabela 4** - Compostos detectados por espectroscopia de absorção no UV-Vis

<b>Composto detectado</b>	<b>Banda (nm)</b>	<b>Referência</b>
Anel A de flavonoides	280	HAMLI et al. (2021)
Fenólicos e flavonoides	270 a 330	PARK et al. (1998)
Ácido gálico	275	DUTRA et al. (2008); CARDOZO et al. (2015); PAES LEME DE MELLO SOUSA et al. (2019)
Ácido cafeico, catequina, naringenina e pinocembrina	250 a 300	GREGORIS; STEVANATO (2010)
Di-hidrocanferida	232	CARDOZO et al. (2015)

**Fonte:** elaborada pela autora

A saber, Cardozo et al. (2015) relataram picos máximos de absorção em 232 nm e na faixa entre 270 nm e 285 nm para própolis de Jataí (*Tetragonisca angustula*), geoprópolis de Manduri (*Melipona marginata*) e Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) da cidade de

Prudentópolis (PR). Os picos de absorção intensa em 232 nm foram atribuídos à presença de di-hidrocanferida, que é um composto marcador da própolis da região.

No presente estudo, todas as amostras apresentaram picos de absorção na banda de 218 a 232 nm. Foram verificados para as amostras D e E picos de absorções em 284 nm, ambas são oriundas da mesma localidade de coleta (Morro do Alto). As amostras F, G, H e I apresentaram picos próximos a 230 nm, enquanto as amostras G e I apresentaram picos entre 202 e 206 nm.

Ressalta-se, embora as amostras sejam de localidades distintas, estas pertencem à mesma região geográfica e demonstraram possuir espectros de absorção na região UV-Vis. semelhantes, embora tenha sido observada variação na absorbância dos extratos de geoprópolis, ao longo do tempo, para a maioria das amostras.

Outros métodos deverão ser aplicados para a detecção de diferentes componentes presentes em geoprópolis e suas quantidades, para que se discuta o perfil de caracterização química e a influência causada por diferentes fatores, como a variação em decorrência da produção por diferentes espécies de abelhas em diferentes regiões geográficas etc.

Portanto, a seguir, importa avaliar se a matriz polimérica, composta de zeína e lignina, é adequada para carrear compostos ativos presentes em geoprópolis e isto pode ser indicado pela eficiência de encapsulação.

A eficiência de encapsulação informa sobre a capacidade de transporte de um composto ativo (ONG et al., 2017). Foi avaliado um nanossistema composto de zeína/alginato/caseinato de sódio para carrear própolis (ZHANG et al., 2019), os autores obtiveram percentuais de encapsulação entre 76 e 86 %. Do Nascimento et al. (2016) avaliaram a eficiência de encapsulação por meio de compostos marcadores na própolis vermelha. As nanopartículas poliméricas compostas por poli- $\epsilon$ -caprolactona e *Pluronic* foram produzidas por método de nanoprecipitação, e os valores de eficiência de encapsulação variaram de 66 a 85 % em diferentes formulações. Thammasit et al. (2021) demonstraram eficiência de encapsulação superior a 88% ao encapsular própolis em nanopartículas de poli(n-butil)cianocrilato.

A seguir, na Tabela 5 são apresentados os dados referentes ao ensaio de eficiência de encapsulação. Os comprimentos de onda foram selecionados com base na absorbância máxima dos extratos de geoprópolis observados, anteriormente, nos ensaios de estabilidade.

**Tabela 5** - Identificação das amostras, comprimento de onda e eficiência de encapsulação (%)

<b>Amostras</b>	<b>Comprimento de onda de absorção (nm)</b>	<b>E.E. (%)</b>
<b>D</b>	226	99,91
<b>E</b>	219	99,80
<b>F</b>	228	99,87
<b>G</b>	226	99,87
<b>H</b>	232	99,90
<b>I</b>	226	99,86

E.E. (%) - Percentagem de eficiência de encapsulação. **Fonte:** elaborada pela autora

A eficiência de encapsulação dos ativos contidos em geoprópolis foi avaliada e os resultados obtidos demonstraram altos percentuais de encapsulação, todos acima de 99,8 %. Os excelentes percentuais de encapsulação obtidos neste estudo podem significar a alta afinidade química entre o biopolímero zeína, o composto ativo, o geoprópolis, e a macromolécula lignina.

### **3.2. Caracterização dos nanossistemas e estabilidade**

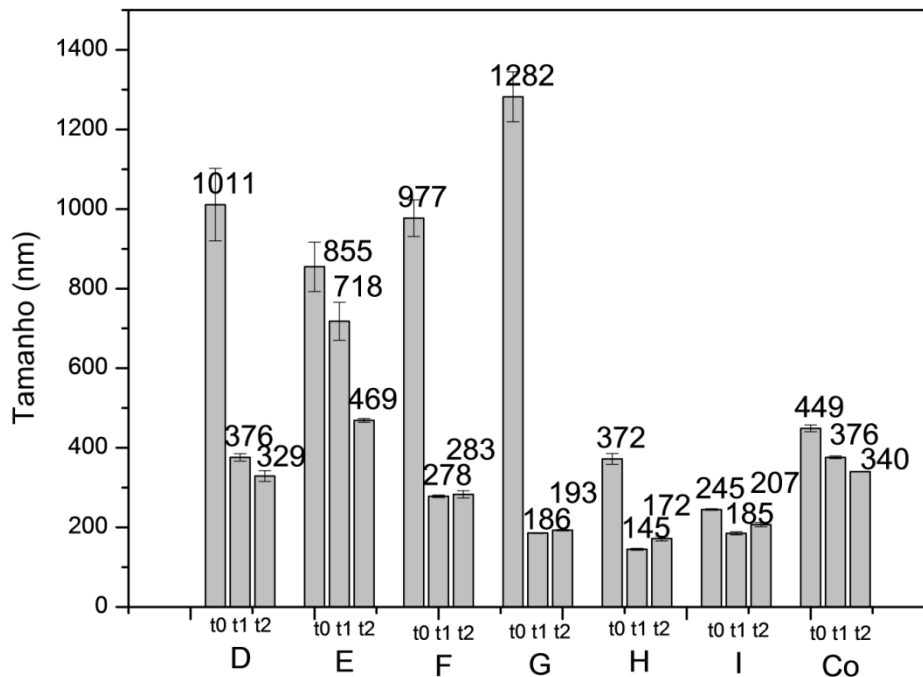
Uma formulação de nanopartículas formadas de zeína-lignina foi produzida para carrear as seis diferentes amostras de extratos de geoprópolis, assim como um controle de nanopartículas sem ativo (C). As características de tamanho, índice de polidispersão, potencial Zeta e estabilidade química das nanopartículas foram avaliadas no 1º, 35º e 85º dia, ou t0, t1 e t2, respectivamente. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6 e Figuras 6, 7, 8 e 9.

**Tabela 6** - Resultados para diâmetro hidrodinâmico (nm), índice de polidispersão (IP), potencial zeta (mV) e pH das NP de zeína e lignina contendo diferentes extratos de própolis e das nanopartículas vazias ao longo de t0 (1º dia), t1 (35º dia) e t2 (85º dia)

	Tamanho (nm)	IP	$\zeta$ (mV)	pH
<b>Amostra D</b>				
t0	1011±9 <sup>a</sup>	0,286±0,071 <sup>a</sup>	-47,1±1,0 <sup>a</sup>	8,30±0,01 <sup>a</sup>
t1	376±9 <sup>b</sup>	0,334±0,030 <sup>a</sup>	-52,4±2,3 <sup>b</sup>	7,80±0,02 <sup>b</sup>
t2	329±1 <sup>b</sup>	0,391±0,052 <sup>a</sup>	-53,7±2,3 <sup>b</sup>	7,61±0,03 <sup>c</sup>
<b>Amostra E</b>				
t0	855±6 <sup>a</sup>	0,170±0,419 <sup>a</sup>	-57,9±0,6 <sup>a</sup>	8,40±0,00 <sup>a</sup>
t1	718±48 <sup>a</sup>	0,258±0,064 <sup>a</sup>	-56,7±0,3 <sup>a</sup>	7,93±0,01 <sup>b</sup>
t2	469±5 <sup>b</sup>	0,315±0,063 <sup>a</sup>	-57,1±1,6 <sup>a</sup>	7,73±0,03 <sup>c</sup>
<b>Amostra F</b>				
t0	977±5 <sup>a</sup>	0,594±0,052 <sup>a</sup>	-42,7±0,4 <sup>a</sup>	8,40±0,03 <sup>a</sup>
t1	278±3 <sup>b</sup>	0,147±0,011 <sup>b</sup>	-68,5±1,2 <sup>b</sup>	8,18±0,01 <sup>b</sup>
t2	283±9 <sup>b</sup>	0,131±0,050 <sup>b</sup>	-65,8±3,4 <sup>b</sup>	8,15±0,01 <sup>b</sup>
<b>Amostra G</b>				
t0	1282±6 <sup>a</sup>	0,427±0,129 <sup>a</sup>	-40,6±0,6 <sup>a</sup>	8,70±0,01 <sup>a</sup>
t1	186±1 <sup>b</sup>	0,139±0,012 <sup>b</sup>	-63,3±2,6 <sup>b</sup>	8,08±0,00 <sup>b</sup>
t2	193±2 <sup>b</sup>	0,122±0,047 <sup>b</sup>	-61,8±1,7 <sup>b</sup>	8,70±0,01 <sup>a</sup>
<b>Amostra H</b>				
t0	372±1 <sup>a</sup>	0,423±0,005 <sup>a</sup>	-58,5±1,5 <sup>a</sup>	8,40±0,01 <sup>b</sup>
t1	145±2 <sup>b</sup>	0,203±0,009 <sup>b</sup>	-61,4±0,9 <sup>a</sup>	7,98±0,01 <sup>c</sup>
t2	172±6 <sup>b</sup>	0,348±0,058 <sup>a</sup>	-57,6±5,3 <sup>a</sup>	8,40±0,04 <sup>a</sup>
<b>Amostra I</b>				
t0	245±2 <sup>a</sup>	0,153±0,018 <sup>b</sup>	-63,3±4,0 <sup>b</sup>	8,40±0,02 <sup>a</sup>
t1	185±4 <sup>c</sup>	0,429±0,035 <sup>a</sup>	-57,8±1,4 <sup>ab</sup>	8,11±0,02 <sup>b</sup>
t2	207,4±5 <sup>b</sup>	0,427±0,040 <sup>a</sup>	-55,4±0,6 <sup>a</sup>	8,07±0,06 <sup>b</sup>
<b>Amostra C</b>				
t0	449±8 <sup>a</sup>	0,183±0,005 <sup>b</sup>	-50,5±0,8 <sup>c</sup>	8,82±0,03 <sup>a</sup>
t1	376±3 <sup>b</sup>	0,345±0,042 <sup>a</sup>	-43,4±0,7 <sup>a</sup>	7,49±0,01 <sup>c</sup>
t2	340±1 <sup>c</sup>	0,174±0,035 <sup>b</sup>	-46,4±0,9 <sup>b</sup>	8,37±0,03 <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma coluna para cada amostra são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Os resultados são expressos como média de três determinações  $\pm$  desvio padrão. IP - índice de polidispersão;  $\zeta$  - potencial zeta; pH - potencial hidrogeniônico. Amostras D, E, F, G, H e I - NP contendo os diferentes extratos de geoprópolis obtidos; C - amostra controle. **Fonte:** elaborada pela autora.

Assim que se produziram as nanopartículas, foram medidos seus tamanhos. Estes demonstraram que as amostras de geoprópolis D, E, F e G resultaram nos valores mais altos,  $1011 \pm 9$  nm,  $855 \pm 6$  nm,  $977 \pm 5$  nm e  $1282 \pm 6$  nm, respectivamente. Em contraste, as amostras H, I e C demonstraram valores inferiores,  $372 \pm 1$  nm,  $245 \pm 2$  nm e  $449 \pm 8$  nm, respectivamente, como é possível observar na Figura 6.

**Figura 6** - Gráfico de tamanho das nanopartículas (nm)

D, E, F, G, H e I - diferentes formulações oriundas das diferentes amostras de geoprópolis; Co - amostra sem ativo; t0 - 1º dia; t1 - 35º dia; t2 - 85º dia. **Fonte:** elaborada pela autora.

É possível afirmar que todas as amostras diferiram no tamanho médio ao longo do tempo. As amostras D, F, G e H diminuíram de tamanho após 35 dias e mantiveram o tamanho médio até os 85 dias. A amostra E manteve o tamanho médio até os 35 dias (718 nm), diminuindo, de maneira significativa, até os 85 dias (469 nm). Entretanto, a amostra I diminuiu em t1 (185 nm) e aumentou em t2 (207 nm). Já a amostra controle demonstrou uma tendência de redução do tamanho médio ao longo do tempo, 449 nm, 376 nm e 340 nm em t0, t1 e t2, respectivamente.

Destacam-se as amostras D, F e G pelas reduções de tamanho médio apresentadas. A amostra D passou de 1011 nm no tempo inicial para 376 nm em t1, posteriormente, em t2, apresentou o valor médio de 329 nm. Já para as amostras F e G as reduções foram ainda maiores. Em F passou de 977 para 278, posteriormente, 283 nm. Na amostra G, os valores passaram de 1282 nm para 186 e 193 nm, respectivamente, em t0, t1 e t2.

No presente estudo, todas as amostras diminuíram de tamanho quando comparado ao tempo inicial. Além disso, com exceção da amostra E, todas as amostras apresentaram tamanhos médios menores que 400 nm, em t1 e t2, demonstrando características de tamanho médio desejáveis em sistemas coloidais.

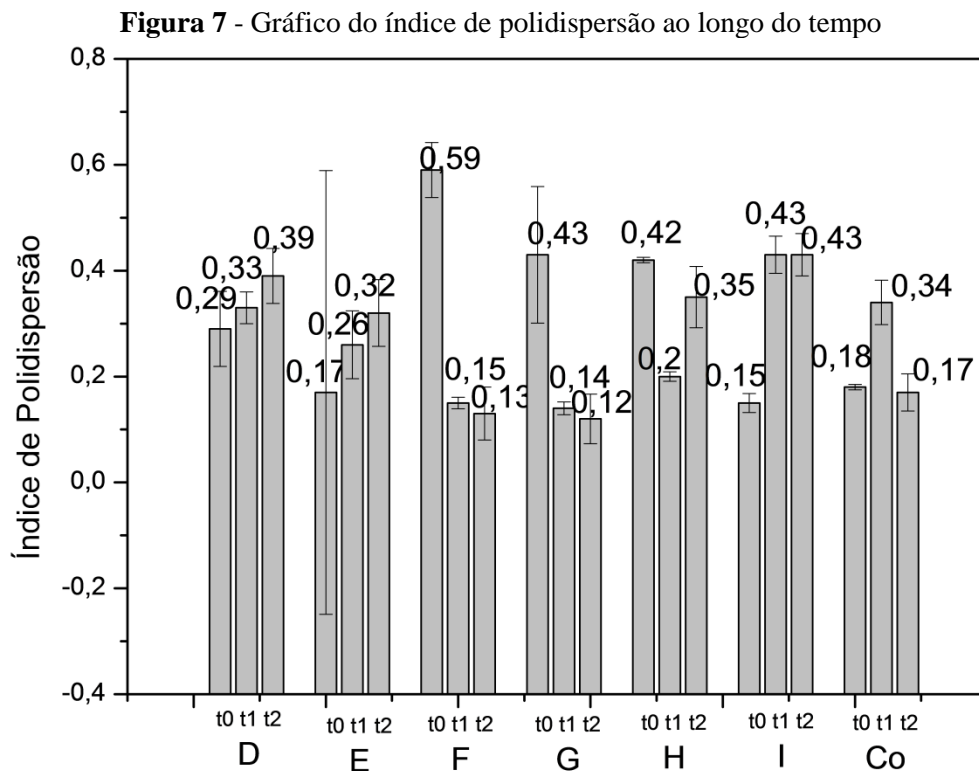
Valores semelhantes foram encontrados na produção de nanopartículas contendo própolis para as mais variadas finalidades. Zhang et al. (2019) obtiveram nanopartículas

produzidas com zeína, alginato, caseinato de sódio e própolis que variaram de 208 a 362 nm por meio de três métodos distintos de preparo.

Ong et al. (2017) observaram valores que variaram de 125,7 nm até 512,3 nm em nanopartículas formadas de quitosana e tripolifosfato como carreadores de própolis. Neste caso, maiores concentrações de quitosana causaram aumento no tamanho médio das partículas, ultrapassando os 400 nm. Shaltouki et al. (2019) encapsularam própolis na cera de abelha e tiveram valores na faixa entre 200 nm e 500 nm no tamanho médio das nanocápsulas produzidas.

Valores de tamanho menores foram relatados, Correa et al. (2019) produziram nanopartículas contendo própolis com tamanho aproximado de 30 nm por meio do método de emulsificação. Matei et al. (2015) sintetizaram oligômeros de quitosana/própolis/prata com tamanhos entre 24 nm e 35 nm. De maneira semelhante, Afrasiabi et al. (2020) produziram nanopartículas muito pequenas, entre 70 nm e 75 nm, ambos utilizaram o método de sonicação.

Tão importante quanto o tamanho, é avaliar a distribuição de tamanho de nanopartículas no nanossistema formado. Valores inferiores a 0,3 indicam sistemas monodispersos. Os resultados para este parâmetro estão ilustrados na Figura 7.



D, E, F, G, H e I - diferentes formulações oriundas das diferentes amostras de geoprópolis; Co - amostra sem ativo; t0 - 1º dia; t1 - 35º dia; t2 - 85º dia. **Fonte:** elaborada pela autora.

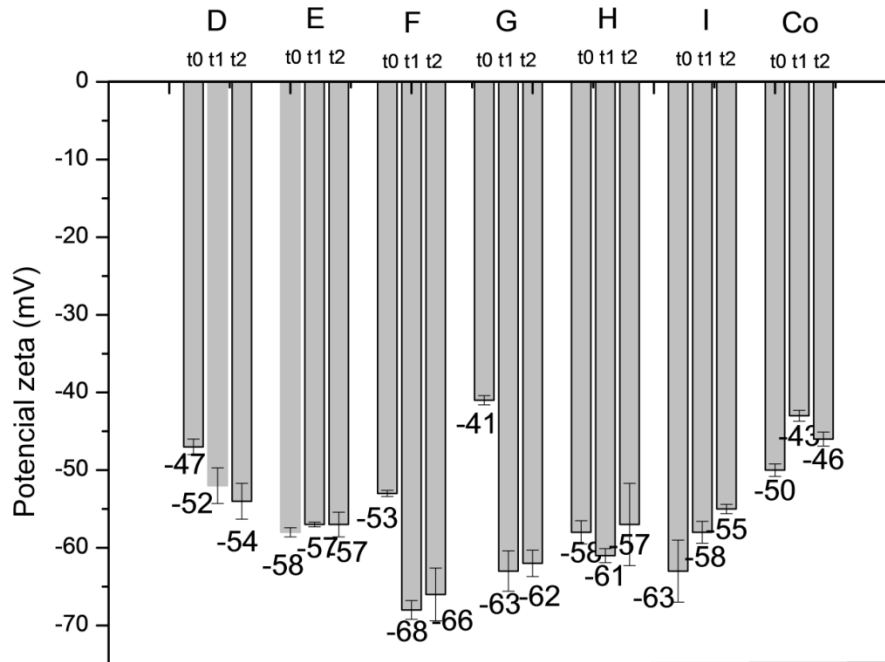
Quando dos resultados obtidos para o índice de polidispersão, as amostras que apresentaram valores menores que 0,3, logo após o preparo, foram D, E, I e C.

A amostra D pouco variou, não diferindo estatisticamente ao longo do tempo, tal qual a amostra E. Foram observadas reduções dos valores de índice de polidispersão para as amostras F e G, estas variaram de 0,59 para 0,15 e 0,13 e de 0,43 para 0,14 e 0,13, respectivamente, ao longo do tempo. Para a amostra I foi observado incremento no valor obtido após 35 dias, enquanto a amostra H teve redução no mesmo período. A amostra controle teve aumento seguido de redução nos valores para índice de polidispersão, 0,18, 0,34 e 0,17, em t1, t2 e t3, respectivamente.

Valores semelhantes foram demonstrados por outros autores que produziram nanopartículas contendo própolis. Do Nascimento et al. (2016) observaram valores entre 0,09 a 0,17, sendo o maior valor para amostra placebo. Machado et al. (2019) também obtiveram valores abaixo de 0,2, enquanto Zhang et al. (2019) observaram valores na faixa entre 0,23 e 0,26. Destaca-se que dentre todas as amostras, F e G apresentaram valores abaixo de 0,2 em t1 e t2, demonstrando serem dispersões homogêneas entre 35 e 85 dias após produção.

Quando dos resultados para potencial Zeta, estes variaram de  $-68 \pm 1$  mV a  $-41,1 \pm 1$  mV para os nanossistemas e todos os valores são compatíveis com sistemas coloidais estáveis. Os resultados das formulações com e sem ativo, ao longo dos 85 dias, estão representados a seguir, no gráfico (Figura 8).

**Figura 8** - Gráfico dos valores obtidos para o potencial zeta em seis formulações com ativos e controle sem ativo em t0, t1 e t2



D, E, F, G, H e I - diferentes formulações oriundas das diferentes amostras de geoprópolis; Co - amostra sem ativo; t0 - 1º dia; t1 - 35º dia; t2 - 85º dia. **Fonte:** elaborada pela autora.

Valores de potencial zeta de alta magnitude ( $> 30$  mV) demonstram haver repulsão eletrostática entre as partículas e isto evita que se aglomerem em solução (HAMLI et al., 2021).

Thammasit et al. (2021) produziram nanopartículas de poli(n-butilcianoacrilato) contendo própolis e obtiveram valores de potencial zeta que variaram de -8 mV a -9 mV. Valores próximos foram reportados na literatura (MACHADO et al., 2016; DO NASCIMENTO et al., 2016; ZHANG et al., 2019), estes autores observaram valores entre -20 e -31 mV em ensaios utilizando própolis como composto ativo.

Valores totalmente diferentes foram encontrados por Correa et al. (2019), + 2mV, e Ong et al. (2017) que ao produzirem nanopartículas de quitosana contendo própolis da Malásia, observaram valores entre +35 e +75 mV.

A composição do polímero utilizado está diretamente associada ao valor de potencial zeta na superfície das nanopartículas, assim como co-polímeros e emulsificantes e/ou tensoativos adicionados à formulação. Sendo assim, é possível sugerir que na superfície do nanossistema formado existe uma camada de nanoligninas aderidas, visto o potencial zeta característico da mesma, em meio com pH básico.

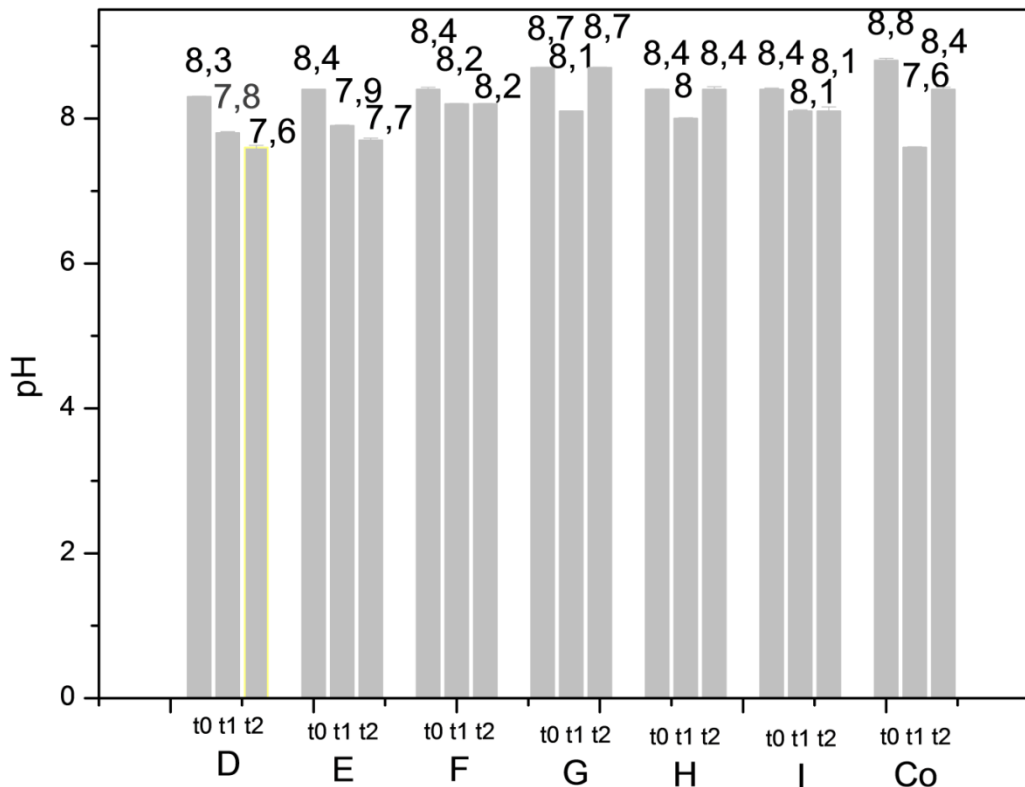
O monitoramento do pH das suspensões nanoparticuladas servem como indicadores da estabilidade físico-química, uma vez que reduções em curto período de tempo no pH

informam se houve degradação do polímero e, também, a possível difusão do ativo para o meio aquoso durante o armazenamento (SCHAFFAZICK et al., 2003; DO NASCIMENTO et al., 2016).

Particularmente, para as nanopartículas de zeína o pH influencia em seu tamanho. Ademais, já foi verificado que zeína produzida em reação de precipitação por antissolvente apresentou ponto isoelétrico em pH 6 (SPASOJEVIĆ et al., 2020). Estes autores observaram nanopartículas de zeína de tamanhos inferiores e mais estáveis, nas faixas de 3 – 4 e 8 – 9.

A Figura 9 mostra os valores obtidos para o pH nas seis diferentes formulações com amostras de extrato de geoprópolis e mais o controle negativo, sem extrato, ao longo de oitenta e cinco dias.

**Figura 9** - Gráfico de pH das nanoformulações mais o controle sem ativo, em t0, t1 e t2



D, E, F, G, H e I - diferentes formulações oriundas das diferentes amostras de geoprópolis; Co - amostra sem ativo; t0 - 1º dia; t1 - 35º dia; t2 - 85º dia. **Fonte:** elaborada pela autora.

Os valores de pH obtidos neste estudo variaram de 8,3 até 8,8, logo após o preparo. Todas as amostras apresentaram redução no valor de pH durante o armazenamento em relação ao tempo inicial que variaram no intervalo entre 7,6 e 8,7.

Do Nascimento et al. (2016) utilizaram policaprolactona (PCL)-plurônica, para carrear própolis vermelho, que apresentaram pH em torno de 6. Nanopartículas de zeína sem alginato

apresentaram estabilidade em pH acima de seis, enquanto que zeína com alginato foi estável na faixa de pH entre 3 e 8 (HU; MCCLEMENTS, 2014).

Embora os valores de pH tenham diferido, os valores são superiores do ponto isoelétrico da zeína, garantindo que não precipite ou se agregue durante o armazenamento (HU; MCCLEMENTS, 2014; CUIXIA SUN et al., 2017; WANG et al., 2022).

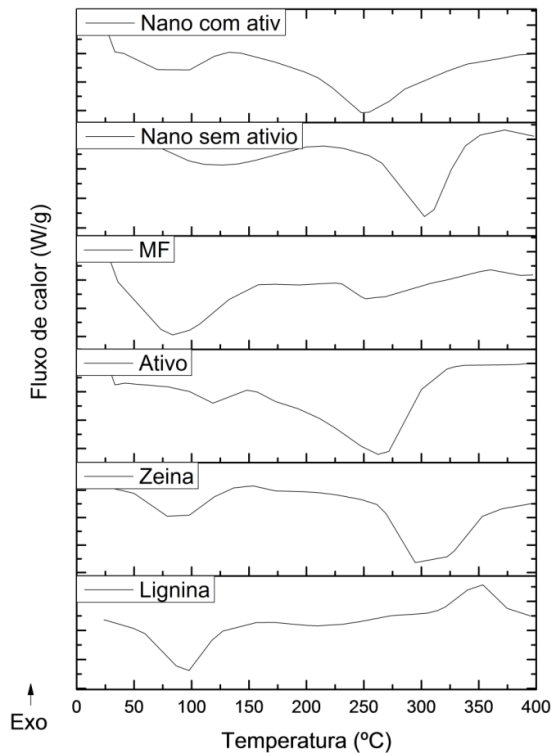
As seis amostras de formulação carreadora de geoprópolis demonstraram boas características de potencial zeta e pH, indicando boa estabilidade físico-química. Especialmente com relação ao potencial zeta, altos valores significam que grandes forças repulsivas tendem a evitar agregação proveniente de colisões com nanopartículas adjacentes.

Por outro lado, valores altos foram obtidos para o tamanho das nanopartículas logo após o preparo e, chama a atenção que na maioria das formulações estes valores reduziram com o passar do tempo. Ao considerar o índice de polidispersão, duas das amostras se destacam com IP muito baixos ( $< 0,2$ ) e as duas características juntas (tamanho e IP) classificaram as amostras F e G como mais adequadas para o prosseguimento das análises.

### 3.2.1. Calorimetria

Foram obtidos resultados por Calorimetria Exploratória Diferencial para zeína, lignina, nano sem ativo, ativo F, mistura física para ativo F e nano com ativo F. A Figura 10 mostra as curvas correspondentes às amostras citadas.

**Figura 10** - Termogramas DSC para as amostras de zeína, lignina, nanopartícula sem ativo, nanopartícula com extrato F, extrato F e Mistura física com extrato F



↑Exo - evento exotérmico; MF - mistura física. **Fonte:** a própria autora

Lignina, zeína e ativo F demonstram picos distintos. Comparando-os à curva da mistura física, é possível verificar características dos três componentes em uma mesma curva. Na comparação das curvas de nano sem e com ativos, estas demonstram um pico de fusão próximo a 300 °C para a amostra de nano sem ativo, enquanto a nano com ativo F fundiu em 250 °C, aproximadamente.

Foram visualizados um pico endotérmico e um exotérmico para a lignina. O evento térmico endotérmico apresentou seu ápice em 97 °C, já o evento exotérmico apresentou pico na temperatura de 315 °C.

Na curva correspondente à zeína, os dois picos são resultados de eventos endotérmicos. O primeiro evento apresentou pico na temperatura de 88 °C e o segundo evento térmico ocorreu em 299 °C. Um deslocamento da linha de base ocorreu em 164 °C, esta reação ocorreu na faixa entre 156 °C e 170 °C. Este deslocamento representa a temperatura de transição vítrea da zeína, valor semelhante já foi atribuído a este evento em caracterização de filme de zeína (MAGOSHI; NAKAMURA; MURAKAMI, 1992).

Ao observar a curva do ativo F, dois picos endotérmicos são verificados, o primeiro pico na temperatura de 119 °C e o segundo em 266 °C.

Na mistura física foram observados três picos. O primeiro e o segundo picos são endotérmicos. As temperaturas nos picos foram de 84 e 251 °C. O terceiro pico, exotérmico, apresentou ápice em 361 °C.

Para a nanopartícula sem ativos dois picos endotérmicos foram verificados. O primeiro pico na temperatura 121 °C e o segundo ocorreu com temperatura de 304 °C. Enquanto isso a nanopartícula com ativo apresentou primeiro pico endotérmico em 87 °C e o segundo pico endotérmico em 250 °C, demonstrando estabilidade em altas temperaturas de ambas as formulações.

Do Nascimento et al. (2016) detectaram quatro picos endotérmicos em própolis vermelha. Destes, três ocorreram entre 82 e 107 °C e foram atribuídos à volatilização da água. O quarto ocorreu próximo a 135 °C e fora referido como proveniente de processos de fusão de flavonóides e outros compostos fenólicos presentes no extrato.

Acima de 200 °C ocorre degradação da matéria orgânica. Entre 100 e 200 °C, em própolis, ocorre transição de fase, assim como a vaporização de aromáticos e óleos essenciais que apresentam pontos de ebulição próximos a 200 °C (PANT et al., 2022).

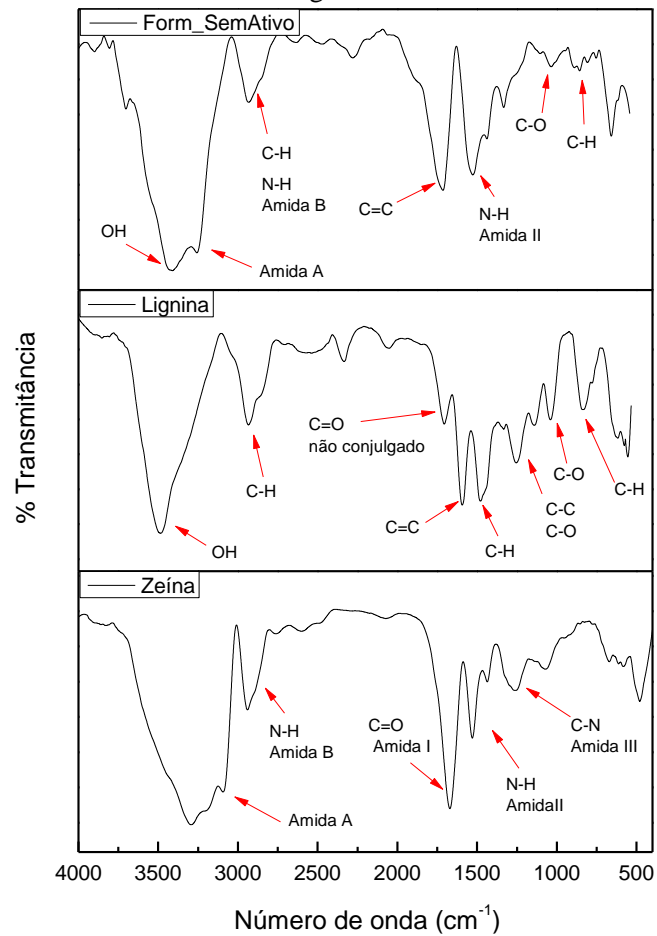
De acordo com resultados observados, verifica-se que o pico exotérmico da lignina não apareceu nas curvas de nanopartículas sem e com ativo, demonstrando que a matriz polimérica formada de zeína pode ter tido uma interação com os componentes presentes na lignina (EL-HOUSSINY et al., 2016). Também, observa-se que a amostra de nanopartícula com ativos demonstrou um deslocamento do pico quando a comparamos com a curva das nanopartículas sem ativos, sugerindo que os componentes zeína, lignina e geoprópolis interagiram.

### 3.2.2. Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier

O espectro FTIR reflete informações sobre as ligações químicas de grupos funcionais. O pico de absorção característico de um composto no espectro FTIR está relacionado ao ambiente molecular ao redor do mesmo. Portanto, espectros de FTIR foram usados para investigar as potenciais interações entre zeína, lignina e os extratos de geoprópolis F e G.

A seguir, serão apresentados na Figura 11 os espectros de absorção no infravermelho das amostras de zeína, lignina e das nanopartículas de zeína com lignina sem geoprópolis.

**Figura 11** - Espectros de infravermelho das amostras de zeína, lignina e nanopartícula de zeína e lignina



Fonte: elaborada pela autora

O espectro de FTIR da zeína apresentou bandas características de proteínas. A primeira banda observada foi em aproximadamente  $3315 - 3085 \text{ cm}^{-1}$ , correspondente a Amida A (estiramento das sobreposições das ligações C-H e OH, dos grupos funcionais  $\text{CH}_3$  e  $=\text{CH}_2$  ácidos graxos e aminoácidos). As bandas de absorção nas regiões entre  $1600$  e  $1700 \text{ cm}^{-1}$  e  $1400 - 1550 \text{ cm}^{-1}$  foram previamente atribuídas a Amida I e Amida II da proteína, respectivamente (MOUZAKITIS et al., 2022). Foi observada, em aproximadamente  $1263 \text{ cm}^{-1}$ , a vibração de estiramento na região compreendida a amida III (PROENÇA, 2018).

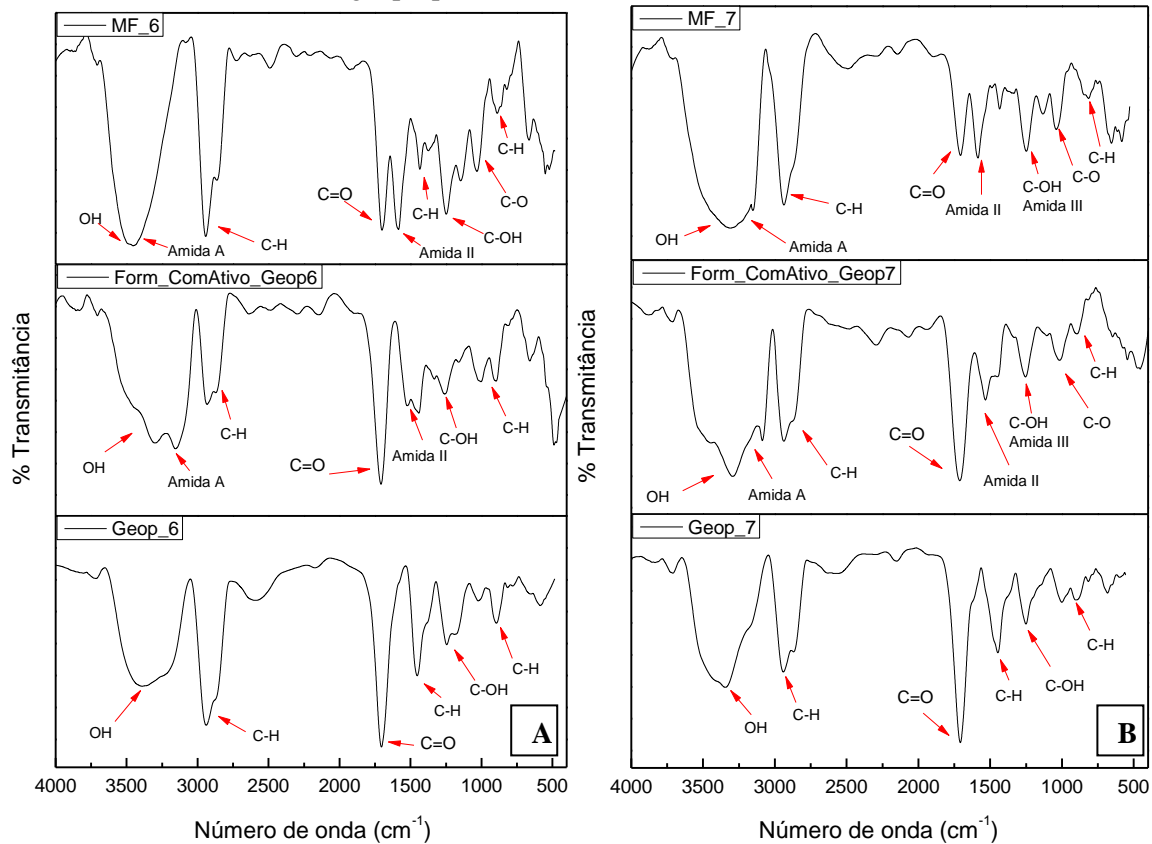
A amostra de lignina apresentou estiramento em aproximadamente  $3475 \text{ cm}^{-1}$  devido à presença de hidroxilas (OH). Banda de absorção em  $2925 \text{ cm}^{-1}$ , decorrente do estiramento C-H em grupos metílicos e metilênicos. A banda em  $1719 \text{ cm}^{-1}$  que corresponde ao estiramento de carbonilas e carboxilas não conjugadas é uma banda característica de espectros de lignina. Em  $1598 \text{ cm}^{-1}$  ocorreu o estiramento de C-C do esqueleto aromático e estiramento de  $\text{C}=\text{O}$ . Por fim, em  $1046 \text{ cm}^{-1}$  a deformação angular C-O do grupo metoxil e em  $829 \text{ cm}^{-1}$

característico de deformação do tipo C-H fora do plano nas posições 2, 5 e 6 de unidade Guaiacila (CHEN et al., 2015; SHARMA et al., 2022).

No espectro da nanopartícula de zeína com lignina (Form\_SemAtivo) foi possível observar uma sobreposição dos picos de zeína e lignina. Na faixa de  $3458 - 3252 \text{ cm}^{-1}$  observa-se que houve um alargamento da banda, consequência da sobreposição das bandas referentes hidroxilas e amida A. Em  $2933 \text{ cm}^{-1}$  observa-se pico de estiramento C-H. O pico em  $1714 \text{ cm}^{-1}$  foi verificado aumento de intensidade, o que pode ser justificado pela presença do estiramento de carbonilas e carboxilas não conjugadas (lignina) e amida I (zeína). Da mesma forma, em  $1539 \text{ cm}^{-1}$  é observada a sobreposição dos picos referentes a amida II e o estiramento de C-C do esqueleto aromático e estiramento de C=O. Os picos em  $1048 \text{ cm}^{-1}$  e  $865 \text{ cm}^{-1}$  tiveram diminuição de intensidade, o que corresponde a deformação angular C-O do grupo metoxil e deformação do tipo C-H da unidade Guaiacila, respectivamente.

Na Figura 12 serão apresentados os espectros de FTIR para as nanopartículas com os ativos F e G.

**Figura 12** - Espectros de infravermelho dos extratos de geoprópolis F e G, formulações com geoprópolis F e G e as misturas físicas F e G



(A) - Geop\_6 - extrato de geoprópolis F; Form\_ComAtivo\_Geop 6 - formulação de nanopartícula de geoprópolis F; MF\_6 - mistura física dos componentes zeína, lignina e geoprópolis F; (B) - Geop\_7 - geoprópolis G; Form\_ComAtivo\_Geop 7 - formulação de nanopartícula de geoprópolis G; MF\_7 - mistura física dos componentes zeína, lignina e geoprópolis G. **Fonte:** elaborada pela autora

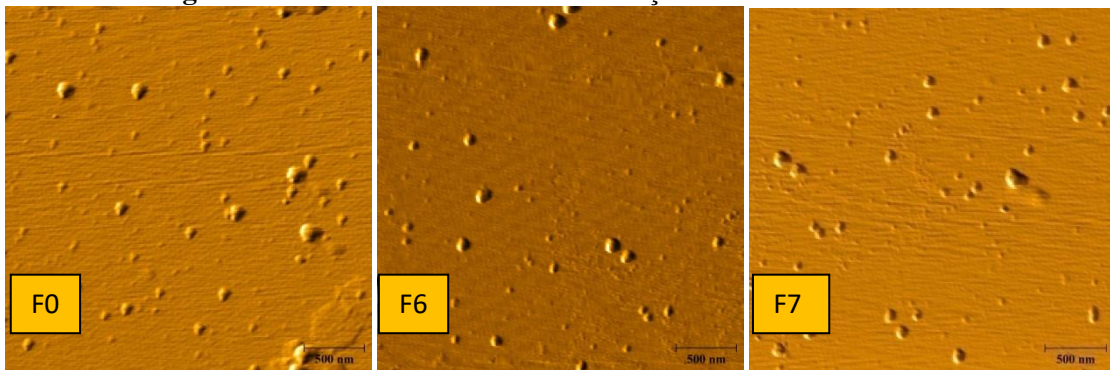
Observando os espectros de FTIR dos geoprópolis F e G (Figura 12) é possível verificar similaridade entre eles. Ambos os extratos são oriundos da mesma espécie de abelha sem ferrão Mandaçaia, o que pode explicar essa semelhança entre os espectros. A primeira banda observada em ambos foi em aproximadamente  $3300\text{ cm}^{-1}$ , referente à vibração de alongamento de grupos hidroxila (OH de compostos fenólicos) (OLIVEIRA et al., 2016). As bandas em aproximadamente  $2920\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas à vibração de alongamento C-H do grupo metileno. A banda em  $1698\text{ cm}^{-1}$  corresponde à vibração de alongamento de C=O, correlacionado com a capacidade antioxidante (MOŢ; SILAGHI-DUMITRESCU; SÂRBU, 2011). A banda em  $1460\text{ cm}^{-1}$  pode estar relacionada a  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ , flavonóides e anéis aromáticos, onde as vibrações seriam a vibração de flexão ( $\delta$ ) de C-H e a vibração de alongamento de aromáticos. O pico em aproximadamente em  $1230\text{ cm}^{-1}$  é associado às resinas fenólicas (SHAKOURY et al., 2022; SUREK et al., 2022). O pico de  $\sim 879\text{ cm}^{-1}$ , pode ser atribuído a ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$  presentes em carboidratos dos polifenóis glicosilados (KAZEMI; DIVSALAR; SABOURY, 2018).

Nos espectros para a mistura física e a formulação com ativo, tanto para o geoprópolis 6 quanto para o geoprópolis 7, é possível observar uma sobreposição e deslocamento de algumas bandas características de seus componentes. Porém, nas misturas físicas é observada uma maior concentração de picos, ou seja, menos sobreposição. Nas formulações com ativo, os espectros apresentaram picos característicos da zeína, lignina e do geoprópolis.

### 3.2.3. Microscopia de Força Atômica

As imagens obtidas por AFM estão apresentadas na Figura 13. Estas permitiram a observação do formato esférico das nanopartículas nas formulações compostas de zeína e lignina sem geoprópolis (F0), zeína, lignina e geoprópolis F (F6) e zeína, lignina e geoprópolis G (F7).

**Figura 13** - AFM de amostras de formulação sem e com ativo F e G

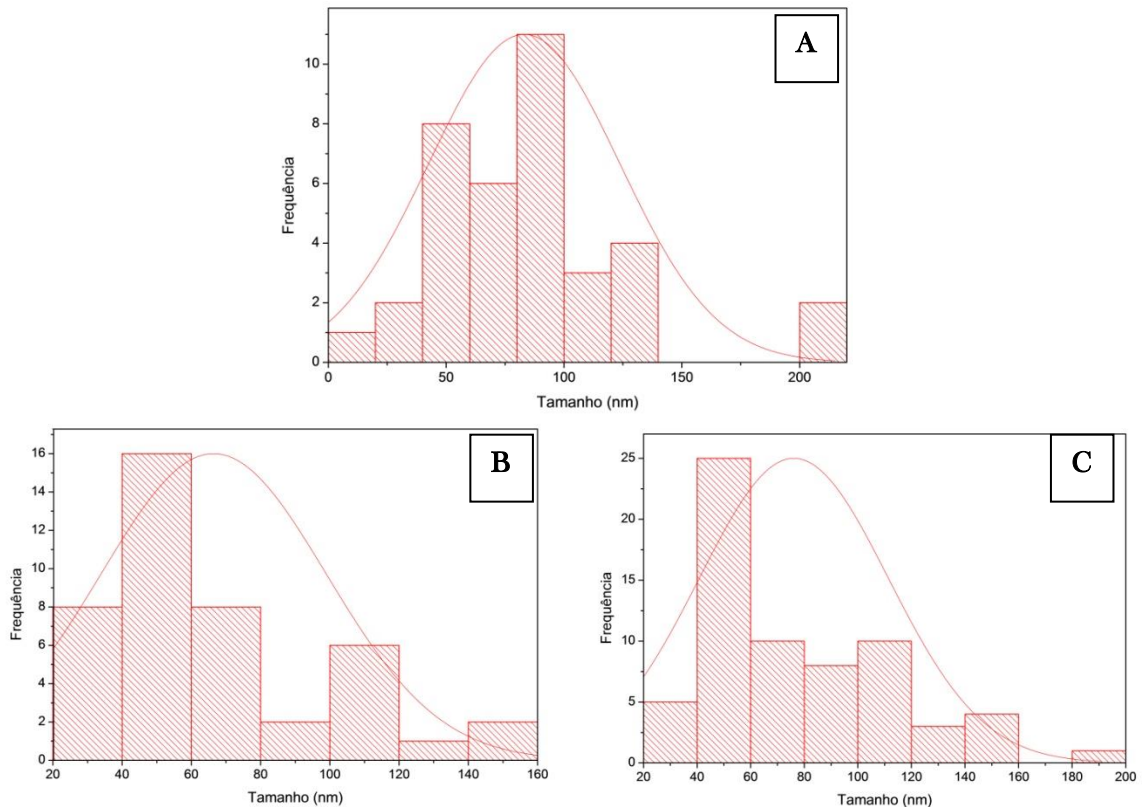


F0 – formulação sem geoprópolis; F6 – formulação com geoprópolis F; F7 – formulação com geoprópolis G.

**Fonte:** elaborada pela autora

Outro aspecto possível de ser observado com as imagens F0, F6 e F7 (Figura 12) é o tamanho das nanopartículas nas três diferentes formulações. Portanto, foram medidos os tamanhos do diâmetro (nm) das nanopartículas, por meio do software *Image J*, e os valores obtidos estão representados nos histogramas (Figura 14).

**Figura 14** - Distribuição de tamanho das formulações de nanopartículas sem e com geoprópolis



A – formulação sem ativo (F0); B – formulação com geoprópolis F (F6); C – formulação com geoprópolis G (F7). **Fonte:** elaborada pela autora

Evidencia-se com a observação dos histogramas a tendência de sistemas polidispersos. Nanopartículas de tamanhos entre 40 e 60 nm apresentaram maior frequência para F6 e F7 enquanto para F0, a maior frequência observada foi de nanopartículas com tamanhos entre 80 e 100 nm. Isto demonstra um possível efeito de menores tamanhos de partículas na presença de geoprópolis. Todos estes valores são inferiores aos demonstrados por análises de tamanho obtidas em DLS, uma vez que neste último caso, os tamanhos de nanopartículas medidos têm como base o diâmetro hidrodinâmico e para AFM as amostras são secas antes da medição, tendo, possivelmente, sua área reduzida.

### 3.3. Teste de germinação “*in vitro*”

O teste de germinação *in vitro* representa um importante parâmetro que reflete o estado fitossanitário de um lote de sementes (BRASIL, 2009).

Optou-se por realizar o teste de germinação em sementes de feijão Mulatinho (*P. vulgaris*) e tomate-cereja (*S. lycopersicum*) submetidos aos diferentes tratamentos, com a finalidade de verificar se os tratamentos alterariam a taxa de germinação nas sementes de um

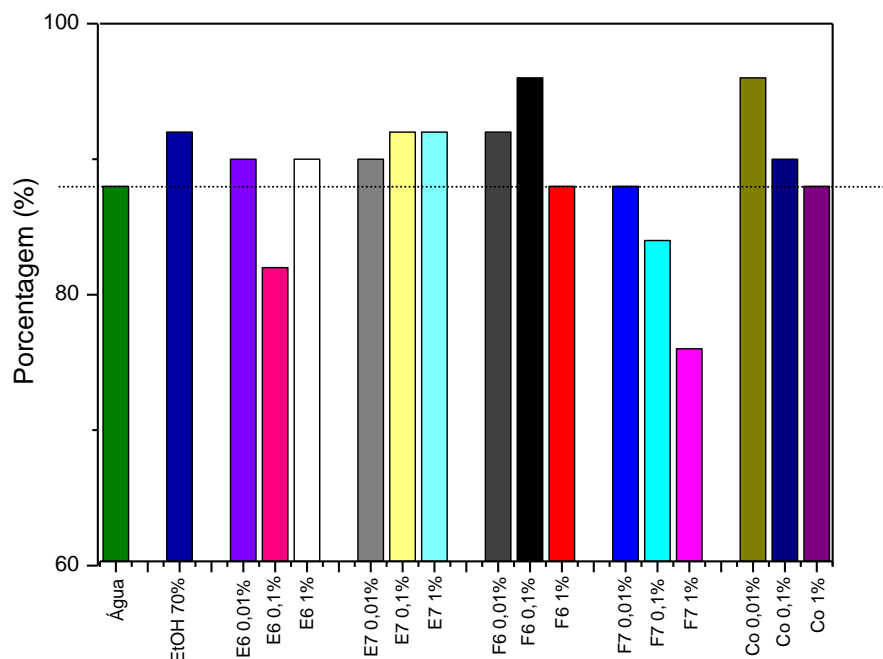
mesmo lote e, além disso, se os tratamentos poderiam interferir na média do tamanho das plântulas, obtidas após 5 dias de incubação.

A escolha dos tratamentos teve o intuito de analisar se os extratos em sua forma pura demonstrariam diferenças quanto ao extrato encapsulado, em três diferentes concentrações (0,01, 0,1 e 1% m/v). Além disso, comparar os diferentes tratamentos com o tratamento controle (água). Adicionou-se um tratamento composto por álcool 80% v/v, uma vez que este é o solvente dos extratos de geoprópolis e que, conhecidamente, possui ação bactericida e fungicida. Sendo que se incluiu também um tratamento composto por nanopartículas sem geoprópolis, nas mesmas concentrações dos demais tratamentos.

Os resultados obtidos com o teste de germinação estão apresentados na forma de gráfico (Figuras 15 e 16) e na Tabela 7.

Na Figura 15, o gráfico do teste de germinação mostra que a germinação das sementes de feijão tratadas com água teve quase 90% das sementes germinadas. Os tratamentos F6 0,1% e Co 0,01% alcançaram as melhores porcentagens, com 96% das sementes germinadas. Nenhum dos tratamentos atingiu 100% de germinação das sementes testadas e isto está relacionado, possivelmente, às características genéticas e de fitossanidade das sementes selecionadas.

**Figura 15** - Gráfico do teste de germinação de sementes de feijão (*P. vulgaris*) submetidas aos diferentes tratamentos (n = 50) / 5 dias



EtOH – solução etanolólica 80%; E6 – extrato de geoprópolis F; E7 – extrato de geoprópolis G; F6 – formulação de nanopartículas com ativo F; F7 – formulação de nanopartículas com ativo G; Co – formulação controle de nanopartículas sem ativo. **Fonte:** elaborada pela autora.

Para efeito de comparação, na confecção da tabela 7 considerou-se a germinação obtida para o tratamento controle (água) como 100% e efetuou-se o cálculo da taxa de germinação dos demais tratamentos.

Com isso, foi possível verificar que, com exceção dos tratamentos E6 0,1% e F7 0,1 e 1%, todos os demais tratamentos apresentaram taxa de germinação superior ou igual ao tratamento controle, para sementes de feijão. As melhores taxas obtidas foram dos tratamentos F6 0,1% e formulação controle (Co) 0,01%, ambos com aumento de 9% em relação ao controle.

Ao observar no gráfico os tratamentos da F7 é possível sugerir uma relação negativa entre o aumento da concentração de geoprópolis na formulação e a porcentagem de germinação. Tendência semelhante se observa para a formulação controle, apesar de que esta apresentou valores superiores para a porcentagem de germinação, comparada aos tratamentos da F7.

Os tratamentos com E7 para feijão, nas três concentrações testadas, demonstraram valores superiores ao tratamento controle e a taxa de germinação aumentou com o aumento da concentração até 0,1%, mantendo-se constante até 1%. O tratamento de solução etanólica também demonstrou taxa de germinação superior ao controle.

**Tabela 7** - Taxa de germinação de feijão e tomate em porcentagem (%)

<b>Tratamento</b>	<b><i>P. vulgaris</i> (%)</b>	<b><i>S. lycopersicum</i> (%)</b>
Água	100	100
<b>Etanol</b>	105	49
<b>E6 0,01%</b>	102	109
<b>E6 0,1%</b>	93	112
<b>E6 1%</b>	102	112
<b>E7 0,01%</b>	102	112
<b>E7 0,1%</b>	105	102
<b>E7 1%</b>	105	102
<b>F6 0,01%</b>	105	100
<b>F6 0,1%</b>	109	107
<b>F6 1%</b>	100	109
<b>F7 0,01%</b>	100	112
<b>F7 0,1%</b>	95	109
<b>F7 1%</b>	86	93
<b>Co 0,01%</b>	109	107
<b>Co 0,1%</b>	102	102
<b>Co 1%</b>	100	100

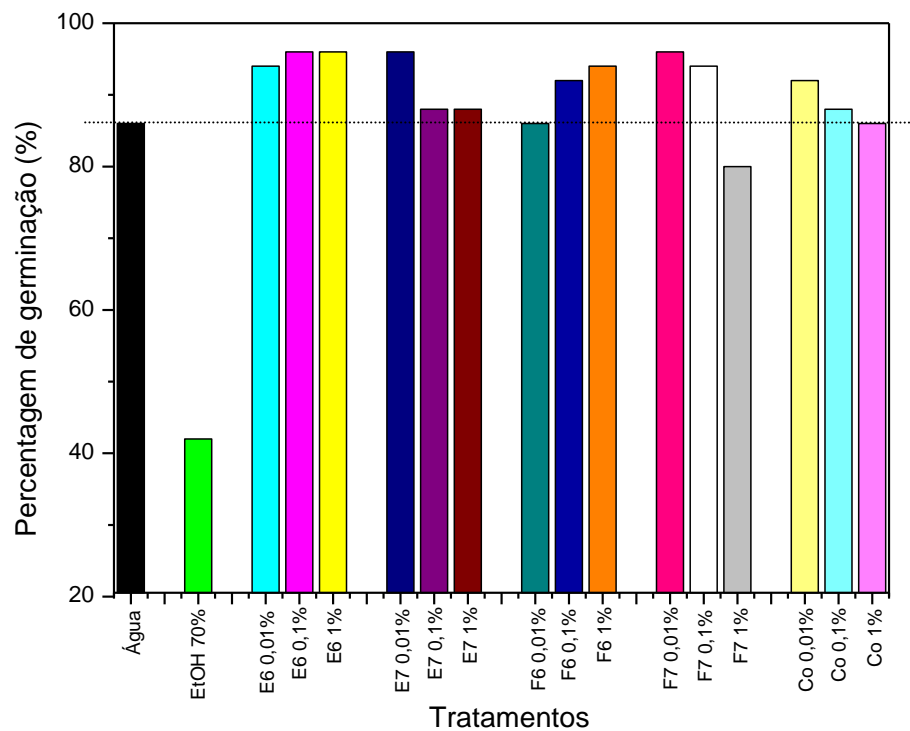
E6 – extrato de geoprópolis F; E7 – extrato de geoprópolis G; F6 – formulação de nanopartículas com ativo F; F7 – formulação de nanopartículas com ativo G; Co – formulação controle de nanopartículas sem ativo. **Fonte:** elaborada pela autora.

Já para as sementes de tomate, os tratamentos etanol 80% v/v e F7 1% foram os que apresentaram taxa de germinação inferior ao controle, sendo que o etanol, possivelmente,

inibiu a germinação das sementes de tomate. Os demais tratamentos apresentaram taxa de germinação superior ou igual ao tratamento controle. Observou-se a mesma correlação negativa entre concentração e taxa de germinação dos tratamentos F7 e Co, assim como foi observado nas sementes de feijão.

Entretanto, para as sementes de tomate, o tratamento F6 demonstrou aumento na taxa de germinação com o aumento da concentração e E6 aumentou a taxa de germinação de 0,01 para 0,1% e manteve-se constante em 1%, com taxa de 12% de aumento na taxa de germinação em relação ao tratamento controle.

**Figura 16** - Gráfico da taxa de germinação de sementes de tomate cereja (*S.lycopersicum*) submetidas aos diferentes tratamentos (n = 50) / 5 dias



EtOH – solução etanólica 80%; E6 – extrato de geoprópolis F; E7 – extrato de geoprópolis G; F6 – formulação de nanopartículas com ativo F; F7 – formulação de nanopartículas com ativo G; Co – formulação controle de nanopartículas sem ativo. **Fonte:** elaborada pela autora.

Vieira et al. (2010) demonstraram que o tratamento de sementes de feijão com extrato de própolis não interferiu no desenvolvimento fisiológico das sementes. Além disso, o extrato demonstrou efeito fungistático para *Alternaria spp.*, *Cladosporium spp.* e *Coletotrichum spp.*, três importantes patógenos da cultura do feijoeiro.

No entanto, a depender do tempo de exposição e concentração, o extrato de própolis pode apresentar efeito citotóxico com efeito inibitório na germinação de sementes de feijão-fava (CIBANAL et al., 2022). Previamente, Cibanal et al. (2020) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de própolis e geoprópolis frente às bactérias comuns de tomateiros

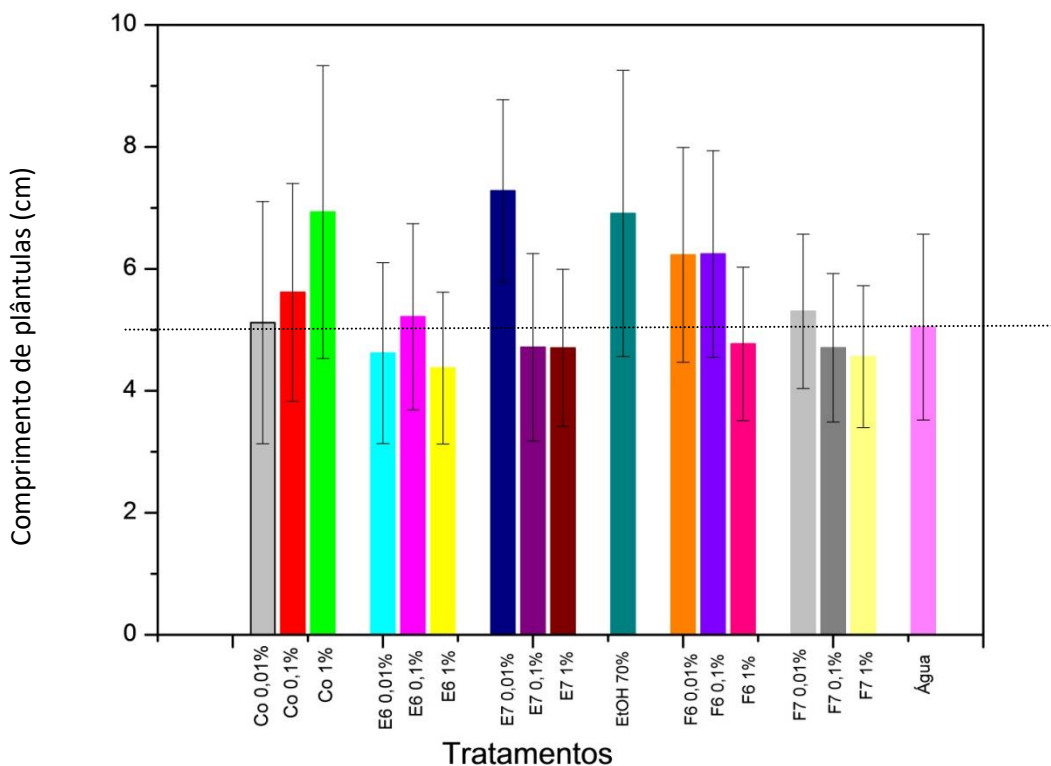
e obtiveram como resultado uma relação dose-dependente. Os autores frisaram que doses eficientes são conseguidas com altas concentrações que podem apresentar fitotoxicidade.

Aplicações de quitosana com própolis, anteriormente, não surtiram efeito de aumento na porcentagem de germinação de *Pinnus spp.* (SILVA-CASTRO et al., 2018).

Os efeitos relacionados à concentração e tempo de exposição tanto dos extratos quanto das formulações deverão ser avaliados com outras pesquisas. Sinteticamente, pode-se afirmar que os extratos e formulações nas concentrações avaliadas não apresentaram efeitos deletérios na germinação das sementes expostas. Além disso, tanto para os extratos de geoprópolis quanto para as formulações com e sem geoprópolis, uma solução na concentração de 0,01 % demonstraram efeito quando não melhor, igual, comparado ao tratamento controle.

A seguir, as Figuras 17 e 18 mostram os gráficos para o tamanho (cm) das plântulas de feijão e tomate-cereja. As medidas foram obtidas por meio de análise de imagens utilizando o software *Image J*.

**Figura 17** - Gráfico do comprimento (cm) de plântulas de feijão (*P. vulgaris*) submetidas aos diferentes tratamentos em diferentes concentrações após 5 dias de incubação



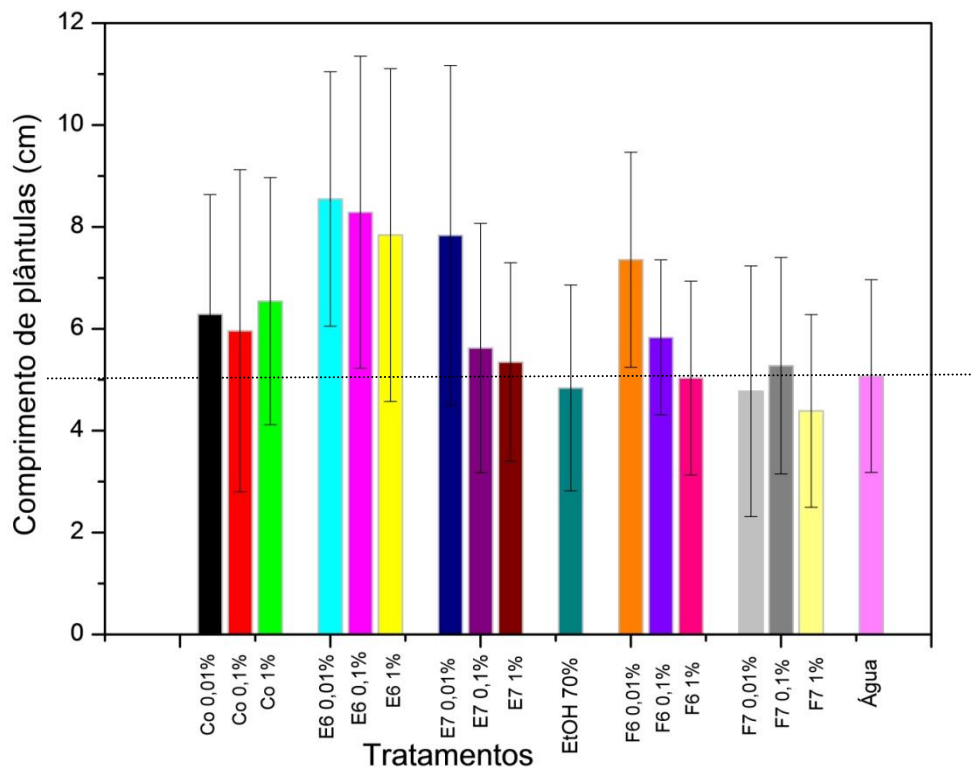
Co – formulação controle de nanopartículas sem ativo; E6 – extrato de geoprópolis F; E7 – extrato de geoprópolis G; EtOH – solução etanólica 80%; F6 – formulação de nanopartículas com ativo F; F7 – formulação de nanopartículas com ativo G. **Fonte:** elaborada pela autora.

Quanto ao tamanho das plântulas, considerando somente as raízes principais, os melhores tratamentos foram os que utilizaram E7 0,01%, etanol 80% v/v e formulação

controle 1%. Chama atenção que o tratamento com solução etanólica 80% em feijões mostrou bons resultados para germinação e tamanho das plântulas. Isso não foi observado em sementes de tomate-cereja, onde o tratamento com solução etanólica resultou em plântulas com tamanhos menores e taxa de germinação, aproximadamente, 50% mais baixas, quando comparadas ao tratamento controle.

Com excessão de F7 e etanol, todos os tratamentos apresentaram tamanho de plântulas de tomate maiores ou igual quando comparados ao tratamento controle. Como pode ser observado na Figura 18.

**Figura 18** - Gráfico de comprimento (cm) de plântulas de tomate-cereja (*S. lycopersicum*) submetidas aos diferentes tratamentos em diferentes concentrações após incubação por 5 dias



Co – formulação controle de nanopartículas sem ativo; E6 – extrato de geoprópolis F; E7 – extrato de geoprópolis G; EtOH – solução etanólica 80%; F6 – formulação de nanopartículas com ativo F; F7 – formulação de nanopartículas com ativo G. **Fonte:** elaborada pela autora.

Os tratamentos E6 nas três concentrações testadas resultaram em plântulas com tamanhos médios próximos a 8 cm, assim como os tratamentos E7 0,01% e F6 0,01%. O que significa quase 60% em rendimento de biomassa.

Efeito de crescimento vegetativo já foi associado aos nutrientes importantes para plantas e que são encontrados em extratos de própolis (CARVALHO; SODRÉ, 2021). Terpenoides, particularmente, importantes para as plantas são giberelinas, além de açúcares, aminoácidos, vitaminas do grupo B e E e minerais (SEMIDA; RADY, 2014b), estes

nutrientes demonstraram ação como bioestimulantes em processos de embebição de sementes que ajudaram contra processos deletérios de sementes submetidas a estresse salino, por exemplo.

Assim, embora, efeitos positivos possam ser observados na germinação de sementes e no tamanho de plântulas de feijão e tomate-cereja com a utilização de geoprópolis, seja na forma de extrato ou como uma nanoformulação, maiores informações deverão ser levantadas no sentido de relacionar a composição química dos extratos com parâmetros de atividades biológicas específicas, uma vez que as diferenças entre os tratamentos observados neste estudo são inconclusivos.

## 4. CONCLUSÃO

Espectros de absorção obtidos para os extratos de geoprópolis evidenciaram a presença de compostos polifenólicos, com picos característicos entre 200 e 400 nm, bem como os espectros em regiões do infravermelho de dois dos extratos, onde se evidenciaram vibrações de hidroxilas e compostos aromáticos, característicos dos compostos fenólicos.

Formulações com base em zeína e lignina contendo geoprópolis desenvolvidas foram avaliadas e demonstraram que dentre as seis amostras de formulações com geoprópolis obtidas, todas apresentaram potencial Zeta e pH desejáveis para nanossistemas estáveis. Dentre estas, F e G foram as que apresentaram as características mais desejáveis, sobretudo as de tamanho e índice de polidispersão, durante o período monitorado. Os ensaios de eficiência de encapsulação demonstraram alta eficiência e o DSC e FTIR apontam para a interação química de componentes da zeína, lignina e geoprópolis. Além disso, imagens obtidas por AFM demonstraram nanopartículas esféricas e maior frequência de nanopartículas menores (40-60 nm) quando as formulações eram compostas com geoprópolis. Estes resultados corroboram para que a escolha de combinação da nanoformulação tenha sido adequada para a aplicação proposta.

O teste de germinação efetuado em sementes de feijão e tomate-cereja utilizando diferentes tratamentos demonstrou que os tratamentos utilizando geoprópolis não resultaram em efeitos deletérios.

Estudos que avaliem outros parâmetros, dosagens e novas formulações serão bem-vindos. Efeitos de toxicidade poderão ser aplicados no sentido de inibir certas plantas daninhas e os estudos que demonstram efeitos sinérgicos com geoprópolis abrem um universo para inúmeras descobertas.

Para além da produção de alimentos em campo, formulações incorporadas com geoprópolis poderão ser aplicadas em tecnologias pós-colheita, no recobrimento de frutos e vegetais, assim como no setor de armazenamento de grãos, substituindo fungicidas sintéticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO-ELYOUSR, K. A. M. et al. Effectiveness of Egyptian propolis on control of tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 124, n. 5, p. 467–472, 1 out. 2017.
- ACHARYA, P. et al. Green-Synthesized Nanoparticles Enhanced Seedling Growth, Yield, and Quality of Onion (*Allium cepa* L.). **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, n. 17, p. 14580–14590, 3 set. 2019.
- AFRASIABI, S. et al. Propolis nanoparticle enhances the potency of antimicrobial photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* in a synergistic manner. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 15560, 23 set. 2020.
- ALI, Q. et al. Research advances and applications of biosensing technology for the diagnosis of pathogens in sustainable agriculture. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 8, p. 9002–9019, fev. 2021.
- ALTIERI, M. A.; NICHOLLS, C. I. Agroecology: a brief account of its origins and currents of thought in Latin America. **Agroecology and Sustainable Food Systems**, v. 41, n. 3–4, p. 231–237, 21 abr. 2017.
- ANDRADE et al., D. Syntropy and innovation in agriculture. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, v. 45, p. 20–24, ago. 2020.
- ANSARI, M. J. Fatores que afetam a preparação e as propriedades de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação | **Zenodo**. Disponível em: <<https://zenodo.org/record/1134425#.Y3zjr73MLIU>>. Acesso em: 22 nov. 2022.
- ANTONELLI, M. et al. Effects of different management techniques utilized in na organic peach orchard during the training phase. **Acta Horticulturae**, n. 465, p. 587–592, abr. 1998.
- ARMENDÁRIZ-BARRAGÁN, B. et al. Plant extracts: from encapsulation to application. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 13, n. 8, p. 1165–1175, 2 ago. 2016.
- AZEVEDO DE M OLIVEIRA, L. F. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of red propolis embedded mesoporous silica nanoparticles. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 46, n. 7, p. 1199–1208, jul. 2020.
- BAKSHI, P. S. et al. Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 1072–1083, maio 2020.
- BANKOVA. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 114–117, 2005.
- BANKOVA, V. et al. Constituents of Brazilian Geopropolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 53, n. 5–6, p. 402–406, 1 jun. 1998.
- BARBOSA, V. T. et al. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using Brazilian propolis. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 6, p. e2888, 2019.
- BARBOZA, J. R. et al. Cytotoxicity and Pro-Apoptotic, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Geopropolis Produced by the Stingless Bee *Melipona fasciculata* Smith. **Biology**, v. 9, n. 9, p. 292, set. 2020.

- BARROS, C. H. N.; CASEY, E. A Review of Nanomaterials and Technologies for Enhancing the Antibiofilm Activity of Natural Products and Phytochemicals. **ACS Applied Nano Materials**, v. 3, n. 9, p. 8537–8556, 25 set. 2020.
- BENITES-LAZARO, L. L. et al. Land-water-food nexus of biofuels: Discourse and policy debates in Brazil. **Environmental Development**, v. 33, p. 100491, mar. 2020.
- BERRETTA ET AL., A. A. Functional Properties of Brazilian Propolis: From Chemical Composition Until the Market. [s.l.] **IntechOpen**, 2017.
- BILUCA, F. C. et al. Physicochemical parameters, bioactive compounds, and antibacterial potential of stingless bee honey. 2021. **Journal of Food Processing and Preservation** - Wiley Online Library. Disponível em: <<https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpp.15127>>. Acesso em: 21 jul. 2022.
- BOMBARDI, L. M. Intoxicação e morte por agrotóxicos no Brasil: A nova versão do capitalismo oligopolizado. ISSN, p. 21, set. 2011.
- BOMBARDI, L. M. A Geography of Agrotoxins use in Brazil and its Relations to the European Union. [s.l.] **Portal de Livros Abertos da USP**, 2019.
- BOMBO, A. B. et al. A Mechanistic View of Interactions of a Nanoherbicide with Target Organism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 16, p. 4453–4462, 24 abr. 2019.
- BONSUCESSO, J. S. et al. Physical characterization of geopropolis produced by *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Apicultural Research**, p. 1–7, 15 jun. 2021.
- BRASIL. Instrução Normativa SDA nº 03, de 19 jan. 2001. Anexo VI - Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 jan. 2001.
- BRASIL. Regras para Análise de Sementes. **Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- BRAVO CADENA, M. et al. Enhancing cinnamon essential oil activity by nanoparticle encapsulation to control seed pathogens. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 755–764, nov. 2018.
- CAMPOS, E. V. R. et al. Polysaccharides as safer release systems for agrochemicals. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, n. 1, p. 47–66, jan. 2015.
- CAMPOS, E. V. R. et al. Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. **Ecological Indicators**, v. 105, p. 483–495, out. 2019.
- CARDOZO, D. V. et al. Chemical Variability of Geopropolis from Jataí, Mandaçaia and Mandurí Stingless Bees. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2457–2474, 2015.
- CARVALHO, G. J. L. DE; SODRÉ, G. DA S. Application of propolis in agriculture. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 88, 25 out. 2021.
- CASTRO, K. C. DE; COSTA, J. M.; CAMPOS, M. G. N. Drug-loaded polymeric nanoparticles: a review. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 71, n. 1, p. 1–13, 2 jan. 2022.
- CHANDRA, S. et al. Chitosan nanoparticles: A positive modulator of innate immune responses in plants. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 15195, dez. 2015.

- CHATTERJEE et al. Changes in soil carbon stocks across the Forest-AgroforestAgriculture/Pasture continuum in various agroecological regions: A meta-analysis. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 266, p. 55–67, 2018.
- CHEN, Z. et al. Modification of xylan in alkaline treated bleached hardwood kraft pulps as classified by attenuated total-internal-reflection (ATR) FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 418–426, 20 ago. 2015.
- CIBANAL, I. L. et al. Chemical characterization and in vitro antimicrobial activity of honeybee propolis and *Scaptotrigona jujuyensis* geopropolis against tomato pathogenic bacteria. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 5, p. 1799–1808, 17 jun. 2020.
- CIBANAL, I. L. et al. Propolis extract combined with oregano essential oil applied to lima bean seeds against *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, 22 jun. 2022.
- CLEMENT, C. R. et al. Disentangling Domestication from Food Production Systems in the Neotropics. **Quaternary**, v. 4, n. 1, p. 4, mar. 2021.
- CORREA, Y. X. et al. Colombian propolis as starting material for the preparation of nanostructured lipid carriers. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 381–388, maio 2019.
- CUESTA-RUBIO, O. et al. Chemical Characterization of Cuban Propolis by HPLC–PDA, HPLC–MS, and NMR: the Brown, Red, and Yellow Cuban Varieties of Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 18, p. 7502–7509, 1 set. 2007.
- CUIXIA SUN et al. Preparação, caracterização e estabilidade de partículas coloidais compostas de zeína-goma-laca carregadas de curcumina - **ScienceDirect**. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814617301784?via%3Dihub>>. Acesso em: 22 jul. 2022.
- CUNHA, I. B. S. et al. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, p. 964–970, dez. 2004.
- DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, 2 dez. 2014.
- DAYAN et al. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 4022–4034, 15 jun. 2009.
- DE OLIVEIRA, J. L. et al. Association of zein nanoparticles with botanical compounds for effective pest control systems. **Pest Management Science**, v. 75, n. 7, p. 1855–1865, 2019.
- DE SOUZA, S. A. et al. Characterisation of phenolic compounds by UPLC-QTOF-MS/MS of geopropolis from the stingless bee *Melipona subnitida* (jandaíra). **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 6, p. 549–558, nov. 2018.
- DO NASCIMENTO, T. G. et al. Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, n. 1, p. 301, 17 jun. 2016.
- DOS SANTOS, C. M. et al. Chemical Composition and Pharmacological Effects of Geopropolis Produced by *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. e8320804, 26 out. 2017.
- DUTRA, R. P. et al. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 557–562, dez. 2008.

- ELENA GREGORIS; ROBERTO STEVANATO. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 76–82, 1 jan. 2010.
- EL-HADY, N. A. A. et al. Exogenous Application of Foliar Salicylic Acid and Propolis Enhances Antioxidant Defenses and Growth Parameters in Tomato Plants. **Plants**, v. 10, n. 1, p. 74, jan. 2021.
- EL-HOUSSINY, A. S. et al. Drug–polymer interaction between glucosamine sulfate and alginate nanoparticles: FTIR, DSC and dielectric spectroscopy studies. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, n. 2, p. 025014, maio 2016.
- ELLIS, E. C. et al. Used planet: A global history. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 20, p. 7978–7985, 14 maio 2013.
- EL-SAADONY, M. T. et al. Nutritional Aspects and Health Benefits of Bioactive Plant Compounds against Infectious Diseases: A Review. **Food Reviews International**, p. 1–23, 20 jul. 2021.
- FAO, I. The State of Food Security and Nutrition in the World 2021: Transforming food systems for food security, improved nutrition and affordable healthy diets for all. Rome, Italy: FAO, 2021.
- FERREIRA et al. Produtos apícolas evitam danos oxidativos induzidos por agrotóxicos em peixes. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0074499>>. Acesso em: 27 nov. 2021.
- FERREIRA et al., B. Southern-Brazilian geopropolis: A potential source of polyphenolic compounds and assessment of mineral composition - **ScienceDirect**. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996919305691?via%3Dihub>>. Acesso em: 27 nov. 2021.
- FRACETO, L. F. et al. Nanotechnology in Agriculture: Which Innovation Potential Does It Have? **Frontiers in Environmental Science**, v. 4, 22 mar. 2016.
- FREITAS, B. M. C.; BOMBARDI, L. M. A Política nacional de irrigação e o uso de agrotóxicos no Brasil: Contaminação e intoxicações no Ceará. **GEOgraphia**, v. 20, n. 43, p. 86–100, 16 out. 2018.
- GABRIEL, M. B. et al. The chemical composition and antioxidant activity of mandaçaia (melipona quadrifasciata) geopropolis varies more due to region than month of collection. **Natural Product Research**, v. 36, n. 6, p. 1626–1630, 19 mar. 2022.
- GHISALBERTI, E. L. Propolis: A Review. **Bee World**, v. 60, n. 2, p. 59–84, 1 jan. 1979.
- GONZÁLEZ-MARTÍN, M. I. et al. Pesticide residues in propolis from Spain and Chile. An approach using near infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 165, p. 533–539, 1 abr. 2017.
- GUGINSKI-PIVA, C. A. et al. Propolis for the control of powdery mildew and the induction of phytoalexins in cucumber. **Idesia** (Arica), v. 33, n. 1, p. 39–47, fev. 2015.
- GUHA, T. et al. Nanoprimering with zero valent iron (nZVI) enhances germination and growth in aromatic rice cultivar (*Oryza sativa* cv. Gobindabhog L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 127, p. 403–413, jun. 2018.
- HAMLI et al. Physicochemical characteristics of liposome encapsulation of stingless bees' propolis. **Heliyon**, v. 7, n. 4, p. e06649, 1 abr. 2021.
- HARWOOD, J. 'Whatever happened to the Mexican Green Revolution?' **Agroecology and Sustainable Food Systems**, v. 44, n. 9, p. 1243–1252, 20 out. 2020.

- HATUNOĞLU, E. et al. Antibacterial and mechanical properties of propolis added to glass ionomer cement. **The Angle Orthodontist**, v. 84, n. 2, p. 368–373, 1 mar. 2014.
- HOFMANN, T. et al. Technology readiness and overcoming barriers to sustainably implement nanotechnology-enabled plant agriculture. **Nature Food**, v. 1, n. 7, p. 416–425, jul. 2020.
- HU, K.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of surfactant-stabilized zein nanoparticles: A pH modulated antisolvent precipitation method. **Food Research International**, v. 64, p. 329–335, out. 2014.
- IBGE. IBGE - Censo Agro 2017. Disponível em: <<https://censoagro2017.ibge.gov.br/2012agencia-de-noticias/noticias/25786-em-11-anos-agricultura-familiar-perde-9-5-dosestabelecimentos-e-2-2-milhoes-de-postos-de-trabalho.html>>. Acesso em: 9 ago. 2022.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. IV ed. [s.l: s.n.].
- JERÔNIMO VILLAS-BÔAS. Manual Tecnológico: Mel de Abelhas Sem Ferrão. [s.l: s.n.].
- JIANG, F. et al. Fabrication and characterization of zein-alginate oligosaccharide complex nanoparticles as delivery vehicles of curcumin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 342, p. 116937, nov. 2021.
- JIMÉNEZ-ARIAS, D. et al. Biostimulant Nanoencapsulation: The New Keystone To Fight Hunger. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 27, p. 7083–7085, 8 jul. 2020.
- JUNIOR et al. Geopropolis gel for the adjuvant treatment of candidiasis – formulation and in vitro release assay. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 278–286, 1 maio 2019.
- KAH, M. et al. A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. **Nature Nanotechnology**, v. 13, n. 8, p. 677–684, ago. 2018.
- KAH, M.; TUFENKJI, N.; WHITE, J. C. Nano-enabled strategies to enhance crop nutrition and protection. **Nature Nanotechnology**, v. 14, n. 6, p. 532–540, jun. 2019.
- KASAAI, M. R. Zein and zein -based nano-materials for food and nutrition applications: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 79, p. 184–197, 1 set. 2018.
- KAZEMI, F.; DIVSALAR, A.; SABOURY, A. A. Structural analysis of the interaction between free, glycosylated and fructosylated hemoglobin with propolis nanoparticles: A spectroscopic study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1329–1337, 1 abr. 2018.
- KUMAZAWA et al. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329–339, 2004.
- LAVINAS et al. Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. **ScienceDirect**. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0102695X18305489?via%3Dihub>>. Acesso em: 27 nov. 2021.
- LI, H. et al. Fabrication of stable zein nanoparticles coated with soluble soybean polysaccharide for encapsulation of quercetin. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 342–351, fev. 2019.
- LI, J. et al. Structure and Physical Properties of Zein/Pluronic F127 Composite Films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 6, p. 1309–1318, 13 fev. 2013.

- LIBERIO, S. A. et al. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 1–10, dez. 2011.
- LIMA, S. K. et al. Produção e consumo de produtos orgânicos no mundo e no Brasil. p. 52, 2020.
- LIU, Z.-H. et al. Codesign of Combinatorial Organosolv Pretreatment (COP) and Lignin Nanoparticles (LNPs) in Biorefineries. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, n. 2, p. 2634–2647, 22 jan. 2019.
- LOWRY, G. V.; AVELLAN, A.; GILBERTSON, L. M. Opportunities and challenges for nanotechnology in the agri-tech revolution. **Nature Nanotechnology**, v. 14, n. 6, p. 517–522, jun. 2019.
- LUGANI, Y.; OBEROI, S.; RATTU, G. Nanotechnology in Food Industry—Applications and Future Perspectives. Em: MAURYA, V. K. et al. (Eds.). *Sustainable Agriculture Reviews 55: Micro and Nano Engineering in Food Science* Vol 1. Sustainable Agriculture Reviews. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 71–92.
- MACHADO, B. A. S. et al. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0145954, 8 jan. 2016.
- MAGOSHI, J.; NAKAMURA, S.; MURAKAMI, K.-I. Structure and physical properties of seed proteins. I. Glass transition and crystallization of zein protein from corn. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 45, n. 11, p. 2043–2048, 1992.
- MAHAKHAM, W. et al. Nanopriming technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8263, dez. 2017.
- MARCELO G. CANTERI et al. SASM-Agri - Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. v. 1, p. 18–24, 2001.
- MARIANI, R. O. et al. National-scale changes in crop diversity through the Anthropocene. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 20361, 13 out. 2021.
- MATEI, P. M. et al. Synthesis of Chitosan Oligomers/Propolis/Silver Nanoparticles Composite Systems and Study of Their Activity against *Diplodia seriata*. **International Journal of Polymer Science**, v. 2015, p. 1–11, 2015.
- MCCOOK, S. Crônica de uma praga anunciada epidemias agrícolas e história ambiental do café nas Américas. **Varia Historia**, v. 24, p. 87–111, jun. 2008.
- MERWAD, A.-R. M. A. Mitigation of salinity stress effects on growth, yield and nutrient uptake of wheat by application of organic extracts. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 51, n. 9, p. 1150–1160, 14 maio 2020.
- MOȚ, A. C.; SILAGHI-DUMITRESCU, R.; SÂRBU, C. Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV–vis spectroscopic data. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 4–5, p. 516–522, 1 jun. 2011.
- MOUZAKITIS, C.-K. et al. Physicochemical properties of zein-based edible films and coatings for extending wheat bread shelf life. **Food Hydrocolloids**, v. 132, p. 107856, 1 nov. 2022.

- NANI, B. D. et al. Anti-inflammatory and anti-Candida Effects of Brazilian Organic Propolis, a Promising Source of Bioactive Molecules and Functional Food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 10, p. 2861–2871, 11 mar. 2020.
- NI, S. et al. Starch-Based Composite Films with Enhanced Hydrophobicity, Thermal Stability, and UV-Shielding Efficacy Induced by Lignin Nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 23, n. 3, p. 829–838, 14 mar. 2022.
- OLIVEIRA et al. A new chemotherapeutic approach using doxorubicin simultaneously with geopropolis favoring monocyte functions. **Life Sciences**, v. 217, p. 81–90, 15 jan. 2019.
- OLIVEIRA, H. C. et al. Nanoencapsulation Enhances the Post-Emergence Herbicidal Activity of Atrazine against Mustard Plants. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0132971, 17 jul. 2015.
- OLIVEIRA, R. N. et al. FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 21, p. 767–779, set. 2016.
- ONG, T. H. et al. Chitosan-propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial activity against *Enterococcus faecalis* biofilms. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0174888, 31 mar. 2017.
- PAES LEME DE MELLO SOUSA, J. et al. Chemical and Antimicrobial Potential Study of Brazilian Propolis Produced by Different Species of Bees. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 5, p. 1480–1497, 2019.
- PANT et al. Assessment of fatty acids, amino acids, minerals, and thermal properties of bee propolis from Northern India using a multivariate approach. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 111, p. 104624, 1 ago. 2022.
- PARK et al., Y. K. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502–2506, 1 abr. 2002.
- PARK, Y. K. et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Food Science and Technology**, v. 18, p. 313–318, ago. 1998.
- PATEL, A. R. et al. Quercetin loaded biopolymeric colloidal particles prepared by simultaneous precipitation of quercetin with hydrophobic protein in aqueous medium. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 423–429, 15 jul. 2012.
- PAZIN, W. M. et al. Bioactivity and action mechanism of green propolis against *Pythium aphanidermatum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, 2019.
- PEREIRA, A. DO E. S. et al. Lignin nanoparticles: New insights for a sustainable agriculture. **Journal of Cleaner Production**, p. 131145, 28 fev. 2022.
- PEREIRA, A. DO E. S.; OLIVEIRA, H. C.; FRACETO, L. F. Polymeric nanoparticles as an alternative for application of gibberellic acid in sustainable agriculture: a field study. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 7135, 9 maio 2019.
- PEREIRA, B. L. C. et al. Estudo da degradação térmica da madeira de Eucalyptus através de termogravimetria e calorimetria. **Revista Árvore**, v. 37, p. 567–576, jun. 2013.
- PEREIRA, C. S.; MATTE, W. D.; VENÂNCIO, P. H. B. Aplicação de extrato de própolis na agricultura. **Revista de Ciências Agroambientais**, v. 14, n. 1, 29 ago. 2016.
- PEREIRA, D. S. et al. Herbicidal potential (phytotoxic) of honey bee propolis extracts of the Brazilian northeast on weeds of cultivated pastures. **Journal of Apicultural Research**, p. 1– 10, 24 ago. 2021.

PINHEIRO MACHADO, G. T. et al. Development of propolis nanoparticles for the treatment of bovine mastitis: in vitro studies on antimicrobial and cytotoxic activities. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 99, n. 4, p. 713–723, dez. 2019.

PIPERNO et al. Amazonia and the Anthropocene: What was the spatial extent and intensity of human landscape modification in the Amazon Basin at the end of prehistory? 2015. Disponível em: <<https://journalssagepub-com.ez87.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1177/0959683615588374>>. Acesso em: 25 nov. 2021.

PROENÇA, P. L. F. Sistema Nanocarreador de Zeína para Compostos Bioativos (Óleo de Menta, Cipermetrina, Clorpirifós e Amitraz) Visando Controle do Carrapato Bovino. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Sorocaba, p.57. 2018.

RANI, L. et al. An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. **Journal of Cleaner Production**, v. 283, p. 124657, 10 fev. 2021.

RICHARD W. KORSMEYER et al. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 25–35, 1 maio 1983.

RISTIVOJEVIĆ, P. et al. Poplar-type Propolis: Chemical Composition, Botanical Origin and Biological Activity. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 11, p. 1934578X1501001117, 1 nov. 2015.

SAMPIETRO ET AL. Efficacy of Argentinean propolis extracts on control of potato soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 12, p. 4575–4582, 2020.

SANTOS, L. M. et al. Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 4, p. 1369–1382, 15 mar. 2020.

SAUVADET, M. et al. Cocoa agroforest multifunctionality and soil fertility explained by shade tree litter traits. **Journal of Applied Ecology**, v. 57, n. 3, p. 476–487, mar. 2020.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726–737, out. 2003.

SCHROTH et al. Pests and diseases in agroforestry systems of the humid tropics | **SpringerLink**. Disponível em: <<https://link-springercom.ez1.periodicos.capes.gov.br/article/10.1023%2FA%3A1006468103914>>. Acesso em: 26 nov. 2021.

SEIF EL-YAZAL, M. Presoaking Treatment of Propolis Aqueous Extract Alleviates Salinity Stress in Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Plants Grown under Calcareous Saline Soil Conditions. **International Letters of Natural Sciences**, v. 76, p. 23–33, 1 ago. 2019.

SEMIDA, W. M.; RADY, M. M. Presoaking application of propolis and maize grain extracts alleviates salinity stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 168, p. 210–217, mar. 2014.

SHAKOURY, N. et al. Encapsulation of propolis extract in whey protein nanoparticles. **LWT**, v. 158, p. 113138, 15 mar. 2022.

SHALTOUKI, P. et al. Synthesis and Characterization of Nanoparticles Propolis Using Beeswax. **Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)**, v. 38, n. 2, abr. 2019.

- SHARMA, S. et al. Valorization of lignin into nanoparticles and nanogel: Characterization and application. **Bioresource Technology Reports**, v. 18, p. 101041, 1 jun. 2022.
- SILVA-CASTRO, I. et al. Application of Bioactive Coatings Based on Chitosan and Propolis for *Pinus* spp. Protection against *Fusarium circinatum*. **Forests**, v. 9, n. 11, p. 685, nov. 2018.
- SIMMONS, C. S. et al. The Amazon Land War in the South of Pará. **Annals of the Association of American Geographers**, v. 97, n. 3, p. 567–592, set. 2007.
- SINGH, A. R. et al. Nanotechnology-based approaches applied to nutraceuticals. **Drug Delivery and Translational Research**, 18 mar. 2021.
- SONG, C. et al. Marine Natural Products: The Important Resource of Biological Insecticide. **Chemistry & Biodiversity**, v. 18, n. 5, maio 2021.
- SPASOJEVIĆ, L. et al. Preparation of composite zein/natural resin nanoparticles. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 85, n. 3, p. 369–380, 2020.
- SUN, Q. et al. Global heat stress on health, wildfires, and agricultural crops under different levels of climate warming. **Environment International**, v. 128, p. 125–136, 1 jul. 2019.
- SUREK, M. et al. Propolis authentication of stingless bees by mid-infrared spectroscopy and chemometric analysis. **LWT**, v. 161, p. 113370, 1 maio 2022.
- TALUKDER, B. et al. Climate CHANGE-TRIGGERED land degradation and planetary health: A review. **Land Degradation & Development**, v. 32, n. 16, p. 4509–4522, out. 2021.
- THAMMASIT, P. et al. Targeted Propolis-Loaded Poly (Butyl) Cyanoacrylate Nanoparticles: An Alternative Drug Delivery Tool for the Treatment of Cryptococcal Meningitis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 2021.
- THOMAZ ET AL. Effects of tropical forest conversion on soil and aquatic systems in southwestern Brazilian Amazonia: A synthesis. **Environmental Research**, v. 183, p. 109220, 2020.
- TORRES-GONZÁLEZ, A. et al. Analysis of volatile components from *Melipona beecheii* geopropolis from Southeast Mexico by headspace solid-phase microextraction. **Natural Product Research**, v. 30, n. 2, p. 237–240, 17 jan. 2016.
- VALCANAI, C. P. et al. Antimicrobial Activity of Volatile Oils from Brazilian Stingless Bees *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* Propolis. **Chemistry & Biodiversity**, v. 19, n. 8, p. e202200369, ago. 2022.
- VIEIRA, G. H. DA C. et al. 044-Efeitos do extrato de própolis sobre a qualidade sanitária e fisiológica. **Cadernos de Agroecologia**, v. 5, n. 1, 2010.
- WANG, B. et al. Green and Facile Preparation of Regular Lignin Nanoparticles with High Yield and Their Natural Broad-Spectrum Sunscreens. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, n. 2, p. 2658–2666, 22 jan. 2019.
- WANG ET AL. Preparation, stability, antioxidative property and in vitro release of cannabidiol (CBD) in zein-whey protein composite nanoparticles. **LWT**, v. 162, p. 113466, 1 jun. 2022.
- WARWICK ESTEVAM KERR; GISLENE ALMEIDA CARVALHO; VÂNIA ALVES DO NASCIMENTO. *Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação*. Belo Horizonte - Minas Gerais: [s.n.].
- WUEST ET AL. Agriculture isn't all rocket science. **Nature Ecology & Evolution**, v. 5, n. 8, p. 1049–1049, 2021.

YUNCHANG GUO et al. Nano-structure and properties of maize zein studied by atomic force microscopy. **Journal of Cereal Science**, v. 41, n. 3, p. 277–281, 1 maio 2005.

ZHANG, H. et al. Enhanced antioxidant activity and in vitro release of propolis by acidinduced aggregation using heat-denatured zein and carboxymethyl chitosan. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 104–112, 1 ago. 2018.

ZHANG, H. et al. One-step assembly of zein/caseinate/alginate nanoparticles for encapsulation and improved bioaccessibility of propolis. **Food & Function**, v. 10, n. 2, p. 635–645, 2019.

ZHANG, J.; ZHAN, P.; TIAN, H. Recent updates in the polysaccharides-based Nanobiocarriers for drugs delivery and its application in diseases treatment: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 115–128, 1 jul. 2021.