

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

IMPACTOS FISIOLÓGICOS E METABÓLICOS EM
TOMATEIROS (*Solanum lycopersicum* L.) SUBMETIDOS À
APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS *in natura* E
NANOENCAPSULADOS DE AÇÃO REPELENTE

Autor: Laura Eduarda Lopes dos Reis
Orientadora: Dra. Cristiane de Melo Cazal

Rio Verde - GO
Agosto – 2017

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

IMPACTOS FISIOLÓGICOS E METABÓLICOS EM
TOMATEIROS (*Solanum lycopersicum* L.) SUBMETIDOS À
APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS *in natura* E
NANOENCAPSULADOS DE AÇÃO REPELENTE

Autor: Laura Eduarda Lopes dos Reis
Orientadora: Dr.^a Cristiane de Melo Cazal

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde - Área de concentração Agroquímica Orgânica.

Rio Verde - GO
Agosto – 2017

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

Reis, Laura Eduarda Lopes dos

RR375i Impactos fisiológicos e metabólicos em tomateiros
(*Solanum lycopersicum* L.) submetidos à aplicação de
óleos essenciais *in natura* e nanoencapsulados de ação
repelente / Laura Eduarda Lopes dos Reis; orientadora
Cristiane de Melo Casal; co-orientador Wagner Luiz
Araújo; co-orientadora Cassia Cristina Fernandes Alves
-- Rio Verde, 2017.
85 p.

Dissertação (Mestrado em Pós-graduação em
Agroquímica) -- Instituto Federal Goiano, Câmpus Rio
Verde, 2017.

1. Fisiologia Vegetal. 2. Nanopartículas
poliméricas. 3. Óleos essenciais. 4. Tomateiro. 5.
Xylopiá aromática. I. Casal, Cristiane de Melo,
orient. II. Araújo, Wagner Luiz, co-orient. III.
Alves, Cassia Cristina Fernandes, co-orient. IV.
Título.

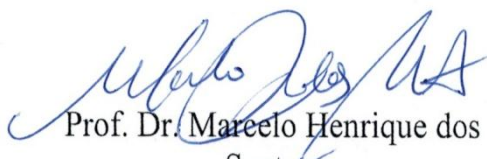
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

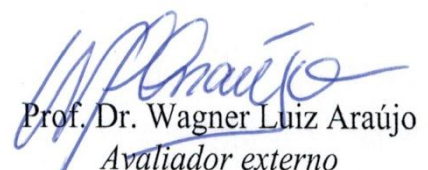
IMPACTOS FISIOLÓGICOS E METABÓLICOS EM
TOMATEIROS (*Solanum lycopersicum* L.) SUBMETIDOS À
APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS *in natura* E
NANOENCAPSULADOS DE AÇÃO REPELENTE

Autora: Laura Eduarda Lopes dos Reis
Orientador: Cristiane de Melo Cazal

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica – Área de concentração
Agroquímica.

APROVADA em 31 de agosto de 2017.


Prof. Dr. Marcelo Henrique dos
Santos
Avaliador externo
UFV - Universidade Federal de
Viçosa


Prof. Dr. Wagner Luiz Araújo
Avaliador externo
UFV - Universidade Federal de
Viçosa


Prof.ª Dr.ª Cristiane de Melo Cazal
Presidente da banca
IF Sudeste de Minas Gerais/Barbacena

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por ter me dado a permissão de ter chegado até aqui. Agradeço a Ele por cada pessoa que cruzou meu caminho e que estão aqui citadas, todas muitíssimo especiais.

Aos meus pais Valter e Josete, que sempre foram minha fortaleza, a eles devo a vida e todos os princípios a mim ensinados.

À minha irmã Cynthia, que com seu zelo nunca permitiu que eu desistisse dos meus sonhos, nela pude confiar e me manter firme nas minhas escolhas. Também ao meu irmão Douglas, que me apontou o caminho e prazer em aprender ciência.

À minha amada avó Ilma, pelo exemplo de coragem e amor.

Sou imensamente grata à orientadora Dr.^a Cristiane de Melo Casal, pela oportunidade de trabalhar com a profissional competente que é. Obrigada por todo incentivo e confiança depositada para conduzir este grande desafio.

À Professora Dr.^a Cássia Alves do Laboratório de Química de Produtos Naturais do IF Goiano, pela primeira oportunidade em trabalhar na prática com óleos essenciais e por todos os ensinamentos de Química Orgânica.

Ao professor Wagner L. Araújo, pela orientação e oportunidade de trabalhar com pesquisadores tão competentes.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, por compartilhar de seus conhecimentos que cujas disciplinas contribuíram para a realização desta pesquisa.

Aos amigos rio-verdenses Cinthya, Lindaura, Humberto, Donizete e Lúcius e seus familiares que tão bem me acolheram em Goiás. O real significado de generosidade pude aprender com eles. Sou imensamente grata pelo amor gratuito que nos uniu como uma grande família.

À amiga Natália, que está comigo em todos os momentos desde a infância. Seus conselhos sempre me impulsionaram a ser uma pessoa melhor.

Ao meu companheiro e amigo Diego Andresse, pelo amor, paciência e compreensão. Estar ao seu lado me fortalece a cada dia.

À Auxiliadora Martins, por não medir esforços para ajudar e contribuir na construção do presente trabalho, compartilhando seu conhecimento.

A todos os pesquisadores da Unidade de Crescimento de Plantas da UFV, que me agregaram à equipe e contribuíram direta ou indiretamente na instalação do experimento, análises, bem como na minha formação.

Ao Sr. José Luíz, técnico do Departamento de Química da UFV, pela realização das nossas análises cromatográficas.

Aos alunos de Iniciação Científica Daniel e Vinícius, que compartilharam da experiência de laboratório no Núcleo de Química do IFSudesteMG- Campus Barbacena.

À CAPES, pela concessão da bolsa e ao CNPq, pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica e ao Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia Goiano e todos do Campus Rio Verde, pela oportunidade de aprimoramento profissional, intelectual e pessoal.

Agradeço também à saudosa e amada Dinha Rosa, que estará sempre presente. Sou grata por tão carinhosamente zelar por mim enquanto a foi permitido e por me incentivar, desde a infância, a estudar. A ela sou infinitamente grata e dedico este trabalho.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para mais uma etapa de minha vida.

Obrigada!

BIOGRAFIA DO AUTOR

Laura Eduarda Lopes dos Reis, filha de Valter dos Reis e Josete Ferreira Lopes, nascida no dia 26 de março de 1993, na cidade de Oliveira-MG, onde cursou o ensino fundamental e médio, concluindo sua educação básica em dezembro de 2010. Em fevereiro de 2011, ingressou no curso de Licenciatura em Química no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Campus Barbacena. Durante a graduação, foi bolsista de Iniciação científica (PIBIC) e Iniciação à docência (PIBID). Concluiu o curso em agosto de 2015 e, em setembro deste mesmo ano, iniciou o mestrado no Programa de Pós-graduação em Agroquímica pelo Instituto Federal Goiano-Campus Rio Verde, sob orientação da Professora Dr.^a Cristiane de Melo Cazal e coorientação da Professora Cássia Cristina Fernandes Alves e do Professor Wagner L. Araújo. Por um ano, permaneceu nas dependências do IF Goiano, onde cursou as disciplinas que lhe deram maior embasamento teórico. Em setembro de 2016, mudou-se para Viçosa-MG e teve a oportunidade de desenvolver seu trabalho científico na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) no Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE TABELAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE APÊNDICE	xii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 <i>Solanum lycopersicum</i> L. e <i>Bemisia tabaci</i>	3
2.2 Óleos essenciais de ação pesticida	5
2.3 <i>Xylopiia aromatica</i> (Annonaceae).....	7
2.4 Nanotecnologia na agricultura: nanopartículas poliméricas carreadoras de compostos bioativos	10
2.4 Efeitos da aplicação de óleos essenciais e nanopartículas em plantas	12
2.5 Referências bibliográficas	14
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos	22

4. TRABALHO CIENTÍFICO.....	23
4.1 INTRODUÇÃO.....	23
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.2.1 Coleta do material vegetal.....	25
4.2.2 Obtenção do óleo essencial.....	26
4.2.3 Quantificação do óleo essencial.....	26
4.2.4 Análise química dos óleos essenciais.....	28
4.2.5 Preparo das nanopartículas.....	28
4.2.6 Caracterização das nanopartículas.....	29
4.2.6.1 Determinação da eficiência de encapsulação (EE%).....	29
4.2.6.2 Determinação do pH.....	30
4.2.6.3 Determinação do potencial zeta.....	30
4.2.6.4 Determinação do diâmetro de partículas.....	30
4.2.6.5 Avaliação morfológica das nanopartículas.....	30
4.2.7 Ensaio biológico.....	31
4.2.7.1 Instalação do experimento.....	31
4.2.7.2 Determinação dos parâmetros biométricos.....	31
4.2.7.3 Determinação de parâmetros fotossintéticos.....	32
4.2.7.3.1 Trocas gasosas e fluorescência.....	32
4.2.7.4 Análises bioquímicas.....	33
4.2.7.4.1 Extração etanólica a quente.....	33
4.2.7.4.2 Análise estatística.....	34
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.3.1 Teor do óleo essencial.....	34
4.3.2 Quantificação do óleo essencial.....	34
4.3.2.1 Validação do método analítico para quantificação do óleo essencial das folhas de <i>X. aromatica</i> por espectroscopia UV-VIS.....	35

4.3.2.2 Validação do método analítico para quantificação do óleo essencial dos frutos de <i>X. aromatica</i> por espectroscopia UV-VIS	37
4.3.3 Análise química dos óleos essenciais.....	38
4.3.3.1 Composição química do óleo essencial de folhas de <i>X. aromatica</i>	38
4.3.3.2 Composição química do óleo essencial de frutos de <i>X. aromatica</i>	41
4.3.4 Caracterização das nanopartículas.....	42
4.3.4.1 Determinação de eficiência de encapsulação (EE%), pH, potencial zeta (pZ) e diâmetro de partículas (Dp)	42
4.3.4.2 Morfologia das nanopartículas.....	43
4.3.5 Ensaio biológicos.....	45
4.3.5.1 Parâmetros biométricos	45
4.3.5.2 Parâmetros fotossintéticos.....	48
4.3.5.3 Parâmetros bioquímicos.....	52
4.4 CONCLUSÕES	55
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
APÊNDICE	63

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Desvio padrão (DP), Precisão (DPR %) e exatidão obtidas na construção da curva de calibração do óleo essencial de folhas de <i>X. aromatica</i>	35
Tabela 2: Precisão (DPR %) de amostras do óleo essencial de folhas de <i>X. aromatica</i> usadas na validação do método analítico	36
Tabela 3: Exatidão (%) de amostras do óleo essencial de folhas de <i>X. aromatica</i> usadas na validação do método analítico	36
Tabela 4: Precisão (DPR %) e exatidão obtidas na construção da curva de calibração do óleo essencial de frutos de <i>X. aromatica</i>	37
Tabela 5: Precisão (DPR %) de amostras do óleo essencial dos frutos de <i>X. aromatica</i> usadas na validação do método analítico	38
Tabela 6: Exatidão (%) de amostras do óleo essencial dos frutos de <i>X. aromatica</i> usadas na validação do método analítico	38
Tabela 7: Constituintes químicos do óleo essencial de folhas de <i>X. aromatica</i>	39
Tabela 8: Constituintes químicos do óleo essencial de frutos de <i>X. aromatica</i>	41
Tabela 9. Eficiência de encapsulação, pH das suspensões coloidais, potencial zeta (pZ), índice de polidispersão (PDI) e diâmetro das nanopartículas poliméricas (Dp) contendo óleos essenciais de folhas e frutos de <i>X. aromatica</i> nas concentrações 1 e 2% e nanopartículas sem óleo essencial	43

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Introdução	
Figura 1: Adulto da mosca branca (<i>B. tabaci</i>) (A), Amadurecimento irregular de frutos de tomate ocasionado pelo ataque de mosca branca (B) folha de tomateiro infestada por adultos da mosca branca (C)	4
Figura 2: Biossíntese de terpenóides a partir do mevalonato	5
Figura 3. Árvore de <i>X. aromatica</i>	8
Figura 4. Folhas, flores e frutos (A) e frutos (B) de <i>X. aromatica</i>	9
Figura 5: Estrutura do polímero poli- ϵ -caprolactona (PCL)	11
Capítulo I	
Figura 1. Curva de calibração do óleo essencial de folhas de <i>X. aromatica</i>	35
Figura 2. Curva de calibração do óleo essencial de frutos de <i>X. aromatica</i>	37
Figura 3. Cromatograma obtido em CG-EM para óleo essencial das folhas de <i>X. aromatica</i> com indicação dos picos referentes aos compostos identificados. Condições: Gás de arraste Hélio (He); temperatura inicial de 40 °C, o incremento da temperatura da coluna foi de 3 °C min ⁻¹ atingindo o máximo de 240°C	39
Figura 4: Fórmula estrutural dos componentes majoritários identificados no óleo essencial de folhas de <i>X. aromatica</i>	40
Figura 5. Cromatograma obtido em CG-EM para óleo essencial dos frutos de <i>X. aromatica</i> com indicação dos picos referentes aos compostos identificados. Condições: Gás de arraste Hélio (He); temperatura inicial de 40 °C, o	

incremento da temperatura da coluna foi de 3 °C min ⁻¹ até 240°C	41
Figura 6: Fórmula estrutural dos componentes majoritários identificados no óleo essencial de frutos de <i>X. aromatica</i>	42
Figura 7: Fotomicroscopia obtidas por MEV das suspensões de: nanopartículas poliméricas com óleo essencial de folhas de <i>X. aromatica</i> (A), de frutos de <i>X. aromatica</i> (B), nanopartículas poliméricas vazias (C)	44
Figura 8: Foto representativa de tomateiros utilizados neste trabalho. Unidades experimentais com 14 DAT (A); com 28 DAT(B)	45
Figura 9. Variação da altura final de tomateiros (<i>S. lycopersicum</i> L. cv. Santa Clara) submetidas à aplicação de óleos essenciais de <i>X. aromatica</i> . Barras pretas representam os controles: Água, Tween80 e Nanopartículas vazias (NV). Barras em cinza representam os tratamentos com OEs: <i>in natura</i> extraído de frutos na concentração 1% (InFr1%) e a 2 % (InFr2%), <i>in natura</i> de folhas a 1 % (InFo1%) e a 2 % (InFo2%), nanopartículas contendo o óleo essencial de frutos a 1 % (NFr1%) e a 2 % (NFr2%) e nanopartículas contendo óleo essencial de folhas na concentração 1 % (NFo1%) e a 2 % (NFo2%). Valores representam as médias ± EP de pelos menos seis plantas independentes. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si ($P < 0,05$), parâmetros que não apresentam letras representam similaridade estatística em todos os tratamentos, segundo o teste Tukey.....	46
Figura 10. Variação de parâmetros biométricos de tomateiros (<i>S. lycopersicum</i> L. cv. Santa Clara) submetidas à aplicação de OEs de <i>X. aromatica</i> . Área foliar específica (AFE) (A); área foliar total (AFT) (B); massa seca de folhas (MSF) (C); massa seca de hastes (MSH) (D); massa seca de raiz (MSR) (E); razão entre raiz e parte aérea (R/PA) (F); massa seca total (MST) (G) e; alocação de biomassa (H). Estatística e siglas como descritas na Figura 9.....	47
Figura 11: Variação nos parâmetros de fluorescência da clorofila <i>a</i> em resposta a aplicação de OEs de <i>X. aromatica</i> em plantas de tomate (<i>S. lycopersicum</i> L. cv. Santa Clara). Eficiência fotoquímica máxima do PSII (F_v/F_m) (A); rendimento quântico efetivo do transporte de elétrons no FSII (F_v'/F_m') (B); coeficiente de extinção fotoquímica (qP) (C); coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) (D); taxa de transporte de elétrons relativo (ETR) (E) e; rendimento quântico do transporte de elétrons (Φ_{PSII}) (E). Estatística e siglas dos tratamentos como descrito na Figura 9.....	50
Figura 12. Variação nos parâmetros de tocas gasosas em resposta a aplicação de óleos essenciais de <i>X. aromatica</i> em plantas de tomate (<i>S. lycopersicum</i> cv. Santa Clara). Fotossíntese líquida (A_N) (A); Condutância estomática (g_s) (B); Concentração interna de CO ₂ (C_i) (C); Taxa de respiração no escuro (R_d) (D). Estatística e siglas dos tratamentos como descrito na Figura 9.....	51
Figura 13: Variação nos conteúdos de metabólitos envolvidos no	

metabolismo do Carbono em resposta a aplicação de óleos essenciais de *X. aromatica* em tomateiro (*S. lycopersicum* cv. Santa Clara). Glicose (A); Frutose (B); Sacarose (C); Amido (D) e Malato (E). Estatística e siglas dos tratamentos como descrito na Figura 9..... 53

Figura 14: Variação nos conteúdos de metabólitos envolvidos no metabolismo do Nitrogênio em resposta a aplicação de óleos essenciais de *X. aromatica* em tomateiro (*S. lycopersicum* cv. Santa Clara). Chl (Clorofila) total (A); Razão Chl *a*/Chl *b* (B); Aminoácidos solúveis totais (C); Proteínas solúveis totais (D) e Nitrato (E). Estatística e siglas dos tratamentos como descrito na Figura 9..... 54

ÍNDICE DE APÊNDICE

	Página
Metodologia detalhada das análises bioquímicas	
Determinação do conteúdo de açúcares	63
Determinação do conteúdo de amido	63
Determinação do teor de malato	64
Determinação do teor de clorofilas (<i>a</i> e <i>b</i>)	65
Determinação dos conteúdos de aminoácidos	65
Determinação dos teores de proteínas solúveis totais	66
Determinação da concentração de nitrato	66

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

Símbolo/ sigla	Significado	Unidade
A_N	Fotossíntese líquida	$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
AFE	Área foliar específica	$\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$
AFT	Área foliar total	cm^2
CG-DIC	Cromatografia a gás acoplada a detector de Ionização por Chama	
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas	
Chl	Clorofila	
C_i	Concentração interna de CO_2	$\text{mmol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$
DP	Desvio padrão	
D_p	Diâmetro das partículas	nm
DPR	Desvio padrão relativo	%
e.V	Eletron volt	
EE	Eficiência de encapsulação	%
E	Exatidão	%
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo	
EtOH	Álcool Etílico	
ETR	Taxa de transporte de elétrons	
FDA	Food and Drug Administration	
F_m	Fluorescência máxima emitida	
F_m'	Fluorescência máxima da clorofila	
F_o	Fluorescência inicial	
F_v/F_m	Eficiência fotoquímica máxima do FSII	
F_v'/F_m'	Eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII	
g_s	Condutância estomática	$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
h	Hora	
IE	Impacto eletrônico	
IF	Instituto Federal	
IR	Índice de Retenção	
InFo	Tratamento com Óleo essencial de folhas <i>in natura</i>	
InFr	Tratamento com Óleo essencial de frutos <i>in natura</i>	
IRGA	Analisador de Gás Infravermelho	
L	Litro	

LD	Limite de Detecção	
LQ	Limite de Quantificação	
m	Metro	
MF	Massa fresca	mg
min	Minutos	
MSF	Massa seca foliar	g
MSH	Massa seca de hastes	g
MSR	Massa seca de raiz	g
mV	Mili Volts	
NFo	Tratamento com óleo essencial de folhas nanoencapsulado	
NFr	Tratamento com óleo essencial de frutos nanoencapsulado	
NI	Compostos não identificados	
nm	Nanômetro	
NP	Nanopartículas	
NPK	Nitrogênio-Fósforo-Potássio	
NPQ	Coefficientes de extinção não-fotoquímica	
NV	Nanopartícula vazia	
°C	Grau celsius	
OE	Óleo essencial	
PCL	Poli-ε-caprolactona	
pH	Potencial hidrogeniônico	
PSII	Fotossistema II	
PZ	Potencial zeta	
qP	Coefficientes de extinção fotoquímica	
R/PA	Razão raiz/parte aérea	
R _d	Respiração no escuro	μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹
S	Sobrenadante	
TR	Tempo de retenção	min
φPSII	Rendimento quântico do transporte de elétrons	

RESUMO

DOS REIS, LAURA EDUARDA LOPES: Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, agosto de 2017. Impactos fisiológicos e metabólicos em tomateiros (*Solanum lycopersicum* L.) submetidos à aplicação de óleos essenciais *in natura* e nanoencapsulados de ação repelente. Orientadora: Cristiane de Melo Casal; Coorientadora: Cássia Cristina Fernandes Alves; Coorientador: Wagner Luiz Araújo.

A busca por novos produtos fitossanitários tem impulsionado inúmeras pesquisas visando a utilização de produtos naturais como alternativa para o controle de pragas agrícolas. A família Annonaceae é uma reconhecida fonte de compostos de ação inseticida e os óleos essenciais das folhas e frutos da espécie *Xylopia aromatica* apresentam potencial contra mosca branca (*Bemisia tabaci*), uma praga agrícola de destaque na agricultura mundial. Registre-se que a nanoencapsulação dos compostos ativos de óleos essenciais promove sua proteção contra ações de degradações ambientais, aumenta a eficácia e prolonga sua atividade. Diante de um novo produto fitossanitário, faz-se necessária a avaliação do seu comportamento sobre a planta alvo, assegurando a alta produtividade demandada pelo setor agrícola. Neste contexto, o presente trabalho investigou os efeitos fisiológicos e metabólicos em tomateiro *Solanum lycopersicum* L. submetidos à aplicação de óleos essenciais nas formas *in natura* e nanoencapsulados extraídos das folhas e frutos de *X. aromatica*. Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação em Clevenger tendo o rendimento médio de 0,05 % e 0,58 % para folhas e frutos, respectivamente. Os compostos majoritários encontrados foram limoneno (37,76 %), biciclogermacreno (13,59 %), α -pineno (7,75 %) e β - pineno (8,11%) para os óleos essenciais das folhas e limoneno (65,44 %), β -pineno (8,44 %), α -pineno (7,66 %) e β -mirceno (3,29 %) para os frutos. O método de nanoprecipitação para obtenção das nanopartículas de PCL contendo os óleos essenciais apresentou nanopartículas lisas e monodispersas com eficiência de encapsulação entre

94 e 98 % nas formulações obtidas. O presente trabalho revelou que a aplicação dos óleos essenciais extraídos das folhas e dos frutos de *X. aromatica*, tanto na forma *in natura* quanto nanoencapsulados, não causaram prejuízos às plantas de tomate submetidas aos tratamentos, em termos de crescimento, parâmetros fotossintéticos e bioquímicos, quando analisados no estágio vegetativo das plantas. Os parâmetros de crescimento não mostraram alterações significativas de altura, área foliar total e área foliar específica, massa seca das folhas, massa seca de hastes, massa seca de raízes e alocação de biomassa. Os parâmetros fotossintéticos foram determinados a partir dos dados expressos pela fluorescência e trocas gasosas, os quais não revelaram danos ao aparato fotossintéticos. As avaliações bioquímicas foram realizadas partir da determinação dos conteúdos dos metabólitos açúcares, amido, malato, clorofilas *a* e *b*, aminoácidos, proteínas e nitrato. De modo geral, pequenas variações intrínsecas foram observadas para cada parâmetro, entre os tratamentos e, não consolidaram, contudo, danos ao metabolismo primário das plantas tratadas com óleos essenciais *in natura* e nanoencapsulados. Tomados em conjunto, os dados obtidos indicam que a aplicação de óleos essenciais de folhas e frutos de *X. aromatica*, seja na forma *in natura* ou nanoencapsulados, não ocasiona prejuízos ao crescimento e metabolismo em tomateiro e que a associação da nanotecnologia ao uso de produtos naturais é potencialmente vantajosa para o setor agrícola no manejo de pragas.

PALAVRAS-CHAVE: fisiologia vegetal, nanopartículas poliméricas, óleos essenciais, tomateiro, *Xylopiya aromatica*

ABSTRACT

DOS REIS, LAURA EDUARDA LOPES: Goiano Federal Institute – Campus Rio Verde – GO, August of 2017. Physiological and metabolic impacts on tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) submitted to the application of *in natura* and nanoencapsulated essential oils with repellent action. Advisor: Cristiane de Melo Casal; Co-Advisor: Cássia Cristina Fernandes Alves; Co-Advisor: Wagner Luiz Araújo.

The search for new phytosanitary products has stimulated innumerable researches that aim the use of natural products as an alternative for the control of agricultural pests. The *Annonaceae* family is a recognized source of insecticidal action compounds and the essential oils of the leaves and fruits of the *Xylopia aromatica* species have potential against whitefly (*Bemisia tabaci*), a prominent agricultural pest in agriculture world. It should be noted that the nanoencapsulation of the active compounds of essential oils promotes their protection against environmental degradation actions, increases the effectiveness and prolongs their activity. Faced with a new phytosanitary product, it is necessary to evaluate its behavior on the target plant, ensuring the high productivity demanded by the agricultural sector. In this context, the present work investigated the physiological and metabolic effects in *Solanum lycopersicum* L. tomatoes submitted to the application of essential oils *in natura* and nanoencapsulated form extracted from the leaves and fruits of *X. aromatica*. The essential oils were obtained by hydrodistillation in Clevenger having an average yield of 0.05 % and 0.58 % for leaves and fruits, respectively. The major compounds found were limonene (37.76 %), bicyclogermacrene (13.59 %), α -pinene (7.75 %) and β -pinene (8.11 %) for leaf essential oils and limonene, β -pinene (8.44 %), α -pinene (7.66%) and β -myrcene (3.29 %) for the fruits. The nanoprecipitation method for obtaining PCL nanoparticles containing the essential oils presented smooth and monodisperse nanoparticles with encapsulation efficiency between 94 and 98 % in the obtained formulations. The present

work revealed that the application of the essential oils extracted from leaves and fruits of *X. aromatica*, both *in natura* and nanoencapsulated form, did not cause damage to the tomato plants submitted to the treatments, in terms of growth, photosynthetic and biochemical parameters when analyzed in the vegetative stage of the plants. Growth parameters did not show significant changes in height, total and specific leaf area, leaf, stems and roots dry mass, and biomass allocation. The photosynthetic parameters were determined from the data expressed by fluorescence and gas exchange, which did not reveal photosynthetic damage. The biochemical evaluations were carried out from the determination of the contents of the metabolites sugars, starch, malate, chlorophyll a and b, amino acids, proteins and nitrate. In general, small intrinsic variations were observed for each parameter, among treatments and, however, did not consolidate damage to the primary metabolism of plants treated with *in natura* and nanoencapsulated essential oils. Taken together, the data obtained indicate that the application of essential oils of leaves and fruits of *X. aromatica*, either *in natura* or nanoencapsulated form, does not cause damage to the growth and metabolism in tomato, and that the association of nanotechnology with the use of natural products is potentially advantageous for the pest management on the agricultural sector.

KEY WORDS: essential oils, plant physiology, polymer nanoparticles, tomato, *Xylopiya aromatica*

1. INTRODUÇÃO

A chamada Revolução Verde, entre as décadas de 1960 e 1970, impulsionou a utilização em larga escala de produtos fitossanitários no Brasil, visando em última instância, maior produtividade no setor agrícola (Octaviano, 2010). O país, atualmente, ocupa lugar de destaque no mercado mundial do agronegócio, e está diretamente associado ao uso intensivo de insumos agrícolas (Investnews, 2015). Dessa forma, maior produção está associada à necessidade de uso intensivo de agrotóxicos; porém, isso acontece muitas vezes de maneira indiscriminada, oferecendo riscos à saúde dos consumidores e manipuladores, danos ao meio ambiente, além de proporcionar o surgimento de novas pragas e patógenos (Rambow et al, 2014).

A produção de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), de grande importância econômica no Brasil, contextualiza à temática de uso intensivo de insumos no controle de pragas. Registre-se que tais organismos causam danos de tal magnitude fazendo do tomate uma das hortaliças líderes no emprego de agrotóxico (Anvisa, 2014); em conjunto, isso eleva os custos da produção e favorece a seleção de pragas.

Este cenário tem proporcionado o surgimento de pragas mais resistentes. Como exemplo, temos a *Bemisia tabaci* conhecida popularmente como mosca branca (Scarpellini et al., 2002). Inseto esse que ganha destaque em todo o mundo como importante praga agrícola pela sua rápida disseminação. Ademais, essa praga provoca sérios danos a uma ampla gama de culturas como tomate, algodão, brócolis, feijão, soja e plantas ornamentais, demandando, portanto, o uso de quantidades consideráveis e onerosas de agrotóxicos (Rana et al., 2016; Yang et al., 2010).

As plantas produzem um conjunto diversificado de aleloquímicos que regulam, entre outras, as interações inseto-planta, especialmente na sua defesa contra a herbivoria (Van Beek; Breteler, 1993; Cloyd, 2004; Isman, 2006). Dessa forma, tais aleloquímicos

constituem fonte importante de moléculas inseticidas. Isso tem despertado o interesse de pesquisas que visam a produção de alimentos com degradação mínima dos recursos naturais. Alternativas ecologicamente corretas incluem pesticidas botânicos produzidos a partir de metabólitos secundários presentes nas plantas. Nesse contexto, os produtos naturais têm se mostrado como fontes promissoras para o desenvolvimento de métodos alternativos mais seletivos e específicos para o controle de pragas que atendam às exigências de eficiência agrônômica, segurança toxicológica e baixo impacto ambiental (Bizzo et al, 2009; Kordali et al., 2016; Lija-Escaline et al., 2015, Viegas, 2003).

Compostos orgânicos, como os óleos essenciais obtidos a partir de flores, folhas, cascas, caules e frutos dos mais variados vegetais, têm ganhado destaque como inseticidas botânicos por serem fontes adequadas para o desenvolvimento de agentes de controle de insetos pragas. Muitos óleos essenciais possuem, em sua composição química, substâncias que são responsáveis por efeitos pesticidas, além de serem relativamente pouco, ou nada, tóxicos para mamíferos e possuírem um baixo período residual no ambiente, pela sua volatilidade (Isman et al., 2011; Roh, 2015; Hakimi et al., 2015).

Xylopiya aromatica (Annonaceae), conhecida popularmente como pimenta-de-macaco (Maas et al., 2016), apresenta teor elevado de óleo essencial e, assim, representa uma fonte promissora de substâncias bioativas (Nguemtchouin et al., 2010; Obiri et al., 2014). No óleo essencial extraído de suas folhas e frutos foram identificados em maior abundância as substâncias limoneno, α e β -pineno e β -mirceno (Lago et al., 2003; Stashenko; Jaramillo; Martínez, 2004; Peres, 2015). Estes compostos apresentam, comprovadamente, atividade sobre insetos, bem como os óleos essenciais que os contêm (Viegas, 2003; Moreira et al., 2013; Peres, 2015).

Como forma de agregar maior estabilidade e eficiência à potencial atividade dos óleos essenciais, a nanotecnologia oferece vantagens para utilização desses compostos voláteis e fotolábeis a partir da sua dispersão ou encapsulamento em matrizes poliméricas. Nesse contexto, o nanoencapsulamento oferece proteção aos compostos, prolongando sua atividade através da liberação gradativa do princípio ativo, reduzindo, portanto, a necessidade de altas doses iniciais ou aplicações frequentes do produto ao longo do cultivo (Mukhopadhyay, 2014; Christofoli, et al., 2015).

Embora o desenvolvimento de novos produtos fitossanitários seja uma constante na indústria agroquímica, a avaliação dos possíveis efeitos causados em plantas a partir de sua aplicação faz-se também necessária. Não obstante, o possível

efeito fitotóxico de óleos essenciais nanoencapsulados é ainda largamente desconhecido. Assim, é necessário avaliar as possíveis alterações, no desenvolvimento da planta, provocadas pelo nanopesticida. Desta forma, o presente trabalho buscou investigar o impacto da aplicação de inseticidas botânicos à base de óleos essenciais das folhas e frutos de *Xylopiya aromatica* nas formas *in natura* e nanoencapsulados utilizados no controle de *Bemisia tabaci* em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) pelo monitoramento dos parâmetros de crescimento, fotossintéticos e bioquímicos durante o seu desenvolvimento vegetativo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Solanum lycopersicum* L. e *Bemisia tabaci*

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), pertencente à família Solanaceae, é uma das principais hortaliças cultivadas no Brasil e assume grande importância comercial, tanto para o consumo *in natura* quanto em processamento industrial (Filgueira, 2003). A produção de tomate demanda alto nível tecnológico e utilização de mão de obra, conferindo a esta cultura elevada importância econômica e social (Haji et al, 2004). No entanto, o tomateiro é atacado por um grande número de pragas e os danos causados por estes organismos, como redução de produtividade ou de qualidade do produto comercial, são de tal magnitude que o tomateiro é uma das culturas líder no emprego de agrotóxico (Anvisa, 2014; Bezerra, 2009).

A produção em larga escala aliada ao uso de agrotóxicos eleva os custos, além de promover maior pressão de seleção e aumento no número de populações que são resistentes aos ingredientes ativos inseticidas. Neste cenário, tem-se como exemplo a mosca branca (*Bemisia tabaci*), uma praga de ampla distribuição mundial (Scarpellini et al., 2002).

A *B. tabaci* (Gennadius) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) (Figura 1 A) é uma praga polífaga que ataca frequentemente diversas espécies vegetais incluindo solanáceas, cucurbitáceas, ornamentais e plantas daninhas (Baldin et al., 2007; Oliveira et al., 2001). Além disso, ocasiona perdas diretas decorrente da sucção contínua de seiva e danos indiretos que estão relacionados com a transmissão de geminivírus, que são

responsáveis por alterações no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de plantas, podendo culminar com a morte da planta. Em tomateiros, por exemplo, a *B. tabaci* causa crescimento irregular dos frutos, ocasionando alterações na consistência da polpa, aspecto esponjoso e esbranquiçado, e quedas na produção, de modo geral (Figura 1 B) (Baldin, 2005; Baldin et al., 2007).

O manejo das populações de mosca branca tem dependido principalmente de inseticidas sintéticos como neonicotinoides, piretroides e piriproxifem, que são aplicados praticamente durante todo o ano (Wang et al., 2017). Seu controle é dificultado, em virtude da sua elevada taxa de crescimento apresentada pelo inseto e pelo seu hábito de permanecer na fase abaxial das folhas, dificultando grandemente o contato da praga com o inseticida (Figura 1 C) (Oliveira et al., 2001; Fernandes et al., 2008; Barbosa et al., 2011). Além disso, o uso contínuo de inseticidas com mesmo modo de ação tem ocasionado falhas no controle da mosca branca, possivelmente pelo rápido desenvolvimento de resistência e, neste contexto, isto já foi relatado para os principais grupos químicos de inseticidas como organofosforados, carbamatos, piretroides, ciclodieno, reguladores de crescimento e neonicotinoides (Silva et al., 2009a).



Figura 1: Adulto da mosca branca (*B. tabaci*) (A), Amadurecimento irregular de frutos de tomate ocasionado pelo ataque de mosca branca (B) folha de tomateiro infestada por adultos da mosca branca (C). Fonte: Inoue-Nagata et al., (2016); Agrodefesa (2017).

2.2 Óleos essenciais de ação pesticida

Inúmeras tentativas de minimizar os riscos ambientais, sociais e econômicos provocados pelo uso intensivo de agrotóxicos têm sido discutidas e normatizadas no setor agrícola (Alves Filho, 2002). Nessa perspectiva, os compostos botânicos têm sido alvo de intensa investigação indicando grandes perspectivas para os óleos essenciais como ingredientes ativos na produção de pesticidas botânicos, tornando-os uma opção para o controle de pragas de forma mais seletiva e menos tóxica (Souza; Vendramim, 2005).

Os óleos essenciais são compostos voláteis sintetizados através de vias metabólicas secundárias de plantas que funcionam como moléculas de comunicação e defesa. Na maioria das vezes, constituem-se de misturas complexas de substâncias que são originadas pela biossíntese de terpenoides no citosol, a partir do mevalonato. Os terpenos são substâncias que possuem como unidade básica a molécula de isopreno (C_5H_8) e podem ser subdivididos em função do número de unidades isoprênicas sendo: monoterpenos (2 unidades), sesquiterpenos (3 unidades), diterpenos (4 unidades), sesterpenos (5 unidades), triterpenos e esteroides (6 unidades) e tetraterpenos ou carotenoides (8 unidades) como demonstrado na Figura 2 (Simões; Spitzer, 2000).

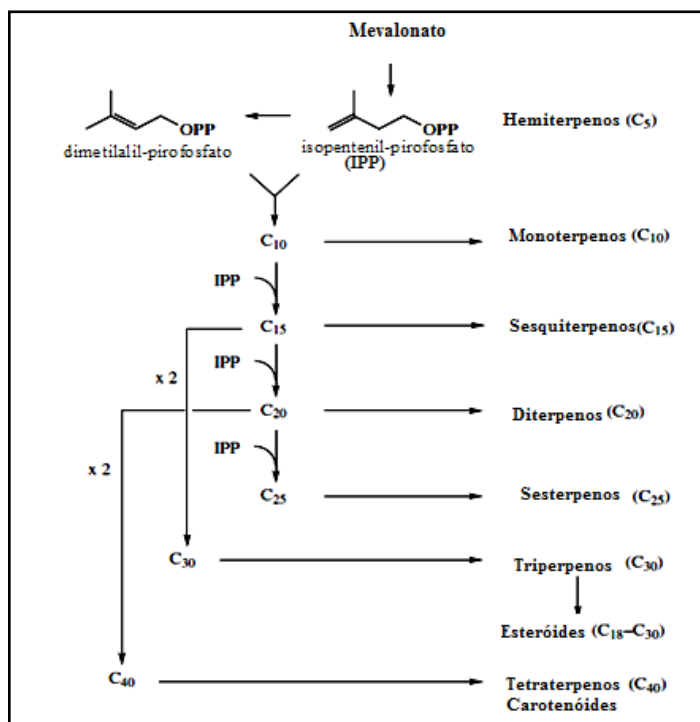


Figura 2: Biossíntese de terpenoides a partir do mevalonato. Fonte (Simões; Spitzer, 2000).

Os óleos essenciais são compostos principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos (Simões; Spitzer, 2000). Além de compostos terpênicos, a constituição química dos óleos essenciais pode variar entre álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e compostos com enxofre (Nerio et al., 2010; Koul et al., 2008). A composição dos óleos essenciais é determinada geneticamente e pode variar com a origem botânica, ciclo vegetativo, fatores climáticos, tipo de solo e procedimentos de obtenção do óleo (Chen et al., 2011; Ibrahim et al., 2001).

Em plantas, os óleos essenciais atuam principalmente na defesa, direta ou indireta contra herbívoros e patógenos, no processo de reprodução das plantas através de atração de polinizadores e disseminadores de sementes e na termotolerância vegetal (Pavela; Benelli, 2016). Os óleos essenciais desempenham papéis importantes nas plantas e está, muito provavelmente, associado à composição química variável dependente das condições ambientais em que elas se encontram. Ademais, suas propriedades biológicas são determinadas pela sinergia de seus componentes e nem sempre expressas pelo composto majoritário (Nerio et al., 2010; Koul et al., 2008).

Recentemente, têm-se observado crescente interesse às atividades biológicas dos óleos essenciais tais como, inseticida, bactericida, virucida, fungicida, antiparasidical, citotóxica, além de sua utilização na indústria, farmacêutica, alimentícia e de cosméticos (Kyarimpa et al., 2014). Os terpenos encontrados em óleos essenciais são alvos de inúmeros estudos como inseticidas, uma vez que a proteção contra insetos pragas em plantas está entre as principais finalidades destas classes de compostos (Simões; Spitzer, 2000). Estes compostos bioativos podem atuar com múltiplos mecanismos de ação, ocasionando a morte dos insetos por asfixia e aprisionamento, bem como causar repelência, deterrência alimentar e de oviposição, esterilização, além do bloqueio do metabolismo e interferência no desenvolvimento (Isman, 2006). Isso é possível pelo grande número de ingredientes ativos em cada mistura fazendo com que o desenvolvimento de resistências seja menos provável (Silva et al., 2009b; Pavela; Benelli, 2016).

A eficácia biológica de óleos essenciais contra organismos-alvo vem sendo amplamente relatada. Kordali e colaboradores (2016) avaliaram a toxicidade de óleos essenciais obtidos a partir de três espécies de *Artemisia* (*A. absinthium*, *A. santonicum* e *A. spicigera*) contra gorgulho do celeiro, *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) e todos os óleos essenciais testados foram identificados como tóxicos

para adultos de *S. granarius*. Souza (2012) obteve valores acima de 80% de mortalidade para imaturos de *Aedes aegypti* com o óleo essencial de *Xylopia leviagata* em condições de laboratório nas concentrações de 275,0 e 500,0 ppm. Volpe e colaboradores (2015) investigaram a ação do óleo essencial de *Piper aduncum* demonstrando que todos os tratamentos utilizados apresentaram mortalidade entre 90 e 100 % das ninfas de psíldeo (*Diaphorina citri*).

O interesse na utilização de óleos essenciais para o controle de insetos tem aumentado significativamente nos países industrializados, inclusive no Brasil por ser um país com flora rica e diversa (Oliveira et al., 2014). Tais, estudos são, portanto, o primeiro passo no desenvolvimento de novos pesticidas que possam ser o produto final utilizado em sistemas de manejo de pragas. A utilização de compostos vegetais para o controle de *B. tabaci* tem apresentado resultados promissores por meio de substâncias obtidas a partir de plantas, substâncias essas que atuam sobre larvas, ovos, ninfas e adultos da praga (Kim Chae et al., 2011; Baldin et al., 2013; Christofoli et al., 2015, Peres, 2015).

Christofoli et al. (2015) desenvolveram e caracterizaram nanoesferas biodegradáveis contendo óleos essenciais das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* e avaliaram o seu efeito repelente em populações *B. tabaci* sobre plantas de. Estes ensaios biológicos resultaram em reduções de até 95 % no número de ovos e ninfas em comparação com o controle ao se utilizar o óleo essencial *in natura* e nanoencapsulado em matriz polimérica.

2.3 *Xylopia aromatica* (Annonaceae)

A família Annonaceae compreende cerca de 2.500 espécies, distribuídas em aproximadamente 135 gêneros. Sua distribuição geográfica ocorre quase que exclusivamente nas regiões tropicais. Somente no Brasil, ocorrem 29 gêneros e 386 espécies, sendo 10 gêneros e 47 espécies no Cerrado (Maas et al., 2016). Essa família é caracterizada pela presença de terpenoides, alcaloides, além de óleos essenciais cuja composição é predominantemente de monoterpenos e sesquiterpenos (Simões; Spitzer, 2000; Krinski et al., 2014; Roman, 2015). Plantas dessa família são bastante comuns e possuem ampla distribuição no Brasil, como a espécie *X. aromatica* (Figura 3). Essa planta é conhecida popularmente como pimenta-de-macaco, pindaíba, e pimenteira e,

possui como sinônimos relevantes *Uvaria aromatica* Lam. e *Xylopia grandiflora* A. St. Hill (Maas et al., 2016).



Figura 3. Árvore de *X. aromatica*. Fonte: Peres (2015).

X. aromatica é uma planta nativa do Cerrado, pioneira, semidecídua e de fácil reconhecimento, com altura variável de 2 a 8 metros. Apresenta ramos e folhas pendentes e flores com pétalas brancas e cálice vermelho-pardo (Figura 4 A). As flores, quando abertas, lembram estrelas, com pedicelos muito curtos e voltados para cima. Os frutos (Figura 4 B) são comestíveis e se apresentam vermelhos na deiscência e amarronzados ou pretos quando secos (Maas et al., 2016). As sementes são ovoides, ariladas apicalmente e azuladas. Em média, são encontradas duas a oito sementes por carpídio. Os frutos são usados popularmente como condimento, principalmente no tempero de carnes, e como substituto da pimenta do reino (*Piper nigrum*) por apresentarem odor semelhante, porém mais suave, além de serem considerados carnitivos e afrodisíacos na medicina popular (Maia et al., 2005).



Figura 4. Folhas, flores e frutos (A) e frutos (B) de *X. aromatica* (Fonte: Arquivo pessoal).

O gênero *Xylopia* representa uma fonte promissora de substâncias bioativas (Nguemtchouin et al., 2010; Obiri et al., 2014). Do óleo essencial das folhas e frutos de *X. aromatica* foram identificados como compostos majoritários: limoneno, α e β -pineno e β -mirceno (Lago et al., 2003; Stashenko; Jaramillo; Martínez, 2004; Peres, 2015). Esses compostos apresentam comprovadamente atividade inseticida (Viegas Jr, 2003; Moreira et al., 2013; Peres, 2015), demonstrando, portanto, sua potencial atuação como agente de controle da mosca branca.

Peres (2015) avaliou a atividade de óleos essenciais *in natura* e nanoencapsulados das folhas e frutos de *X. aromatica* frente à mosca branca em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Neste trabalho, as análises químicas dos óleos essenciais revelaram os compostos majoritários sendo: γ -elemeno (38,7 %), sabineno (21,46 %), α -pineno (7,12 %), β -pineno (6,70 %) e limoneno (2,88 %) para os óleos essenciais de folhas e o sabineno (69,7 %) para os de frutos. As nanopartículas carreadoras desses óleos foram obtidas utilizando PCL como polímero. Os testes biológicos mostraram que os óleos essenciais *in natura* e nanoencapsulados nas concentrações 0,1, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 % induzem a diminuição da oviposição da *B. tabaci* na medida em que a concentração aumenta. Dessa forma, foi observada eficiência de controle da mosca branca em 98 e 91 % a partir da aplicação do óleo essencial *in natura* e nanoencapsulado, respectivamente, extraído de folhas de *X. aromatica* na concentração 2 %. Nessa mesma concentração, o óleo essencial extraído dos frutos apresentou eficiência de 96 e 88 % nas formas *in natura* e nanoencapsulados, respectivamente. Tais resultados sugerem que os óleos essenciais, tanto *in natura* quanto nanoencapsulados, das folhas e frutos da *X. aromatica* representam uma alternativa promissora no controle da *B. tabaci* nas diferentes culturas alvos de ataques dessa praga.

2.4 Nanotecnologia na agricultura: nanopartículas poliméricas carreadoras de compostos bioativos

A comprovação do efeito de compostos naturais com atividade pesticida é uma realidade utilizada há séculos. No entanto, as substâncias terpênicas presentes em sua composição química tendem a ser voláteis, termo e fotolábeis; e podem, ainda, ser facilmente oxidadas ou hidrolisadas dependendo da sua estrutura. Embora o efeito de contato dos óleos essenciais seja promissor, a rápida fumigação e a biodegradação das substâncias ativas ocorrem após a aplicação sobre as plantas, limitando significativamente a aplicação de óleos essenciais contra pragas em condição de campo (Bezzerra, 2009; Vieira et al., 2012; Pavela; Benelli, 2016). Diante disso, o desenvolvimento de novas formulações capazes de otimizar a utilização de compostos bioativos, proporcionando maior estabilidade e eficiência ao emprego dos mesmos tem sido amplamente buscado (Clemente et al., 2014; Grillo et al., 2012; Kumari;Yadav; Yadav, 2010; Pereira et al., 2014).

Neste sentido, a nanotecnologia pode dar uma contribuição significativa a partir de sistemas carreadores que promovem a encapsulação dos compostos ativos. A encapsulação tem sido utilizada como ferramenta versátil para diferentes pesticidas inclusive os hidrofóbicos, aumentando sua dispersão em meios aquosos e permitindo sua liberação gradual (Singh Sekhon, 2014; Scott; Chen, 2012; Perlatti et al., 2014).

O termo “nano” é de origem grega que significa anão. Esse termo deu origem à unidade de medida nanômetro, que deu nome a essa tecnologia e equivalente a bilionésima parte de 1 metro ($1 \text{ nm} = 1/1.000.000.000 \text{ m}$). Os produtos nanométricos são chamados na literatura científica mundial de nanoparticulados ou nanoestruturados e, segundo o *Food and Drug Administration* - FDA, nanopartículas são as “partículas com dimensões menores que $1 \mu\text{m}$ que exibem propriedades não reconhecidas em partículas maiores” (Scott; Chen, 2012). Dessa forma, essas pequenas estruturas se comportam com propriedades diferentes das que apresentariam em escala macroscópica, permitindo, assim, o surgimento de uma área da ciência com grande potencial de aplicações em diversos ramos (Roco, 2003; Durán et al., 2006).

Na agricultura, a nanotecnologia apresenta grande potencial, pois, dentre outras funções, permite reduzir a quantidade de produtos químicos a partir do desenvolvimento de sistemas de liberação controlada para pesticidas, minimizar as perdas de nutrientes

na fertilização e aumentar os rendimentos através da gestão otimizada de água e nutrientes. Além disso, permite a construção de novas ferramentas moleculares para detecção e controle de pragas. Dispositivos derivados de nanotecnologia também estão sendo explorados no melhoramento de plantas e na transformação genética vegetal (Mukhopadhyay, 2014).

As nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas) são altamente preferidas no sistema de administração de agroquímicos (Kumari et al., 2010). Estes sistemas nanoparticulados são de fácil reprodutibilidade e podem ser preparados utilizando polímeros biodegradáveis (Grillo et al., 2012; Rao; Geckeler, 2011). Estes sistemas oferecem proteção aos compostos bioativos e prolonga sua atividade pela capacidade de transportá-lo para o organismo alvo e, em seguida, proporcionar uma liberação gradual do princípio ativo sob velocidade e condições específicas, reduzindo, portanto, a necessidade de altas doses iniciais ou reaplicação do produto ao longo do cultivo (Mukhopadhyay, 2014). Além disso, podem ajudar a minimizar os efeitos tóxicos indesejáveis sobre organismos não alvo, bem como melhorar a estabilidade físico-química e evitar a degradação do agente ativo (Durán; Marcato, 2013; Gogos et al, 2012; Perlatti et al., 2014). Outra vantagem, é que sistemas poliméricos podem atuar como protetor solar físico do princípio ativo encapsulado devido à sua capacidade de dispersão de luz (Pohlmann et al., 2013).

Vários tipos de polímeros são utilizados no preparo de nanopartículas e, os poliésteres alifáticos são utilizados pela sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e facilidade em incorporar ampla variedade de compostos bioativos (Pereira et al., 2014; Pohlmann et al., 2013; Rao; Geckeler, 2011; Sinha et al., 2004). Dentre os poliésteres alifáticos, o poli-ε-caprolactona (PCL) é considerado bom material de síntese para a preparação de nanopartículas com solubilidade e degradação adequadas para a distribuição de pesticidas, permanecendo inofensivo para o ambiente (Nuruzzaman et al., 2016). A estrutura monomérica do polímero PCL está representada na Figura 5.

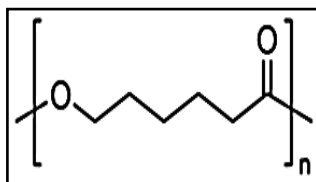


Figura 5: Estrutura do polímero poli-ε-caprolactona (PCL).

2.4 Efeitos da aplicação de óleos essenciais e nanopartículas em plantas

Apesar de apresentar caráter promissor no setor agrícola, a utilização de compostos naturais como óleos essenciais deve ser cautelosa, uma vez que sua alta eficácia contra insetos implica também em possíveis danos ao vegetal no qual é aplicado, isto é, o composto bioativo pode ser tóxico à praga e, ao mesmo tempo, fitotóxico (Isman, 2000). Embora alguns terpenos possuam papéis principais no metabolismo da planta de origem, a maioria deles têm papéis ecológicos, prejudiciais ou benéficos, para o metabolismo de outros organismos (Amri et al., 2012).

Mono e sesquiterpenos, em óleos essenciais, são conhecidos por afetar os processos fisiológicos em plantas daninhas, como a fotossíntese, a síntese da clorofila e rompimento celular, e pode implicar na acumulação de glóbulos lipídicos no citoplasma ou redução de organelas (De Feo et al., 2002). Nesse contexto, estudos têm mostrado sua potencial funcionalidade desses compostos como herbicidas (Batish et al., 2004; Grichi; Nasr; Khouja, 2016; Kaur et al., 2010). Abrahim et al. (2000) mostraram que α -pineno inibe a germinação das sementes e o crescimento das raízes primárias no milho. Os mesmos autores demonstraram que α -pineno, limoneno, 1,8-cineol e cânfora afetaram a atividade respiratória mitocondrial de milho e hipocótilo de soja (Abrahim et al., 2003).

Depois de penetrar na planta, o óleo pode transitar nos espaços intercelulares e possivelmente também no sistema vascular. As membranas celulares são danificadas pela penetração de moléculas de hidrocarboneto, que conduz ao risco de extravasamento do conteúdo celular. Também podem reduzir a taxa de transpiração, provavelmente bloqueando estômatos e espaços intercelulares, isto pode também ser a razão para a redução da fotossíntese que eventualmente ocorre (Baker, 2003).

Apesar dos efeitos descritos acima, é importante ressaltar que isto depende dos componentes químicos do óleo aplicado sobre a planta, das condições ambientais e da espécie vegetal em questão. Além disso, o aparecimento dos efeitos fitotóxicos depende da forma como as substâncias são aplicadas, bem como a dose empregada (Corrêa; Salgado, 2011), além, logicamente, do tempo de exposição.

Christofoli et al. (2015) comprovou a potencial atividade repelente dos óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* em plantas de tomate não sendo relatado em seu estudo qualquer alteração do aspecto morfológico das plantas

submetidas aos alvos da praga e da aplicação dos óleos essenciais *in natura* e nanoencapsulados. Semelhante resultado no que concerne a ação repelente foi observada com óleos essenciais de *X. aromatica* em feijoeiro (Peres, 2015). No entanto, o óleo essencial extraído das folhas, aplicados *in natura* em concentrações de próximas a 2 %, provocou a secagem precoce das folhas, ou seja, nessas condições, o composto volátil apresentou fitotoxicidade à planta. Porém, na mesma concentração, esse óleo aplicado na forma de nanopartículas poliméricas não apresentou o mesmo comportamento, isto é, os feijoeiros submetidos à aplicação do óleo essencial nanoencapsulado mantiveram, em aspecto visual, sua integridade.

Estudos recentes têm demonstrado avanços na compreensão da interação entre nanopartículas e sistemas biológicos (Arruda et al, 2015; Dietz; Herth, 2011; Khan et al, 2016). Os mecanismos dessa interação a nível molecular, apesar de emergentes nas pesquisas, são ainda largamente desconhecidos (Barrena et al., 2009). Ademais, não existe nenhum mecanismo definitivo sobre a toxicidade de nanopartículas, bem como uma compreensão completa do papel dos nanomateriais sobre a fisiologia das plantas a nível metabólico (Rico et al., 2011).

Sabe-se que o tamanho reduzido de nanopartículas oferece maior superfície de contato por unidade de massa, e permitem que elas entrem nas células através de raízes e estômatos podendo interferir na transpiração, respiração e fotossíntese (Rana; Kalaichelvan, 2013). Vários fatores podem influenciar a toxicidade de nanopartículas, porém, neste momento, nenhuma tendência geral é amplamente aceita. Os principais fatores que influenciam a toxicidade em plantas podem ser: a composição, a concentração, o tamanho, a área superficial específica e as propriedades físico-químicas das nanopartículas; bem como a espécie, idade, ciclo de vida e condições de crescimento da planta em que são aplicados os nanomateriais (Rico et al., 2011).

Apesar dos estudos sobre interação planta-nanopartículas serem emergentes nas pesquisas atualmente, pouco se sabe sobre os possíveis efeitos dessas nanopartículas carreadoras de óleos essenciais em plantas. Dessa forma, a associação de nanopartículas, compostos naturais e processos biológicos estão a receber cada vez mais atenção na comunidade científica.

2.5 Referências bibliográficas

Abraham, D., Braguini, W.L., Kelmer-Bracht, A.M., Ishii-Iwamoto, E.L., 2000. Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize. *J. Chem. Ecol.*, 26, 611–624. Doi:10.1023/A:1005467903297

Abraham, D., Francischini, A.C., Pergo, E.M., Kelmer-Bracht, A.M., Ishii-Iwamoto, E.L., 2003. Effects of α -pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. *Plant Physiol. Biochem.*, 41, 985–991. Doi:10.1016/j.plaphy.2003.07.003

Agrodefesa. Programa de tomate. Disponível em: <<http://www.agrodefesa.gov.br/post/ver/212910/programa-de-tomate>> acesso em 21 mar 2017.

Alves Filho, J. P., 2002. Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesse corporativo. São Paulo: Annablume.

Amri, I., Gargouri, S., Hamrouni, L., Hanana, M., Fezzani, T., Jamoussi, B., 2012. Chemical composition, phytotoxic and antifungal activities of *Pinus pinea* essential oil. *J. Pest Sci.*, 85, 199–207. Doi:10.1007/s10340-012-0419-0

Arruda, S.C.; Silva, A.L.; Galazzi, R.M.; Azevedo, R.A.; Arruda, M.A., 2015. Nanoparticles applied to plant science: a review. *Talanta*, 131, 693-705. Doi: doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.050

Baker, J.M., 2003. The effects of oils on plants. *Environmental Pollution*, 1, 27-44. Doi: doi.org/10.1016/0013-9327(70)90004-2

Baldin, E. L. L.; Vendramim, J. D.; Lourenção, A. L., 2005. Resistência de genótipos de tomateiro à mosca-Branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). *Neot. Entomology*, 34, 435-441. Doi: dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2005000300012

Baldin, E.L.L., Crotti, A.E.M., Wakabayashi, K.A.L., Silva, J.P.G.F., Aguiar, G.P., Souza, E.S., Veneziani, R.C.S., Groppo, M., 2013. Plant-derived essential oils affecting settlement and oviposition of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B on tomato. *J. Pest Sci.*, 86, 301–308. Doi:10.1007/s10340-012-0462-x

Baldin, E.L.L.; Souza, D.R.; Souza, E.S.; Beneduzzi, R.A., 2007. Controle de mosca-branca com extratos vegetais, em tomateiro cultivado em casa-de-vegetação. *Horticultura Brasileira.*, 25, 602-606. Doi: dx.doi.org/10.1590/S0102-05362007000400022

Barbosa, J. C.; Barreto, S. D.; Inoue-Nagata, A. K.; Rezende, J. A. M., 2011. Characterization and experimental host range of a Brazilian tomato isolate of Tomato severe rugose virus. *J. Phytopathology*, 159, 644-646. Doi: 10.1111/j.1439-0434.2011.01817.x

Barrena, R.; Casals, E.; Colan, J.; Font, X.; Sanchez, A; Puentes, V., 2009. Evaluation of the ecotoxicology of model nanoparticles. *Chemosphere*. 74, 850-857.

Batish, D.R., Setia, N., Singh, H.P., Kohli, R.K., 2004. Phytotoxicity of lemon-scented eucalypt oil and its potential use as a bioherbicide. *Crop Prot.*, 23, 1209–1214. Doi:10.1016/j.cropro.2004.05.009

Bezerra, C. G. D., 2009. Efeito de extrato bruto e frações meliáceas (Rutales: Meliaceae) na sobrevivência e no comportamento de *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera : Aleroyrodidae) em tomateiro. Tese (doutorado em Ciências) à escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Bizzo, H.R., Hovell, A.M.C., Rezende, C.M., 2009. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Quim. Nova*, 32, 588–594. Doi:10.1590/S0100-40422009000300005

Brasil, 2014. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Brasília.

Chen, F. Tholl, D., Bohlmann, J., Pichersky, E., 2011. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant J.*, 66, 212–229. Doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04520.x

Christofoli, M., Costa, E.C.C., Bicalho, K.U., de Cássia Domingues, V., Peixoto, M.F., Alves, C.C.F., Araújo, W.L., de Melo Casal, C., 2015. Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae) in *Bemisia tabaci* populations. *Ind. Crops Prod.*, 70, 301–308. Doi: 10.1016/j.indcrop.2015.03.025

Clemente, Z., Grillo, R., Jonsson, M., Santos, N.Z.P., Feitosa, L.O., Lima, R., Fraceto, L.F., 2014. Ecotoxicological Evaluation of Poly(epsilon-Caprolactone) Nanocapsules Containing Triazine Herbicides. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 14, 4911–4917. Doi: 10.1166/jnn.2014.8681

Cloyd, R.A., 2004. Natural indeed: are natural insecticides safer and better than conventional insecticides? *Illinois Pesticide Review*, 17, 1-8.

Corrêa, J.C.R., Salgado, H.R.N., 2011. Atividade inseticida das plantas e aplicações: Revisão. *Rev. Bras. Plantas Med.*, 13, 500–506. Doi: 10.1590/S1516-05722011000400016

De Feo, V., De Simone, F., Senatore, F., 2002. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*, 61, 573–578. Doi: 10.1016/S0031-9422(02)00284-4

Dietz K.J.; Herth, S., 2011. Plant nanotoxicology. *Trends Plant Sci.*, 16, 582-589. Doi: 10.1016/j.tplants.2011.08.003

Duran, N.; Marcato, P.D., 2013. Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: a review. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 48, 1127-1134. Doi: 10.1111/ijfs.12027

Durán, N.; Mattoso, L. H. C.; Morais, P. C., 2006. Nanotecnologia. São Paulo: Artliber.

Fernandes, F. R.; Albuquerque, L. C.; Giordano, L. B.; Boiteux, L. S.; Ávila, A. C.; Inoue-Nagata, A. K., 2008. Diversity and prevalence of Brazilian begomoviruses associated to tomatoes. *Virus Genes*, 36, 251-258. Doi: 10.1007/s11262-007-0184-y

Filgueira, F. A. R., 2003. Solanáceas II. Tomate: a hortaliça cosmopolitana. In: Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa-MG: UFV.

Gogos, A., Knauer, K.; Bucheli, T.D., 2012. Nanomaterials in plant protection and fertilization: current state, foreseen applications, and research priorities. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 9781-9792. Doi: 10.1021/jf302154y

Grichi, A., Nasr, Z., Khouja, M.L., 2016. Phytotoxic Effects of Essential Oil from *Eucalyptus lehmanii* against Weeds and its Possible Use as a Bioherbicide, *BEPLS.*, 5, 17-23.

Grillo, R., dos Santos, N.Z.P., Maruyama, C.R., Rosa, A.H., de Lima, R., Fraceto, L.F., 2012. Poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. *J. Hazard. Mater.*, 231-232, Doi:10.1016/j.jhazmat.2012.06.019.

Haji, N. P.; Bleicher, E., 2004. Avanços no manejo da mosca-branca *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). *Embrapa Semi-Árido*, 87-104.

Hakimi, S.; Ateyyat, M.; Bounechada, M., 2015. Insecticidal activity of five essential oil of Agerian medicinal plants on peach potato aphid, *myzus persicae* (Homoptera:Aphididae). *Environ. Biol.*, 9, 89-94.

Ibrahim, M.A.; Kainulainen, P.; Aflatuni, A.; Tiilikkala, K.; Holopainen, J.K., 2001. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. *Agric. Food Sci. Finland.*, 10, 243-259.

Inoue-Nagata, A. K.; Lima, M. F.; Gilbertson, R. L., 2016. A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. *Horticultura Brasileira*, 34, 8-18.

Investnews. AGROPECUÁRIA: Aumento de uso de agrotóxicos preocupa deputados. Disponível em: <<http://search.proquest.com/docview/1728306168?accountid=26554>> Acesso em 16 Maio, 2016.

Isman, M.B., 2006. Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51, 45-46.

Isman, M.B., 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 19, 603–608. Doi: 10.1016/S0261-2194(00)00079-X

Isman, M.B.; Miresmailli, S.; Machial, C., 2011. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. *Phytochemistry Reviews*, 10, 197-204. Doi: doi.org/10.1007/s11101-010-9170-4

Kaur, S., Singh, H.P., Mittal, S., Batish, D.R., Kohli, R.K., 2010. Phytotoxic effects of volatile oil from *Artemisia scoparia* against weeds and its possible use as a bioherbicide. *Ind. Crops Prod.* 32, 54–61. Doi:10.1016/j.indcrop.2010.03.007

Khan, M.N.; Mobin, M.; Abbas, Z.K.; Almutairi, K.A.; Siddiqui, Z.H. 2016. Role of nanomaterials in plants under challenging environments. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.038>> Acesso em: 15 Jun. 2017.

Kim, S.; Chae, S.H.; Youn, H.S.; Yeon, S.H.; Ahn, Y.J., 2011. Contact and fumigant toxicity of plant essential oils and efficacy of spray formulations containing the oils against B- and Q-biotypes of *Bemisia tabaci*. *Pest Management Science*, 67, 1093–1099.

Kookana, R.S., Boxall, A.B.A., Reeves, P.T., Ashauer, R., Beulke, S., Chaudhry, Q., Cornelis, G., Fernandes, T.F., Gan, J., Kah, M., Lynch, I., Ranville, J., Sinclair, C., Spurgeon, D., Tiede, K., Van Den Brink, P.J., 2014. Nanopesticides: Guiding principles for regulatory evaluation of environmental risks. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 4227–4240. Doi:10.1021/jf500232f

Kordali, S., Usanmaz, A., Cakir, A., Komaki, A., Ercisli, S., 2016. Antifungal and Herbicidal Effects of Fruit Essential Oils of Four *Myrtus communis* Genotypes. *Chem. Biodivers.* 13, 77–84. Doi:10.1002/cbdv.201500018

Koul, O.; Walia, S.; Dhaliwal, G.S., 2008. Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. *Biopestic. Int.*, 4, 63-84.

Krinski, D.; Massaroli, A.; Machado, M., 2014. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. *Rev. Brasi. Fruti.*, Jaboticabal., 36, 141-146.

Kumari, A., Yadav, S.K., Yadav, S.C., 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 75, 1–18. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.09.001

Kyarimpa, C.M., Böhmendorfer, S., Wasswa, J., Kiremire, B.T., Ndiege, I.O., Kabasa, J.D., 2014. Essential oil and composition of *Tagetes minuta* from Uganda. Larvicidal activity on *Anopheles gambiae*. *Ind Crop. Prod.*, 62, 400–404. Doi: doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.006

Lago, J.H.G., De Ávila, P., Moreno, P.R.H., Limberger, R.P., Apel, M.A., Henriques, A.T., 2003. Analysis, comparison and variation on the chemical composition from the leaf volatile oil of *Xylopiya aromatica* (Annonaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 669–672. Doi:10.1016/S0305-1978(02)00267-3

- Lija-Escaline, J.; Senthil-Nathan, S. Thanigaivel, A.; Pradeepa, V.; Vasantha-Srinivasan, P.; Ponsankar, A.; Edwin, E.S.; Selin-Rani, S.; Abdel-Megeed, A., 2015. Physiological and biochemical effects of botanical extract from *Piper nigrum* Linn (Piperaceae) against the dengue vector *Aedes aegypti* Liston (Diptera: Culicidae)., 114, 4239-4249. Doi: 10.1007/s00436-015-4662-1
- Maas, P.; Lobão, A.; Rainer, H. *Annonaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110555>>. Acesso em: 22 Mai. 2016.
- Maia, J.G.S.; Andrade, E.H.A.; Silva, A.C.; Oliveira, J.; Carreira, L.M.M. Araújo, J.S., 205. Leaf volatile oils from four Brazilian *Xylopi*a species. *Flav. Frag. J.*, 20, 474-747. Doi:10.1002/ffj.1499
- Mohanraj, V.J., Chen, Y., 2006. Nanoparticles - A Review. *Trop. J. Pharm. Res.* 5, 561-573. Doi:10.4314/tjpr.v5i1.14634
- Moreira, I. C.; Roque, N. F.; Vilegas, W.; Zalewski, C.; Lago, J. H. G.; Funasaki, M., 2013. Genus *Xylopi*a (Annonaceae): Chemical and Biological Aspects. *Chem Biodivers.*, 10, 1921-1943. Doi: 10.1002/cbdv.201100308
- Mukhopadhyay, S.S., 2014. Nanotechnology in agriculture: prospects and constraints. *Dovepress journal: Nanotechnology, Science and Applications*, 7, 63-71. Doi: [dx.doi.org/10.2147/NSA.S39409](https://doi.org/10.2147/NSA.S39409)
- Nerio, L. S.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E., 2010. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, 101, 372-378. Doi: doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.048
- Nguemtchouin, M.M.G., Ngassoum, M.B., Ngamo, L.S.T., Gaudu, X., Cretin, M., 2010. Insecticidal formulation based on *Xylopi*a *aethiopi*ca essential oil and kaolinite clay for maize protection. *Crop Prot.* 29, 985-991. Doi:10.1016/j.cropro.2010.06.007
- Nicolau, E.S.; Alves, P.B.; Nogueira, P.C.L.; Moraes, V.R.S.; Matos, A.P.; Bernardo, A.R.; Volante, A.C.; Fernandes, J.B.; Da Silva, M.G.F.G.; Corrêa, A.G.; Blank, A.F.; Silva, A.C.; Ribeiro, L.P., 2013. Atividade inseticida de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* l'Herit E *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Quim. Nova*, 36, 1391-1394. Doi: [dx.doi.org/10.1590/S0100-40422013000900020](https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000900020)
- Nuruzzaman, M., Rahman, M.M., Liu, Y., Naidu, R., 2016. Nanoencapsulation, Nano-guard for Pesticides: A New Window for Safe Application. *J. Agric. Food Chem.* 64, 1447-1483. Doi:10.1021/acs.jafc.5b05214
- Obiri, D.D.; Osafo, N.; Ayande, P.G.; Antwi, A.O., 2014. *Xylopi*a *aethiopi*ca (Annonaceae) fruit extract suppresses Freund's adjuvant-induced arthritis in Sprague-Dawley rats. *J.Ethnopharmacol.*, 152, 522-531. Doi: 10.1016/j.jep.2014.01.035

Octaviano, C. , 2010. Muito além da tecnologia: os impactos da Revolução Verde. ComCiência, 120. Disponível em <http://comciencia.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-76542010000600006&lng=pt&nrm=iso> acesso em 16 ago. 2017.

Oliveira, H.C., Stolf-moreira, R., Bueno, C., Martinez, R., 2015. Nanoencapsulation Enhances the Post- Emergence Herbicidal Activity of Atrazine against Mustard Plants . Plos One, 10, 1–12. Doi: 10.1371/journal.pone.0132971

Oliveira, H.C., Stolf-Moreira, R., Martinez, C.B.R., Sousa, G.F.M., Grillo, R., de Jesus, M.B., Fraceto, L.F., 2015. Evaluation of the side effects of poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules containing atrazine toward maize plants. Front. Chem. 3, 61. Doi: 10.3389/fchem.2015.00061

Oliveira, J. L.; Campos, E.V.R.; Bakshi, M.; Abhilash, P.C.; Fraceto, L.F., 2014. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. Biotec. Advances, 32, 1550–1561. Doi: doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.010

Oliveira, M. R. V.; Henneberry, T. J.; Anderson, P., 2001. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. Crop Protection, 20, 709-723. Doi: doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00108-9

Pavela, R., Benelli, G., 2016. Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. Trends Plant Sci. 21, 1000–1007. Doi:10.1016/j.tplants.2016.10.005

Pereira, A.E.S., Grillo, R., Mello, N.F.S., Rosa, A.H., Fraceto, L.F., 2014. Application of poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. J. Hazard. Mater. 268, 207–215. Doi:10.1016/j.jhazmat.2014.01.025

Peres, M. C., 2015. Nanoencapsulamento do óleo essencial das folhas e frutos de *Xylopiya aromatica* Lamm. e sua atividade frente a oviposição de *Bemisia tabaci* (genn.) (hemiptera: aleroydidae) biótipo B. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Instituto Federal Goiano, Câmpus Rio Verde, Rio Verde.

Perlatti, B.; Bergo Souza, De P.L.; Fernandes Da, Silva M.F.; Das, G., Batista, J.; Rossi, M., 2014. Polymeric nanoparticle-based insecticides: a controlled release purpose for agrochemicals, Insecticides - Development of Safer and More Effective Technologies, Prof. Stanislav Trdan (Ed.), InTech, Doi: 10.5772/53355

Pohlmann, A.R., Fonseca, F.N., Paese, K., Detoni, C.B., Coradini, K., Beck, R.C., Guterres, S.S., 2013. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. Expert Opin. Drug Deliv. 10, 623–38. Doi:10.1517/17425247.2013.769956

Pratt, L.H., Kelmenson, P.M., Lazarova, G.L., Kubota, T., 1997. The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Plant, Cell Env., 20, 672–677. Doi: 10.1046/j.1365-3040.1997.d01-119.x

- Rambow, C.; Panichi, V. B. S.; Figueiredo, J. A. S., 2014. Risco: a percepção da comunidade ribeirinha do Rio dos Sinos em relação ao uso de defensivos agrícolas. *REGET*, 18. Doi: [dx.doi.org/10.5902/2236117013568](https://doi.org/10.5902/2236117013568)
- Rana, S., Kalaichelvan, P.T., 2013. Ecotoxicity of Nanoparticles. *ISRN Toxicol.* 2013, 1–11. Doi: [10.1155/2013/574648](https://doi.org/10.1155/2013/574648)
- Rana, V.S., Popli, S., Saurav, G.K., Raina, H.S., Chaubey, R., Ramamurthy, V. V., Rajagopal, R., 2016. A *Bemisia tabaci* midgut protein interacts with begomoviruses and plays a role in virus transmission. *Cell. Microbiol.* 18, 663–678. Doi: [10.1111/cmi.12538](https://doi.org/10.1111/cmi.12538)
- Rao, J.P., Geckeler, K.E., 2011. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog. Polym. Sci.* 36, 887–913. Doi: [10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001](https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001)
- Rico, C. M.; Majumdar, S.; Duarte-Gardea, M.; Peralta-Videa, J.L.; Gardea-Torresdey, J.L., 2011. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 3485–3498. Doi: [10.1021/jf104517j](https://doi.org/10.1021/jf104517j)
- Roco, M. C., 2003. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Curr Opin Biotechnol.*, 14, 337-346. Doi: [doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00068-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00068-5)
- Roh, H.S.; Kim, J.; Shin, E.S.; Lee, D.W.; Choo, H.Y.; Park, C.G., 2015. Bioactivity of sandalwood oil (*Santalum austrocaledonicum*) and its main components against the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *J. Pest Science*, 88, 621–627. Doi: doi.org/10.1007/s10340-014-0631-1
- Roman, P., 2015. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Ind Crop Prod* ,76, 174–187.
- Scarpellini, J.R, Ramiro, Z.A., Lara, R.I.R., Santos, J.C.C., 2002. Controle químico da mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) Biótipo b (Hemiptera: Aleyrodidae) na cultura do feijoeiro. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 69, 23-27.
- Schaffazick, S.R., Guterres, S.S., De Lucca Freitas, L., Pohlmann, A.R., 2003. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova* 26, 726–737. Doi: [10.1590/S0100-40422003000500017](https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000500017)
- Scott, N.; Chen, H., 2012. Nanoscale Science and engineering for agriculture and food systems. *Industrial Biotechnology*, 8, 340-343. Doi: doi.org/10.1089/ind.2012.1549
- Sherry, M.; Charcosset, C.; Fessi, H.; Greige-Gerges, H., 2013. Essential oils encapsulated in liposomes: a review. *J. Liposome Res.*, 23, 268-275. Doi: [10.3109/08982104.2013.819888](https://doi.org/10.3109/08982104.2013.819888)
- Silva, I. A.; Valenti, M, W.; Silva-Matos, D. M., 2009b. Fire effects on the population structure of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam (Rutaceae) in a Brazilian savanna. *Braz J. Biol.*, 69, 813-818. Doi: [dx.doi.org/10.1590/S1519-69842009000400008](https://doi.org/10.1590/S1519-69842009000400008)

Silva, L.D., Omoto, C., Bleicher, E., Dourado, P.M., 2009a. Monitoramento da Suscetibilidade a Inseticidas em Populações de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera : Aleyrodidae) no Brasil. *Neotropical Entomology*, 38, 116–125.

Simões, C. M. O.; Spitzer, V., 2000. Óleos voláteis. *In*: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A. & Petrovick, P. R. (ed.) *Farmacognosia*. Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, 2ª edição.

Singh Sekhon, B., 2014. Nanotechnology in agri-food production: An overview. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 7, 31–53. Doi: 10.2147/NSA.S39406

Sinha, V.R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., Trehan, A., 2004. Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: An overview. *Int. J. Pharm.* 278, 1–23. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2004.01.044

Souza, A.P. De, Vendramim, J.D., 2005. Efeito translaminar, sistêmico e de contato de extrato aquoso de sementes de nim sobre *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B em tomateiro. *Neotrop. Entomol.* 34, 83–87. Doi: 10.1590/S1519-566X2005000100012

Souza, L. M. B., 2012. Avaliação da ação inseticida de extratos vegetais e óleo essencial e substâncias sobre imaturos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em condições de laboratório. Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Stashenko, E.E., Jaramillo, B.E., Martínez, J.R., 2004. Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopia aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 1025, 105–113. Doi: 10.1016/j.chroma.2003.10.059

Van Beek, T.A., Breteler, H., 1993. *Phytochemistry and Agriculture*. Clarendon Press, Oxford. Oxford: Clarendon Press; Nova York : Oxford University Press.

Viegas, C., 2003. Terpenos com atividade inseticida: Uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quim. Nova* 26, 390–400. Doi: 10.1590/S0100-40422003000300017

Volpe, H.X., Fazolin, M., Garcia, R.B., Magnani, R.F., Barbosa, J.C., Miranda, M.P., 2016. Efficacy of essential oil of *Piper aduncum* against nymphs and adults of *Diaphorina citri*. *Pest Manag. Sci.* 72, 1242–1249. Doi: 10.1002/ps.4143

Yang, N.W.; Li, A.L.; Wan, F.H.; Liu, W.X.; Johnson, D., 2010. Effects of plant essential oils on immature and adult sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* biotype B. *Crop Protection*, 29, 1200-1207. Doi: doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.006

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar os impactos fisiológicos e metabólicos da aplicação dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Xylopiya aromatica* nas formas *in natura* e nanoencapsulados em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.).

3.2 Objetivos específicos

- Obtenção dos óleos essenciais das folhas e frutos de *Xylopiya aromatica*;
- Avaliar o rendimento de extração dos óleos essenciais;
- Analisar a composição química dos óleos essenciais por CG-EM e CG-DIC;
- Produção de nanopartículas poliméricas contendo óleos essenciais de folhas e de frutos de *X. aromatica*;
- Caracterização das nanopartículas;
- Investigar as características fisiológicas e metabólicas em tomateiros, submetidos à aplicação dos óleos essenciais no que se refere a parâmetros biométricos, fotossintéticos e bioquímicos no estágio vegetativo.

4. TRABALHO CIENTÍFICO

(Normas de acordo com a revista *Scientia Horticulturae*)

4.1 INTRODUÇÃO

Apesar do necessário uso de pesticidas sintéticos no setor agrícola, quando aplicados de maneira indiscriminada, maior risco de desenvolvimento de resistência das pragas é aparente. Além disso, afeta a população de insetos benéficos (inimigos naturais e polinizadores), coloca a saúde dos produtores e consumidores em risco e contribui com o aumento da poluição ambiental (Batish et al., 2008; Sparks, 2013; Odukkathil; Vasudevan, 2013; Christofoli et al., 2015). Neste contexto, alternativas ecologicamente corretas, visando o controle químico de pragas, têm despertado o interesse de pesquisas incluindo pesticidas de origem botânica.

Os óleos essenciais têm se mostrado como fontes promissoras para o desenvolvimento de métodos alternativos, mais seletivos e específicos de controle, e que atendam às exigências de eficiência agrônômica, segurança toxicológica e baixo impacto ambiental (Bizzo et al., 2009; Christofoli et al., 2015; Kordali et al., 2016; Lija-Escaline et al., 2015; Viegas, 2003). Com teor relativamente elevado de óleos essenciais, a *Xylopiya aromatica*, também conhecida popularmente como pimenta-de-macaco, é uma espécie nativa do bioma Cerrado e de ampla distribuição no Brasil (Maas et al., 2016). O gênero *Xylopiya* representa uma fonte promissora de substâncias bioativas (Nguemtchouin et al., 2010; Obiri et al., 2014). Os compostos majoritários identificados no óleo essencial de folhas e frutos de *X. aromatica* foram: limoneno, α e β -pineno e β -mirceno (Lago et al., 2003; Stashenko; Jaramillo; Martínez, 2004; Peres,

2015), compostos esses que comprovadamente apresentam atividade contra insetos (Viegas, 2003; Moreira et al., 2013, Peres, 2015).

Cumprir mencionar que testes biológicos realizados por Peres (2015) mostraram que os óleos essenciais *in natura* e nanoencapsulados em matriz polimérica de *X. aromatica* induziram a diminuição significativa de oviposição de *Bemisia tabaci*, popularmente conhecida como mosca branca. Observou-se também eficiência de controle da mosca branca a partir da aplicação do óleo essencial *in natura* (98 %) e nanoencapsulado (91 %), extraído das folhas de *X. aromatica* na concentração 2 %. Nessa mesma concentração, o óleo essencial extraído dos frutos apresentou eficiência de 96 e 88 % nas formas *in natura* e nanoencapsulados, respectivamente.

O potencial uso de óleos essenciais como defensivos agrícolas se apresentam como principais vantagens: alta eficácia contra ampla gama de pragas de importância agrícola, múltiplos mecanismos de ação pelo grande número de ingredientes ativos de estrutura química complexa, tornando menos provável o desenvolvimento de resistência, processo de produção relativamente simples e barato e baixo risco à saúde humana durante a aplicação pela baixa toxicidade dos resíduos (Pavela; Benelli, 2016).

Diversos fatores podem limitar os estudos da atividade biológica e aplicação, dos óleos essenciais em campo. Isso ocorre por causa da composição dos mesmos que são quimicamente instáveis em condições ambientais e podem facilmente sofrer degradação sob a ação de oxigênio e temperaturas, além de serem pouco solúveis em água (Sherry et al, 2013; Simões et al., 2000). Diante desses impasses, a nanotecnologia aliada ao uso desses produtos naturais oferece proteção do princípio ativo e promove sua liberação gradual, aumentando, conseqüentemente, a eficácia desses produtos como defensivos agrícolas.

Os óleos essenciais são compostos pela combinação de diversas substâncias aleloquímicas, as quais podem também atuar sobre outros organismos vegetais (Haig, 2008). Por se tratar de substâncias que possuem atividade biológica e comportamentos desconhecidos, testes de fitotoxicidade também são requeridos para assegurar a qualidade das plantas de cultivo (Saito, 2004). Vale ressaltar que os possíveis efeitos sobre plantas dependem dos componentes químicos do óleo essencial aplicado, das condições ambientais e da espécie de planta alvo. Além disso, dependem da forma de aplicação desses compostos, bem como a dose empregada (Corrêa; Salgado, 2011), consolidando a perspectiva da aplicação dos óleos essencial como bioinseticidas.

O tamanho reduzido oferece maior superfície de contato por unidade de massa, o que permitem que elas entrem nas células através de raízes e estômatos podendo interferir na transpiração, respiração e fotossíntese (Rana; Kalaichelvan, 2013). Embora resultados conflitantes tenham sido relatados, vários fatores podem influenciar a toxicidade de nanopartículas em plantas como a composição, a concentração, o tamanho, a área superficial específica e as propriedades físico-químicas, bem como a espécie, idade, ciclo de vida e condições de cultivo da planta (Rico et al., 2011). Essas variáveis auxiliam na investigação do comportamento de nanopartículas carreadores de compostos bioativos sobre plantas de interesse agrícola.

O cultivo do tomateiro demanda grandes quantidades de insumos agrícolas por ser altamente suscetível a doenças e ao ataque de pragas, como a mosca branca (*B. tabaci*). Além de ser uma cultura de grande importância econômica e nutricional, o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é também uma espécie modelo entre dicoledôneas para estudos de processos biológicos variados (Pratt et al., 1997). Devido à escassez de informações sobre possíveis efeitos causados pela aplicação de bioinseticidas em tomateiros, o presente trabalho buscou investigar suas respostas fisiológicas e metabólicas quando submetidos à aplicação de óleos essenciais de folhas e frutos de *X. aromatica* aplicados na forma *in natura* e nanoencapsulados em matriz polimérica. Pretendeu-se, pois, avançar e contribuir com a perspectiva da potencial utilização destes produtos naturais no controle de *B. tabaci* em culturas agrícolas e particularmente no tomateiro.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Coleta do material vegetal

Folhas e frutos de *X. aromatica* (Annonaceae) foram coletados na região do cerrado localizado nas dependências da Universidade de Rio Verde no município de Rio Verde-GO (latitude 17°47'53"S, longitude 51°55'53"W). A identificação foi realizada pela Dr.^a Luzia Francisca de Souza no Herbário Jataiense Germano Guarim Neto, onde a exsicata está preservada sob o número 7437.

4.2.2 Obtenção do óleo essencial

Óleos essenciais de folhas e frutos de *X. aromatica* foram obtidos por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger. O material vegetal fresco foi triturado na proporção de 200 gramas de massa vegetal em 500 mL de água destilada. Após 4 horas de extração, o hidrolato foi retirado e a fase orgânica extraída com diclorometano, que posteriormente foi seca com sulfato de sódio anidro. Os óleos essenciais foram reservados após completa evaporação do solvente à temperatura ambiente e conservado a -5 °C até a análise. O rendimento percentual do óleo foi calculado relacionando a massa de óleo obtida e a massa de material vegetal fresco utilizado na extração.

4.2.3 Quantificação do óleo essencial

A quantificação dos óleos essenciais de folhas e frutos de *X. aromatica* foi realizada por espectroscopia UV/Vis (Christofoli et al., 2015; Maji et al., 2007; Peres, 2015). Inicialmente, foi realizada a varredura espectral dos óleos essenciais diluídos em hexano, a fim de determinar o comprimento de onda de maior absorbância das respectivas soluções estoque na concentração de 0,4 mg mL⁻¹.

A partir desta solução estoque, por diluição foram preparadas as concentrações 0,015; 0,020; 0,025; 0,030; 0,035 mg mL⁻¹ dos óleos essenciais das folhas e dos frutos de *X. aromatica*. Todos os pontos da curva de calibração foram preparados individualmente para cada óleo essencial e analisados em triplicata.

Uma vez determinada a curva de calibração (linearidade), foi realizada a validação do método de quantificação dos óleos essenciais. Os parâmetros analíticos utilizados para validação, além da linearidade, foram: limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão e precisão.

O Limite de Detecção (LD) representa a menor concentração presente na amostra que pode ser detectada, mas, não necessariamente quantificada, enquanto o Limite de Quantificação (LQ) corresponde à menor concentração que pode ser determinada quantitativamente com aceitável precisão e exatidão. LD e LQ são calculados segundo as Equações 01 e 02 representadas a seguir:

(01)

$$LD = 3,3 \times \frac{S}{S}$$

(02)

$$LQ = 10 \times \frac{S}{S}$$

Em que s é o desvio padrão da resposta e S é o coeficiente angular da curva de calibração

Para a determinação da exatidão e precisão do método foram preparadas soluções em três diferentes concentrações abrangendo toda a faixa linear de trabalho. A primeira com concentração 120 % do menor ponto da curva, a segunda com concentração entre 40 e 60 % do maior ponto da curva e o terceiro ponto com concentração entre 90 e 100 % do último ponto (ou o maior ponto) da curva. Seguindo este parâmetro, foram definidas as concentrações de 0,018 mg mL⁻¹, 0,021 mg mL⁻¹ e 0,033 mg mL⁻¹ de ambos os óleos essenciais. Dessa forma os valores selecionados contemplam a faixa linear de trabalho, sem coincidirem com os pontos da curva. Para a determinação da precisão e exatidão da curva, as análises destas três soluções foram realizadas em dias alternados (interdia) e em três horários diferentes (intradia). Todo o processo foi realizado em triplicata.

A exatidão demonstra o grau de concordância entre os valores experimentais e um valor de referência aceito como verdadeiro e é expressa pela Equação 03 representada a seguir:

(03)

$$E = \frac{A}{B} \times 100, \text{ sendo } n = 3$$

Em que, A representa a média da concentração e B a concentração nominal (concentração admitida como verdadeira).

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em série de medidas de amostragem múltipla de uma mesma amostra, ou seja, investiga se a análise apresenta repetição de valores quando operada sequencialmente. A precisão é dada pela porcentagem do Desvio Padrão Relativo (DPR) representado pela Equação 04:

(04)

$$DPR\% = \frac{DP}{C} \times 100, \text{ sendo } n = 3$$

Em que, DP é o desvio padrão e C é representado pela média das absorvâncias.

4.2.4 Análise química dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram diluídos em diclorometano ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) e as soluções obtidas foram submetidas à análise por cromatografia gasosa acoplada a detector de espectrometria de massas (CG-EM), para a análise qualitativa e, à análise por cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama (CG-DIC), para a análise quantitativa de seus constituintes.

CG-EM foi realizada em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-MS-QP2010 ULTRA, equipado com uma coluna RTx-5MS- $0,25 \mu\text{m}$ ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$) sendo utilizado Hélio como gás de arraste e detector por ionização por impacto eletrônico (IE) (70 e.V). A temperatura inicial mantida a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2,0 min, em seguida programada até $240 \text{ }^\circ\text{C}$ a 3°C min^{-1} e permaneceu nessa temperatura por 10,0 min. Temperatura do injetor: $220 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura do detector: $240 \text{ }^\circ\text{C}$. Faixa de detecção do espectrômetro de massas: 40-500 m/z. CG-DIC foi realizada em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-17A, equipado com coluna Supelco SPB-5- $0,25 \mu\text{m}$ ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$) nas mesmas condições estabelecidas para CG-EM. A identificação dos componentes do óleo foi baseada no índice de retenção (IR) calculado em relação aos tempos de retenção da série homóloga de *n*-alcanos (C-7 a C-30) e no padrão de fragmentação observado nos espectros de massas, por comparação destes com dados da literatura (Adams, 2007) e da espectroteca NIST05, NIST11 e WILEY7.

4.2.5 Preparo das nanopartículas

As suspensões coloidais foram preparadas pelo método de nanoprecipitação (ou deposição interfacial do polímero pré-fornado) proposto por Fessi et al. (1989), utilizando o poli- ϵ -caprolactona (PCL) como biopolímero.

Primeiramente foi preparada uma fase orgânica, contendo 50 mg do polímero PCL (poli- ϵ -caprolactona), 250 mg do princípio ativo (óleo essencial), 100 mg de monoesterato de sorbitano (Span®60) e 10 mL do solvente orgânico (acetona) misturados sob agitação constante a 25 °C. Após dissolução dos constituintes, com o auxílio de uma bomba peristáltica, a fase orgânica foi vertida, sob agitação constante, sobre a fase aquosa contendo 100 mg de Polissorbato 80 (Tween® 80) e 20 mL de água ultrapura. Na sequência, o solvente orgânico e parte da água foram eliminados por pressão reduzida ajustando o volume final da suspensão para coloidal 25,0 e 12,5 mL em função das concentrações de óleo essencia a 1 e 2 %, respectivamente.

4.2.6 Caracterização das nanopartículas

4.2.6.1 Determinação da eficiência de encapsulação (EE%)

Para determinação da eficiência de encapsulação foi utilizada a técnica de filtração-centrifugação. Foi adicionado 1 mL de solução coloidal de nanopartículas a Tubos Spin-X (Corning®, microtubos contendo um compartimento revestido de acetato de celulose com poros de 0,22 μm) que foram levados à centrífuga refrigerada por 1 hora a 15 °C em 8.000 rpm. Decorrido esse período, o ultrafiltrado foi retirado e extraído o óleo essencial por extração líquido-líquido com 6 mL de hexano e analisado por espectrofotometria UV/Vis (Christofoli et al., 2015). A concentração de óleo essencial presente no ultrafiltrado foi calculada de acordo com a equação da reta obtida pela curva de calibração de cada óleo essencial descrita no item 4.2.3.

A eficiência de encapsulação (EE%), em porcentagem, foi determinada pela diferença entre a quantidade total de óleo essencial utilizada no preparo da amostra (concentração nominal) e a quantidade total de óleo essencial presente no ultrafiltrado através da Equação 05:

(05)

$$EE\% = \frac{B - A}{B} \times 100$$

Em que, A é a concentração total de óleo essencial no ultrafiltrado (mg mL^{-1}) e B é a concentração total na suspensão (mg mL^{-1}).

4.2.6.2 Determinação do pH

Os valores de pH das suspensões coloidais foram determinados, logo após o preparo, diretamente nas suspensões através de pHmetro (Medidor de pH mPA 210, MS Tecnopon Instrumentação).

4.2.6.3 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta (pZ) foi medido por aparelho Zeta Sizer Nano Z-S (Malvern) para observação da estabilidade das suspensões. Para tal, as amostras foram diluídas em água ultrapura na proporção de 1/10. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.6.4 Determinação do diâmetro de partículas

O diâmetro das partículas (D_p) em suspensão foi determinado em aparelho Diâmetro BI-FOQELS (Fiber Optic Quase Elastic Light Scattering) da Brookhaven Instruments Corporation. As amostras foram diluídas em água destilada para concentração final de 5 % (v/v) e analisadas em triplicata e o desvio padrão das repetições foi calculado.

4.2.6.5 Avaliação morfológica das nanopartículas

As análises foram realizadas no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Para isso, a suspensão coloidal foi depositada em stubs de 12 mm de diâmetro seguida com o processo de secagem em sílica. Após total evaporação do solvente, as amostras foram metalizadas com 2 nm de liga metálica Au/Pd e submetidas à análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV- Quanta 200 FEI).

4.2.7 Ensaio biológico

4.2.7.1 Instalação do experimento

Os tomateiros (*Solanum lycopersicum* L. cv Santa Clara) foram cultivadas em casa de vegetação, na Universidade Federal de Viçosa (20° 45' S, 42° 15' W), Viçosa, Minas Gerais, em vasos plásticos de 1,0 L. O substrato comercial Tropstrato HT® utilizado recebeu adubação de 15 g de 4-14-8 (NPK), por vaso. A irrigação foi realizada diariamente a fim de se manter a umidade do substrato em níveis adequados.

Os seguintes tratamentos com óleos essenciais (OEs) de *X. aromatica* foram utilizados: *in natura* extraído dos frutos na concentração 1 % (InFr1%) e a 2 % (InFr2%), *in natura* das folhas a 1 % (InFo1%) e a 2 % (InFo2%), nanopartículas contendo o óleo essencial dos frutos a 1 % (NFr1%) e a 2 % (NFr2%) e das folhas na concentração 1 % (NFo1%) e a 2 % (NFo2%). Para melhor dispersão do óleo essencial e nanopartículas em água, foi utilizada solução aquosa de Tween 80® à 0,5 %, sendo este um dos controles juntamente com Água e Nanopartículas vazias (NV). Com o auxílio de um pulverizador do tipo spray manual, os óleos essenciais foram aplicados semanalmente nas folhas das plantas em sua fase de desenvolvimento vegetativo aos 14, 21 e 28 dias após o transplântio das plântulas (DAT).

4.2.7.2 Determinação dos parâmetros biométricos

Altura, área foliar total (AFT), área foliar específica (AFE) bem como a massa seca das folhas (MSF), massa seca de hastes (MSH), massa seca de raízes (MSR) e a alocação de biomassa foram determinados, ao final do experimento, 24 horas após a última aplicação dos tratamentos. A altura das plantas foi tomada do nível do solo até o nó apical superior. Além disso, a área foliar de cada planta foi determinada utilizando o programa computacional ImageJ que permitiu o tratamento das imagens obtidas a partir do escaneamento das folhas. Para tanto, foram utilizadas uma folha nova (folha dreno) e uma folha totalmente expandida (folha fonte) de cada planta, obtendo-se o valor médio de área foliar das plantas como um todo, a partir de sua massa seca total. Para determinação da massa seca dos órgãos, as raízes, hastes e folhas foram levadas a estufa

de circulação forçada e mantidas a 70 °C, por 72 h. Com a massa seca total foram determinadas a alocação de matéria seca para os diversos constituintes da planta além da razão massa raiz/parte aérea (R/PA).

4.2.7.3 Determinação de parâmetros fotossintéticos

4.2.7.3.1 Trocas gasosas e fluorescência

Parâmetros fotossintéticos foram estimados no penúltimo folíolo da terceira folha totalmente expandida contada a partir do ápice de todas as unidades experimentais. Foi utilizado um analisador de gases a infravermelho em sistema aberto (IRGA – Infrared Gas Analyzer), dotado de uma câmara de área amostral de 2 cm², modelo LI 6400XT (LI-COR, Lincoln, NE, EUA), com fluorômetro acoplado (LI-6400-40, LI-COR Inc.).

A taxa fotossintética (A_N), a condutância estomática ao vapor de água (g_s) e a concentração interna de CO₂ (C_i) foram medidas simultaneamente aos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, no período das 8 às 12 h. As medições foram realizadas sob irradiância de 1000 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, condição padrão de CO₂ de 400 ppm e sem controle da temperatura da câmara do IRGA. A quantidade de luz azul aplicada foi de 10% da densidade do fluxo fotossintético para maximizar a abertura estomática. A temperatura da casa de vegetação durante as avaliações foi de $23,0 \pm 2,5$ °C. Além das medições descritas acima, também foram determinadas as taxas respiratórias no escuro (R_d) utilizando o mesmo equipamento, durante o período entre 21 e 01 h, após duas horas do término do período luminoso, sendo utilizado o mesmo folíolo usado para determinar os demais parâmetros de fotossíntese.

A determinação da fluorescência da clorofila *a* foi realizada com fluorômetro acoplado ao IRGA. As folhas foram inicialmente expostas ao fraco pulso de luz vermelho-distante ($1-2 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), para a determinação da fluorescência inicial (F_0). Em seguida, para estimar a fluorescência máxima emitida (F_m), foi aplicado um pulso de luz saturante, com irradiância de 6000 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e duração de 1 s. A fluorescência mínima de folhas adaptadas à luz (F_0') e a fluorescência máxima da clorofila (F_m') foram determinadas utilizando o mesmo equipamento

concomitantemente a coleta dos dados de trocas gasosas. Procedeu-se ainda, à estimativa da eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m), da eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII (F_v'/F_m'), dos coeficientes de extinção fotoquímica (qP) e não fotoquímica (NPQ) e da taxa de transporte de elétrons (ETR), conforme Lima et al. (2002).

4.2.7.4 Análises bioquímicas

Para a determinação dos metabólitos, as amostras foliares anteriormente utilizadas nas análises de fluorescência e trocas gasosas foram coletadas durante o período de luz (entre 11:00 e 12:00 h). Todo o material vegetal foi coletado e rapidamente congelado em Nitrogênio líquido e, em seguida, armazenado a -80 °C para análises posteriores.

4.2.7.4.1 Extração etanólica a quente

Alíquotas de aproximadamente 20 mg de massa fresca (MF) foram maceradas em nitrogênio líquido e posteriormente submetidas à extração etanólica, a quente, pela adição de 250 μ L álcool etílico (EtOH) 98 %. Após homogeneização em vortex, as amostras foram colocadas em termomix por 20 minutos a 80 °C sob agitação a 822 g. Posteriormente, seguiu-se com centrifugação por 5 minutos a 17000 g. O sobrenadante foi coletado e armazenado em um novo microtubo de 2,0 mL (S1). Uma nova dissolução foi realizada sobre o precipitado resultante, adicionando 250 μ L EtOH 80 % e repetindo o processo de homogeneização, aquecimento e centrifugação, adicionando o sobrenadante resultante (S2) ao retirado anteriormente (S1+S2). O mesmo processo se repete a partir da adição de 250 μ L EtOH 50 % e adjeção do sobrenadante (S1+S2+S3). A partir da fração solúvel (S) foram determinados os conteúdos de clorofilas *a* e *b* (Porra; Thompson; Kriedemann, 1989), os açúcares glicose, frutose e sacarose (Ferne et al., 2001), aminoácidos solúveis totais (Cross et al., 2006), nitrato (Fritz et al., 2004) e malato (Nunes-Nesi et al., 2007). A partir da fração insolúvel (Pellet), os teores de amido (Ferne et al., 2001) e proteínas totais (Bouquin et al., 2002) foram determinados.

4.2.7.4.2 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com seis repetições para cada tratamento, sendo cada unidade experimental composta por uma planta por vaso. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e para verificar diferença estatística entre os tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Teor do óleo essencial

Após quatro horas de extração, o óleo essencial obtido das folhas de *X. aromatica* apresentou rendimento médio de 0,05 % e coloração levemente amarelada. Cabe ressaltar que, com o mesmo tempo de extração, o óleo essencial obtido dos frutos apresentou-se incolor e rendimento médio de 0,58 %, isto é, 10 vezes superior ao encontrado em tecidos foliares. Andrade et al. (2004) obteve, em 4 horas de extração de material seco rendimento de 0,2 e 0,8 % de óleo essencial de folhas e frutos de *X. aromatica*, respectivamente. Maia et al. (2005) também obteve 0,2 % de rendimento na extração dos óleos essenciais das folhas de *X. aromatica*. Sabe-se que diferentes fatores são responsáveis pela variação no rendimento dos óleos essenciais incluindo a sazonalidade, a idade da planta, a maturação dos frutos e condições climáticas, etc. (Gobbo-Neto; Lopes, 2007).

4.3.2 Quantificação do óleo essencial

A fim de se determinar o valor de absorbância dos óleos essenciais de folhas e frutos de *X. aromatica* realizou-se uma varredura espectral obtendo o comprimento de onda de máxima absorbância de $\lambda = 222$ nm e $\lambda = 219$ nm para os óleos essenciais das folhas e frutos, respectivamente

4.3.2.1 Validação do método analítico para quantificação do óleo essencial das folhas de *X. aromatica* por espectroscopia UV-VIS

A equação da reta $y=22,733x+0,00007$ foi obtida por regressão linear, em triplicata, a partir da curva de calibração do óleo essencial de folhas de *X. aromatica* (Figura 1).

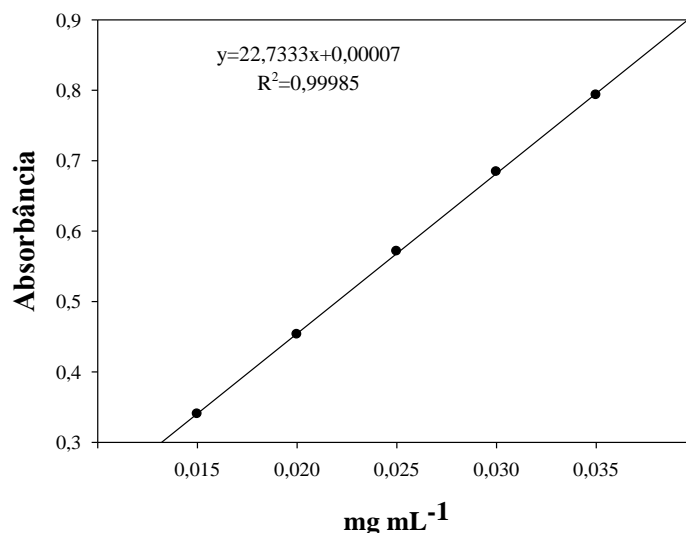


Figura 1. Curva de calibração do óleo essencial de folhas de *X. aromatica*. Os valores representam as médias de três repetições de cada ponto componente da curva de calibração.

O desvio padrão (DP) bem como a precisão (DPR%) e exatidão (%) foram mensurados para cada concentração usada na curva de calibração do óleo essencial de folhas de *X. aromatica* e estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1: Desvio padrão (DP), Precisão (DPR %) e exatidão obtidas na construção da curva de calibração do óleo essencial de folhas de *X. aromatica*

Concentração Nominal (mg mL ⁻¹)	Média	DP	DPR % (Precisão)	Exatidão (%)
0,015	0,340	0,003	0,945	99,8
0,020	0,453	0,001	0,127	99,7
0,025	0,571	0,013	2,290	100,5
0,030	0,684	0,007	0,959	100,3
0,035	0,793	0,007	0,912	99,7

Os dados da precisão e exatidão dos óleos essenciais das folhas de *X. aromatica* estão apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2: Precisão (DPR %) de amostras do óleo essencial de folhas de *X. aromatica* usadas na validação do método analítico

Concentração nominal (mg mL ⁻¹)	DPR (%) Intradia 1	DPR (%) Intradia 2	DPR (%) Intradia 3	DPR (%) Interdia	DP
0,018	0,300	0,700	0,300	0,433	0,231
0,021	0,200	0,300	0,300	0,267	0,058
0,033	0,200	0,100	0,100	0,133	0,058

Valores de DPR inferiores a 5,0 % preconizados pela Anvisa (2010) são representativos de uma boa precisão. Tanto as concentrações preparadas para curva de calibração, quanto para amostras nas leituras intra e interdia apresentaram valores médios de DP inferiores a 5,0 %. Assim, o método de quantificação aqui desenvolvido apresentou-se bastante preciso para as análises dos óleos essenciais das folhas *X. aromatica*. Como observado nas Tabelas 2 e 3, todas as concentrações preparadas revelaram exatidão (entre 80 a 120 % da concentração nominal (Anvisa, 2010)) com suas respectivas concentrações nominais.

Tabela 3: Exatidão (%) de amostras do óleo essencial de folhas de *X. aromatica* usadas na validação do método analítico

Concentração nominal (mg mL ⁻¹)	E (%) Intradia 1	E (%) Intradia 2	E (%) Intradia 3	E (%) Interdia	DP
0,018	101,290	101,290	100,910	101,163	0,219
0,021	100,410	100,640	100,870	100,640	0,230
0,033	100,020	99,690	99,800	99,837	0,168

O LD das folhas de *X. aromatica* calculado de acordo com o desvio padrão do intercepto (0,004) e com o coeficiente angular (22,733) da curva de calibração (0,015; 0,020; 0,025; 0,030 e 0,035 mg mL⁻¹), foi de 0,0006 mg mL⁻¹, e o LQ foi de 0,0018 mg mL⁻¹. Os dados obtidos demonstraram que o método analítico foi linear, preciso e exato em toda faixa de trabalho para o óleo essencial das folhas de *X. aromatica*.

4.3.2.2 Validação do método analítico para quantificação do óleo essencial dos frutos de *X. aromatica* por espectroscopia UV-VIS

A equação da reta $y = 27,58x + 0,0136$ foi obtida por regressão linear a partir da curva de calibração do óleo essencial de frutos de *X. aromatica* (Figura 2).

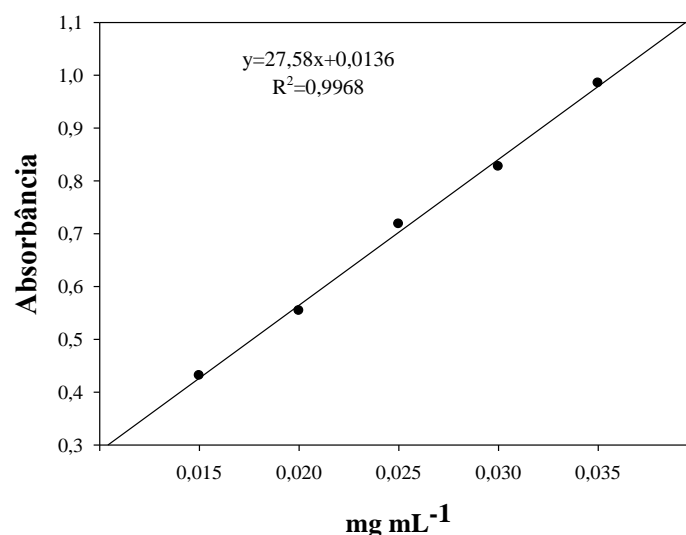


Figura 2. Curva de calibração do óleo essencial de frutos de *X. aromatica*. Os valores representam as médias de três repetições de cada ponto componente da curva de calibração.

A precisão (DPR %) e exatidão (%) obtidas para cada concentração usada na curva de calibração do óleo essencial de frutos de *X. aromatica* encontram descritas na Tabela 4.

Tabela 4: Precisão (DPR %) e exatidão obtidas na construção da curva de calibração do óleo essencial de frutos de *X. aromatica*

Concentração nominal (mg mL ⁻¹)	Média	DP	DPR % (Precisão)	Exatidão (%)
0,015	0,431	0,002	0,354	100,983
0,020	0,554	0,002	0,276	98,036
0,025	0,718	0,003	0,402	102,214
0,030	0,827	0,002	0,279	98,272
0,035	0,985	0,004	0,410	100,601

Os dados da precisão e exatidão intra e interdia dos óleos essenciais das folhas de *X. aromatica* estão apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5: Precisão (DPR %) de amostras do óleo essencial dos frutos de *X. aromatica* usadas na validação do método analítico

Concentração nominal (mg mL ⁻¹)	DPR (%) Intradia 1	DPR (%) Intradia 2	DPR (%) Intradia 3	DPR (%) Interdia	DP
0,018	0,300	0,700	0,300	0,433	0,231
0,021	0,200	0,300	0,300	0,267	0,058
0,033	0,200	0,100	0,100	0,133	0,058

Tabela 6: Exatidão (%) de amostras do óleo essencial dos frutos de *X. aromatica* usadas na validação do método analítico

Concentração nominal (mg mL ⁻¹)	E% Intradia 1	E% Intradia 2	E% Intradia 3	E% Interdia	DP
0,018	101,290	101,290	100,910	101,163	0,219
0,021	100,410	100,640	100,870	100,640	0,230
0,033	100,020	99,690	99,800	99,837	0,168

O LD dos frutos de *X. aromatica* calculado de acordo com o desvio padrão do intercepto (0,023) e com o coeficiente angular (27,580) da curva de calibração (0,015; 0,020; 0,025; 0,030 e 0,035 mg mL⁻¹), foi de 0,0028 mg mL⁻¹, ao passo que o LQ foi de 0,0085 mg mL⁻¹. O LQ calculado foi menor que o primeiro ponto da curva de calibração. Todos os resultados demonstraram que o método analítico foi linear, preciso e exato em toda faixa de trabalho para o óleo essencial dos frutos de *X. aromatica*.

4.3.3 Análise química dos óleos essenciais

4.3.3.1 Composição química do óleo essencial de folhas de *X. aromatica*

Análise química dos óleos essenciais foi realizada e um cromatograma representativo do óleo essencial das folhas de *X. aromatica* está representado na Figura 3.

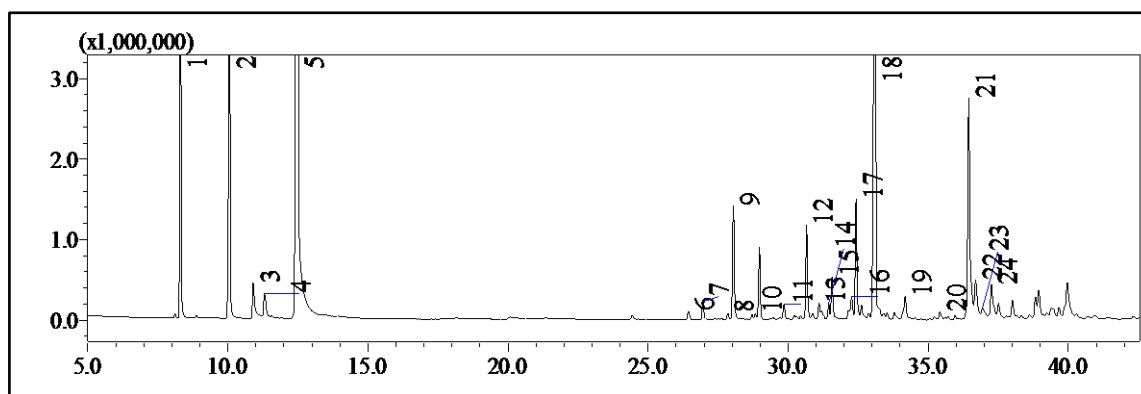


Figura 3. Cromatograma obtido em CG-EM para óleo essencial das folhas de *X. aromatica* com indicação dos picos referentes aos compostos identificados. Condições: Gás de arraste Hélio (He); temperatura inicial de 40 °C, o incremento da temperatura da coluna foi de 3 °C min⁻¹ atingindo um máximo de 240°C

Um total de 24 compostos químicos presentes no óleo essencial de folhas de *X. aromatica* foi identificado (Tabela 7), dos quais o limoneno (37,76 %), biciclogermacreno (13,59 %), β - pineno (8,11 %) e α -pineno (7,75 %) apresentaram os maiores percentuais e são representados na Figura 4.

Tabela 7: Constituintes químicos do óleo essencial de folhas de *X. aromatica*

CG-EM					CG-DIC	
Pico	TR (min)	Composto	IR exp.*	IR lit.**	TR (min)	Área (%)
1	8,31	α -pineno	930,8	932,0	9,20	7,75
2	10,05	β -pineno	973,3	974,0	11,14	8,11
3	10,90	β -mirceno	994,0	988,0	12,09	1,55
4	11,30	δ -3- careno	1003,4	1008,0	12,51	0,64
5	12,50	Limoneno	1029,3	1024,0	13,96	37,76
6	26,44	δ -elemeno	1334,8	1335,0	28,98	0,21
7	26,96	α -cubebeno	1346,6	1345,0	29,55	0,34
8	27,85	α -ilangeno	1367,3	1373,0	30,47	0,19
9	28,04	α -copaeno	1371,8	1374,0	30,70	1,75
10	28,83	β -elemeno	1389,9	1389,0	31,25	0,47
11	29,85	E-cariofileno	1414,4	1418	32,54	0,29
12	30,66	Aromadendreno	1434,1	1439,0	33,41	1,43
13	31,10	Seychelleno	1444,8	1444,0	33,64	0,15
14	31,45	Rotundeno	1453,3	1457,0	33,89	0,59

15	31,57	Alloaromadendre	1456,2	1458,0	34,32	1,12
16	32,27	γ -gurjuneno	1473,3	1475,0	34,70	0,03
17	32,43	γ -muuroleno	1477,1	1478,0	35,26	2,71
18	33,11	Biciclogermacren	1493,8	1500,0	36,04	13,59
19	34,18	δ -cadineno	1521,0	1522,0	37,09	0,49
20	35,42	β -germacreno	1553,0	1559,0	38,58	0,18
21	36,45	Espatulenol	1579,6	1577,0	39,29	4,08
22	36,69	Globulol	1585,9	1590,0	39,50	1,21
23	36,93	Veridiflorol	1592,0	1592,0	39,81	0,29
24	37,26	Guaiol	1600,5	1600,0	40,13	0,80
NI						14,28

* = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

** = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007), baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

NI = Não identificados

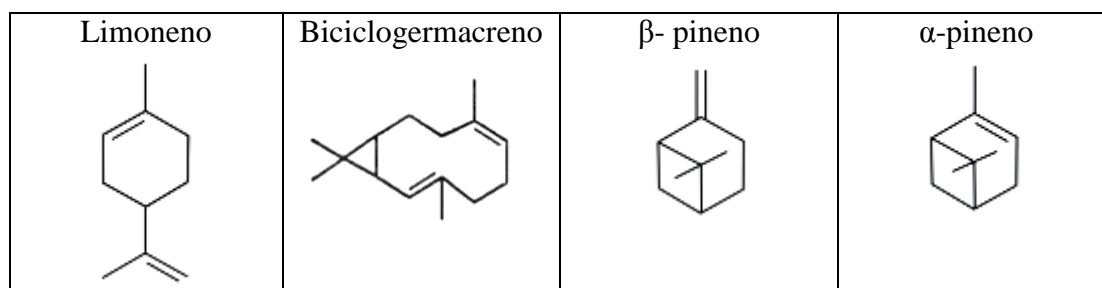


Figura 4: Fórmula estrutural dos componentes majoritários identificados no óleo essencial de folhas de *X. aromatica*

Os compostos limoneno, biciclogermacreno, α -pineno e β -pineno presentes majoritariamente nos óleos essenciais das folhas de *X. aromatica* foram também descritos por Lago et al. (2003), Maia et al. (2005) e Peres (2015) utilizando o método de hidrodestilação no processo de extração dos mesmos. Cumpre mencionar que esses compostos foram também identificados em diferentes óleos essenciais que apresentaram atividade sobre insetos (Baldin et al., 2013; Nguemtchouin et al., 2010; Volpe et al., 2016), sugerindo possível ação pesticida dos óleos essenciais das folhas de *X. aromatica*.

4.3.3.2 Composição química do óleo essencial de frutos de *X. aromatica*

Um cromatograma representativo da análise química dos óleos essenciais de frutos de *X. aromatica* está representado na Figura 5.

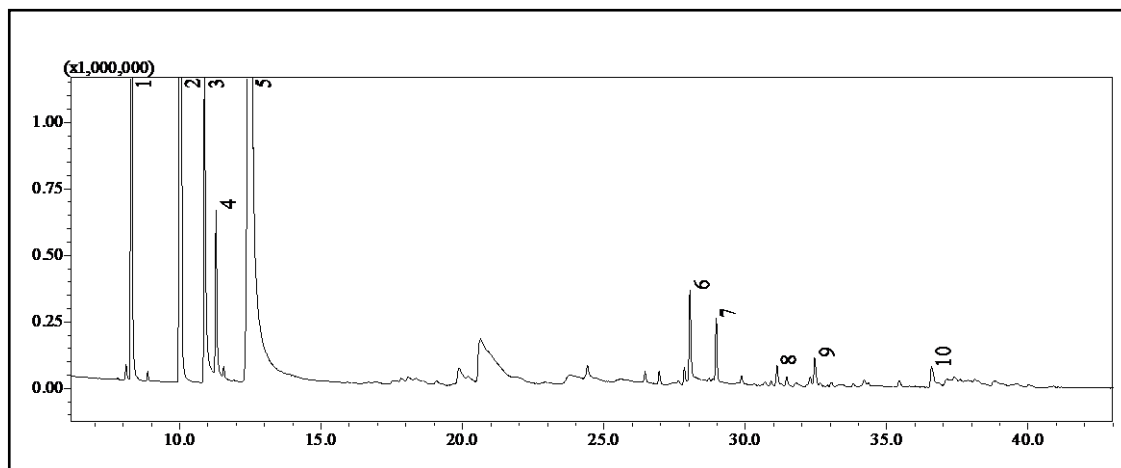


Figura 5. Cromatograma obtido em CG-EM para óleo essencial dos frutos de *X. aromatica* com indicação dos picos referentes aos compostos identificados. Condições: Gás de arraste Hélio (He); temperatura inicial de 40 °C, o incremento da temperatura da coluna foi de 3 °C min⁻¹ até 240°C.

De um total de 10 compostos químicos identificados no óleo essencial dos frutos de *X. aromatica* (Tabela 8), em maiores porcentagens foram encontrados limoneno (65,44 %), β -pineno (8,44 %), α -pineno (7,66 %) e β -mirceno (3,29 %) e estão representados na Figura 6.

Tabela 8: Constituintes químicos do óleo essencial de frutos de *X. aromatica*

Pico	CG-EM				CG-DIC	
	TR (min)	Composto	IR exp.*	IR lit.**	TR (min)	Área (%)
1	8,30	α -pineno	930,53	932,00	9,20	7,66
2	10,04	β -pineno	973,05	974,00	11,13	8,44
3	10,87	β -mirceno	993,30	988,00	12,11	3,29
4	11,28	Pseudolimoneno	1002,92	-	12,50	0,97
5	12,53	Limoneno	1030,07	1024,00	14,04	65,44
6	28,04	α -copaeno	1371,77	1374,00	30,69	0,46
7	28,97	β -patchouleno	1393,29	1379,00	31,65	0,32

8	31,12	Seicheleno	1445,28	1444,00	35,93	0,42
9	32,45	D-germacreno	1477,80	1484,00	39,23	0,31
10	36,59	Espatuleno	1583,18	1577,00	41,34	0,12
NI						12,57

* = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

** = Índice de retenção da literatura (Adams, 2007), baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

NI = Não identificados

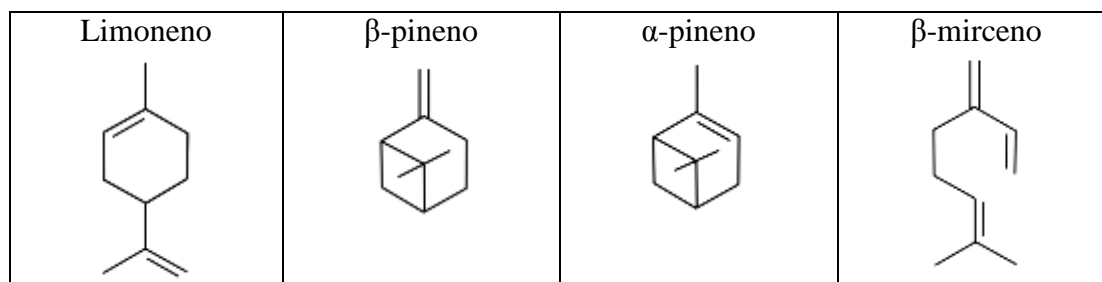


Figura 6: Fórmula estrutural dos componentes majoritários identificados no óleo essencial de frutos de *X. aromatica*

Os compostos identificados foram também relatados por Stashenko e colaboradores (2004). A partir da hidrodestilação e por, destilação simultânea-extração de solvente, hidrodestilação assistida por microondas e extração por fluido supercrítico (CO₂), outros compostos também foram identificados nos óleos essenciais dos frutos de *X. aromatica* (Stashenko et al., 2004). As variações na composição química estão relacionadas a diferentes incluindo a coleta do material vegetal regiões diferentes, com diferentes condições climáticas, de sazonalidade, e propriedades do solo, sendo tais fatores determinantes no rendimento e composição dos óleos essenciais (Gobbo-Neto; Lopes, 2007).

4.3.4 Caracterização das nanopartículas

4.3.4.1 Determinação de eficiência de encapsulação (EE%), pH, potencial zeta (pZ) e diâmetro de partículas (Dp)

A Tabela 9 apresenta os valores obtidos para eficiência de encapsulação (EE%), pH das suspensões coloidais, potencial zeta (pZ) e diâmetro das nanopartículas poliméricas (Dp) contendo óleos essenciais de folhas e frutos de *X. aromatica* nas concentrações 1 e 2 % e nanopartículas vazias (sem óleo essencial).

Tabela 9. Eficiência de encapsulação, pH das suspensões coloidais, potencial zeta (pZ), índice de polidispersão (PDI) e diâmetro das nanopartículas poliméricas (Dp) contendo óleos essenciais de folhas e frutos de *X. aromatica* nas concentrações 1 e 2 % e nanopartículas sem óleo essencial

Nanopartículas	EE%	pH	pZ (mV)	Dp (nm)
Folhas 1%	94,86	6,24	-30,10 ±6,40	185,30
Folhas 2%	96,77	6,21	-30,80 ±7,89	230,90
Frutos 1%	95,42	6,20	-31,10 ±6,39	186,90
Frutos 2%	98,83	6,19	-25,20 ±6,47	200,40
Vazias	-	6,13	-28,40 ±5,15	243,60

A nanoprecipitação é uma técnica simples e adequada para encapsular óleos essenciais uma vez que suas características hidrofóbicas os tornam bons candidatos para o encapsulamento eficiente em sistemas nanoparticulares (Asbahani et al., 2015). Em nosso estudo, foram obtidas altas taxas de encapsulação tanto para os óleos essenciais de frutos a 1 e 2 %, quanto para os das folhas a 1 e 2 %, variando de 94 a 98 %. Os valores de pH obtidos das suspensões foram entre 6,13 e 6,24. O potencial zeta exibido pelas formulações de nanopartículas foi entre -28 e -31 mV. O valor negativo de pZ determinados para ambas as nanopartículas avaliadas é pela característica iônica do PCL.

4.3.4.2 Morfologia das nanopartículas

A avaliação da morfológica foi realizada por MEV para maiores informações sobre a homogeneidade, forma, superfície e diâmetro das nanopartículas obtidas. As fotomicroscopias (Figura 7) das formulações de encapsulação dos óleos essenciais de *X. aromatica* revelaram partículas esféricas, de superfície lisa e monodispersas.

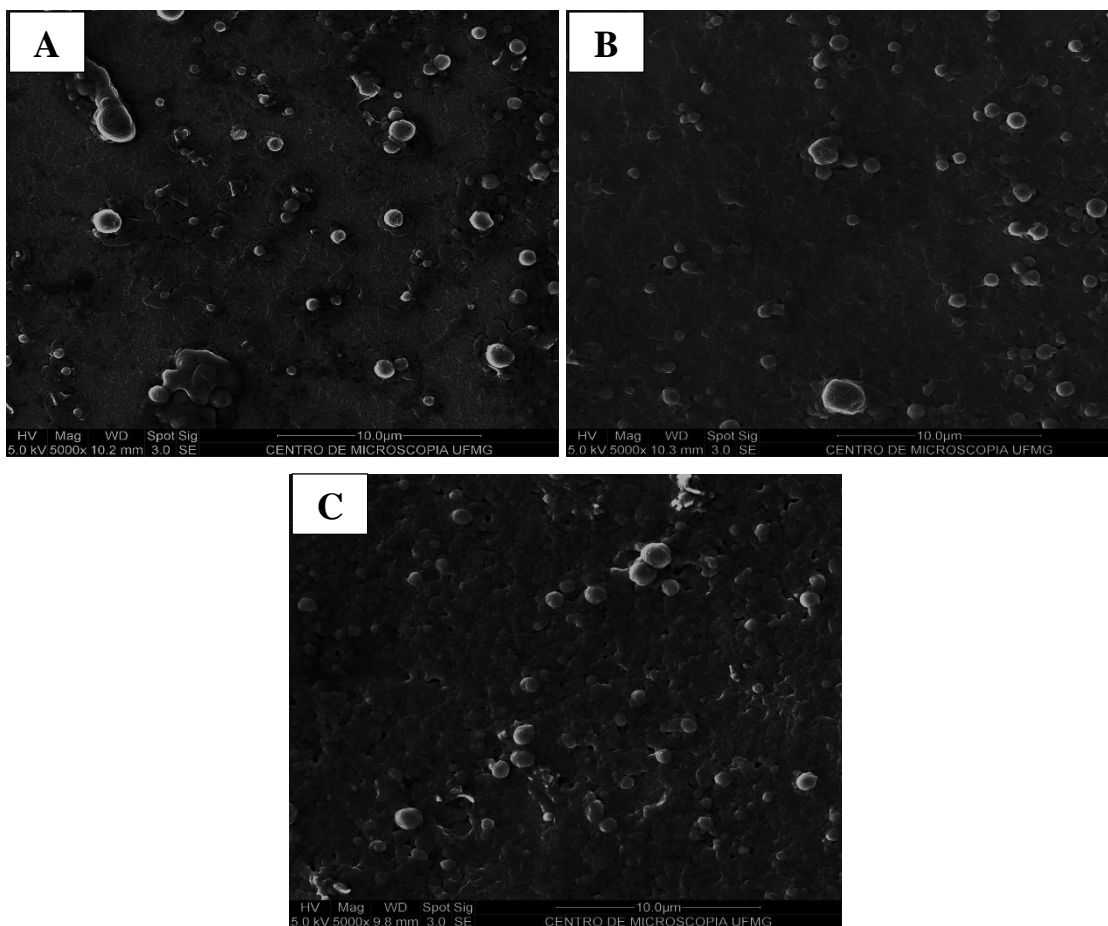


Figura 7: Fotomicroscopia obtidas por MEV das suspensões de: nanopartículas poliméricas com óleo essencial de folhas de *X. aromatica* (A), de frutos de *X. aromatica* (B) e nanopartículas poliméricas vazias (C).

Essas características desejáveis de nanopartículas também foram observadas por Christofoli et al. (2015). Esses autores obtiveram nanoesferas lisas, monodispersas e de diâmetros entre 400 e 500 nm utilizando o polímero PCL como matriz para encapsulação óleos essenciais de folhas de *Z. rhoifolium*. Além disso, Pinto et al. (2016) obtiveram partículas de PCL contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* de formas esféricas e sem fissuras, com diâmetro médio de 173,6 nm que claramente condizem com nosso trabalho.

4.3.5 Ensaios biológicos

4.3.5.1 Parâmetros biométricos

A partir da simples inspeção visual de plantas controles (Água, Tween80, NV) comparadas aos seus respectivos tratamentos (InFr1%, InFr2%, InFo1%, InFo2%, NFr1%, NFr2%, NFo1%, NFo2%) não foram observados quaisquer sintomas aparentes de lesões visíveis nas folhas de tomateiros ao final do experimento (Figura 8).

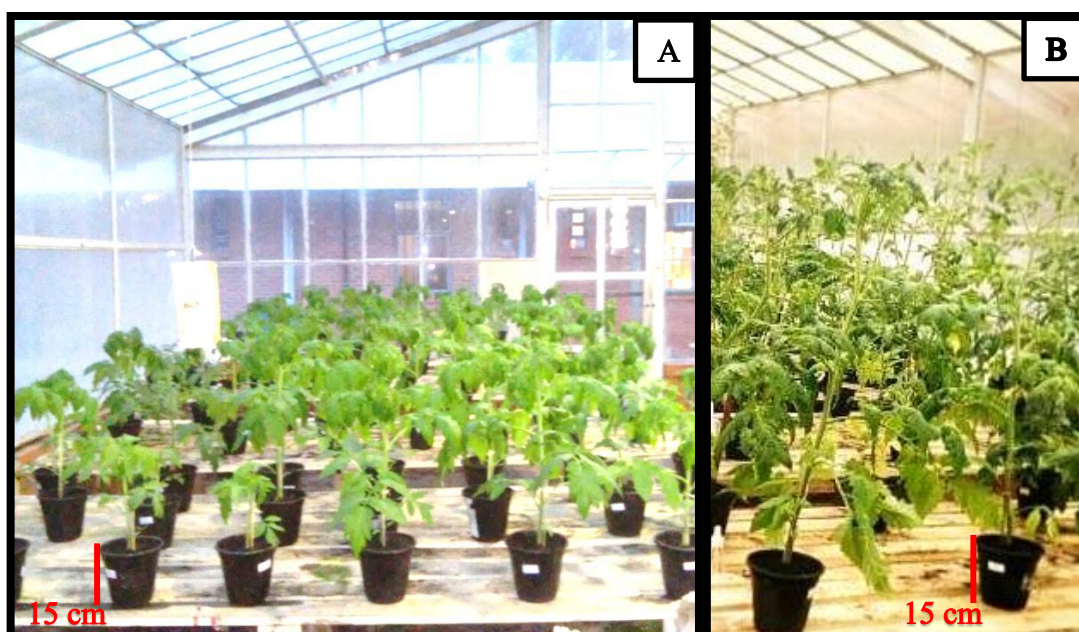


Figura 8: Foto representativa de tomateiros utilizados neste trabalho. Unidades experimentais com 14 DAT (A); com 28 DAT(B).

Kaur et al. (2010) avaliaram o efeito fitotóxico do óleo essencial da *Artemisia scoparia* em diferentes plantas daninhas com 6 semanas de idade e observaram que as concentrações de 2, 4 e 6 % do óleo causaram clorose, necrose e murcha em plantas *Echinochloa crus-galli* e *Parthenium hysterophorus*. Segundo, tais autores, a clorose ocorreu pela perda do conteúdo de clorofila, ao passo que a murcha foi ocasionada pelo extravasamento excessivo de eletrólitos, provavelmente pelo rompimento da integridade da membrana celular. Contudo, tais efeitos fitotóxicos oriundos da aplicação de óleos essenciais foram também relatados em plantas daninhas por Batish et al. (2004), e Clay; Dixon; Willoughby (2005). Esse comportamento não foi observado em nosso estudo como representado.

Embora a tendência de redução na altura final de plantas, submetidas aos tratamentos contendo óleos essenciais na concentração de 1 % tenha sido observada, a aplicação dos tratamentos nas mais diferentes combinações não acarretou em impactos significativos no crescimento total, e as plantas apresentaram a altura média de $89,2 \pm 5$ cm (Figura 9). Tais resultados, tomados em conjunto com a ausência de danos visíveis nas plantas e a eficiência anteriormente comprovada no controle de *B. tabaci* (Peres, 2015) demonstram grande potencial dos óleos essenciais de *X. aromatica*.

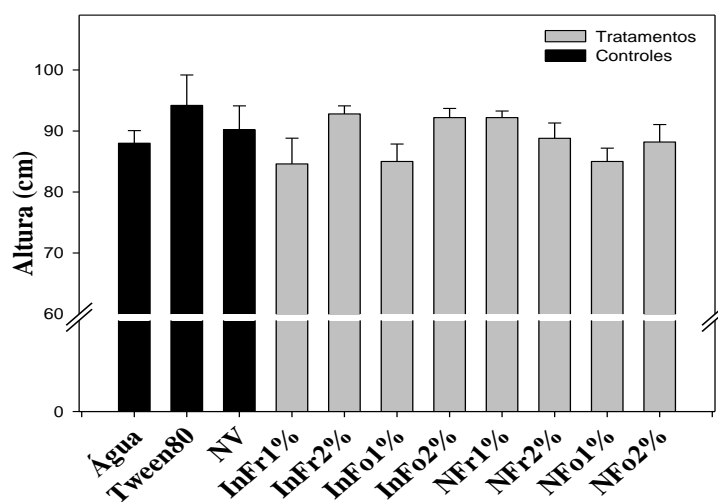


Figura 9. Variação da altura final de tomateiros (*S. lycopersicum* L. cv. Santa Clara) submetidas à aplicação de óleos essenciais de *X. aromatica*. Barras pretas representam os controles: Água, Tween80 e Nanopartículas vazias (NV). Barras em cinza representam os tratamentos com OEs: *in natura* extraído de frutos na concentração 1% (InFr1%) e a 2% (InFr2%), *in natura* de folhas a 1% (InFo1%) e a 2% (InFo2%), nanopartículas contendo o óleo essencial de frutos a 1% (NFr1%) e a 2% (NFr2%) e nanopartículas contendo óleo essencial de folhas na concentração 1% (NFO1%) e a 2% (NFO2%). Valores representam as médias \pm EP de pelo menos seis plantas independentes. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si ($P < 0,05$), parâmetros que não apresentam letras representam similaridade estatística em todos os tratamentos, segundo o teste Tukey.

Embora a altura final das plantas não diferiu significativamente entre os diferentes tratamentos utilizados, decidiu-se investigar as possíveis alterações na fixação de Carbono a nível de planta inteira. Assim, a área foliar total (AFT) e área foliar específica (AFE), massa seca de folhas (MSF), de hastes (MSH), de raízes (MSR), total (MST) e razão raiz/parte aérea (R/PA) foram e estão representados graficamente na Figura 10.

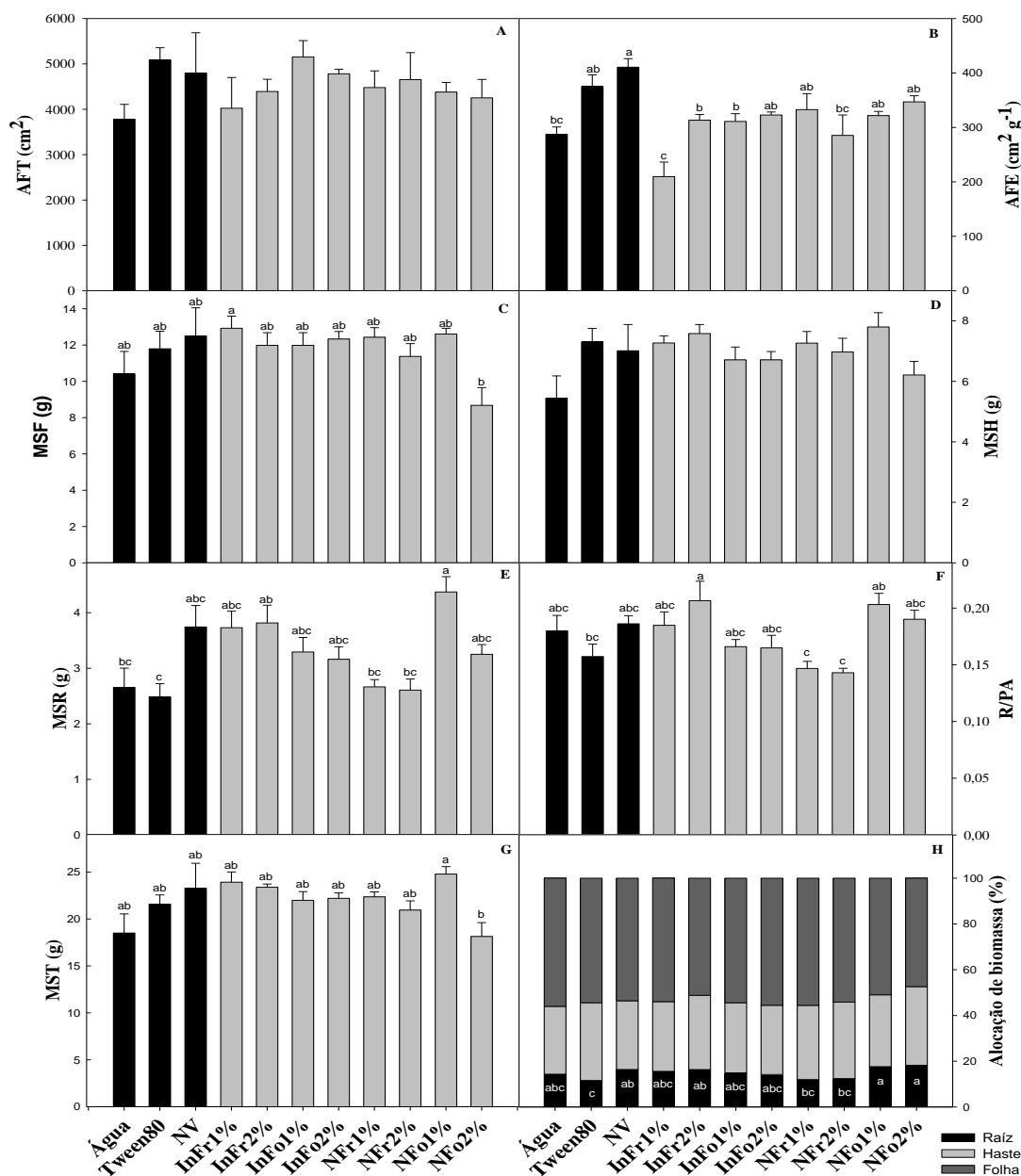


Figura 10. Variação de parâmetros biométricos de tomateiros (*S. lycopersicum* L. cv. Santa Clara) submetidas à aplicação de OEs de *X. aromatica*. Área foliar específica (AFE) (A); área foliar total (AFT) (B); massa seca de folhas (MSF) (C); massa seca de hastes (MSH) (D); massa seca de raiz (MSR) (E); razão entre raiz e parte aérea (R/PA) (F); massa seca total (MST) (G) e; alocação de biomassa (H). Estatística e siglas como descritas na Figura 9.

Algumas alterações entre plantas submetidas aos tratamentos e aos respectivos controles em termos de AFE, MSF, MSR, MST e R/PA foram observadas.

O decréscimo na AFE (razão entre área e massa seca foliar) indicou que houve aumento da biomassa nas folhas e provavelmente redução da expansão foliar em plantas submetidas ao tratamento InFr1%. Estes dados se confirmam ao avaliar os resultados

expressos por AFT (Figura 10 B) e MSF (Figura 10 C), em que menor área foliar em InFr1% pode ser observada, bem como maior MSF em comparação com os demais tratamentos. De modo diferente, em plantas submetidas ao tratamento N Fo2% não foram observadas reduções em AFE embora menor MSF tenha sido observado neste tratamento. Verificou-se também que plantas tratadas com Tween 80, N Fr1% e N Fr2% apresentaram menor massa seca de raízes (Figura 10 E), acarretando menor razão raiz parte aérea (R/PA- Figura 10 F). Embora plantas submetidas ao tratamento N Fo1% tenham apresentado maior alocação de biomassa na raiz, não se verificaram variações na R/PA, sugerindo alocação similar entre as diferentes partes das plantas.

As variações encontradas em massa seca total (MST- Figura 10 G) podem ser atribuídas às variações observadas em MSF e MSR, visto que não foram verificadas quaisquer variações em massa seca de hastes (MSH- Figura 10 D). No entanto, a porcentagem de alocação de biomassa (Figura 10 H) apresentou alterações apenas à nível de raízes. Tomados em conjunto, estes dados demonstram que embora plantas submetidas aos tratamentos N Fo1% e N Fo2% apresentaram maior percentual de biomassa em raízes quando comparados com os demais tratamentos. Embora estes tratamentos não apresentaram diferenças em relação aos controles Água e NV.

As análises de crescimento ora representadas expressam as condições morfofisiológicas das plantas. Não obstante, as diferenças intrínsecas observadas dentro de cada tratamento frente aos diferentes parâmetros observados, consistem em variações relativamente pequenas em termos biológicos, não revelando plenamente as possíveis interferências no desenvolvimento vegetativo das plantas, provocadas pela aplicação dos tratamentos. Assim, é plausível sugerir que a ação inseticida dos óleos essenciais obtidos de *X. aromatica* ocorre com pouco, se algum, impacto no crescimento de tomateiro. No entanto, com vistas a sustentar tal hipótese, decidiu-se expandir essas análises mediante a investigação de aspectos fotossintéticos e bioquímicos, em plantas de tomateiro submetidas aos óleos essenciais de *X. aromatica*.

4.3.5.2 Parâmetros fotossintéticos

Um dia após a última aplicação dos óleos essenciais, foram realizadas análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* considerando a importância dos processos fotossintético e respiratório sobre os parâmetros de crescimento. Cumpre

mencionar que a fluorescência da clorofila *a* fornece informações sobre o funcionamento do Fotossistema II (PSII), possibilitando estimar o desempenho fotossintético de uma forma quase instantânea.

A razão F_v/F_m fornece uma medida muito útil acerca do rendimento quântico fotoquímico máximo do PSII. Assim, a eficiência fotoquímica máxima do PSII (F_v/F_m) (Figura 11 A) permaneceu praticamente inalterada entre os diferentes tratamentos e, apresentaram-se dentro de uma faixa considerada ótima (entre 0,75 e 0,83; Maxwell; Johnson, 2000), indicando que os tratamentos aplicados não ocasionaram estresse às plantas.

Não se observaram também diferenças para os demais parâmetros associados à fluorescência da clorofila *a* (Figura 11 A-F) como rendimento quântico efetivo do transporte de elétrons no PSII (F_v'/F_m'), coeficiente de extinção fotoquímica (qP), coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) e taxa de transporte de elétrons (ETR). O coeficiente de extinção fotoquímica (qP) dá indicativo da proporção de centros de reação do PSII que estão abertos, enquanto $\phi PSII$ representa a proporção de energia absorvida que está sendo utilizada nas reações fotoquímicas. Dessa forma, $\phi PSII$ e qP estão inter-relacionados com F_v'/F_m' ($F_v'/F_m' = \phi PSII/qP$), expressando a eficiência “real” de captura de energia de excitação (Maxwell; Johnson, 2000). Apesar dos dados obtidos em qP (Figura 11 C) e $\phi PSII$ (Figura 11 F) apresentarem variações entre os tratamentos, os valores obtidos em F_v'/F_m' (Figura 11 B) não apresentaram alterações significativas entre os tratamentos. Assim como observado para F_v'/F_m' os valores de ETR (Figura 11 E) também foram semelhantes entre os tratamentos. Juntos esses resultados sugerem que a etapa fotoquímica da fotossíntese não foi comprometida pela aplicação dos óleos essenciais de *X. aromatica* em plantas de tomateiro. Cumpre mencionar também que a fluorescência da clorofila *a* tem sido sugerida, e apresenta grande potencial como ferramenta para monitorar e analisar os efeitos das NPs em plantas. Neste contexto, o comportamento da fluorescência de clorofila *a* em folhas de soja foi alterado na presença de diferentes concentrações de nanopartículas de prata (Falco et al., 2015). Com efeito, a aplicação de nanopartículas poliméricas contendo óleos essenciais de *X. aromatica* não promoveu, de modo geral, alterações nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*.

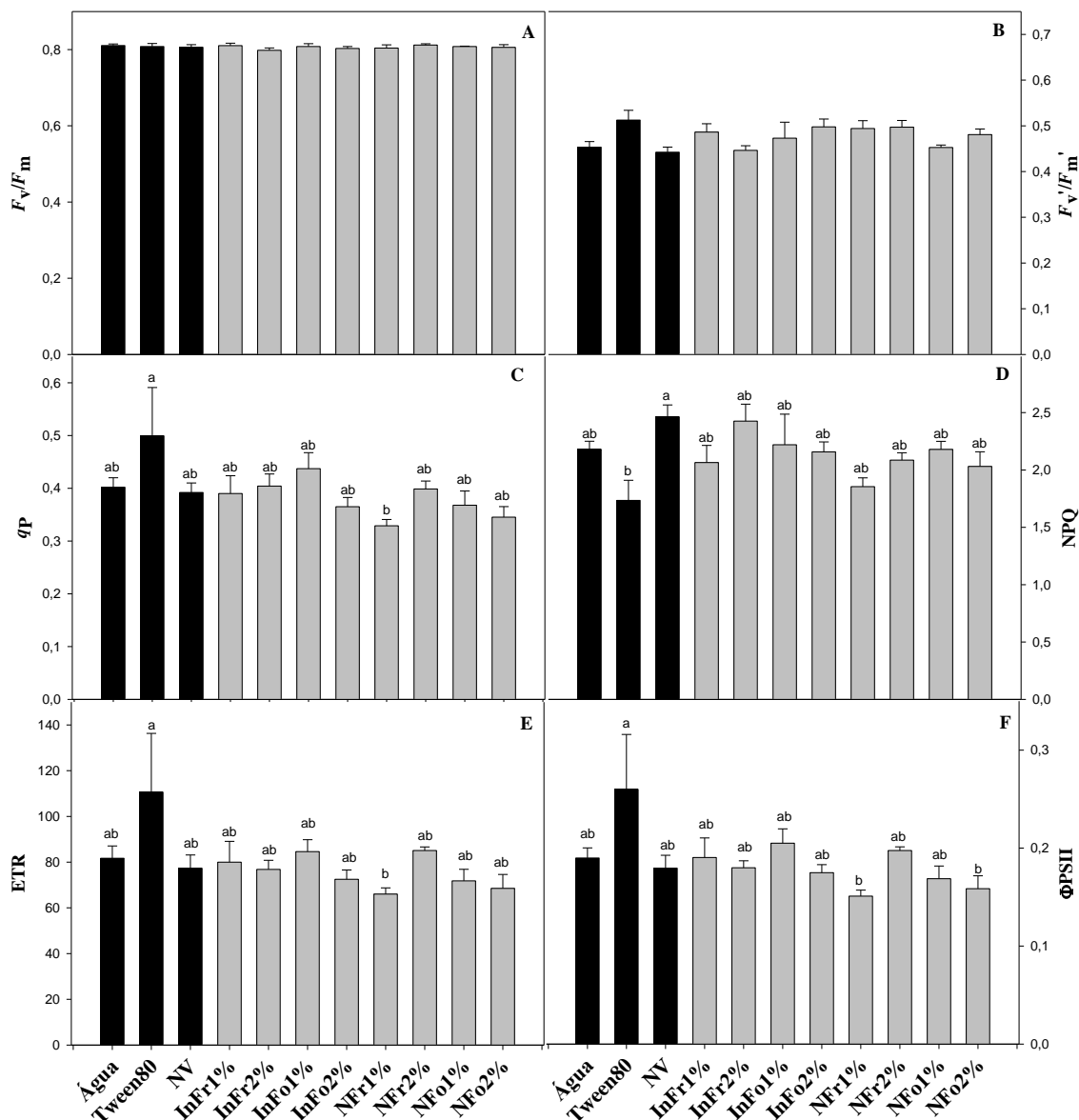


Figura 11: Variação nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em resposta a aplicação de OEs de *X. aromatica* em plantas de tomate (*S. lycopersicum* L. cv. Santa Clara). Eficiência fotoquímica máxima do PSII (F_v/F_m) (A); rendimento quântico efetivo do transporte de elétrons no FSII (F_v'/F_m') (B); coeficiente de extinção fotoquímica (qp) (C); coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) (D); taxa de transporte de elétrons relativo (ETR) (E) e; rendimento quântico do transporte de elétrons (Φ_{PSII}) (E). Estatística e siglas dos tratamentos como descrito na Figura 9.

De modo semelhante ao observado para os parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, não foram observadas alterações para os parâmetros de trocas gasosas. Assim, tanto a fotossíntese líquida (A_N - Figura 12 A) quanto a condutância estomática (g_s - Figura 12 B), a razão entre a concentração interna de CO_2 e a externa (C_i/C_a - Figura 12 C) e a taxa de respiração no escuro (R_d - Figura 12 D) não foram afetadas pelos

diferentes tratamentos aqui impostos. Tomados em conjunto, os resultados de fluorescência da clorofila *a* e de trocas gasosas mostraram que não ocorreram quaisquer limitação seja difusiva ou bioquímica da atividade fotossintética das plantas frente a aplicação dos tratamentos e que, as pequenas alterações no crescimento parecem ter ocorrido sem danos bioquímicos ou mesmo fotoquímicos à fotossíntese.

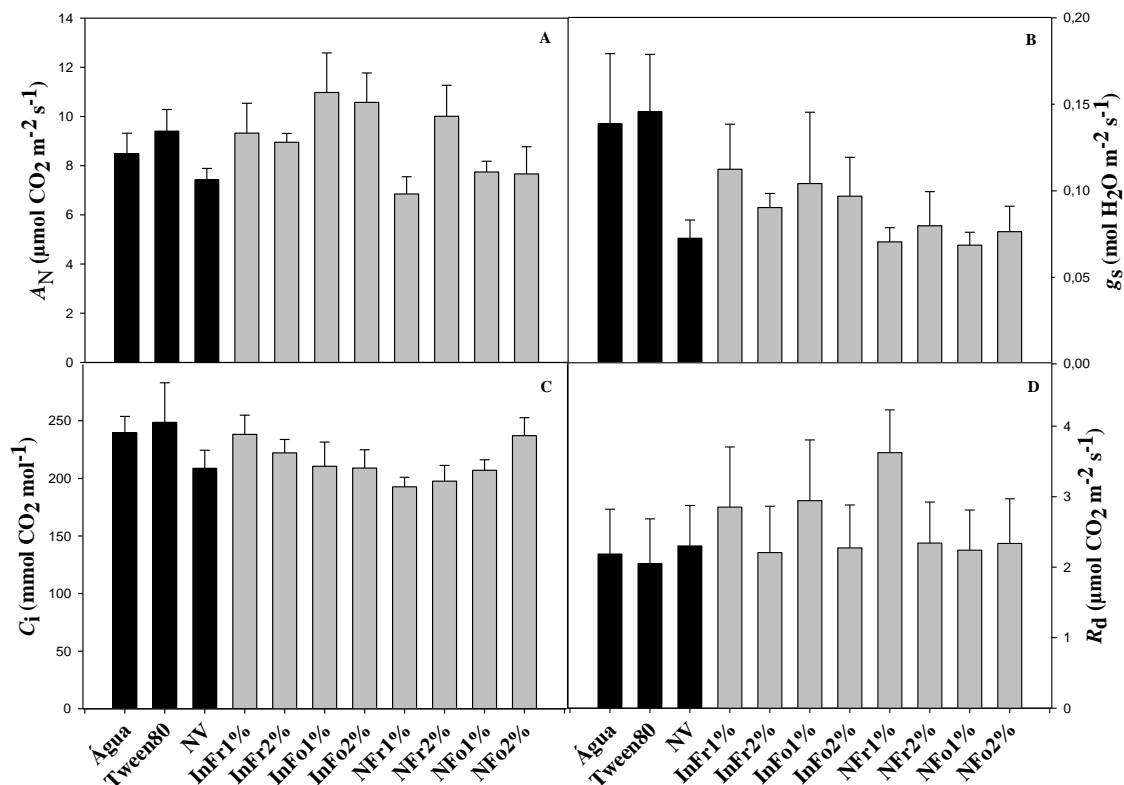


Figura 12. Variação nos parâmetros de trocas gasosas em resposta a aplicação de óleos essenciais de *X. aromatica* em plantas de tomate (*S. lycopersicum* cv. Santa Clara). Fotossíntese líquida (A_N) (A); Condutância estomática (g_s) (B); Concentração interna de CO_2 (C_i) (C); Taxa de respiração no escuro (R_d) (D). Estatística e siglas dos tratamentos como descrito na Figura 9.

Registre-se também que, de modo similar aos demais tratamentos, as nanopartículas vazias (NV) não provocaram nenhuma variação nos parâmetros fotossintéticos investigados em nosso estudo. Comportamento similar foi também observado por Oliveira et al. (2015) ao verificarem que as nanoformulações com o polímero PCL *per se* não promovem efeitos negativos significantes sobre plantas de mostarda durante o estágio vegetativo. Coletivamente, isso garantiria o potencial uso de nanopartículas de PCL como ferramenta carreadora de compostos ativos no setor agrícola com pequeno ou nenhum impacto ao crescimento e as taxas fotossintéticas em tomateiro.

4.3.5.3 Parâmetros bioquímicos

Com o intuito de investigar os possíveis efeitos da aplicação de óleos essenciais sobre o metabolismo do carbono e do nitrogênio em tomateiro durante estágio vegetativo, foi realizada detalhada caracterização bioquímica nas mesmas folhas.

De modo geral, pequenas variações foram observadas nos níveis de compostos associados ao metabolismo do carbono em função dos tratamentos aplicados (Figura 13). Apesar de os conteúdos de glicose (Figura 13 A), frutose (Figura 13 B) e sacarose (Figura 13 C) apresentarem tendência de redução em plantas tratadas com Tween 80 e InFr2%, não se observaram diferenças estatísticas em relação ao controle Água. No entanto, os conteúdos destes açúcares tenderam a incrementos quando as plantas foram cultivadas em presença de NFo1%. Assim como verificado para os açúcares solúveis, os conteúdos de amido foram similares entre os tratamentos e controles (Figura 13 D). Os conteúdos de malato não apresentaram diferenças significativas entre os controles e os tratamentos InFr1%, InFo2%, InFo2%, NFo1% e NFo2%. Os tratamentos InFo1%, NFr1% e NFr2% apresentaram menores conteúdos de malato diferindo significativamente do controle Água, porém condizentes com os demais.

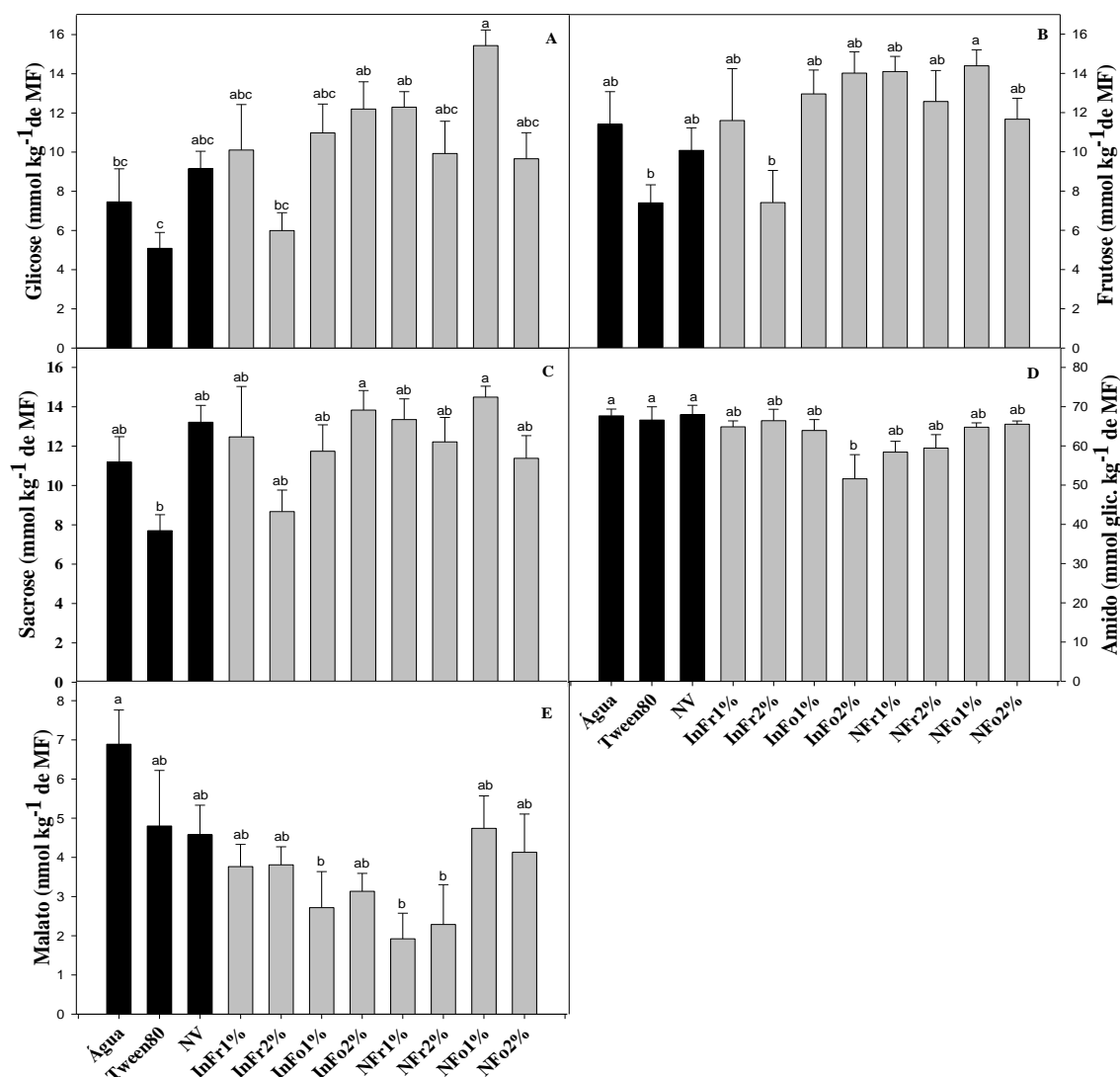


Figura 13: Variação nos conteúdos de metabólitos envolvidos no metabolismo do Carbono em resposta a aplicação de óleos essenciais de *X. aromatica* em tomateiro (*S. lycopersicum* cv. Santa Clara). Glicose (A); Frutose (B); Sacarose (C); Amido (D) e Malato (E). Estatística e siglas dos tratamentos como descrito na Figura 9.

Houve pouca variação nos teores foliares de clorofilas totais (Figura 14 A), variando entre 1,9 e 2,7 mg g⁻¹ de MF sem diferença estatística entre os controles e os tratamentos. A razão Chl *a*/Chl *b* (Figura 14 B) oscilou entre 2,7 e 3,3 e os dados observados também não diferiram significativamente. Os conteúdos de aminoácidos totais (Figura 14 C) oscilaram entre 10,38 e 13,88 μmol g⁻¹ MF sendo NFr02% tratamento com menor teor e InFr1% com maior. Apesar dessas variações, elas não são estatisticamente significativas o que caracteriza similaridade entre os tratamentos e controles.

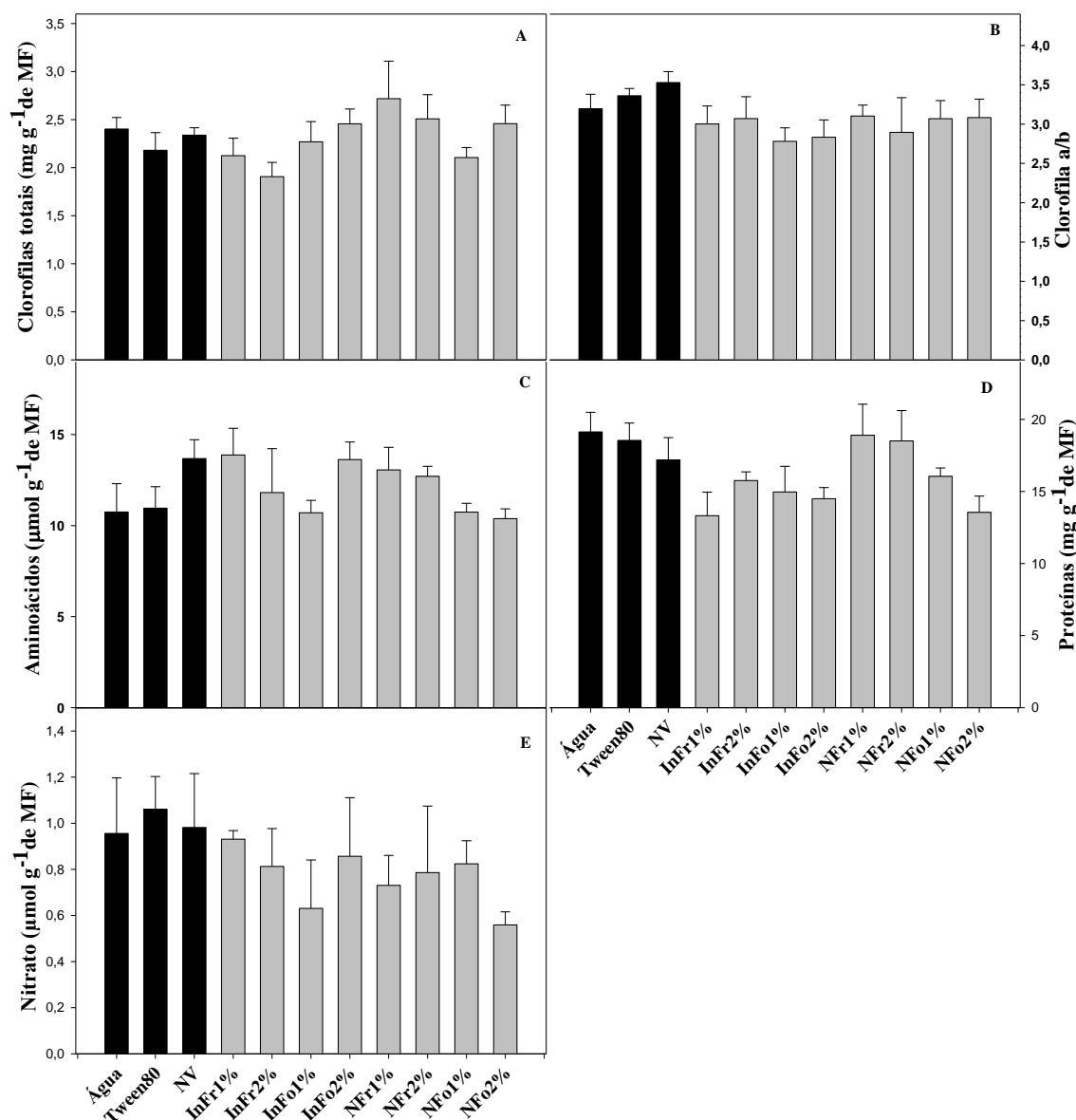


Figura 14: Variação nos conteúdos de metabólitos envolvidos no metabolismo do Nitrogênio em resposta a aplicação de óleos essenciais de *X. aromatica* em tomateiro (*S. lycopersicum* cv. Santa Clara). Chl (Clorofila) total (A); Razão Chl *a*/Chl *b* (B); Aminoácidos solúveis totais (C); Proteínas solúveis totais (D) e Nitrato (E). Estatística e siglas dos tratamentos como descrito na Figura 9.

De modo geral, os conteúdos de proteínas solúveis totais oscilaram entre 13,3 e 19,13 mg g⁻¹ MF. Assim como os demais metabólitos envolvidos no metabolismo do nitrogênio, os conteúdos de proteínas não diferiram significativamente entre os controles e plantas submetidas aos tratamentos. Nesse contexto, a manutenção em parâmetros de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a* observada neste trabalho, demonstram que o processo fotossintético, incluindo a captação de carbono e reações fotoquímicas, não são alteradas em tomateiro quando em presença de óleos essenciais

de *X. aromatica*. Entretanto, em função das pequenas alterações observadas em compostos associados ao metabolismo do carbono (Figura 10) e do nitrogênio (Figura 11), é plausível sugerir que tanto a assimilação quanto o metabolismo primário são possivelmente ajustados em resposta à presença desses óleos essenciais. Embora as evidências aqui apresentadas sejam apenas circunstanciais e, portanto, em clara necessidade de estudos futuros e complementares, os ajustes metabólicos aqui observados não são similares aos observados em condições de estresse vários (Obata; Fernie, 2012; Kissoudis et al., 2014; Jorge et al., 2016) e assim, os resultados corroboram com o potencial uso de nanopartículas de PCL como ferramenta carreadora de compostos ativos no setor agrícola. Outro aspecto importante associado ao trabalho em apreço e que, de certa forma, previne generalizações, é que os resultados foram obtidos sob em condições controladas. Assim, é preciso interpretar com cautela tais resultados tendo em vista a difícil previsão dessas respostas em condições de campo. Não obstante, os impactos fisiológicos e moleculares no que respeita o crescimento e as taxas fotossintéticas em plantas de interesse agrônômico são variados e portanto, em clara necessidade de mais detalhados estudos.

4.4 CONCLUSÕES

O presente trabalho apresenta evidências consistentes que a aplicação dos óleos essenciais extraídos das folhas e dos frutos de *X. aromatica*, tanto na forma *in natura* quanto nanoencapsulados, não causaram grandes prejuízos à tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.cv Santa Clara) submetidas aos tratamentos, durante seu estágio vegetativo, em termos de crescimento, parâmetros fotossintéticos e bioquímicos. Apesar de pequenas variações intrínsecas em alguns parâmetros terem sido observadas entre os tratamentos, nesta fase de desenvolvimento, as plantas não tiveram perdas significativas em nenhum dos fatores estabelecidos no trabalho. Isso confirma o potencial desempenho das nanopartículas de óleos essenciais de folhas e frutos de *X. aromatica* no controle de *Bemisia tabaci* em tomateiros. Trabalhos futuros devem se concentrar nos impactos fisiológicos e metabólicos da aplicação das nanopartículas de óleos essenciais de folhas e frutos de *X. aromatica* em outros estádios de crescimento, buscando investigar possíveis alterações nos frutos de tomate.

Registre-se também que estudos associando nanotoxicidade quando a exposição se inicia em estádios diferentes do crescimento vegetal e suas possíveis comparações não foram ainda realizados. Cumpre mencionar que existe uma crescente necessidade de realizar mais pesquisas sobre a interação de nanopartículas e plantas cultivadas, particularmente em estádios mais avançados do desenvolvimento, uma vez estas não são tão frágeis quanto as mudas. Nesse contexto, é plausível sugerir que a absorção e o mecanismo de toxicidade podem ser diferentes. Apesar da nanotecnologia ser uma técnica relativamente onerosa para o setor agrícola, a associação aos óleos essenciais ainda se torna vantajosa no controle de pragas por causa de suas funções de proteção e liberação gradual do princípio ativo que a nanoencapsulação proporciona, aumentando assim a eficiência destes produtos naturais no controle de pragas agrícolas. Ademais, como demonstrado aqui, a aplicação de óleos essenciais causando pouco, se algum, impacto ao crescimento e metabolismo das plantas apresenta-se como ferramenta promissora de manejo integrado de pragas agrícolas. Um melhor entendimento da utilização de nanopartículas associadas aos produtos naturais em culturas agrícolas torna-se uma ferramenta valiosa no controle de pragas visando maior eficácia pesticida e menor impacto ambiental.

Futuras investigações acerca das respostas das plantas aos óleos essenciais nanoencapsulados combinados com flutuações nas condições climáticas (inundações, áridos, níveis elevados de CO₂ dentre outros) faz-se também necessário para destacar a possível interação positiva entre tais óleos essenciais e a proteção das plantas contra esses agentes estressantes. Dessa forma, o presente trabalho estabelece bases para pesquisas futuras, incluindo os demais estádios de desenvolvimento da planta, bem como para outras espécies de planta-alvo de pragas e frente à combinações de estresses.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, D., Braguini, W.L., Kelmer-Bracht, A.M., Ishii-Iwamoto, E.L., 2000. Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize. *J. Chem. Ecol.* 26, 611–624. doi:10.1023/A:1005467903297
- Abraham, D., Francischini, A.C., Pergo, E.M., Kelmer-Bracht, A.M., Ishii-Iwamoto, E.L., 2003. Effects of α -pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 41, 985–991. doi:10.1016/j.plaphy.2003.07.003

- Adams, R. P., 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. 4th ed. Allured Publishing Corporation. Carol Stream, Illinois.
- Amri, I., Gargouri, S., Hamrouni, L., Hanana, M., Fezzani, T., Jamoussi, B., 2012. Chemical composition, phytotoxic and antifungal activities of *Pinus pinea* essential oil. J. Pest Sci. 85, 199–207. doi:10.1007/s10340-012-0419-0
- Andrade, E.H.A., Silva, A.C.M., Carreira, L.M.M., Oliveira, J., Maia, J.G.S., 2004. Essential Oil Composition from Leaf, Fruit and Flower of *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. J. Essent. Oil Bear. Plants 7, 151–154. doi:10.1080/0972-060X.2004.10643382
- Asbahani, A. El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E.H.A., Casabianca, H., Mousadik, A. El, Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F.N.R., Elaissari, A., 2015. Essential oils: From extraction to encapsulation. Int. J. Pharm., 483, 220–243. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.12.069
- Baker, J.M., 2003. The effects of oils on plants. Environmental Pollution, 1, 27-44. [https://doi.org/10.1016/0013-9327\(70\)90004-2](https://doi.org/10.1016/0013-9327(70)90004-2)
- Baldin, E.L.L., Crotti, A.E.M., Wakabayashi, K.A.L., Silva, J.P.G.F., Aguiar, G.P., Souza, E.S., Veneziani, R.C.S., Groppo, M., 2013. Plant-derived essential oils affecting settlement and oviposition of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B on tomato. J. Pest Sci. (2004). 86, 301–308. doi:10.1007/s10340-012-0462-x
- Batish, D.R., Setia, N., Singh, H.P., Kohli, R.K., 2004. Phytotoxicity of lemon-scented eucalypt oil and its potential use as a bioherbicide. Crop Prot. 23, 1209–1214. doi:10.1016/j.cropro.2004.05.009
- Batish, D.R., Singh, H.P., Kohli, R.K., Kaur, S., 2008. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. Forest Ecol. Manage. 256, 2166–2174.
- Bizzo, H.R., Hovell, A.M.C., Rezende, C.M., 2009. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. Quim. Nova 32, 588–594. doi:10.1590/S0100-40422009000300005
- Bouquin, T., Mattsson, O., Naested, H., Foster, R., Mundy, J., 2002. The *Arabidopsis lue1* mutant defines a katanin p60 ortholog involved in hormonal control of microtubule orientation during cell growth. J Cell Sci, 116, 791-801.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RE nº 899, de 29 de maio de 2010. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.
- Christofoli, M., Costa, E.C.C., Bicalho, K.U., de Cássia Domingues, V., Peixoto, M.F., Alves, C.C.F., Araújo, W.L., de Melo Casal, C., 2015. Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae) in *Bemisia tabaci* populations. Ind. Crops Prod. 70, 301–308. doi:10.1016/j.indcrop.2015.03.025
- Clay, D.V., Dixon, F.L., Willoughby I., 2005. Natural products as herbicides for tree establishment. Forestry, 78, 1-9. doi:10.1093/forestry/cpi001

Clemente, Z., Grillo, R., Jonsson, M., Santos, N.Z.P., Feitosa, L.O., Lima, R., Fraceto, L.F., 2014. Ecotoxicological Evaluation of Poly(epsilon-Caprolactone) Nanocapsules Containing Triazine Herbicides. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14, 4911–4917. doi: 10.1166/jnn.2014.8681

Corrêa, J.C.R., Salgado, H.R.N., 2011. Atividade inseticida das plantas e aplicações: Revisão. *Rev. Bras. Plantas Med.* 13, 500–506. doi:10.1590/S1516-05722011000400016

Cross, J.M., Von Korff, M., Altmann, T., Bartzetko, L., Sulpice, R., Gibon, Y., Palacios, N., Stitt, M. Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiol*, v. 142, n. 4, p. 1574-1588, 2006.

DaMatta, F.; Loos, R.; Silva, E.; Loureiro, M.; Ducatti, C., 2002. Effects of soil water deficit and nitrogen nutrition on water relations and photosynthesis of pot-grown *Coffea canephora* Pierre. *Trees*, 16,555-558.

De Feo, V., De Simone, F., Senatore, F., 2002. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry* 61, 573–578. doi:10.1016/S0031-9422(02)00284-4

Falco, W.F., Queiroz, A.M., Fernandes, J., Botero, E.R., Falcão, E.A., Guimarães, F.E.G., Peko, J.M., Oliveira, S.L., Colbeck, I., Caires, A.R.L., 2015. Interaction between chlorophyll and silver nanoparticles: A close analysis of chlorophyll fluorescence quenching. *J Photochem. Photobiol. A Chem.* 299, 203–209. doi:10.1016/j.jphotochem.2014.12.001

Fernie, A.R. Roscher, A.; Ratcliffe, G.; Kruger, N.J., 2001. Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta*, 212, 250-263. Doi: 10.1007/s004250000386

Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J. P.; Ammoury, N. Benita, S., 1989. Nanocapsule formation by interfacial deposition following solvent displacement. *International J. Pharm.*, 55, R1-R4. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0)

Fritz, C; Palacios-Rojas, N.; Feil, R.; Stitt, M., 2006. Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *Plant J.*, 46, 533-548. Doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02715.x

Gibon, Y, Blaesing, O.E, Hannemann, J, Carillo, P, Hohne, M, Hendriks J.H.M, Palacios, N, Cross, J, Selbig, J, Stitt, M., 2004. A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: Comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell*,16, 3304-3325. Doi: 10.1105/tpc.104.025973.

Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P., 2007. Plantas Medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím. Nova*, 30, 374-381. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>.

Grichi, A., Nasr, Z., Khouja, M.L., 2016. Phytotoxic Effects of Essential Oil from *Eucalyptus lehmanii* against Weeds and its Possible Use as a Bioherbicide 5, 17–23.

Haig T., 2008. Allelochemicals in Plants. In: Zeng R.S., Mallik A.U., Luo S.M. (eds) Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry. Springer, New York, NY.

Jorge, T.F., Rodrigues, J.A., Caldana, C., Schmidt, R., van Dongen, J.T., Thomas-Oates, J., António, C., 2016. Mass spectrometry-based plant metabolomics: Metabolite responses to abiotic stress. *Mass Spectrometry Reviews*, 35, 620-649.

Kaur, S., Singh, H.P., Mittal, S., Batish, D.R., Kohli, R.K., 2010. Phytotoxic effects of volatile oil from *Artemisia scoparia* against weeds and its possible use as a bioherbicide. *Ind. Crops Prod.* 32, 54–61. doi:10.1016/j.indcrop.2010.03.007

Kissoudis, C., van de Wiele, C., Visser, R.G.F., van der Linden, G., 2014. Enhancing crop resilience to combined abiotic and biotic stress through the dissection of physiological and molecular crosstalk. *Frontiers in Plant Science*, 5.

Kookana, R.S., Boxall, A.B.A., Reeves, P.T., Ashauer, R., Beulke, S., Chaudhry, Q., Cornelis, G., Fernandes, T.F., Gan, J., Kah, M., Lynch, I., Ranville, J., Sinclair, C., Spurgeon, D., Tiede, K., Van Den Brink, P.J., 2014. Nanopesticides: Guiding principles for regulatory evaluation of environmental risks. *J. Agric. Food Chem.* 62, 4227–4240. doi:10.1021/jf500232f

Kordali, S., Usanmaz, A., Cakir, A., Komaki, A., Ercisli, S., 2016. Antifungal and Herbicidal Effects of Fruit Essential Oils of Four *Myrtus communis* Genotypes. *Chem. Biodivers.* 13, 77–84. doi:10.1002/cbdv.201500018

Lago, J.H.G., De Ávila, P., Moreno, P.R.H., Limberger, R.P., Apel, M.A., Henriques, A.T., 2003. Analysis, comparison and variation on the chemical composition from the leaf volatile oil of *Xylopia aromatica* (Annonaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 669–672. Doi:10.1016/S0305-1978(02)00267-3

Lija-Escaline, J.; Senthil-Nathan, S. Thanigaivel, A.; Pradeepa, V.; Vasantha-Srinivasan, P.; Ponsankar, A.; Edwin, E.S.; Selin-Rani, S.; Abdel-Megeed, A., 2015. Physiological and biochemical effects of botanical extract from *Piper nigrum* Linn (Piperaceae) against the dengue vector *Aedes aegypti* Liston (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.*, 114, 4239-4249. Doi: 10.1007/s00436-015-4662-1.

Lima, A.L.S.; DaMatta, F.M.; Pinheiro, H.A.; Totola, M.R.; Loureiro, M.E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ Exp Bot*, v. 47,p. 239-247, 2002.

Maas, P.; Lobão, A.; Rainer, H. *Annonaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110555>>. Acesso em: 22 Mai. 2016.

Maia, J.G.S.; Andrade, E.H.A.; Silva, A.C.; Oliveira, J.; Carreira, L.M.M. Araújo, J.S., 205. Leaf volatile oils from four Brazilian *Xylopia* species. *Flav. Frag. J.*, 20, 474-747.

Maji, T., Baruah, I., Dube, S., Hussain, M., 2007. Microencapsulation of *Zanthoxylum limonella* oil (ZLO) in glutaraldehyde crosslinked gelatin for mosquito repellent application. *Bioresour. Technol.* 98, 840–844. Doi:10.1016/j.biortech.2006.03.005.

Maxwell, K.; Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. *J. Experim. Botany*, 51, 659-668. Doi: 10.1093/jexbot/51.345.659.

Morais, L. A. S. de; Marinho-Prado, J.S., 2016. Plantas com atividade inseticida. In: Halfeld-Vieira, B. de A.; Marinho-Prado, J.S., Nechet, K. de L.; Morandi, M. A. B.; Bettiol, W. *Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas*. Brasília, DF: Embrapa, Cap. 19. p. 542-593.

Moreira, I. C.; Roque, N. F.; Vilegas, W.; Zalewski, C.; Lago, J. H. G.; Funasaki, M., 2013. Genus *Xylopi*a (Annonaceae): Chemical and Biological Aspects. *Chem Biodivers.*, 10, 1921-1943. Doi: 10.1002/cbdv.201100308.

Nguemtchouin, M.M.G., Ngassoum, M.B., Ngamo, L.S.T., Gaudu, X., Cretin, M., 2010. Insecticidal formulation based on *Xylopi*a *aethiopi*c*a* essential oil and kaolinite clay for maize protection. *Crop Prot.* 29, 985–991. Doi:10.1016/j.cropro.2010.06.007

Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Gibon, Y., Sulpice, R., Lytovchenko, A., Fisahn, J., Graham, J., Ratcliffe, R.G., Sweetlove, L.J., Fernie, A.R., 2007. Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant J.*, 50, 1093-1106. Doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03115.x

Obata, T., Fernie, A.R., 2012. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cell Mol Life Sci.*, 69, 3225-3243.

Obiri, D.D.; Osafo, N.; Ayande, P.G.; Antwi, A.O., 2014. *Xylopi*a *aethiopi*c*a* (Annonaceae) fruit extract suppresses Freund's adjuvant-induced arthritis in Sprague-Dawley rats. *J.Ethnopharmacol.*, 152, 522-531. Doi: 10.1016/j.jep.2014.01.035

Odukkathil, G., Vasudevan, N., 2013. Toxicity and bioremediation of pesticides in agricultural soil. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 12, 421–444. Doi: 10.1007/s11157-013-9320-4.

Oliveira, H.C., Stolf-moreira, R., Bueno, C., Martinez, R., 2015. Nanoencapsulation Enhances the Post- Emergence Herbicidal Activity of Atrazine against Mustard Plants . *Plos One*, 10, 1–12. Doi:10.1371/journal.pone.0132971.

Pavela, R., Benelli, G., 2016. Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. *Trends Plant Sci.* 21, 1000–1007. Doi:10.1016/j.tplants.2016.10.005

Peres, M. C., 2015. Nanoencapsulamento do óleo essencial das folhas e frutos de *Xylopi*a *aromática* Lamm. e sua atividade frente a oviposição de *Bemisia tabaci* (genn.) (hemiptera: aleroydidae) biótipo B. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, Rio Verde.

Pinto, N.O.F., Rodrigues, T.H.S., Pereira, R.C.A., Silva, L.M.A.S., Cáceres, C.A., Azeredo, H.M.C., Muniz, C.R., Brito, E.S., Canuto, K.M., 2016. Production and physico-chemical characterization of nanocapsules of the essential oil from *Lippia*

- sidoides* Cham . Ind. Crops Prod. 86, 279–288. doi:10.1016/j.indcrop.2016.04.013
- Porra, R.; Thompson, W.; Kriedemann, P., 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, 975, 384–394. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(89\)80347-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80347-0).
- Pratt, L.H., Kelmenson, P.M., Lazarova, G.L., Kubota, T., 1997. The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant, Cell Env.*, 20, 672–677.
- Rana, S., Kalaichelvan, P.T., 2013. Ecotoxicity of Nanoparticles. *ISRN Toxicol.* 2013, 1–11. Doi:10.1155/2013/574648.
- Rao, J.P., Geckeler, K.E., 2011. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog. Polym. Sci.* 36, 887–913. Doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001
- Rico, C. M.; Majumdar, S.; Duarte-Gardea, M.; Peralta-Videa, J.L.; Gardea-Torresdey, J.L., 2011. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *J Agri Food Chem*, 59, 3485–3498. Doi:10.1021/jf104517j.Interaction
- Saito, M.L. 2004. As plantas praguicidas, alternativa para o controle de pragas na agricultura. *Informativo Embrapa Meio Ambiente, Jaguariuna, SP, jul/ago, p.1-3.*
- Schaffazick, S.R.; Guterres, S.S., De Lucca Freitas, L., Pohlmann, A.R., 2003. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova* 26, 726–737. Doi:10.1590/S0100-40422003000500017
- Sherry, M.; Charcosset, C.; Fessi, H.; Grige-Gerges, H., 2013. Essential oils encapsulated in liposomes: a review. *J. Liposome Res.*, 23, 268-275.
- Simões, C. M. O.; Spitzer, V., 2000. Óleos voláteis. *In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A. & Petrovick, P. R. (ed.) Farmacognosia. Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, 2ª edição, 387-416.*
- Singh Sekhon, B., 2014. Nanotechnology in agri-food production: An overview. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 7, 31–53. Doi:10.2147/NSA.S39406
- Sinha, V.R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., Trehan, A., 2004. Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: An overview. *Int. J. Pharm.* 278, 1–23. Doi:10.1016/j.ijpharm.2004.01.044
- Souza, A.P. De; Vendramim, J.D., 2005. Efeito translaminar, sistêmico e de contato de extrato aquoso de sementes de nim sobre *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B em tomateiro. *Neotrop. Entomol.* 34, 83–87. Doi:10.1590/S1519-566X2005000100012
- Sparks, T.C., 2013. Insecticide discovery: an evaluation and analysis. *Pestic. Biochem. Phys.*, 107, 8–17. Doi: doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.05.012

Stashenko, E.E., Jaramillo, B.E., Martínez, J.R., 2004. Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopia aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 1025, 105–113. Doi:10.1016/j.chroma.2003.10.059

Viegas, C., 2003. Terpenos com atividade inseticida: Uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quim. Nova* 26, 390–400. Doi:10.1590/S0100-40422003000300017

Volpe, H.X., Fazolin, M., Garcia, R.B., Magnani, R.F., Barbosa, J.C., Miranda, M.P., 2016. Efficacy of essential oil of *Piper aduncum* against nymphs and adults of *Diaphorina citri*. *Pest Manag. Sci.* 72, 1242–1249. Doi:10.1002/ps.4143

APÊNDICE

METODOLOGIA DETALHADA DAS ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Determinação do conteúdo de açúcares

Os teores de glicose, frutose e sacarose foram determinados segundo metodologia descrita anteriormente (Fernie et al., 2001). Em uma microplaca, foram adicionados 160,0 μL de mix de quantificação (HEPES/KOH 71,43 mM com MgCl_2 2,14 mM pH 7,0, ATP 2,41 mM, NADP^+ 1,07 mM, e 0,54 unidades de desidrogenase da glicose-6-fosfato - G6PDH ($5,0 \text{ mg mL}^{-1}$)) e 50,0 μL do extrato. Foram feitas leituras das absorvâncias a 340 nm com intervalos entre leituras de um minuto. Uma vez ocorrida a estabilização da densidade óptica (OD), adicionaram-se 5,0 μL , sequencialmente, das seguintes enzimas: hexocinase (1,5 U por reação), fosfoglicose isomerase (0,7 U por reação) e invertase (5,0 unidades (U) por reação). A aplicação de cada enzima procedeu após a estabilização da OD de cada um dos açúcares, respectivamente quantificados. Para estimar a concentração dos respectivos açúcares, resultados expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$, utilizou-se a seguinte equação:

$$\mu\text{mol NADPH} = \Delta\text{OD} \cdot (2,85 \cdot 6,22) \quad (06)$$

Determinação do conteúdo de amido

A concentração de amido foi determinada como descrito previamente (Ferne et al., 2001). Aos tubos contendo a solução S resultante da extração etanólica e o NaOH 0,1 M (mesmo extrato utilizado para quantificação de proteínas), foram adicionados 70,0 μL de ácido acético 1 M para neutralização do extrato, e homogeneizado em vortex. Uma alíquota de 40,0 μL da suspensão foi retirada e colocada em uma microplaca, que continha 60,0 μL do mix de hidrolise do amido composto pelas enzimas amiloglicosidase (0,14 U μL^{-1}) e α -amilase (0,01 U μL^{-1}) ressuspendidas em tampão acetato de sódio 0,5 M pH 4,9. A microplaca foi vedada com fita de alumínio (3M Modelo 425®) e incubada por 1 h a 60 °C, com leve agitação. Posteriormente, a microplaca foi centrifugada por 30 s a 10000 rpm. Uma vez ocorrido a hidrólise do amido em glicose, 15,0 μL da suspensão com cada amostra foram transferidos para uma nova placa seguindo com adição de 160,0 μL do meio de reação composto por tampão HEPES/KOH 1M pH 7,0 MgCl_2 30,0 mM, ATP 109,0 mM, NADP⁺ 48,4 mM e 56 unidades de desidrogenase da glicose-6-fosfato– G6PDH (0,7 U μL^{-1}). Por meio de um leitor de microplacas, mencionado anteriormente, foram lidas as absorbâncias das respectivas amostras a 340 nm, com 1 minuto de intervalo entre leituras. Uma vez estabilizado a OD, foram adicionados aos poços 5,0 μL de hexocinase (2 U por reação). O conteúdo de amido foi então calculado com a mesma equação utilizada para determinação de açúcares. Os resultados expressos em μmol de glicose g^{-1} MF.

Determinação do teor de malato

Os conteúdos de malato foram determinados como descrito anteriormente (Nunes-Nesi et al., 2007). Em cada reação foram adicionados 25,0 μL de tampão Tricina/KOH 0,4 M com MgCl_2 20,0 mM pH 9,0, 10,0 μL de brometo de metiltiazolildifeniltetrazólio (MTT, 10,0 mM), 5,0 μL de NAD⁺ (60,0 mM), 2,0 μL de fenazinaetosulfato (PES, 20,0 mM), 5,0 μL de Triton X-100 10% (v/v), 28,0 μL de H₂O, adicionando-se ainda 25,0 μL da solução S (amostra). Por meio de um leitor de microplacas, as leituras foram feitas a 570 nm com intervalo entre leituras de 1 min. Uma vez estabilizado a OD, foi adicionado aos poços 5,0 μL de malato desidrogenase (MDH - 1,0 U por reação). A determinação dos níveis de malato foi feita a partir da

curva de calibração utilizando o ácido L-málico (5,0 mM). Para a confecção da curva, utilizou-se os volumes 0,0, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 μL utilizando água destilada para ajuste do volume final de 10,0 μL . Cada 1,0 μL de solução de ácido L-málico (5,0 mM) equivale a 5,0 nmol de malato. Os resultados desse ácido orgânico obtidos foram expressos em nmol g^{-1} MF.

Determinação do teor de clorofilas (*a* e *b*):

Foram adicionados 50,0 μl da solução S obtida na extração etanólica e 120,0 μl de EtOH 98% em uma microplaca de 96 poços. As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro de microplacas ELISA (VersaMax™) a 645 e 665 nm. Os teores de Clorofilas *a* e *b* foram determinados, imediatamente após a extração etanólica e ao abrigo de luz, a partir das equações:

(07)

$$\text{Clorofila } a = 5,21 \cdot A_{665} - 2,07 \cdot A_{645}$$

(08)

$$\text{Clorofila } b = 9,29 \cdot A_{645} - 2,74 \cdot A_{665}$$

Em que, A_{665} representa a absorvância obtida a 665 nm e A_{645} a absorvância em 645 nm.

A partir dos dados obtidos, determinou-se o teor de clorofilas totais e razão entre clorofilas *a* e clorofilas *b* (Chl *a/b*).

Determinação dos conteúdos de aminoácidos:

Em uma microplaca, foram adicionados 50,0 μl da solução S obtida na extração etanólica de cada amostra, 50,0 μl de solução tampão citrato de sódio (Na-citrato 1,0 M + 0,2% ácido ascórbico) e 100,0 μl de solução de Ninhydrina (1% em EtOH 70%). A curva padrão foi preparada utilizando Leucina 1,0 mM em EtOH 70% nos volumes de 0,0, 2,0, 5,0, 10,0, 20,0, 30,0, 50,0 μl ajustando para o volume final para 50,0 μl com EtOH 70% (0,00, 0,04, 0,10, 0,20, 0,40, 1,00 mM, respectivamente). Em seguida, a microplaca foi vedada com fita metálica e submetida a aquecimento em

termomix por 20 minutos a 95 °C. As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro ELISA (VersaMax™) a 550 e 570 nm.

Determinação dos teores de proteínas solúveis totais

O teor de proteínas solúveis totais foi determinado segundo Gibon e colaboradores (2004). Inicialmente, o precipitado (Pellet) resultante da extração etanólica, fração insolúvel em etanol, foi lavado com EtOH 70%, seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante resultante, de modo a garantir qualquer resíduo de pigmento ou fração solúvel da extração etanólica. Posteriormente, o pellet foi ressuspensionado em 400,0 µL de NaOH 0,1 M e homogeneizado em vortex. Os microtubos foram incubados por 1 h a 95 °C, sob agitação constante e, após centrifugados por 5 min, 14.000 rpm, a 4 °C.

Em uma microplaca, foi colocada a alíquota de 5,0 µL do sobrenadante retirado dos microtubo, seguindo com adição 180,0 µL da solução de Bradford em cada poço. O comprimento de onda utilizado para leitura da microplaca foi de 595 nm. Pôde-se determinar a concentração de proteína nas amostras, após a confecção da curva padrão com 5,0 µL de albumina de soro bovino (BSA), nas concentrações de 0,0, 0,1, 0,25, 0,35, 0,50, 0,60, 0,75, 1,0 mg µL⁻¹. Os resultados foram expressos em mg g⁻¹ MF.

Determinação da concentração de nitrato

Para a quantificação de nitrato, utilizou-se a metodologia descrita previamente (Fritz et al., 2006). Em cada reação foi adicionado 10,0 µL de tampão fosfato 1 M pH 7,5, 0,5 µL de NADPH 50,0 mM preparado em NaOH 5,0 mM, 2,0 µL de nitrato redutase (5,0 U mL⁻¹) preparada em tampão fosfato 0,1 M pH 7,5, 78,5 µL de H₂O e 10,0 µL da solução S. Foram preparadas duas reações para cada amostra, em uma delas foi adicionado a nitrato redutase, na outra o volume da solução enzimática foi substituído por H₂O. A reação enzimática promove a redução do nitrato a nitrito. Dessa forma, o íon nitrito já presente na amostra pode ser quantificado e descontado do nitrito total quantificado, garantindo que apenas a quantificação do nitrito oriundo da reação enzimática. Uma vez montada a placa com as duas reações em paralelo, as placas foram incubada no escuro, por 30 min, a 25 °C. Posteriormente, adicionaram-se 15,0 µL de

fenazinametossulfato (PMS) 0,25 mM e incubou novamente por 20 min a 25 °C. Após esse período, acrescentaram à reação 120,0 µL de um mix contendo sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 3,0 M (m/v) e dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina – NNEDA 0,02% (m/v) na proporção de 1:1. Após uma terceira incubação por 10 min a 25 °C, as absorbâncias foram determinadas no comprimento de onda de 540 nm em um leitor de microplacas. A determinação do conteúdo de nitrato foi possível a partir da curva de calibração utilizando nitrato de potássio (KNO₃) como padrão nas seguintes concentrações: 0,0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 e 1,6 µM. Os resultados foram expressos em µmol g⁻¹ de MF.