

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
AGRÁRIAS-AGRONOMIA**

**EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Zanthoxylum  
rhoifolium* e *Zanthoxylum riedelianum*  
NANOENCAPSULADOS EM *Bemisia tabaci* (GENNADIUS)  
BIÓTIPO B.**

Autor: Marcela Christofoli  
Orientadora: Dra. Cristiane de Melo Cazal

**RIO VERDE - GO  
Fevereiro – 2014**

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
AGRÁRIAS-AGRONOMIA**

**EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Zanthoxylum  
rhoifolium* e *Zanthoxylum riedelianum*  
NANOENCAPSULADOS EM *Bemisia tabaci* (GENNADIUS)  
BIÓTIPO B.**

Autor: Marcela Christofoli  
Orientadora: Dra. Cristiane de Melo Cazal

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde - Área de concentração Agronomia.

**RIO VERDE – GO  
Fevereiro – 2014**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação  
(Almira de Araújo Medeiros – CRB1 2.327)

632.96  
C556e

Christofoli, Marcela.

Efeito dos óleos essenciais de *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum riedelianum* nanoencapsulados em *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B./ Marcela Christofoli. -- 2014.

92f.: graf., tabs.

Orientador: Cristiane de Melo Cazal.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Agrárias – Agronomia, Rio Verde, 2014.

Bibliografia: f. 6 - 92.

1. Mosca-branca, óleo essencial, produtos naturais, nanotecnologia. – Dissertação (Mestrado). I. Cazal, Cristiane de Melo. II. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde.

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
AGRÁRIAS-AGRONOMIA**

EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Zanthoxylum  
rhoifolium* E *Zanthoxylum riedelianum*  
NANOENCAPSULADOS EM *Bemisia tabaci* (GENNADIUS)  
BIÓTIPO B

Autora: Marcela Christofoli  
Orientadora: Dra. Cristiane de Melo Cazal

TITULAÇÃO: Mestre em Ciências Agrárias-Agronomia - Área de  
Concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado

APROVADA em 27 de fevereiro de 2014.

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Jaqueline Magalhães Pereira  
Avaliadora externa  
UFG/GO

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Cássia Cristina Fernandes Alves  
Avaliadora interna  
IF Goiano/RV

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Cristiane de Melo Cazal  
Presidente da banca  
IF Goiano/Iporá

*A Deus, pelas bênçãos recebidas:*

*A minha linda filha Bárbara, e ao meu esposo Rodrigo, pelo amor, paciência e compreensão nos momentos de ausência:*

*Aos meus pais Luiz e Vilma, por todo amor e dedicação:*

*A minha irmã Rosane, por tudo que significa para mim.*

*Com Amor,*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

Ao meu marido Rodrigo e a minha filha Bárbara que me incentivaram e apoiaram nos momentos difíceis.

Aos meus queridos pais, que sempre me orientaram e apoiaram em meus estudos.

À minha querida orientadora e professora, Dr<sup>a</sup>. Cristiane de Melo Cazal, que acreditou em minha capacidade intelectual, confiou em meu potencial para a pesquisa e muito me ensinou com dedicação, sabedoria e paciência e principalmente pela sua eterna amizade.

À professora Dr<sup>a</sup>. Cássia Cristina Fernandes Alves pelo acolhimento em seu laboratório, e pelos ensinamentos e colaboração.

Ao professor Dr. Márcio Fernandes Peixoto, pela colaboração, paciência e amizade.

À professora Dr<sup>a</sup>. Eliana Dias Quintela, que através da EMBRAPA, contribuiu na doação das ninfas de mosca-branca para os ensaios biológicos.

À Solange e em especial ao Antônio Carlos da AGROTEC, pela imensa colaboração nas extrações e óleo essencial.

Ao Valtenir, Darcílio, Marcos, Rodrigo, Bárbara e Honestino pela imensa colaboração na coleta das folhas para extração dos óleos.

Ao Sr. Edinho, e a Sr<sup>a</sup> Luzia e seus familiares, pela imensa colaboração permitindo a coleta de material vegetal em suas propriedades.

Ao técnico Gabriel da Central Analítica que muito contribuiu para este trabalho.

À Vanessa e Keylla da UFSCAR que muito contribuíram com as análises químicas de CG-MS.

À Dr<sup>a</sup>. Tatiane e à Caroline do laboratório LabMic da UFG, pela grande contribuição nas análises do Microscópio Eletrônico de Varredura.

Ao professor Dr. Moacir Rossi Forin por sua imensa colaboração neste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Entomologia de IF Goiano – Câmpus Rio Verde, Simone, Estevão, Wenderson, Caio, Cassia, Janini, e de todos os outros que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais, Marcelo, Juliana, Elizabeth, Cristina, Elisângela e Nelcimar, pelo grande apoio e colaboração.

Aos meus colegas do laboratório de Química Orgânica do Câmpus Iporá, Eliângela, Marcos, Ramon, Raiane e Jéssica, pela imensa colaboração e boa convivência.

Às minhas grandes amigas Elisângela e Nelcimar pelo apoio nos momentos difíceis, aconselhamento e eterna amizade.

Aos meus colegas de mestrado Marília, Silvânia, Vanessa, Cristiane, Simone, Luiz, Viviane, Nulciene, Paula, Priscila, Marília, Cíntia, Colemar, e a todos colegas da Pós-Graduação pelos momentos compartilhados nessa jornada.

Às minhas queridas amigas e alunas de iniciação científica, Dawanne e Eliângela, pela importante colaboração e grande apoio neste trabalho.

À querida Aline, pelo carinho, amizade e boa convivência.

A todos professores da Pós-Graduação, cujas disciplinas contribuíram para a realização desta pesquisa através das inúmeras leituras, discussões e trabalhos, recebam minha admiração, respeito e meu muito obrigado.

À FAPEG pela concessão da bolsa de estudos, providencial para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias e ao Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia Goiano, pela oportunidade de aprimoramento profissional, intelectual e pessoal.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para mais uma etapa de minha vida.

Obrigada!

## BIOGRAFIA DO AUTOR

Marcela Christofoli, filha de Luiz Christofoli e Vilma Terezinha Christofoli, graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Goiás – Unidade Universitária de Iporá - GO. Possui especialização em Metodologia do Ensino Fundamental e especialização em Tecnologias Aplicadas ao Ensino de Biologia, ambas pela Universidade Federal de Goiás. Mestre em Ciências Agrárias pelo Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia Goiano – área de concentração Agronomia.



## ÍNDICE

	Páginas
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS .....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. Óleos essenciais .....	4
2.2. Nanotecnologia.....	6
2.3. A família Rutaceae e o gênero <i>Zanthoxylum</i> .....	9
2.4. <i>Bemisia tabaci</i> .....	12
3. OBJETIVOS .....	16
4. METODOLOGIA .....	16
4.1. Coleta do material vegetal.....	16
4.2. Obtenção do óleo essencial.....	16
4.3. Análise química do óleo essencial.....	17
4.4. Quantificação do óleo essencial .....	17
4.4.1. Validação do método analítico para quantificação do óleo essencial das folhas de <i>Z. rhoifolium</i> e <i>Z. riedelianum</i> por espectroscopia UV/VIS.....	17
4.4.2. Preparo das soluções padrões para construção da curva analítica .....	18
4.4.3. Preparo das soluções padrão para determinação da exatidão e precisão do método analítico.....	18
4.5. Preparo das nanopartículas.....	19
4.6. Caracterização das Nanopartículas .....	21

4.6.1. Determinação da eficiência de encapsulação (EE%) do óleo essencial .....	21
4.6.2. Determinação do pH.....	22
4.6.3. Determinação do Potencial Zeta .....	22
4.6.4. Determinação do diâmetro das partículas .....	22
4.6.5. Avaliação morfológica das suspensões de nanopartículas .....	22
4.6.6. Estudo da degradação acelerada pela luz UV .....	23
4.6.7. Estudos da liberação <i>in vitro</i> .....	23
4.7. Ensaio Biológico .....	24
4.7.1. Plantio e transplante das mudas de tomate hospedeiras.....	24
4.7.2. Aplicação do óleo essencial e infestação com <i>B. tabaci</i> .....	25
4.7.3. Concentração e tempo letal .....	26
4.8. Delineamento Experimental .....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
5.1. Teor e aspecto físico do óleo essencial das folhas de <i>Z. rhoifolium</i> e <i>Z. riedelianum</i> .....	27
5.2. Análises químicas dos óleos essenciais.....	28
5.2.1. Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Z. rhoifolium</i> .....	28
5.2.2. Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Z. riedelianum</i> .....	31
5.3. Quantificações dos óleos essenciais.....	34
5.3.1. Validação do método analítico para quantificação do óleo essencial das folhas de <i>Z. rhoifolium</i> por espectroscopia UV-VIS. ....	35
5.3.2. Validação do método analítico para quantificação do óleo essencial das folhas de <i>Z. riedelianum</i> por espectroscopia UV-VIS.....	37
5.4. Nanopartículas dos óleos essenciais de <i>Z. rhoifolium</i> e <i>Z. riedelianum</i> .....	39
5.5. Caracterização das nanopartículas .....	40
5.5.1. Resultados do pH, Diâmetro de Partículas (DP), Potencial Zeta (PZ), e eficiência de encapsulação (EE%).....	41
5.5.2. Morfologia das nanopartículas .....	46
5.5.3. Estudo da degradação acelerada pela luz UV .....	48
5.5.4. Estudo da liberação <i>in vitro</i> .....	50
5.6. Ensaio biológicos .....	53
5.6.1. Ensaio biológico I .....	53
5.6.2. Ensaio Biológico II.....	55
5.6.3. Ensaio Biológico III .....	58
6. CONCLUSÃO .....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62

## ÍNDICE DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1: Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> .....	20
Tabela 2: Planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> .....	20
Tabela 3: Formulações de nanoesferas à base de óleo essencial das folhas de <i>Z. rhoifolium</i> .....	21
Tabela 4: Rendimento da hidrodestilação das folhas de <i>Z. rhoifolium</i> .....	27
Tabela 5: Rendimento da hidrodestilação das folhas de <i>Z. riedelianum</i> .....	28
Tabela 6: Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de <i>Z. rhoifolium</i> .....	30
Tabela 7: Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de <i>Z. riedelianum</i> .....	33
Tabela 8: Precisão e exatidão obtidas na construção da curva de calibração por padronização externa.....	36
Tabela 9: Precisão [DPR (%)] de amostras do óleo essencial de <i>Z. rhoifolium</i> usadas na validação do método analítico.....	36
Tabela 10: Exatidão (%) de amostras do óleo essencial de <i>Z. rhoifolium</i> usadas na validação do método analítico.....	37
Tabela 11: Precisão e exatidão obtidas na construção da curva de calibração por padronização externa.....	38
Tabela 12: Precisão [DPR (%)] de amostras do óleo essencial de <i>Z. riedelianum</i> usadas na validação do método analítico.....	38
Tabela 13: Exatidão (%) de amostras do óleo essencial de <i>Z. riedelianum</i> usadas na validação do método analítico.....	39
Tabela 14: Resultados do pH, diâmetro de partículas (DP), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulação (EE%) para as diferentes formulações de nanopartículas ( $\pm$ Desvio Padrão).....	41
Tabela 15: Estimativa dos efeitos e valores de p para variação de eficiência de encapsulação (EE%) das nanopartículas de PCL contendo óleo essencial de <i>Z. riedelianum</i> .....	45
Tabela 16: Resultados do pH, diâmetro de partículas (DP), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulação (EE%), para as diferentes formulações de nanoesferas de PCL preparadas com o óleo essencial das folhas de <i>Z. riedelianum</i> ( $\pm$ Desvio Padrão).....	45
Tabela 17: Resultados do pH, diâmetro de partículas (DP), potencial zeta (PZ) e	

eficiência de encapsulação (EE%), para as diferentes formulações de nanoesferas de PCL preparadas com o óleo essencial das folhas de <i>Z. rhoifolium</i> ( $\pm$ Desvio Padrão).....	46
Tabela 18. Ensaio biológico I: Número médio de ovos (O) e ninfas (N) de <i>B. tabaci</i> e eficiência (E%) de controle em razão da aplicação do óleo essencial das folhas de <i>Z. rhoifolium</i> e <i>Z. riedelianum</i> em tomateiros, no teste com escolha.....	54
Tabela 19. Ensaio biológico I: Número médio de ovos (O) e ninfas (N) de <i>B. tabaci</i> e eficiência (E%) de controle em razão da aplicação do óleo essencial das folhas de <i>Z. rhoifolium</i> e <i>Z. riedelianum</i> em tomateiros, no teste sem escolha.....	55
Tabela 20. Ensaio biológico II: Número médio de ovos (O) e ninfas (N) de <i>B. tabaci</i> e eficiência (E%) de controle em razão da aplicação do óleo essencial das folhas de <i>Z. rhoifolium</i> e <i>Z. riedelianum</i> em tomateiros, no teste com escolha.....	56
Tabela 21. Ensaio biológico II: Número médio de ovos (O) e ninfas (N) de <i>B. tabaci</i> e eficiência (E%) de controle em razão da aplicação do óleo essencial das folhas de <i>Z. rhoifolium</i> e <i>Z. riedelianum</i> em tomateiros, no teste sem escolha.....	57
Tabela 22. Ensaio biológico III: Média do número de ovos (O) e ninfas (N) de <i>B. tabaci</i> e eficiência (E%) de controle em razão da aplicação das nanoesferas à base de óleos essenciais das folhas de <i>Z. rhoifolium</i> e <i>Z. riedelianum</i> em tomateiros, no teste com escolha.....	59
Tabela 23. Ensaio biológico III: Média do número de ovos (O) e ninfas (N) de <i>B. tabaci</i> e eficiência (E%) de controle em razão da aplicação das nanoesferas à base de óleos essenciais das folhas de <i>Z. rhoifolium</i> e <i>Z. riedelianum</i> em tomateiros, no teste sem escolha.....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: (a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; (b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; (c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; (d) fármaco adsorvido ou disperso na matriz polimérica das nanoesferas. (Adaptado de SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003).....	7
Figura 2: Caule de <i>Z. riedelianum</i> (Rutaceae) (A), <i>Z. rhoifolium</i> (B) e <i>Z. riedelianum</i> (C).....	10
Figura 3: <i>B. tabaci</i> adulto (A e B), ninfas e ovos (C).....	13
Figura 4: Esquema de preparo de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação.....	19
Figura 5: Determinação da eficiência de encapsulação pela técnica de filtração-centrifugação.....	21
Figura 6: Câmara Ultravioleta.....	23
Figura 7: Mudas de tomate em bandejas de polipropileno (A) e transplantadas (B) em casa de vegetação do laboratório de cultura de tecidos do IF Goiano <i>campus</i> Rio Verde.....	25
Figura 8: Ensaio biológico com <i>B. tabaci</i> : teste sem escolha (A); teste com escolha (B).....	26
Figura 9: Cromatograma obtido no GC-EM para o óleo essencial das folhas de <i>Z. rhoifolium</i> . Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 100° C; tempo inicial de 6,0 min, a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 250° C, permanecendo nesta temperatura por 4,0 min.....	29
Figura 10: Ampliação do cromatograma obtido no GC-EM para o óleo essencial das folhas de <i>Z. rhoifolium</i> . Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 100° C; tempo inicial de 6,0 min, a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 250° C, permanecendo nesta temperatura por 4,0 min.....	29
Figura 11: Cromatograma obtido no GC-EM para o óleo essencial das folhas de <i>Z. riedelianum</i> . Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 100° C; tempo inicial de 6,0 min, a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 250° C, permanecendo nesta temperatura por 4,0 min.....	31

Figura 12: Ampliação do cromatograma obtido no GC-EM para o óleo essencial das folhas de <i>Z. riedelianum</i> . Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 100° C; tempo inicial de 6,0 min, a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 250° C, permanecendo nesta temperatura por 4,0 min.....	32
Figura 13: Espectro de varredura por espectroscopia UV-VIS do óleo essencial de <i>Z. rhoifolium</i> ( $\lambda_{\max}$ =247,72 nm) em hexano.....	34
Figura 14: Espectro de varredura por espectroscopia UV-VIS do óleo essencial de <i>Z. riedelianum</i> ( $\lambda_{\max}$ =245,93 nm) em hexano.....	35
Figura 15: Curva de calibração do óleo essencial de <i>Z. rhoifolium</i> ( $\lambda_{\max}$ =247,72 nm) em hexano.....	36
Figura 16: Curva de calibração do óleo essencial de <i>Z. riedelianum</i> ( $\lambda_{\max}$ =245,93 nm) em hexano.....	38
Figura 17: Estrutura do polímero poli- $\epsilon$ -(caprolactona) (PCL).....	39
Figura 18: Espectro de varredura do óleo essencial de <i>Z. rhoifolium</i> ( $\lambda_{\max}$ =247,72 nm) e dos componentes das nanopartículas (PCL, Span 60, Oleato de isodecila e Tween 80) em hexano.....	40
Figura 19: Espectro de varredura do óleo essencial de <i>Z. riedelianum</i> ( $\lambda_{\max}$ =245,93 nm) e dos componentes das nanopartículas (PCL, Span 60, Oleato de isodecila e Tween 80) em hexano.....	41
Figura 20: Efeito de fatores sobre o pH das nanopartículas de PCL contendo óleo essencial de <i>Z. riedelianum</i> .....	42
Figura 21: Efeito de fatores sobre o diâmetro de partículas (DP) das nanopartículas de PCL contendo óleo essencial de <i>Z. riedelianum</i> .....	42
Figura 22: Efeito de fatores sobre o potencial zeta (PZ) das nanopartículas de PCL contendo óleo essencial de <i>Z. riedelianum</i> .....	43
Figura 23: Efeito de fatores sobre a eficiência de encapsulação (EE%) das nanopartículas de PCL contendo óleo essencial de <i>Z. riedelianum</i> .....	44
Figura 24: Fotomicroscopia obtidas por MEV das suspensões de: nanoesferas vazias (A e B), nanoesferas com óleo essencial de <i>Z. riedelianum</i> (C e D), nanocápsulas de <i>Z. riedelianum</i> (E) e nanoesferas de <i>Z. rhoifolium</i> (F).....	47
Figura 25: Média da degradação da luz do óleo essencial das folhas de <i>Z. rhoifolium in natura</i> (OE ZRO) e das nanoesferas (NS4) à base desses óleos, além do controle (OE ZRO).....	49
Figura 26: Média da degradação da luz do óleo essencial das folhas de <i>Z. riedelianum in natura</i> (OE ZRI) e das nanocápsulas (NC5) e nanoesferas (NS3) à base desses óleos, além do controle (OE ZRI).....	49
Figura 27: Média do perfil de liberação in vitro do óleo essencial das folhas de <i>Z. rhoifolium</i> a partir da dispersão de nanoesferas seguida da sua difusão através do saco de diálise. A concentração teórica para dispersão é de 0,167 mg/mL.....	51
Figura 28: Média do perfil de liberação in vitro do óleo essencial das folhas de <i>Z. riedelianum</i> a partir da dispersão de nanocápsulas seguida da sua difusão através do saco de diálise. A concentração teórica para dispersão é de 0,167 mg/mL.....	51
Figura 29: Média do perfil de liberação in vitro do óleo essencial das folhas de <i>Z. riedelianum</i> a partir da dispersão de nanoesferas seguida da sua difusão através do saco de diálise. A concentração teórica para dispersão é de 0,167 mg/mL.....	52

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

IE	Impacto eletrônico
IK	Índice de Kovats
NC	Nanocápsulas
NS	Nanoesferas
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
EE	Eficiência de encapsulação
PZ	Potencial zeta
DP	Diâmetro das partículas
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
PCL	Poli- $\epsilon$ -(caprolactona)
UV-VIS	Ultravioleta-Visível
daa	Dias após a aplicação

## RESUMO

CHRISTOFOLI, M. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde – GO, fevereiro de 2014. **Efeito dos óleos essenciais de *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum riedelianum* nanoencapsulados em *Bemisia tabaci* (Gennadius) Biótipo B.** Orientador: Cristiane de Melo Casal. Co-orientadores: Cassia Cristina Fernandes Alves e Márcio Fernandes Peixoto.

A *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B (Hemíptera: Aleyrodidae) é uma praga agrícola encontrada em diversas regiões do país infestando plantas como tomate, brócolis, algodão, feijão e soja. O controle dessa praga não é muito eficaz, uma vez que este inseto se alimenta da seiva na face abaxial das folhas da planta hospedeira, liberando um resíduo ceroso que impede a penetração de produtos químicos, além disso, tem um rápido desenvolvimento de resistência, e ainda promove a manifestação de fungos e vírus, o que exige aplicação de altas doses de inseticidas, causando prejuízos ao ambiente. Os produtos naturais têm se mostrado como uma das fontes promissoras para o desenvolvimento de métodos alternativos para o controle de pragas minimizando assim os problemas ambientais podendo ser mais seletivos e específicos. A presente proposta buscou desenvolver nanopartículas de PCL contendo os óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum*, bem como avaliar o efeito desses óleos *in natura* e nanoencapsulados em *B. tabaci* biótipo B. A hidrodestilação das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* forneceu um óleo essencial com rendimento médio de 0,03 e 0,02%, respectivamente: A análise cromatográfica (CG-MS) do óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium* apresentou como compostos majoritários o  $\beta$ -elemeno (31,26%), D-germacreno (18,16%),  $\beta$ -cariofileno (12,09%),  $\delta$ -elemeno (7,63%),  $\beta$ -cedreno (6,69%), biciclogermacreno (4,57%) e E-cariofileno (3,63%). Enquanto que os



compostos majoritários no óleo essencial de *Z. riedelianum*, foram  $\gamma$ -elemeno, (24,81%), fitol (18,16%) biciclogermacreno (16,18%), Cis-nerolidol (8,26%) e D-germacreno (6,52%). O método de nanoprecipitação se mostrou eficiente no preparo das nanopartículas de PCL (poli- $\epsilon$ -(caprolactona)) à base do óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum*, apresentando eficiência de encapsulação acima de 96%. No entanto as nanoesferas se mostraram mais estáveis, pois não apresentaram precipitação de polímero, além de serem mais viáveis econômica e ecologicamente. No estudo de liberação *in vitro*, em 72 horas de ensaio, verificou-se a difusão do óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* nas nanoesferas e nanocápsulas acima de 80%. Quanto à degradação acelerada pela luz as nanopartículas dos óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* oferecem alta proteção contra a degradação. Os óleos essenciais de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* *in natura*, nas concentrações de 1,0; 2,0 e 5,0%, reduziram a oviposição de *B. tabaci*. Para as nanoesferas de PCL a base dos óleos das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum*, nas concentrações 2 e 5%, houve redução na oviposição de aproximadamente 95%. Os resultados sugerem que os óleos de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* têm potencial para serem usados no controle de *B. tabaci*. Os resultados destacam ainda, os benefícios da utilização das nanoesferas de PCL com os óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* no controle de *B. tabaci*.

**PALAVRAS CHAVE:** Mosca-branca, óleo essencial, produtos naturais, nanotecnologia.

CHRISTOFOLI, M. Goiás Federal Institute of Education, Science and Technology –Rio Verde *Campus* – GO, February of 2014. **Effect of nanoencapsulated essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium* and *Zanthoxylum riedelianum* in *Bemisia tabaci* (Gennadius) Biotype B.** Adviser: Cristiane de Melo Casal. Coadvisers: Cassia Cristina Fernades Alves and Márcio Fernandes Peixoto.

## ABSTRACT

*Bemisia tabaci* (Gennadius) biotype B (Hemíptera: Aleyrodidae) is an agricultural pest found in many regions of Brazil, infecting several plants such as tomato, broccoli, cotton, beans and soybean. Unfortunately its control is not very effective because this insect is a plant sap feeding localized on the abaxial surface of leaves from the host plant, releasing a waxy residue which prevents chemical penetration. Accordingly; due to the rapid development of resistance associated with fungus and virus development, the control of this pest requires the application of high doses of insecticide, which causes environmental damage. Natural products have been demonstrated to be one promising source for the development of alternative methods for pest control, thus minimizing environmental problems in addition to being more selective and specific. In this context, the present study sought to develop PCL (poly- $\epsilon$ -(caprolactone)) nanoparticle containing essential oils from leaves of *Zanthoxylum rhoifolium* and *Z. riedelianum* as well as to evaluate the effect of these oils in natura and nanoencapsulated on *B. tabaci* biotype B. Hydrodistillation of *Z. rhoifolium* and *Z. riedelianum* leaves yielded essential oils with average yields of 0.03% and 0.02%, respectively. Notably, the plant species used presented different chemical compositions. Thus, chromatography analysis (CG-MS) of the essential oils from the *Z. rhoifolium* leaves indicated that the main components were:  $\beta$ -elemene (31.26%), D-germacrene (18.16%),  $\beta$ -caryophyllene

(12.09%),  $\delta$ -elemene (7.63%),  $\beta$ -cedrene (6.69%), bicyclogermacrene (4.57%), and E-caryophyllene (3.63%). The main components of the essential oils from *Z. riedelianum* were:  $\gamma$ -elemene (24.81%), phytol (18.16%), bicyclogermacrene (16.18%), Cis-nerolidol (8.26%), and D-germacrene (6.52%). The nanoprecipitation method proved to be efficient in the preparation of PCL nanoparticles made of essential oils from *Z. rhoifolium* and *Z. riedelianum* leaves, exhibiting encapsulation efficiencies higher than 96%. However the nanospheres were even more stable because it showed no polymer precipitation, in addition to being more economically and environmentally viable. In the *in vitro* release test, with 72 h of testing, diffusion of more than 80% of the essential oils from *Z. rhoifolium* and *Z. riedelianum* leaves was observed in the nanospheres and nanocapsules. By studying light-accelerated degradation, it was demonstrated that nanoparticles of the essential oils from *Z. rhoifolium* and *Z. riedelianum* leaves offer high protection against degradation. *In natura* essential oils from *Z. rhoifolium* and *Z. riedelianum* were evaluated against *B. tabaci* biotype B, and the best results were observed for concentrations of 1.0%, 2.0% and 5.0% with reductions in egg-laying of approximately 90%. Further, a biological assay using PCL nanospheres made of essential oils from *Z. rhoifolium* and *Z. riedelianum* leaves was performed at concentrations of 2% and 5%, with an efficacy in egg-laying reduction of approximately 95% for both concentrations. Together, the results obtained indicate that essential oils from *Z. rhoifolium* and *Z. riedelianum* have the potential to be used in the control of *B. tabaci*. Additionally, the results presented emphasize the benefits of using PCL nanospheres with essential oils from *Z. rhoifolium* and *Z. riedelianum* leaves in the control *B. tabaci*.

**Key words:** essential oil, nanotechnology, natural products, Whitefly.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa lugar de destaque no mercado mundial do agronegócio, no entanto, esse mercado está associado ao uso de insumos para o controle de pragas e doenças agrícolas. Estima-se que o consumo de agrotóxicos em 2012 chegou a 823,2 milhões de toneladas, dos quais 36% foram importados, o que coloca o País como o maior mercado em termos de faturamento para empresas como a Basf, DuPont, Monsanto e Syngenta (SINDAG, 2013a).

Segundo o Decreto Federal nº 4074, de 04 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento. Sua utilização faz aumentar a eficiência econômica através de ganhos de produtividade, pois eles são responsáveis por controlar pragas que prejudicam muitas plantações. Contudo o manejo desses produtos químicos requerem muitos cuidados, pois seu uso prolongado pode ser prejudicial ao meio ambiente e a saúde da população. A exposição a agrotóxicos pode ocasionar várias doenças e intoxicações, desde os agricultores que ficam expostos, quanto às pessoas que ingerem ou que inalam; pois algumas substâncias químicas se acumulam no organismo e causam doenças mais demoradas e até mais graves (ANVISA, 2011).

O controle de pragas agrícolas utilizando agrotóxicos é uma prática comum, porém bastante nociva ao ambiente, primeiramente pela toxicidade desses defensivos, que podem permanecer durante anos no ambiente; segundo pela grande quantidade de agrotóxicos aplicados, sendo que a maior parte é perdida por evaporação, lixiviação, escoamento e degradação biológica, fazendo com que aumente a quantidade de agroquímicos aplicados e conseqüentemente aumentem a poluição (PRIMEL *et al.*, 2005). O uso indiscriminado de pesticidas pode causar graves conseqüências como a contaminação do solo, da água, do ar, da fauna e da flora (MARTINEZ, 2002). Além disso, novos problemas fitossanitários resultantes do desequilíbrio ecológico têm aumentado à utilização de inseticidas e fungicidas na agricultura mundial e brasileira, aumentando o

custo da produção, favorecendo a seleção de pragas e patógenos, afetando a população de insetos benéficos (inimigos naturais e polinizadores), além de colocar em risco a saúde de produtores e consumidores (BEZERRA, 2009).

Em contrapartida, o controle das pragas agrícolas é necessário, pois elas estão entre as principais responsáveis pelos prejuízos na produção agrícola e pelo aumento do custo da produção. Segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola as importações brasileiras de defensivos agrícolas bateram recorde em 2012, crescendo 11% em relação a 2011, com um volume importado 296,81 mil toneladas de ingrediente ativo (SINDAG, 2013b). O crescimento das importações de defensivos agrícolas, bem como de inseticidas deve continuar em função do aumento da produção e dos problemas recentes com pragas em várias regiões do Brasil.

A produção de tomate (*Solanum lycopersicum*) em 2011, foi cerca de 3,75 bilhões de toneladas com área plantada de 60.092 hectares (IBGE, 2011), com perspectivas de produção ainda maiores para os próximos anos. No entanto, o tomate é atacado por um grande número de pragas e os danos causados por estes organismos são de tal magnitude que o tomateiro é uma das hortaliças líder no emprego de agrotóxico (BEZERRA, 2009).

A produção em larga escala aliado ao emprego de agrotóxicos, eleva os custos e favorece a seleção de pragas. Este cenário tem proporcionado o crescimento de pragas agrícolas mais resistentes, como é o caso da *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae), conhecida popularmente como mosca-branca, encontrada em diversas regiões do país, infestando uma variedade de plantas como feijão, algodão, brócolis, tomate, soja, além de plantas ornamentais (SCARPELLINI, 2010). Uma considerável quantidade de agrotóxicos é utilizada no controle desta praga agrícola, porém não tem apresentado bons resultados, por causa da localização do inseto na face abaxial das folhas da planta e ao resíduo ceroso formado pela praga, que impede a penetração de produtos químicos; promovendo a seleção de insetos mais resistentes (YANG *et al.*, 2010).

Contudo, a utilização de compostos botânicos, como extratos e óleos essenciais com ação inseticida, torna-se uma opção para o controle da mosca-branca, de forma menos nociva ao meio ambiente e à saúde humana. Alguns pesquisadores tem se dedicado na busca por compostos naturais com ação inseticida sobre *B. tabaci* (SOUZA & VENDRAMIM, 2000; SOUZA, 2004; BALDIN *et al.*, 2007), mas poucos estudos vêm sendo realizados sobre a ação de óleos essenciais no controle desta praga agrícola, demonstrando a importância de maiores estudos nesta área.

Os óleos essenciais são compostos voláteis produzidos como metabólitos secundários pelas plantas, sendo reponsáveis pelo odor característico das plantas, interação inseto-plantas, entre outras funções. Entretanto, as características dos óleos essenciais como volatilidade, insolubilidade em água, facilidade de oxidação, dificultam os estudos sobre suas atividades biológicas e a viabilidade de aplicação destes compostos no campo (NASCIMENTO *et al.*, 2007; MORAIS, 2009).

Entretanto estes problemas podem ser minimizados com o uso da nanotecnologia. Compostos naturais com ação inseticida nanoencapsulados otimizam o sistema de controle de pragas, por meio da liberação gradual do princípio ativo, redução da necessidade de altas doses, diminuição da toxicidade e dos efeitos indesejáveis aos organismos não alvos, proteção contra degradação ambiental e perda por fatores externos.

A nanotecnologia é uma técnica de desenvolvimento e utilização de materiais em escala nanométrica que envolve o encapsulamento com finas camadas poliméricas aplicáveis em sólidos, gotículas de líquido ou material gasoso formando partículas que podem liberar seu conteúdo em velocidade e condições específicas (SPARKS 1981, SOUZA *et al.*, 2012; CAZO *et al.*, 2012). As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores que apresentam diâmetro inferior a 1µm, que promovem a liberação controlada do princípio ativo, oferecendo maior segurança, seletividade, biodegradabilidade, viabilidade econômica e baixos impactos ambientais (SOUZA *et al.*, 2012).

As aplicações da nanotecnologia na agricultura incluem pesticidas encapsulados em nanomateriais para a controlada liberação; fertilizantes, biofertilizantes e micronutrientes; vacina animais e detecção de patógenos de plantas; nanopartículas para conservação do solo; na engenharia genética, entre outras áreas (KIM *et al.*, 2006; DUCAN, 2011). A formação dessa película é responsável por aumentar a seletividade desses compostos encapsulados e a capacidade de biodegradabilidade e biocompatibilidade (WU *et al.*, 2012). Além disso, estes sistemas utilizam óleos essenciais envoltos por películas de partículas poliméricas denominadas de nanopartículas, que maximizam o seu efeito, a baixas concentrações (SOPPIRMATH & AMINABHAVI, 2002). Dessa forma, esse sistema de liberação controlada, por meio das nanopartículas, associado ao uso de compostos naturais como os óleos essenciais, vem a favorecer o controle de pragas agrícolas.

Atualmente, são realizados vários estudos sobre as atividades biológicas de compostos naturais como os óleos essenciais de diversos gêneros de plantas. Dentre essas plantas estudadas, destaca-se o gênero *Zanthoxylum*, que de acordo com dados da literatura, seus extratos e óleos essenciais apresentam atividades inseticida, antifúngica, antibacteriana e fumigante (MENUT *et al.*, 2000; FACUNDO *et al.*, 2003; BAFI-YEBOA *et al.*, 2005; MOURA, 2006; CHOOCHOT *et al.*, 2007; THEODORO, 2009; PIETRO, 2011 ). Os óleos essenciais *Z. rhoifolium*, apresentam atividades bactericida, fungicida, microbiana, antinociceptivas, antiinflamatórias, além de serem utilizados em tratamentos cancerígenos e no combate à malária; e *Z. riedelianum*, são utilizadas em processos inflamatórios e reumáticos (PEREIRA, 2010; BOEHME *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2007a; MOURA *et al.*, 2006). Apesar destes relatos, poucos são os estudos sobre o efeito dos óleos essenciais de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* no controle de pragas agrícolas como *B. tabaci*.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de nanopartículas de PCL contendo óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum*, bem como avaliar a ação desses óleos *in natura* e nanoencapsulados em *B. Tabaci* biótipo B.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Óleos essenciais

Os óleos essenciais são reponsáveis pelo odor característico das plantas, autodefesa, atração e proteção contra perda de água e aumento de temperatura foliar, podendo ser encontrados em diferentes estruturas da planta de acordo com a família, tais como pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos, em bolsas lisígenas e tricomas (CASTRO, 2004). São moléculas lipofílicas, com baixo peso molecular, constituídas de misturas de compostos orgânicos voláteis produzidos como metabólitos secundários pelas plantas, constituídos de hidrocarbonetos (terpenos e sesquiterpenos) e compostos oxigenados (álcoois, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas e fenóis) (NERIO *et al.*, 2010). Estes compostos terpênicos (monoterpenos e sesquiterpenos) podem apresentar atividades inseticida, antimicrobiana, fungicida, antiviral, entre outras, podendo ser utilizados para o controle de pragas por meio da aplicação direta do óleo essencial ou do princípio ativo isolado, ou servir como base para descoberta de novos produtos sintéticos (CASTRO, 2004; PADUCH *et al.*, 2007).

Para extração de óleos essenciais usa-se como matéria-prima, partes vegetais como flores, folhas, cascas e raízes, apresentando grande aplicação nas indústrias de perfumaria, cosmética, agricultura, alimentos e são coadjuvantes em medicamentos (BIZZO *et al.*, 2009). Os óleos essenciais podem ser extraídos das partes vegetais por diversos métodos como hidrodestilação, maceração, expressão de pericarpo de frutos cítricos, enfleurage ou enfloração, extração por solventes orgânicos, gases supercríticos (CO<sub>2</sub>) e microondas (SANTOS *et al.*, 2004; MORAIS, 2009).

Os compostos químicos dos óleos essenciais podem ser identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), sendo que seus constituintes são definidos comparando com dados da literatura do equipamento e do Índice de Kovats (MACHADO & FERNANDES JÚNIOR, 2011).

A caracterização química torna possível conhecer os componentes do óleo essencial, entretanto, não é possível afirmar que o componente majoritário é o que realiza a atividade biológica, pois o efeito pode ser atribuído ao constituinte em menor proporção ou ao sinergismo entre os compostos. Além disso, a composição do óleo essencial e consequentemente sua atividade biológica, apesar de serem determinadas por fatores genéticos, podem sofrer alterações significativas. Em relação às particularidades do óleo, algumas pesquisas a respeito de sua composição mostram que mesmo variações genéticas intraespecíficas da espécie vegetal podem alterar o teor do princípio ativo presente no óleo (NASCIMENTO, 2007). Isso acontece, pois os estímulos decorrentes do ambiente, no qual a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos, uma vez que os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente (MORAIS, 2009).

Ademais, outros fatores podem afetar a composição dos óleos essenciais, tais como as interações planta/microrganismos, planta/insetos e planta/planta; idade e estágio de desenvolvimento da planta, fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, clima, solo, época e forma de plantio, adubação, uso de agrotóxicos, irrigação, tempo e condições ambientais, época e horário de coleta, técnicas de colheita e pós-colheita, proveniência do material da planta (fresco ou seco), técnica de extração, fonte botânica, tratamentos culturais e colheita e padrões de variação geográfica (latitudes e longitudes) (MORAIS, 2009; NASCIMENTO, 2007).

Os óleos essenciais de plantas pertencentes aos vários gêneros têm sido extensivamente testados para avaliar suas atividades biológicas como um recurso



natural valioso, seja na forma *in natura*, como em sinergia com outros compostos naturais ou sintéticos (NERIO *et al.*, 2010). Exemplo disso são os crescentes estudos sobre a atividade inseticida dos óleos essenciais de plantas no controle de pragas agrícolas.

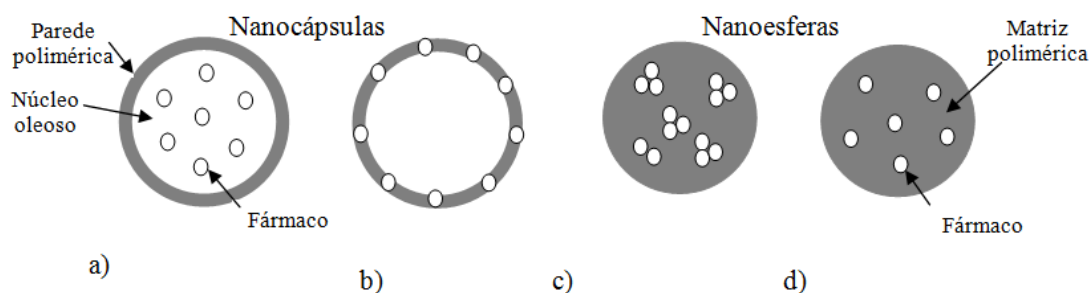
Perspectivas extensas existem para a aplicação de óleos essenciais em um ambiente controlado, por exemplo, em estufas, para a produção de hortaliças, plantas ornamentais e produção orgânica certificada, como também em cultivo a campo em rotação com outros inseticidas, diminuindo as quantidades totais de produtos como inseticidas sintéticos aplicados sobre uma estação de crescimento (YANG *et al.*, 2010). Porém, essa tarefa tem sido dificultada pelas peculiaridades que os óleos apresentam, tais como, volatilidade e insolubilidade em água, características que interferem significativamente nos resultados (NASCIMENTO, 2007).

Contudo, a nanotecnologia torna-se uma técnica importante para proteger o princípio ativo contra degradações, aumentar a solubilidade em água e ainda otimizar a atividade biológica desses compostos, por meio da liberação controlada do princípio ativo, aumentando a eficiência e minimizando os danos ambientais.

## 2.2. Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma técnica de desenvolvimento e utilização de materiais em escala nanométrica que envolve o encapsulamento com finas camadas poliméricas aplicáveis em sólidos, gotículas de líquido ou material gasoso formando partículas denominadas nanocápsulas ou nanoesferas que podem liberar seu conteúdo em velocidade e condições gradativas (SOUZA, 2012, CAZO *et al.*, 2012, SPARKS, 1981). As nanopartículas quando comparadas com outros sistemas coloidais apresentam maior estabilidade em fluidos biológicos e ao armazenamento devido às matérias-primas empregadas na sua produção (DOMINGUES & GUTERRES, 2008).

As nanopartículas poliméricas, nanocápsulas e nanoesferas, são sistemas carreadores que apresentam diâmetro inferior a 1 $\mu$ m. As nanocápsulas são constituídas por uma parede polimérica disposta ao redor de um núcleo oleoso, podendo o princípio ativo estar dissolvido nesse núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Já as nanoesferas não contém óleo em sua composição e são formadas por uma matriz polimérica, em que o princípio ativo se encontra homogeneamente disperso ou solubilizado no interior da matriz (Figura 1) (ALLÉMANN *et al.*, 1993; PUISIEUX *et al.*, 1994; SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003; SOUZA *et al.*, 2012)



**Figura 1:** Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: (a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; (b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; (c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; (d) fármaco adsorvido ou disperso na matriz polimérica das nanoesferas. (Adaptado de SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003).

Existem vários métodos descritos na literatura para preparação das nanopartículas. A escolha do método é determinada pelas características físico-químicas de princípio ativo (solubilidade e estabilidade molecular) e do polímero, entretanto, independente do método de preparação, os produtos são obtidos como suspensões coloidais aquosas (SOARES, 2009; SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003).

As nanopartículas podem ser preparadas a partir de polímeros biodegradáveis naturais ou sintéticos, tais como óxidos metálicos, cerâmicos, silicatos, materiais magnéticos, semicondutores quânticos, lipídios, polímeros, dendrímeros e emulsões (PUOCI *et al.*, 2008; OSKAM, 2006). Os polímeros sintéticos mais utilizados em sistemas nanoestruturados são poliésteres alifáticos, os homo e copolímeros de lactato e glicolato (PLA, PGA, PLGA), poli- $\epsilon$ -(caprolactona) (PCL) e os polihidroxialcanoatos (PHA) (DURÁN *et al.*, 2006). O polímero poli- $\epsilon$ -(caprolactona) (PCL) é um polímero biodegradável com aplicações tecnológicas e com características de tenacidade, flexibilidade e boa compatibilidade, amplamente usado em sistemas de liberação controlada, capaz de formar micro e nanopartículas (GRILLO *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2003).

A definição da técnica a ser utilizada é de suma importância. As técnicas mais utilizadas para preparação das nanopartículas a partir de polímeros pré-formados são: a técnica de nanoprecipitação ou deslocamento do solvente (FRIEDRICH *et al.*, 2008; FESSI *et al.*, 1989), emulsificação-evaporação do solvente (dupla emulsão evaporação do solvente) (COHEN-SELA *et al.*, 2009; WATTS *et al.*, 1990), emulsificação-difusão

do solvente (MOURA-HUERTAS *et al.*, 2010) e o salting-out (SONG *et al.*, 2008; ALLÉMANN *et al.*, 1993).

A nanoprecipitação se baseia na precipitação e formação de vesículas de tamanho coloidal constituídas por uma fase oleosa revestida por uma camada polimérica em um ambiente externo aquoso. A deposição do polímero na interface entre a água e o solvente orgânico, causada pela rápida difusão do solvente, resulta na formação instantânea da suspensão coloidal (FESSI *et al.*, 1989).

As principais caracterizações das nanopartículas envolvem a determinação do pH das suspensões, potencial zeta das partículas, quantidade de substâncias ativas associadas às nanoestruturas (eficiência de encapsulação), diâmetro das partículas das suspensões coloidais, avaliação morfológica, estudo de degradação, avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento e estudo de liberação. O conjunto de informações obtidas pela caracterização das nanopartículas pode conduzir à proposição de modelos que descrevam a organização das nanopartículas em nível molecular, que será dependente da composição qualitativa e quantitativa das formulações (SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003). Entretanto, durante o período de armazenamento pode ocorrer problemas na estabilidade das nanopartículas, o que constitui um obstáculo para aplicação industrial. No entanto, esses problemas podem ser minimizados pela secagem das suspensões por técnicas de liofilização, aspersão, ou nebulização, o que facilita a sua conservação (SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003).

Na última década a pesquisa em nanotecnologia disparou, existindo atualmente inúmeras empresas especializadas na fabricação de novas formas de produtos em escala nanométrica, com aplicações previstas, que incluem indústria de alimentos, da agricultura, terapêutica médica e diagnósticos, produção de energia, computação molecular e materiais estruturais, entre outros (DUCAN, 2011).

A nanotecnologia é uma técnica que tem sido bastante empregada no âmbito da agricultura. Estes sistemas podem ser aplicados no domínio da agricultura, em que os defensivos podem ser aprisionados na matriz polimérica, maximizando o seu efeito, a baixas concentrações (SOPPIRMATH & AMINABHAVI, 2002). Os agrotóxicos encapsulados tem sua atividade prolongada através da liberação gradativa do princípio ativo e reduz a necessidade de altas doses iniciais ou múltiplas aplicações, com diminuição significativa da toxicidade e de efeitos indesejáveis para organismos não-alvos, além de permitir a administração segura para o aplicador e reduzir os impactos ambientais (KOOLI *et al.*, 2002; SEAMAN, 1990). Nesse sentido a nanotecnologia

aplicada à agricultura se torna uma ótima alternativa para o controle de pragas agrícolas de forma mais eficiente e segura, sem causar severos impactos ambientais.

As aplicações da nanotecnologia na agricultura incluem pesticidas encapsulados em nanomateriais para a liberação controlada; fertilizantes, biofertilizantes e micronutrientes; vacina animais e controle de patógenos de plantas; nanopartículas para conservação do solo; na engenharia genética, entre outras áreas, em que a agricultura pode beneficiar da nanotecnologia (KIM *et al.*, 2006; DUCAN, 2011). Em um trabalho realizado por Nguyen *et al.*, (2012), utilizando quitosana para o encapsulamento, os autores obtiveram excelentes resultados na fotoproteção da Deltametrina, um composto com alto potencial inseticida. Li *et al.*,(2011) também conseguiram bons resultados utilizando quitosana como carreadores, facilitando a dissipação do pesticida imidacloprid. Em outro trabalho Tan *et al.*, (2012), demonstram melhor efeito do uniconazole no retardo do crescimento do arroz utilizando nanopartículas de sílica como transportadores. Em outra abordagem, Bilbao-Sáinz *et al.*, (2012) incorporaram a películas de parafina, o composto 2-heptanona, um agente bioativo que demonstrou potencial como um pesticida, tendo como resultado a melhor liberação do bioativo.

O encapsulamento de compostos naturais como os óleos essenciais também tem melhorado seus potenciais biológicos. Os óleos essenciais de *Lippia sidoides* encapsulados, utilizando quitosana e nanogéis de cajueiro, foram testados *in vitro* e *in vivo* em larvas de *Aedes aegypti*, e apresentaram maior mortalidade das larvas quando comparado aos óleos *in natura* (ABREU *et al.*, 2012). Outros dois autores, Maji *et al.*, (2007), e Banerjee *et al.*, (2013), utilizaram carboidrato como polímero para encapsular óleo essencial de *Z. limonella* e puderam prolongar a liberação do óleo, melhorando sua eficiência como repelente.

Diante destas perspectivas, o uso de agrotóxicos encapsulados como forma de prolongar sua atividade por meio da liberação controlada do princípio ativo, reduzindo assim o volume de defensivos aplicados, é importante ferramenta no controle de pragas agrícolas.

### **2.3. A família Rutaceae e o gênero *Zanthoxylum***

A família Rutaceae, distribuída por regiões tropicais e temperadas como a América, o sul da África e Austrália, possui cerca de 150 gêneros e 2000 espécies descritas (SOUZA & LORENZI, 2005; PIRANI, 1999). No Brasil, existem 32 gêneros e cerca de 150 espécies distribuídas em áreas de floresta serranas, caatinga, cerrado e sul do Brasil

(SOUZA & LORENZI, 2005; MELO & ZICKEL, 2004; OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2001; BARROSO *et al.*, 1986).

Esta família compreende espécies arbóreas ou arbustivas com acúleos no caule; folhas alternas ou menos frequentemente opostas, compostas ou raramente simples, sem espículas, margem inteira ou serradas, com pontuações translúcidas; inflorescência cimosas, raramente racemosa, às vezes reduzida a uma única flor; flores pouco vistosas bissexuadas ou unissexuadas, geralmente actinomorfas, diclamídeas; frutos do tipo drupa, baga, folículo ou cápsula (SOUZA & LORENZI, 2005).

Dentre os gêneros desta família, destaca-se o gênero *Zanthoxylum* que compreende espécies lenhosas, arbustivas ou arbóreas que variam entre 6 a 18 metros de altura, caracterizadas pela presença de acúleos no caule, puberulentos ou com indumento simples, raramente estrelado, acinzentados a castanho-esverdeado (Figura 2 A); folhas compostas imparipinadas a paripinadas, margem inteira ou serrada, com 4-16 pares de folíolos, com ou sem acúleos na face inferior; folíolos basais 0,9-4,0×0,6-2,4cm, apicais 3,2-8,0×1,3-3,2cm, opostos, peciolulados, membranáceos a cartáceos, com tricomas estrelados esparsos em ambas as faces, mais densos na base (Figuras 2 A e B) (SILVA, 2006; SILVA JÚNIOR, 2005; MELO & ZICKEL, 2004). Flores de cor branco-esverdeadas com até 0,3 cm de diâmetro, perianto mono e diclamídeo; frutos de até 3 mm de diâmetro, globosos, glandulosos e vermelhos quando maduros, contendo apenas uma semente por fruto (SILVA JÚNIOR, 2005; LORENZI, 2002).



**Figura 2:** Caule de *Z. riedelianum* (A), *Z. rhoifolium* (B) e *Z. riedelianum* (C)

*Z. riedelianum* Engl (Figura 2 C), pertence ao gênero *Zanthoxylum*, e a família Rutaceae. Conhecida popularmente como maminha-de-porca, mamica-de-porca, mamica-de-cadela, tembetarí, tembetaíba, é uma espécie arbórea que pode chegar a 18 m de altura e se caracteriza pela presença de acúleos no caule, com tronco espesso de 40 a 60 cm de diâmetro, sendo sua madeira utilizada comercialmente; as folhas são

compostas, pinadas, com margem inteira, com 4 a 6 pares de folíolos esparsamente pubescentes (LORENZI, 2002).

*Zanthoxylum rhoifolium* Lam (Rutaceae) (Figura 4B), conhecida popularmente como mamica-de-porca, mamica-de-cadela, juvevê, jubebê, tembetarí, betarú amarelo, laranjinha do ceará, maminha-de-porca, temberaú de espinho (LORENZI, 2002; MOREL, *et al.*, 2002), caracteriza-se pela presença de acúleos grandes e espessos em seu tronco, que lembram a forma de “maminha-de-porca”, dando origem a esses nomes populares (SILVA JÚNIOR, 2005). É uma espécie arbórea que cresce até 12 m de altura, com tronco de 30 a 40 cm de diâmetro, folhas compostas imparipenadas ou abruptamente pinadas, com margem serreada, com 5 a 13 pares de folíolos opostos, as vezes aculeados na face inferior, formando uma copa densa e pouco tolerantes à sombra, sendo mais frequentemente encontrado em clareiras e bordas das florestas (LORENZI, 2002; SILVA, 2009). Flores são polipétalas, pequenas e esverdeadas, e seus frutos possuem baga pequena, globosa, vermelhos quando maduros, com cerca de 5 mm de comprimento e 5 mm de largura, e com glândulas avermelhadas contendo óleo essencial de cheiro forte; assementes são duros e pequenas, de cerca de 3 mm de comprimento e 3 mm de largura (CORRÊA, 1978; SILVA & PAOLI, 2000; SILVA JÚNIOR, 2005). Do ponto de vista econômico, a madeira destas espécies são bastante utilizadas na confecção de cabos de ferramentas e em obras internas em construção civil, além de serem usadas em áreas de reflorestamento (LORENZI, 2002).

Contudo, vários estudos têm sido realizados no intuito de verificar a composição química desses óleos essenciais. Os constituintes majoritários encontrados mais frequentemente nos óleos essenciais de espécies do gênero *Zanthoxylum* descritos na literatura são limoneno, germacreno D,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -cariofileno; compostos com alta atividade biológica (CHOOCHOT *et al.*, 2007; MOURA, 2006; FACUNDO *et al.*, 2003; MENUT *et al.*, 2000). A presença destes compostos também foi verificada por Silva *et al.*, (2007b), nos óleos essenciais das folhas de espécies de *Z. rhoifolium*.

De acordo com Lima *et al.*, (2007), o extrato das raízes de *Z. riedelianum* exibe atividade antiinflamatória, analgésica e antinociceptiva, sendo encontrado seis lignanas (sesamina, metilpluviatolido, dimetilmatairesinol, piperitol-4'-O-, gama-gama dimetilailil éter, e kaerofillin hinoquinina), e um triterpeno (lupeol) em sua composição. Do extrato das raízes dessa planta foram isolados benzofenantridínico, 6-acetonil-N-metil-diidrodecarina, lupeol, 6-acetonildiidroqueleritina e 6-acetonildiidroavicina (FERNANDES, 2009). Nos óleos essenciais de *Z. riedelianum*, foram identificados cis-

nerolidol (71,0%) e espatulenol (65,2%) como compostos majoritários (Guy, *et al.*, 2001).

Além disso, alguns estudos sobre a atividade biológica de extrato e óleos essenciais foram realizados sobre estas espécies. O extrato metanólico da raiz de espécies do gênero *Zanthoxylum* apresentou atividade inseticida, antifúngica, antibactericida (THEODORO, 2009; BAFI-YEBOA *et al.*, 2005). O óleo essencial de *Z. limonella* apresentou altas taxas de mortalidade sobre larvas de *Aedes aegypti* (PITASAWAT *et al.*, 2007) e Maji *et al.*, (2007) melhoraram ainda mais essas propriedades repelentes com o microencapsulamento, enquanto Kamsuk *et al.*, (2006) melhoraram a eficácia de repelência óleo essencial de *Z. piperitum* ao adicionar vanilina. Os óleos essenciais de plantas deste gênero também demonstraram atividade inseticida e fumigante (CHOOCHOTE *et al.*, 2007; TRONGTOKIT *et al.*, 2005). O óleo essencial de *Z. rhoifolium* é recomendado como atividade fumigante contra *F. Oxysporum* e *C. Acutatum* (PIETRO *et al.*, 2011). Além disso, podem apresentar atividades antimicrobiana, bactericida, fungicida, antinociceptivas, antiinflamatórias dos óleos essenciais de *Z. rhoifolium*, além de serem utilizados em tratamentos cancerígenos e no combate à malária (PEREIRA, 2010; BOEHME *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2007a; MOURA *et al.*, 2006; CORRÊA, 1978).

A pesquisa dos óleos essenciais como agentes inseticidas, repelentes, antifúngicos, bactericidas, entre outras atividades biológicas, vem revelando o potencial destes compostos nesta área.

#### **2.4. Bemisia tabaci**

*Bemisia tabaci* é uma praga agrícola de grande interesse de estudo, conhecida como mosca-branca, e causadora de sérios danos em diferentes espécies de plantas como algodoeiro, tomateiro, brócolis, e principalmente o feijão e a soja. A infestação de *B. tabaci* em tomates levou a situações alarmantes em diversas regiões do país, como Vale do São Francisco, Bahia, Paraíba e Pernambuco, induzindo sérias desordens fitotóxicas (LIMA, 2003).

Este inseto pertence à ordem Hemiptera e família Aleyrodidae, com cerca de 90 gêneros e 1.100 espécies descritas, sendo que o gênero *Bemisia* possui cerca de 37 espécies conhecidas (BUZZI, 2010; GERLING, 2002). A ordem hemiptera é caracterizada pelas peças bucais adaptadas para sucção dos alimentos, sendo que as mandíbulas e maxilas são transformadas em quatro estiletes alongados, alojados no

rosto segmentado, formando um lábio modificado (BUZZI, 2010). Além disso, outras características são usadas na identificação desta ordem como as antenas, o rosto, as pernas e as asas. Essa ordem compreende uma grande diversidade de insetos, sendo dividida em duas subordens: Heteroptera (percevejos), com cerca de 23 mil espécies catalogadas, e Homoptera (cigarra, cercopídeos, pulgões, entre outros) com cerca de 42,5 mil espécies catalogadas. Os homopteras são divididos Auchenorrhyncha (cigarra e cercopídeos) e Sternorrhyncha (mosca-branca, psílídeos, pulgões e cochonilhas) (TRIPLEHORN & JONNISON, 2011).

A família Aleyrodidae, da subordem Sternorrhyncha, caracteriza-se por insetos pequenos com 2 a 3 mm de comprimento, de metamorfose incompleta, passando pelas fases de ovo, ninfa e adulto (Figura 3); possui dois pares de asas membranosas, recobertas por uma substância pulverulenta de cor branca; aparelho bucal do tipo picador sugador (adultos e ninfas) (LACERDA & CARVALHO, 2008).



**Figura 3:** *B. tabaci* adulto (A e B), ninfas e ovos (C)

Os ovos de *B. tabaci* são periformes, com cerca de 0,18 a 0,21mm de comprimento por 0,06 a 0,09mm de largura, de coloração branca ou amarelada (de acordo com a fase de desenvolvimento); as ninfas de primeiro ínstar são móveis, medindo cerca de 0,24 a 0,27mm de comprimento e 0,12 a 0,18mm de largura, com coloração branco-esverdeada, com forma ventral plana e dorsalmente convexa (TRIPLEHORN & JONNISON, 2011; SOUZA, 2004). A ninfa de segundo ínstar é oval e apresenta olhos brilhantes, e a de terceiro ínstar tem formato elíptico, olhos vermelhos brilhantes, sésseis, havendo pouca diferença morfológica entre esses dois ínstares. A ninfa de quarto ínstar pouco se alimenta para passar pelo estágio de “pupa”, apresenta nítida divisão em cabeça, tórax e abdome, chegando a medir 0,85mm de comprimento por 0,60mm de largura; os adultos são amarelo-pálido com asas brancas, sendo as fêmeas maiores que os machos (TRIPLEHORN & JONNISON, 2011; SOUZA, 2004).



Os adultos são ágeis e começam o acasalamento cerca de 12 a 48 horas após a emergência, sendo que a fêmea pode colocar de 100 a 300 ovos durante sua vida (LACERDA & CARVALHO, 2008).

A duração do ciclo da *B. tabaci* depende da temperatura e da planta hospedeira. A temperatura de 25°C, a fase ovo dura em torno de 5 a 8 dias e a fase ninfal em torno de 12 a 21 dias, e o período de ovo a adulto podendo durar de 16 a 25 dias (NAVA-CAMBEROS *et al.*, 2001; ALBERGARIA & CIVIDANES, 2002). No entanto os limites térmicos inferiores de desenvolvimento de *B. tabaci* biótipo B foram de 11,1°C, 6,8°C e 8,3°C, para as fases de ovo, de ninfa e do ciclo biológico (ovo-adulto), respectivamente (ALBERGARIA & CIVIDANES, 2002). O efeito da planta hospedeira sobre o período de ovo a adulto também pode influenciar, podendo variar entre 24,03 e 20,55 dias para plantas de beringela e tomate, respectivamente (TSAI & WANG, 1996).

A espécie *B. tabaci* apresenta numerosos biótipos, sendo estabelecidos sete grupos ao redor do mundo de acordo com sua região de ocorrência (PERRING, 2001). A caracterização do biótipo B como nova espécie *Bemisia argentifolli* (Bellows & Perring) foi feita conforme consta em Bellows *et al.*, (1994) com base nos danos característicos nas plantas hospedeiras, e na morfologia do inseto, mas atualmente considera-se que *B. argentifolli* é o biótipo B da *B. tabaci*. (SOUZA, 2004). Segundo Lima *et al.*, (2003) o biótipo B de *B. tabaci* se encontra disperso em todo território brasileiro, no entanto afirma que a raça B ainda se encontra em fase de adaptação no país.

A espécie *B. tabaci* é um inseto que se alimenta através da sucção de seiva, tanto na fase de ninfa como na fase adulta, e enquanto se alimenta, insere toxina que enfraquece as plantas e provoca o crescimento desuniforme, tornando-as amarelas e enrugadas, além de excretar substâncias açucaradas que promovem a manifestação de fungos do gênero *Capnodium*, levando à formação da fumagina, que interfere na fotossíntese, causando perda de qualidade do produto final e ainda atuam na transmissão de vírus, como *Geminivirus* pertencentes ao gênero *Begomoviruse* do VMDF (vírus do mosaico dourado do feijoeiro) (SILVA *et al.*, 2012; FONTES *et al.*, 2012; SOUZA & VENDRAMIM, 2001; LOURENÇÃO & NAGAI, 1994; ZUCCHI *et al.*, 1993).

Em tomates, por exemplo, a *B. tabaci* biótipo B causa crescimento irregular dos frutos dando aspecto esponjoso e esbranquiçados dos frutos, e quedas na produção (BEZERRA, 2009; BALDIN, 2005).

Grande quantidade de inseticidas é utilizada no controle dessa praga, principalmente em culturas de feijão, soja e tomate, porém não muito eficaz, tendo em vista que os ovos, ninfas e insetos adultos se localizam na face inferior das folhas e apresentam rápido desenvolvimento de resistência (HOROWITZ & ISHAAYA, 1995). Os fatores de resistência envolvem a adaptação de *B. tabacia* à diferentes habitats, com diferentes características climáticas; a adaptação de biótipos capazes de invadir novos sistemas de cultivo infestando diferentes espécies de plantas; o desenvolvimento de uma ampla gama de espécies cultivadas transmitindo grande número de vírus de plantas; e rápido desenvolvimento de resistência aos agentes de controle químico (MA *et al.*, 2007). Erdogan *et al.*, (2008) realizaram estudo sobre a resistência de *B. tabaci* de diferentes biótipos à diferentes inseticidas, e verificaram fatores de resistência à bifentrina e fenpropatrina, inseticidas comumente usado no controle de mosca branca. Yuan *et al.*, (2012), também encontraram resultados semelhantes, destacando a resistência em duas estirpes de mosca branca para imidacloprid, nitenpiram, e cipermetrina.

Tais problemas têm impulsionado as pesquisas sobre o manejo integrado de pragas levando em consideração todo o sistema produtivo. Táticas de manejo integrado de pragas incluem melhoramento genético de plantas, melhoramento de práticas de cultivo, utilização de inimigos naturais como parasitoides dos gêneros *Eretmocerus* e *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae), além de *Metaphicus* sp (Hymenoptera: Encyrtidae) e *Amitus* spp (Hymenoptera: Platygasteridae), melhoramento do controle químico, bem como a utilização de compostos naturais, com ação inseticida ou repelente (HILJE & MORA, 2006; HILJE & MORALES, 2008). Os estudos com extratos de plantas e óleos essenciais que atuem no controle de pragas agrícolas, sem as reações indesejáveis ao ambiente, vêm crescendo. Souza & Vendramim (2000) em seus estudos sobre extratos de *Trichilia pallida*, *Melia azedarach* constataram efeito inseticida sobre os ovos e ninfas de *B. tabaci*. Baldin *et al.*, (2007), estudaram o extrato de 14 espécies vegetais com atividades inseticidas em relação à *B. tabaci* biótipo B. Também tem se destacado os estudos sobre as atividades biológicas dos óleos essenciais no controle de mosca-branca. Kumar (2008), avaliou a bioeficácia de dois óleos essenciais de nim (*Azadirachta indica*) (natural e comercial) no controle de *B. tabaci*. A ação repelente dos óleos essenciais das folhas de *Thymus vulgaris*, *Pogostemon cablin* e *Corymbia citriodora*, em diferentes concentrações, sobre adultos de mosca branca, bem como a ação inseticida sobre ovos e ninfas desses insetos foram testadas, obtendo

ótimos resultados na redução da taxa de sobrevivência e do número de ovos (YANG *et al.*, 2010). Em outro trabalho, os vapores dos óleos essenciais de *Micromeria fruticosa* L., *Nepeta racemosa* L. e *Origanum vulgare* L. apresentaram altas taxas de mortalidade sobre *Tetranychus urticae* e *B. tabaci* (PONTES, 2006).

Apesar desses estudos sobre as atividades biológicas dos óleos essenciais no controle de Mosca-branca, ainda não há relatos sobre a ação de óleos essenciais de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* no controle desta praga agrícola, demonstrando a importância de maiores estudos nesta área.

### 3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de nanopartículas de PCL contendo os óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum*, bem como avaliar o efeito desses óleos *in natura* e nanoencapsulados em *B. tabaci* biótipo B.

### 4. METODOLOGIA

#### 4.1. Coleta do material vegetal

As folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* (Rutaceae) foram coletadas entre os meses de março de 2012 a fevereiro de 2013, em uma área de mata ciliar na zona rural do município de Iporá, GO (coordenadas: *Z. rhoifolium*: latitude 16° 26' 44.48'' S, longitude 51° 7' 58.72'' O; e *Z. riedelianum*: latitude 16° 26' 44.29'' S, longitude 51° 8' 0.61'' O). Após a coleta, o material foi acondicionado em sacos plásticos umedecidos com água, para manter a hidratação das folhas durante o transporte até o local de extração. As espécies foram identificadas pela Dr<sup>a</sup>. Vânia Sardinha dos Santos, professora do Instituto Federal Goiano *campus* de Iporá, GO.

#### 4.2. Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* foi obtido por hidrodestilação. O material vegetal fresco constituído de folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* foi triturado, colocado em um balão de fundo redondo com capacidade para 3.000 mL sobre uma manta aquecedora e submetido à hidrodestilação por três horas, em aparelho tipo Clevenger. O hidrolato foi extraído com diclorometano, em três repetições de 30 mL cada, e a fase orgânica foi separada com funil de separação. Em seguida, a

solução foi seca com sulfato de sódio anidro e filtrada. O solvente foi removido por pressão reduzida por meio de um evaporador rotativo e o óleo conservado em congelador 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.

### **4.3. Análise química do óleo essencial**

As análises dos constituintes químicos dos óleos essenciais foram realizadas no laboratório da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC QP 5000, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida OPTIMA<sup>®</sup>-5-0,25 µm (30 m x 0,25 mm) e detector por ionização por impacto eletrônico (IE) (70 e.V). A temperatura inicial mantida a 100 °C por 6,0 min, em seguida programada até 250 °C a 10 °C/min e permaneceu nessa temperatura por mais 4,0 min. Temperatura do injetor: 250 °C, temperatura do detector: 300 °C, pressão de injeção: 90 KPa, razão de Splitless: 30, faixa de detecção do espectrômetro de massas: 43-550 m/z, start time (cut time do solvente): 3,0 min e fluxo de 1,2 mL/min. A identificação dos componentes do óleo foi baseada no índice de retenção linear (índice de Kovats (IK) calculado em relação aos tempos de retenção da série homóloga de *n*-alcanos (C-13 a C-21) e no padrão de fragmentação observado nos espectros de massas, por comparação destes com dados da literatura (ADAMS, 2007) e da espectroteca Nist 08.

### **4.4. Quantificação do óleo essencial**

#### **4.4.1. Validação do método analítico para quantificação do óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* por espectroscopia UV/VIS**

O conteúdo do óleo essencial nas nanopartículas foi quantificado por espectroscopia UV/VIS (MAJI *et al.*, 2007, PAULA *et al.*, 2011, ABREU *et al.*, 2012). Após a investigação da faixa linear de trabalho, o método foi validado avaliando a seletividade, sensibilidade, exatidão, precisão, limite de quantificação e de detecção.

A seletividade foi avaliada realizando a varredura dos componentes presentes nas nanopartículas, PCL, Oleato de Isodecila, Span<sup>®</sup> 60 e Tween<sup>®</sup> 80, a fim de detectar possíveis interferentes.

A sensibilidade do método foi avaliada de acordo com Limite de Detecção e Quantificação. O Limite de Detecção (LD) pode ser definido como a menor concentração da substância em uma amostra que pode ser detectada em determinadas

condições por um método específico. O Limite de Quantificação (LQ) é a menor concentração que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis.

A exatidão [exatidão = (média da concentração/concentração nominal) x 100, n = 3] é a correlação entre os resultados obtidos e os admitidos como verdadeiros (concentração nominal) e a precisão {Desvio padrão relativo [DPR (%)] = (desvio padrão/média) x 100; n = 3} é a capacidade do método em repetir o mesmo resultado.

#### **4.4.2. Preparo das soluções padrões para construção da curva analítica**

Os óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* foram quantificados por espectroscopia UV/VIS à 247,72 nm e 245,93 nm, respectivamente. A faixa linear de trabalho foi estabelecida entre 0,0125 e 0,2 mg/mL. A solução padrão foi preparada diluindo 40 mg de óleo essencial em 100 mL de hexano, obtendo uma concentração de 0,4 mg/ml. A partir desta solução padrão foram preparados os seis pontos da curva de calibração (0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,15 e 0,2 mg/mL). Todos os pontos da curva de calibração foram preparados em triplicatas e analisados por espectroscopia UV/VIS, utilizando o método desenvolvido e validado.

#### **4.4.3. Preparo das soluções padrão para determinação da exatidão e precisão do método analítico**

Três soluções com diferentes concentrações foram preparadas para determinação do método analítico nas concentrações 0,015; 0,112 e 0,188 mg/mL e 0,017; 0,0130 e 0,183 mg/ml, para os óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum*, respectivamente. Estes valores foram selecionados por possuírem concentrações dentro da faixa linear utilizada, porém em concentrações diferentes das utilizadas nas curvas de calibração. Estas foram preparadas em triplicata e analisadas intra e inter-dia por três dias não consecutivos.

Para validação do método, o limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados através dos parâmetros da curva de calibração por padronização externa.

O LD foi expresso como  $LD = 3,3 * (s/a)$

O LQ foi expresso como  $LQ = 10 * (s/a)$

Em que *s* é o desvio padrão do intercepto, e *a* é o coeficiente angular da curva de calibração.

#### 4.5. Preparo das nanopartículas

As nanocápsulas (NC) e nanoesferas (NS) foram preparadas baseadas na técnica de deslocamento do solvente descrita por Fessi *et al.*, (1989).

Inicialmente foi preparada a fase orgânica contendo o biopolímero PCL (poli- $\epsilon$ -caprolactona)), o princípio ativo (óleo essencial), oleato de isodecila (somente para nanocápsulas), Span<sup>®</sup> 60 (tensoativo de baixo EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo)), e a acetona. Em seguida esta fase foi vertida, sob agitação constante, sobre a fase aquosa contendo Tween<sup>®</sup> 80 (tensoativo de elevado EHL), mantendo a agitação magnética durante 10 minutos para estabilização. Na seqüência, o solvente orgânico e parte da água foram eliminados via um evaporador rotativo a 40 °C ajustando para um volume final 5 mL (Figura 4).



**Figura 4:** Esquema de preparo de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação.

Para obtenção das nanopartículas à base de óleos essenciais das folhas de *Z. riedelianum*, diferentes formulações foram preparadas a fim de obter maior eficiência de encapsulação e maior estabilidade das nanopartículas. Para tanto, foi realizado um planejamento fatorial 2<sup>2</sup>. As variáveis analisadas foram quantidade de PLC e oleato de

isodecila. Estes componentes foram selecionados por exercerem maiores influências sobre as características das nanopartículas. Os níveis escolhidos para cada variável pode ser observado nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1:** Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial  $2^2$ .

Fatores	Níveis	
	-1	+1
PCL (mg)	150	250
Oleato de isodecila (mg)	100	250

O planejamento fatorial  $2^2$  foi executado com um total de 4 experimentos. A Tabela 2 descreve estes experimentos.

**Tabela 2:** Planejamento fatorial  $2^2$ .

Ensaio/Código amostras	Fatores	
	PCL	Oleato de isodecila
1 (NC1)	-1	-1
2 (NC2)	1	-1
3 (NC3)	-1	1
4 (NC4)	1	1

Nestes experimentos a concentração de óleo essencial, Span<sup>®</sup> 60 e Tween<sup>®</sup> 80 foram mantidas constantes em 50 mg e o volume de água e acetona foram mantidos em 30 mL e 15 mL, respectivamente.

Com a finalidade de avaliar a influência do oleato de isodecila na eficiência de encapsulação e propriedades das nanopartículas, os experimentos foram repetidos na ausência de oleato de isodecila, assim foram preparadas as nanoesferas utilizando 150 mg (NS1) e 250 mg (NS2) de PCL. Em seguida, para avaliar a capacidade de carga da nanoesfera NS1, outras duas formulações foram preparadas, utilizando 100 mg (NS3) e 250 mg (NS4) de óleo essencial.

De posse dos melhores resultados das nanopartículas para o óleo essencial de *Z. riedelianum*, foram preparadas as formulações descritas na Tabela 3 para o óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium*.

**Tabela 3:** Formulações de nanoesferas à base de óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium*.

Formulações	Componentes					
	PCL (mg)	Span 60 (mg)	Óleo essencial (mg)	Acetona (ml)	Tween 80 (mg)	Água (ml)
NS5	150	50	50	15	50	30
NS6	150	50	100	15	50	30
NS7	150	50	250	15	50	30

#### 4.6. Caracterização das Nanopartículas

As nanopartículas à base dos óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* foram analisadas por espectroscopia UV/VIS à 247,72 nm e 245,93 nm, respectivamente.

##### 4.6.1. Determinação da eficiência de encapsulação (EE %) do óleo essencial

A determinação do óleo essencial encapsulado foi realizada utilizando a técnica de filtração-centrifugação. Em tubos com filtros de acetato de celulose e poros de 0,22  $\mu\text{m}$  (Spin-X, Corning®) foram adicionados 1mL das suspensões das nanopartículas (Figura 5). Estas foram colocadas em uma centrífuga (Hettich – Mickro 220), por 1 hora a 8000 rpm a 20°C. Na sequência foi removido 30  $\mu\text{L}$  do ultrafiltrado e analisado por espectroscopia UV/VIS.



**Figura 5:** Determinação da eficiência de encapsulação pela técnica de filtração-centrifugação.



A eficiência de encapsulação (EE%), em porcentagem, foi determinada pela diferença entre a quantidade total de óleo essencial adicionado às nanopartículas e a quantidade de óleo essencial livre através do uso da seguinte equação:

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

Em que A é a concentração de óleo essencial no ultrafiltrado ( $\mu\text{g/mL}$ ) e B é a concentração de óleo essencial total na suspensão ( $\mu\text{g/mL}$ ).

#### **4.6.2. Determinação do pH**

Os valores de pH das suspensões coloidais foram determinados diretamente nas suspensões através do potenciômetro (Qualxtron Mod. 8010), previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e pH 7,0. O pH foi medido logo após o preparo de cada amostra.

#### **4.6.3. Determinação do Potencial Zeta**

O potencial zeta (PZ) foi determinado em quintuplicata no Zeta Potencial Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation).

#### **4.6.4. Determinação do diâmetro das partículas**

O diâmetro das partículas (DP) em suspensão foi determinado em Diâmetro BI-FOQELS (Fiber Optic Quase Elastic Light Scattering) da Brookhaven Instruments Corporation. As amostras foram diluídas em água destilada para uma concentração final de 5% (v/v) e analisadas em quintuplicata.

#### **4.6.5. Avaliação morfológica das suspensões de nanopartículas**

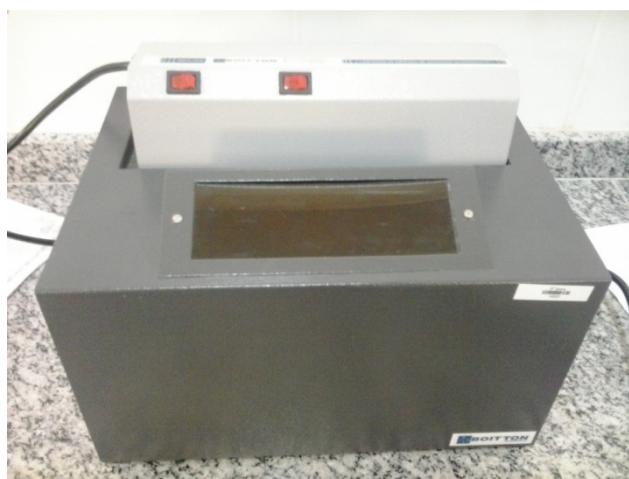
As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic), da Universidade Federal de Goiás (UFG). Para isso, as amostras foram diluídas em água destilada a 5% (v/v). Em seguida, 30 $\mu\text{L}$  da suspensão coloidal foi evaporada diretamente em lâmina de vidro utilizadas para a observação das amostras através microscopia eletrônica de varredura. Após, total evaporação do solvente, as amostras foram metalizadas com ouro e submetidas à análise por

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) Jeol, JSM – 6610, equipado com EDS, Thermo scientific NSS Spectral Imaging.

#### 4.6.6. Estudo da degradação acelerada pela luz UV

Os estudos de degradação acelerada pela luz UV do óleo essencial *in natura* e nanoencapsulados foram realizados em uma câmara Ultravioleta (Figura 6) contendo um conjunto de duas lâmpadas especiais que simulam a radiação no espectro do UV-A e UV-C com comprimentos de onda 365 e 254 nm, respectivamente.

O sistema foi mantido em temperatura ambiente ( $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ) e as amostras de óleo essencial *in natura* e nanoencapsulados (1 mL por *vial*) foram colocadas na câmara e analisadas por espectroscopia UV/VIS em intervalos de tempo previamente estabelecidos (0,0; 0,5; 1; 2; 3; 5 e 7 horas) para avaliar estabilidade dos óleos essenciais. Os experimentos foram realizados em triplicata.



**Figura 6:** Câmara de Ultravioleta.

#### 4.6.7. Estudos da liberação *in vitro*

O estudo do perfil de liberação dos óleos essenciais das nanopartículas foi realizado através da técnica de diálise inversa (MAGENHEIM & BENITA, 1991).

Foi adicionado um volume 10 mL da suspensão das nanopartículas em 90 mL de solução aquosa de 0,3% de Tween 80. Nessa suspensão, foi adicionado vários sacos de diálise (membrana de celulose MM 12000D, Sigma-Adrich Química, Sintra, Portugal) contendo 1,0 mL da solução aquosa de 0,3% de Tween 80, conforme Cazal (2011). O sistema foi mantido sob agitação magnética em banho termostatizado a temperatura

ambiente ( $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ). Em intervalos de tempo previamente estabelecidos (0,0; 0,5; 1; 2; 3; 6; 12; 24; 48 e 72 horas) procedeu-se à remoção dos sacos de diálise do meio de liberação e à quantificação do óleo essencial liberado foi realizada por espectroscopia UV/VIS. Os experimentos foram realizados em triplicata.

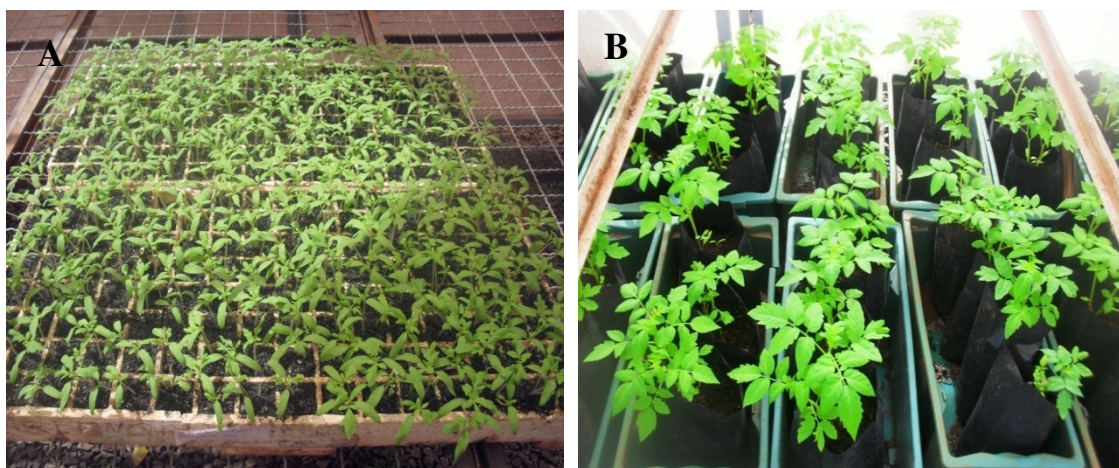
#### **4.7. Ensaio Biológico**

O ensaio biológico foi realizado no laboratório de entomologia do IF Goiano - *campus* Rio Verde. As ninfas de *B. tabaci* biótipo B utilizadas nos experimentos foram cedidas pela Embrapa Arroz e Feijão, localizada em Santo Antônio de Goiás, GO. Os indivíduos de mosca-branca foram criados e mantidos em casa de criação no laboratório de entomologia do IF Goiano – *câmpus* Rio Verde. Para a manutenção da criação foram utilizadas plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), couve (*Brassica oleracea* variedade *acephala*) e soja (*Glycine Max* L.). No ensaio, os óleos essenciais (*in natura* e nanoencapsulados) obtidos das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* foram avaliadas em populações de *B. tabaci*.

Ao todo foram realizados três ensaios com populações de *B. tabaci* utilizando a mesma metodologia. O primeiro foi realizado entre outubro e novembro de 2012; o segundo realizado em julho de 2013, ambos utilizando óleos essenciais *in natura* das duas plantas. O terceiro ensaio utilizando apenas nanopartículas preparadas com os óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* foi realizado em dezembro de 2013.

##### **4.7.1. Plantio e transplante das mudas de tomate hospedeiras**

As sementes de tomate do híbrido Heinz-9553 foram semeadas em duas bandejas de isopor de 128 células cada, preenchidas com substrato comercial Germinar<sup>®</sup> (Figura 7). As mudas foram mantidas em casa de vegetação do laboratório de cultura de tecidos do IF Goiano *câmpus* Rio Verde. Em seguida foram transplantados para vasos contendo cerca de 2 kg de solo preparados com terra, substrato comercial Germinar<sup>®</sup> e adubo orgânico, 22 dias após o plantio, e foram distribuídos aleatoriamente na casa de vegetação.



**Figura 7:** Mudas de tomate em bandejas de polipropileno (A) e transplantadas (B) em casa de vegetação do laboratório de cultura de tecidos do IF Goiano Câmpus Rio Verde.

#### **4.7.2. Aplicação do óleo essencial e infestação com *B. tabaci***

A aplicação do óleo essencial (*in natura* e nanoencapsulados) nas folhas de tomate foi realizada 30 dias após o transplante das mudas, sendo em seguida, submetidas à oviposição pelo período de 24 horas. Para melhor dispersão dos óleos essenciais, eles foram diluídos em solução aquosa de Tween<sup>®</sup> 80 a 0,5% (YANG *et al.*, 2010). Os óleos essenciais *in natura*, nas diferentes concentrações, foram aplicados nas faces adaxial e abaxial das folhas, utilizando algodão umedecidos com a solução aquosa de óleos essenciais e Tween<sup>®</sup> 80 para melhor distribuição na superfície foliar.

Para infestação no teste sem escolha, os insetos foram liberados no interior de sacos de tecido *voil* (0,3 m de largura por 0,38 m de comprimento) colocados na terceira ou quarta folha de cada planta, após a aplicação dos tratamentos, sendo submetidos à oviposição por 24 horas (Figura 8 A). Também foi realizado o teste com escolha. Neste caso, após a aplicação dos óleos essenciais, as mudas de tomate foram colocadas dentro da casa de criação de *B. tabaci* e submetidas à oviposição por um período de 24 horas (Figura 8 B).



**Figura 8:** Ensaio biológico com *B. tabaci*: teste sem escolha (A); teste com escolha (B).

#### 4.7.3. Concentração e tempo letal

Para estimar a concentração letal ( $CL_{50}$ ), foram aplicados nas folhas das plantas hospedeiras os seguintes tratamentos: controle água; controle Tween 80 a 0,5%, os óleos essenciais de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum in natura* em diferentes concentrações (0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5%) (Yang *et al.*, 2010, Pinheiro, 2009). Como controle positivo foi utilizado o inseticida Piriproxifem (Tiger<sup>®</sup>)1%, amplamente utilizado no controle de *B. tabaci*. No terceiro ensaio foram avaliadas a ação das nanoesferas à base de óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* a 5,0 e 2,0%; as nanoesferas vazias (sem óleo essencial) como controle negativo, além do controle água.

Ovos e ninfas foram contados durante aproximadamente 15 dias, em intervalos de cerca de 3 dias a fim de verificar o tempo letal ( $TL_{50}$ ) do óleo essencial *in natura* e nanoencapsulado. A contagem dos ovos e das ninfas nos diferentes ínstares foi realizada com o auxílio de um microscópio estereoscópico (aumento de 20x).

#### 4.8. Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso constituídos de quinze tratamentos com cinco repetições (ensaios biológicos I e II) e seis tratamentos com cinco repetições (ensaio biológico III) para cada um dos testes (com e sem livre escolha). Os dados foram submetidos à análise de variância, realizada no programa computacional Sisvar, sendo a comparação entre médias feita pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Teor e aspecto físico do óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum*

A hidrodestilação das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* forneceram óleos amarelados claros, menos denso que a água, com rendimento médio  $0,03\% \pm 0,01$  e  $0,02\% \pm 0,005$ , respectivamente. As tabelas 3 e 4 trazem o número de extração, a massa e o rendimento dos óleos essenciais obtidos.

**Tabela 4:** Rendimento da hidrodestilação das folhas de *Z. rhoifolium*.

Número de extrações	Mês das extrações	Massa (g) folha fresca	Massa (g) do óleo essencial	Rendimento (%)
1	Janeiro	800	0,20	0,03
2	Fevereiro	800	0,15	0,02
3	Fevereiro	800	0,10	0,01
4	Fevereiro	800	0,10	0,01
5	Fevereiro	800	0,10	0,01
6	Março	300	0,10	0,03
7	Abril	250	0,13	0,04
8	Maio	300	0,15	0,05
9	Junho	250	0,13	0,05
10	Julho	200	0,10	0,05
11	Agosto	200	0,10	0,05
12	Outubro	300	0,20	0,06
13	Novembro	400	0,24	0,06
14	Dezembro	400	0,18	0,04
<b>TOTAL</b>		6,500	1,95	0,03

Os resultados obtidos apontam para uma variação no rendimento dos óleos essenciais ao longo dos meses, no entanto esse rendimento pode ser influenciado por uma série de fatores. Segundo Ferronato (2010), a síntese dos metabólitos secundários, como os óleos essenciais, pode ser afetada pelas condições ambientais, pelo tempo de vida, pelo desenvolvimento da planta e seus diferentes órgãos, sendo estes fatores de considerável importância, podendo influenciar a qualidade e quantidade dos metabólitos produzidos. Além disso, o autor destaca que fatores como a época de colheita, o horário e o modo de secagem do material vegetal podem ter influência sobre a composição e o teor do óleo essencial.

**Tabela 5:** Rendimento da hidrodestilação das folhas de *Z. riedelianum*.

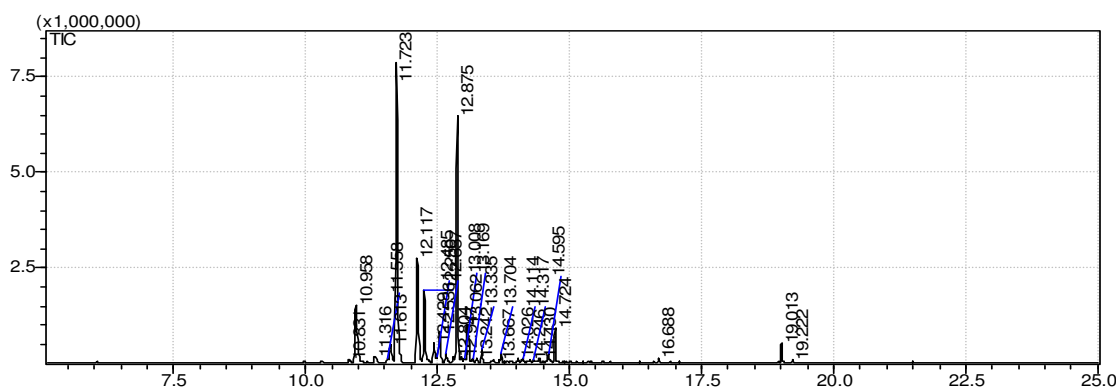
Número de extrações	Mês das extrações	Massa (g) folha Fresca	Massa (g) do óleo essencial	Rendimento (%)
1	Janeiro	900	0,24	0,02
2	Fevereiro	900	0,25	0,02
3	Fevereiro	900	0,30	0,03
4	Fevereiro	900	0,30	0,03
5	Fevereiro	900	0,30	0,03
6	Março	400	0,08	0,02
7	Abril	400	0,08	0,02
8	Maio	400	0,08	0,02
9	Junho	500	0,09	0,02
10	Julho	600	0,12	0,02
11	Agosto	800	0,16	0,02
12	Setembro	800	0,16	0,02
13	Outubro	700	0,20	0,02
14	Novembro	800	0,08	0,01
15	Dezembro	800	0,08	0,01
<b>TOTAL</b>		12,500	2,5	0,02

As interferências no conteúdo total, e nas proporções relativas dos metabólitos secundários podem ocorrer em diferentes níveis sazonais, intra e inter-planta, intra e interespecífico e mesmo com a existência de um controle genético, os metabólitos secundários sofrem modificações através das atividades químicas da planta e do ambiente circundante (MORAIS, 2009; NASCIMENTO, 2007).

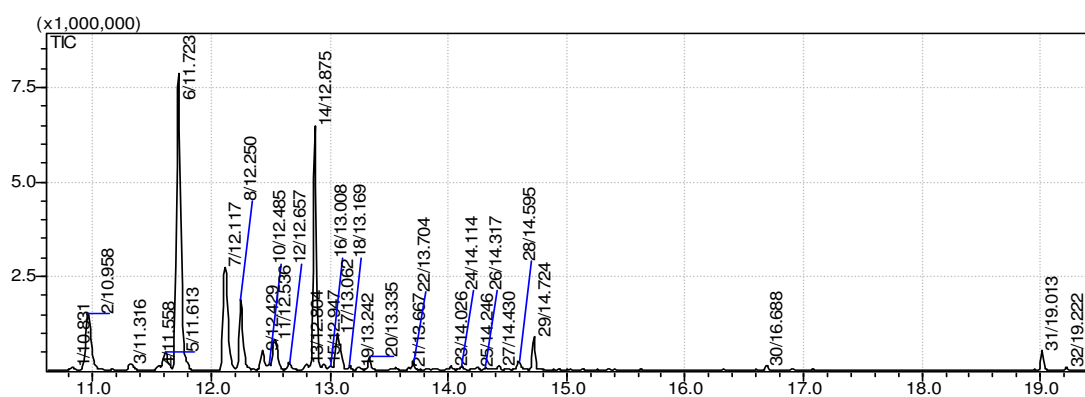
## 5.2. Análises químicas dos óleos essenciais

### 5.2.1. Composição química do óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium*

Os cromatogramas obtidos nas melhores condições estabelecidas para análise do óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium* estão apresentados nas Figuras 9 e 10.



**Figura 9:** Cromatograma obtido no GC-EM para o óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium*. Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 100° C; tempo inicial de 6,0 min, a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 250° C, permanecendo nesta temperatura por 4,0 min.



**Figura 10:** Ampliação do cromatograma obtido no GC-EM para o óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium*. Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 100° C; tempo inicial de 6,0 min, a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 250° C, permanecendo nesta temperatura por 4,0 min.

Foram identificados 32 compostos químicos presentes no óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium* (Tabela 6). Os compostos encontrados em maiores porcentagens foram  $\beta$ -Elemeno, D-germacreno,  $\beta$ -cariofileno,  $\delta$ -elemeno,  $\beta$ -cedreno, biciclogermacreno e E-cariofileno.



**Tabela 6:** Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium*.

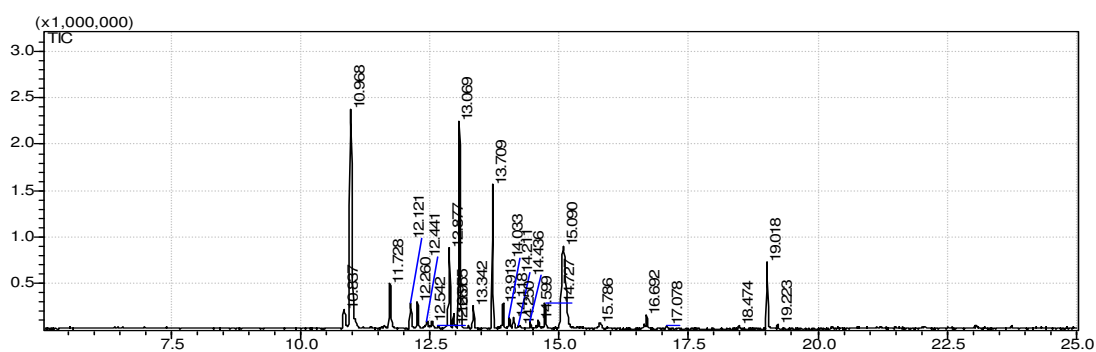
Pico	TR (min)	Composto	Área (%) GC-MS	IR exp.*	IR lit.**
1	10,831	4,7,7-trimetilbiciclo[4.1.0]heptan-3-ol	0,32	1329,283	-
2	10,958	δ elemeno	7,63	1337,952	1335
3	11,316	Geranil Acetato	0,75	1362,389	1379
4	11,558	A-cubebeno	0,44	1378,908	1387
5	11,613	2,4-diiisopropenil-1-metil-1-vinilciclohexano	2,08	1382,662	-
6	11,723	β-elemeno	31,26	1390,171	1389
7	12,117	β-cariofileno	12,09	1419,639	1408
8	12,250	B-cedreno	6,69	1430,086	1419
9	12,429	Seicheleno	1,91	1444,148	1446
10	12,485	β-farnesenoE	0,42	1448,547	1454
11	12,536	E-cariofileno	3,63	1452,553	1464
12	12,657	Tau cadinol	0,82	1462,058	1475
13	12,804	1,1,7-trimetil-4-metilenedecahidro-1H-ciclopropa[e]azuleno	0,56	1473,606	-
14	12,875	D-germacreno	18,16	1479,183	1484
15	12,947	biciclo[5.3.0]decano, 2-metilene-5-(1-metilvinil)-8-metil	0,49	1484,839	-
16	13,008	Cedreno	0,36	1489,631	-
17	13,062	biciclogermacreno	4,57	1493,873	1500
18	13,169	α-farnesenoE	0,32	1502,524	1505
19	13,242	D-cadinol	0,25	1508,877	-
20	13,335	biciclo[4.1.0]-3-hepteno, 2-isopropenil-5-isopropil-7,7-dimetil	0,95	1516,971	-
21	13,667	3-hexen-1-ol benzoato	0,16	1545,866	-
22	13,704	nerolidol E	0,55	1549,086	1561
23	14,026	Viridiflorol	0,12	1577,111	1592
24	14,114	1,2-15,16-diepoxihexadecano	0,25	1584,769	1600
25	14,246	2-isopropenil-5-metil-6-hepten-1-ol	0,13	1596,258	-
26	14,317	2-nitro-2-hepten-1-ol	0,13	1602,649	-
27	14,430	cis-Z-α-bisabolenopoxide	0,52	1613,340	-
28	14,595	Tau-muurolol	0,68	1628,950	1644
29	14,724	α-cadinol	2,09	1641,154	1652
30	16,688	Hexadecanal	0,24	1837,045	-
31	19,013	Fitol	1,26	1999,656	1942
32	19,222	2,4-dimetil-1-heptanol	0,17	2024,911	-

Em outros trabalhos também foram verificadas a presença de D-germacreno (9,3%), biciclogermacreno (3,1%), entre outros compostos presentes nos óleos

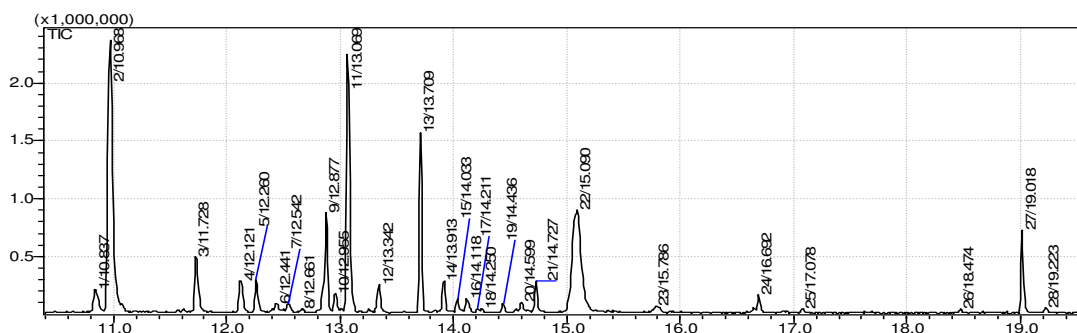
essenciais dos frutos de *Z. rhoifolium* (PIETRO *et al.*, 2011). Além destes, os autores identificaram  $\gamma$ -elemeno (0,2%), D-germacreno (6,0%) e biciclogermacreno (5,8%) nos óleos essenciais dos frutos de *Z. fagara* e D-germacreno (2,3%) e biciclogermacreno (1,5%) para os óleos essenciais dos frutos de *Z. monophyllum*. Outros autores como Silva *et al.*, (2007b) analisaram a composição química dos óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e identificaram a presença de biciclogermacreno (33,6%) e D-germacreno (11,9%) como compostos majoritários. Estes compostos também foram identificados nos óleos essenciais dos frutos de *Z. rhesta* (ROUT *et al.*, 2007) e nos óleos das folhas de *Z. syncarpum* (VIEIRA *et al.*, 2009). Entretanto, as porcentagens dos componentes diferem dos resultados encontrados no presente trabalho, uma vez que o material vegetal foi coletado em regiões diferentes, com diferentes condições climáticas, de sazonalidade, e propriedades do solo, sendo estes fatores determinantes no rendimento e composição dos óleos essenciais.

### 5.2.2. Composição química do óleo essencial das folhas de *Z. riedelianum*

As Figuras 11 e 12 apresentam os cromatogramas obtidos nas melhores condições estabelecidas para análise do óleo essencial das folhas de *Z. riedelianum*.



**Figura 11:** Cromatograma obtido no GC-EM para o óleo essencial das folhas de *Z. riedelianum*. Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 100° C; tempo inicial de 6,0 min, a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 250° C, permanecendo nesta temperatura por 4,0 min.



**Figura 12:** Ampliação do cromatograma obtido no GC-EM para o óleo essencial das folhas de *Z. riedelianum*. Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 100° C; tempo inicial de 6,0 min, a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 250° C, permanecendo nesta temperatura por 4,0 min.

Foram observados 28 constituintes químicos presentes no óleo essencial das folhas de *Z. riedelianum* (Tabela 7). No óleo essencial das folhas de *Z. riedelianum*, observou-se como compostos majoritários  $\gamma$ -elemeno, fitol, biciclogermacreno, *cis*-nerolidol e D-germacreno. Já Guy *et al.*, (2001) identificaram a presença de espatulenol (65,2%), aromadendreno (4,7%), cariofileno oxide (3,7%) e *cis*-nerolidol (1,9%) como compostos majoritários. No entanto, os compostos majoritários aqui encontrados, também foram identificados em espécies do mesmo gênero *Zanthoxylum* por Rout *et al.*, (2007).

Os óleos essenciais são produzidos como metabólitos secundários pelas plantas, constituídos de terpenos e sesquiterpenos, e podem apresentar atividades inseticida, antimicrobiana, fungicida, antiviral, entre outras (NERIO *et al.*, 2010; CASTRO, 2004; PADUCH *et al.*, 2007). Pietro *et al.*, (2011) verificaram a presença de  $\gamma$ -elemene óleo essencial dos frutos de *Z. fagara* e a presença de biciclogermacreno e D-germacreno óleo essencial dos frutos de *Z. fagara*, *Z. monophyllum* e *Z. rhoifolium* obtendo bons resultados quanto a atividade inseticida (fumigante) contra *Sitophilus oryzae* e atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* e *Colletotrichum acutatum*.

**Tabela 7:** Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Z. riedelianum*.

Pico	TR (min)	Composto	Área (%) GC-MS	IR exp.*	IR lit.**
1	10,837	2,5,6-trimetil-1,3,6-heptatrieno	1,90	1329,693	-
2	10,968	$\gamma$ -elemene	24,81	1338,635	1432
3	11,728	2,4-diisopropenil-1-metil-1-vinilciclohexano	3,68	1390,512	-
4	12,121	Aromadendreno	2,49	1419,953	1439
5	12,260	$\gamma$ -muuroleno	2,12	1430,872	1478
6	12,441	1,11-hexadecadiino	0,35	1445,090	-
7	12,542	Isotujol	0,58	1453,024	-
8	12,661	1-cloroundecano	0,39	1462,372	-
9	12,877	D-germacreno	6,52	1479,340	1484
10	12,955	biciclo[5.3.0]decano, 2-metileno-5-(1-metilvinil)-8-metil-	1,08	1485,467	-
11	13,069	Biciclogermacreno	16,18	1494,423	1500
12	13,342	$\delta$ -cadineno	1,40	1517,581	1522
13	13,709	<i>cis</i> -nerolidol	8,26	1549,521	1531
14	13,913	Espatulenol	1,58	1567,276	1577
15	14,033	cariofileno oxide	0,55	1577,720	-
16	14,118	Viridiflorol	0,65	1585,117	1592
17	14,211	Eudesmol	0,20	1593,211	1619
18	14,250	Isopulegol	0,15	1596,606	-
19	14,436	$\alpha$ -bisaboleno epoxide	0,41	1613,907	-
20	14,599	$\alpha$ -muurolol	0,51	1629,328	1644
21	14,727	$\alpha$ -cadinol	1,64	1641,438	1652
22	15,090	Fitol	18,16	1675,781	1942
23	15,786	1-hexanol, 2-(hidroximetil)-	0,78	1744,177	-
24	16,692	1, 11-undecanodiol	0,71	1837,473	-
25	17,078	Palmitaldeído	0,28	1878,801	-
26	18,475	$\alpha$ -ácido Linolênico	0,25	1968,789	-
27	19,018	NI	4,10	1999,943	-
28	19,223	5,6-dimetildecano	0,27	2025,034	-

\* = 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.

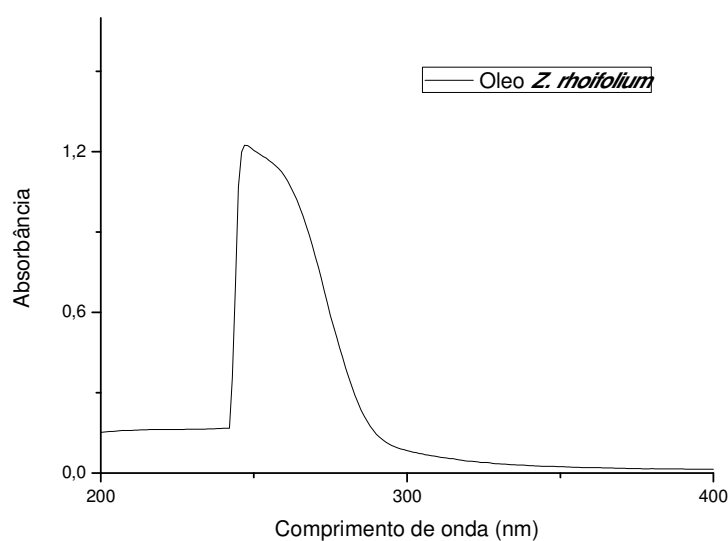
NI = Não identificados

Os compostos naturais como os óleos essenciais são reponsáveis, entre outras ações, pela interação inseto-planta, tais como atração e repelência, por exemplo (CASTRO, 2004). Um estudo realizado sobre o mutualismo entre plantas e insetos, por meio da influência na síntese de terpenos pela infestação de *B. tabaci* e, demonstrou que as plantas aumentam a síntese de compostos terpênicos como  $\alpha$ -pineno, limoneno, canfora,  $\alpha$ -cedreno e  $\beta$ -cedreno, ao serem infestadas por esta praga agrícola (LUAN *et*

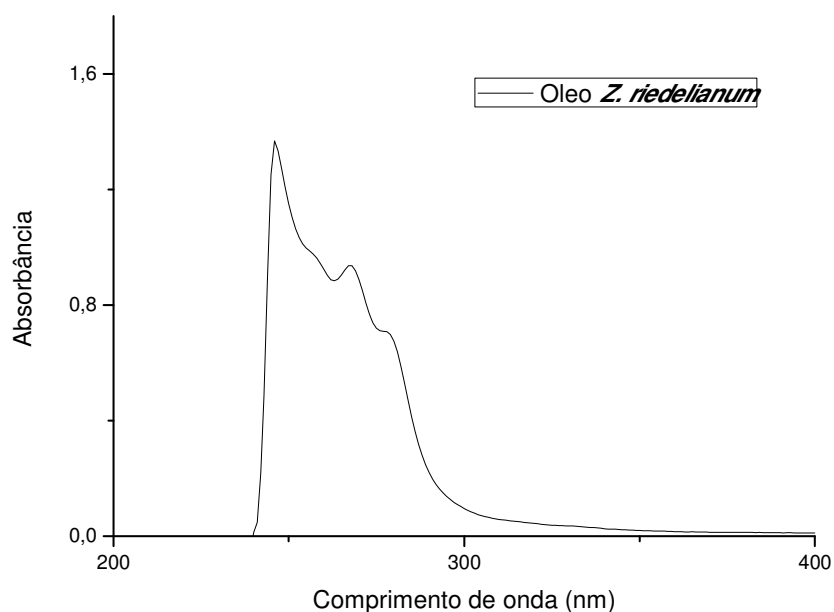
*al.*, 2013). Além disso, os autores realizaram ensaio para avaliar a ação destes compostos terpênicos sobre o desempenho de *B. tabaci*, e verificaram que os compostos  $\alpha$ -cedreno e  $\beta$ -cedreno reduzem a postura de ovos e a sobrevivência das fêmeas de Mosca-branca. Segundo os autores, ao reprimir a expressão dos genes que codificam a síntese desses compostos os efeitos da infestação por *B. tabaci* eram ainda mais severos, comprovando assim a eficiência destes compostos no controle de *B. tabaci* (LUAN *et al.*, 2013). O composto  $\beta$ -cedreno foi encontrado na espécie *Z. rhoifolium*, porém não foi encontrado na espécie *Z. riedelianum*, no entanto ambas apresentaram perfil semelhante no estudo sobre o controle de *B. tabaci* realizado no presente trabalho.

### 5.3. Quantificações dos óleos essenciais

Os óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* foram quantificados por espectroscopia UV-VIS a 247,72 nm e 245,93 nm, respectivamente, de acordo com a maior absorbância observada para este comprimento de onda, as Figura 13 e 14 mostra o espectro de varredura para ambos os óleos essenciais.



**Figura 13:** Espectro de varredura por espectroscopia UV-VIS do óleo essencial de *Z. rhoifolium* ( $\lambda_{\max}=247,72$  nm) em hexano.

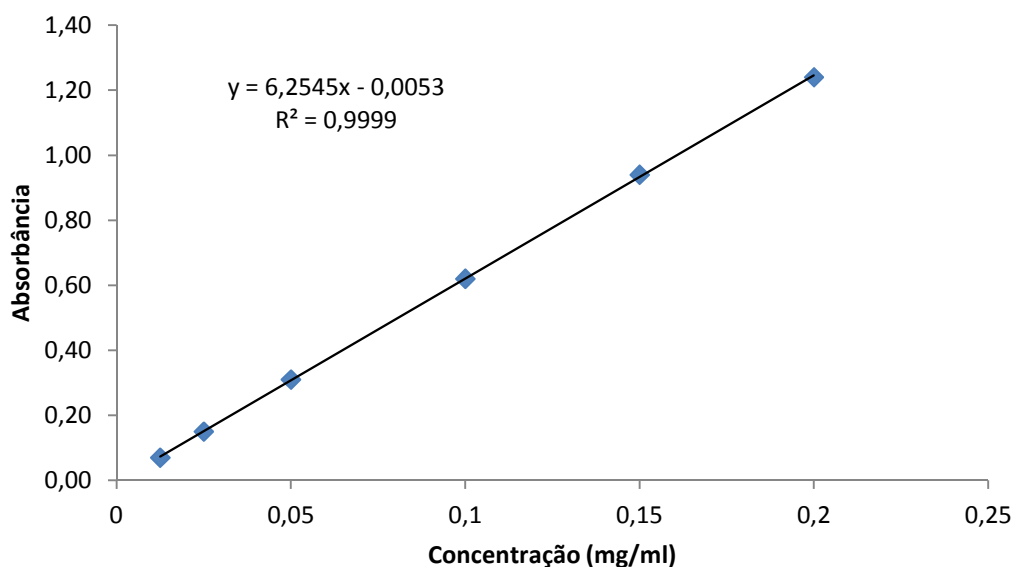


**Figura 14:** Espectro de varredura por espectroscopia UV-VIS do óleo essencial de *Z. riedelianum* ( $\lambda_{\text{max}}=245,93$  nm) em hexano.

### 5.3.1. Validação do método analítico para quantificação do óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium* por espectroscopia UV-VIS.

A validação de um método é necessária para demonstrar se o método utilizado na quantificação é eficaz, reprodutivo e específico (RIBANI, *et al.*, 2004). Os parâmetros necessários para medir a aceitabilidade do desempenho de um método analítico de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), podem variar de acordo com a categoria, conforme a finalidade. O presente trabalho se enquadra na categoria I, cuja finalidade é a realização de testes quantitativos para determinação do princípio ativo. Neste caso, é necessário avaliar a especificidade, linearidade, precisão, repetibilidade e exatidão.

A curva de calibração foi obtida através da regressão linear, utilizando as concentrações 0,2; 0,15; 0,1; 0,5; 0,025 e 0,0125mg/mL (Figura 15). A equação da reta do óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium* foi  $y = 6,2545x - 0,0053$ , em que  $y$  é a absorção da banda e  $x$  é a concentração do óleo essencial na solução em mg/mL foi linear ( $n = 3$ ) na faixa de trabalho e o coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) foi de 0,9999.



**Figura 15:** Curva de calibração do óleo essencial de *Z. rhoifolium* ( $\lambda_{\text{max}}=247,72$  nm) em hexano.

A exatidão (%) e precisão (DPR %) obtidas para cada concentração usada na curva de calibração do óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium* se encontra descrita na Tabela 8.

**Tabela 8:** Precisão e exatidão obtidas na construção da curva de calibração por padronização externa.

Concentração Nominal (mg/mL)	Média das Abs	Desvio Padrão ( $n = 3$ )	DPR (%) (Precisão)	Exatidão (%)
<b>0,0125</b>	0,07	0,00	0,0	98,9
<b>0,025</b>	0,15	0,00	0,0	100,2
<b>0,05</b>	0,31	0,01	1,9	99,7
<b>0,1</b>	0,62	0,01	1,9	98,4
<b>0,15</b>	0,94	0,02	1,6	99,8
<b>0,2</b>	1,24	0,01	0,8	98,9

Os dados da precisão e exatidão intra e inter-dia dos óleos de *Z. rhoifolium* estão apresentados nas Tabelas 9 e 10.

**Tabela 9:** Precisão [DPR (%)] de amostras do óleo essencial de *Z. rhoifolium* usadas na validação do método analítico.

<b>Concentração (mg/mL)</b>	<b>Intra-dia 1 (n = 3)</b>	<b>Intra-dia 2 (n = 3)</b>	<b>Intra-dia 3 (n = 3)</b>	<b>Inter-dia (n = 9)</b>
<b>0,0150</b>	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>0,1120</b>	0,8	0,8	0,8	0,8
<b>0,1880</b>	0,5	0,5	0,5	0,5

**Tabela 10:** Exatidão (%) de amostras do óleo essencial de *Z. rhoifolium* usadas na validação do método analítico.

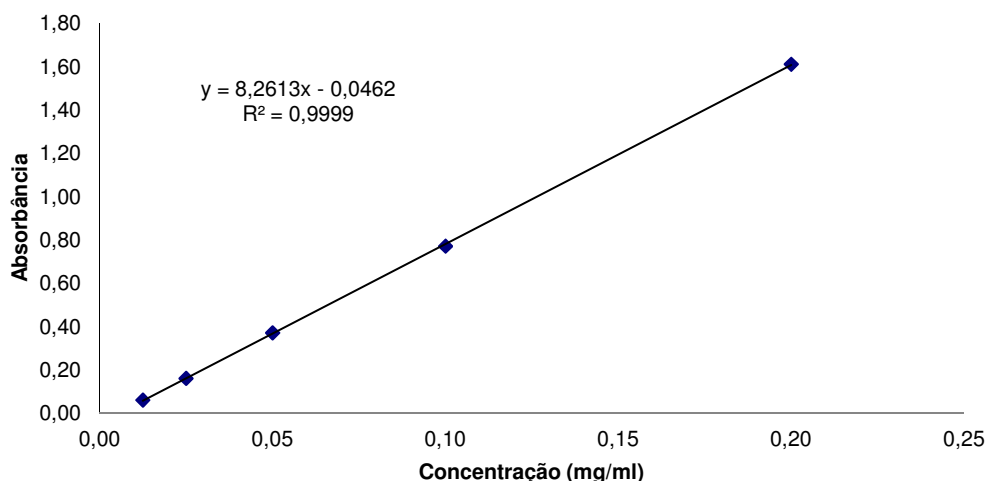
<b>Concentração (mg/mL)</b>	<b>Intra-dia 1 (n = 3)</b>	<b>Intra-dia 2 (n = 3)</b>	<b>Intra-dia 3 (n = 3)</b>	<b>Inter-dia (n = 9)</b>
<b>0,0150</b>	101,27	101,27	101,27	101,3
<b>0,1120</b>	103,98	101,60	102,55	102,7
<b>0,1880</b>	102,77	101,07	102,77	102,2

O LD de *Z. rhoifolium* calculado de acordo com o desvio padrão do intercepto (0,002) e com o coeficiente angular (0,022) da curva de calibração (0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,15 e 0,2 mg.mL<sup>-1</sup>), foi de 0,0018 mg.mL<sup>-1</sup>, e o LQ foi de 0,0029 mg.mL<sup>-1</sup>.

### 5.3.2. Validação do método analítico para quantificação do óleo essencial das folhas de *Z. riedelianum* por espectroscopia UV-VIS.

Para quantificação, a curva de calibração foi obtida em função das absorbâncias relativas às concentrações 0,2; 0,1; 0,5; 0,025 e 0,0125 mg.mL<sup>-1</sup>. As curvas analíticas para a o óleo essencial de *Z. riedelianum* foram obtida através da regressão linear, apresentada na Figura 15. A equação da reta do óleo essencial das folhas de *Z. riedelianum* foi  $y = 8,2613x - 0,0463$ , e  $y$  é a absorção da banda e  $x$  é a concentração do óleo essencial na solução em mg.mL<sup>-1</sup> foi linear (n= 3) na faixa de trabalho e o coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) foi de 0,9999.





**Figura 16:** Curva de calibração do óleo essencial de *Z. riedelianum* ( $\lambda_{\text{max}}=245,93$  nm) em hexano.

A exatidão e precisão obtidas para cada concentração usada na curva de calibração do óleo essencial das folhas de *Z. riedelianum* encontra-se descrita nas Tabela 11.

**Tabela 11:** Precisão e exatidão obtidas na construção da curva de calibração por padronização externa.

<b>Concentração Nominal (mg/mL)</b>	<b>Média das Abs</b>	<b>Desvio Padrão (n = 3)</b>	<b>DPR (%) (Precisão)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
<b>0,0125</b>	0,06	0,00	<b>0,0</b>	<b>102,9</b>
<b>0,025</b>	0,16	0,01	<b>3,6</b>	<b>101,5</b>
<b>0,05</b>	0,37	0,02	<b>4,1</b>	<b>100,0</b>
<b>0,1</b>	0,77	0,01	<b>1,5</b>	<b>98,0</b>
<b>0,2</b>	1,61	0,00	<b>0,1</b>	<b>100,2</b>

Os dados da precisão e exatidão intra e inter-dia dos óleos de *Z. riedelianum* estão apresentados na Tabela 12 e 13.

**Tabela 12:** Precisão [DPR (%)] de amostras do óleo essencial de *Z. riedelianum* usadas na validação do método analítico.

<b>Concentração (mg/mL)</b>	<b>Intra-dia 1 (n = 3)</b>	<b>Intra-dia 2 (n = 3)</b>	<b>Intra-dia 3 (n = 3)</b>	<b>Inter-dia (n = 9)</b>
<b>0,017</b>	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>0,130</b>	1,5	0,6	1,9	1,3
<b>0,183</b>	1,2	1,4	0,4	1,0

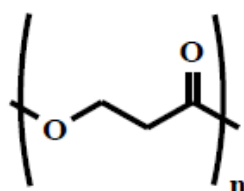
**Tabela 13:** Exatidão (%) de amostras do óleo essencial de *Z. riedelianum* usadas na validação do método analítico.

Concentração (mg/mL)	Intra-dia 1 (n = 3)	Intra-dia 2 (n = 3)	Intra-dia 3 (n = 3)	Inter-dia (n = 9)
0,017	101,52	101,52	101,52	101,5
0,130	99,85	99,85	101,10	100,3
0,183	101,69	102,13	105,89	103,2

O LD do óleo essencial de *Z. riedelianum* calculado de acordo com o desvio padrão do intercepto (0,005) e com o coeficiente angular (0,044) da curva de calibração (0,0125; 0,025; 0,05; 0,1 e 0,2 mg.mL<sup>-1</sup>), foi de 0,0018 mg.mL<sup>-1</sup> e o LQ foi de 0,0054 mg.mL<sup>-1</sup>. O LQ calculado foi menor que o primeiro ponto da curva de calibração, provando que o método foi linear, exato e preciso em toda faixa de trabalho para o óleo essencial das folhas de *Z. riedelianum*.

#### 5.4. Nanopartículas dos óleos essenciais de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum*

As suspensões de nanopartículas contendo os óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* foram preparadas através do método de nanoprecipitação (FESSI *et al.*, 1989), utilizando o polímero poli- $\epsilon$ -(caprolactona) (PCL), cuja estrutura é mostrada na Figura 17.



**Figura 17:** Estrutura do polímero poli- $\epsilon$ -(caprolactona) (PCL).

As propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e ausência de toxicidade desse polímero favoreceram sua escolha. Ao sofrer degradação, o polímero sofre mudança deletéria em suas propriedades, em virtude da alteração na sua estrutura química, através do relaxamento da cadeia polimérica, da quebra da unidade monomérica localizada na extremidade da cadeia (erosão) ou ainda através da cisão aleatória de uma ligação em alguma posição ao longo da cadeia polimérica (degradação). Dessa forma, um polímero biodegradável tem a degradação medida, total

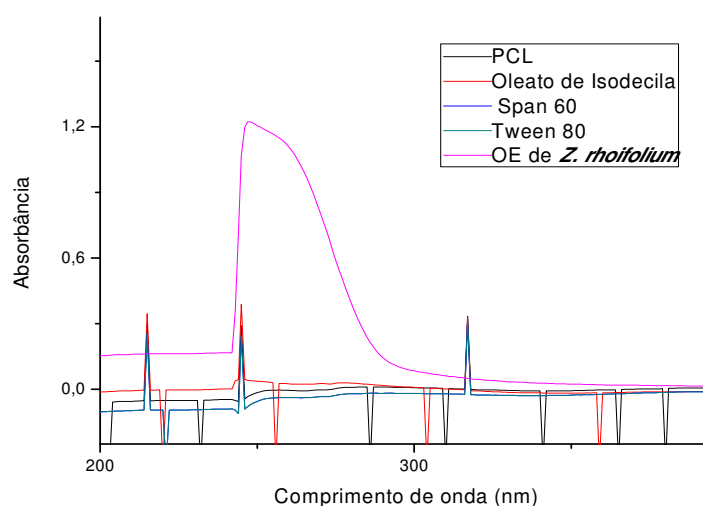
ou parcialmente, por um sistema biológico (RÉ & RODRIGUES, 2006; NOBES & MARCHESSAULT, 1999).

Nos sistemas nanométrico, os tensoativos têm a finalidade de proporcionar estabilidade aos sistemas nanoparticulados. Dessa forma, a sedimentação das partículas e a difusão da substância ativa encapsulada podem ser evitadas pelo uso de um tensoativo de elevado EHL (equilíbrio hidrofílico-lipofílico); por sua vez, um tensoativo de baixo EHL, favorece a obtenção de população de tamanho pequeno e homogêneo (GUTERRES *et al.*, 1995).

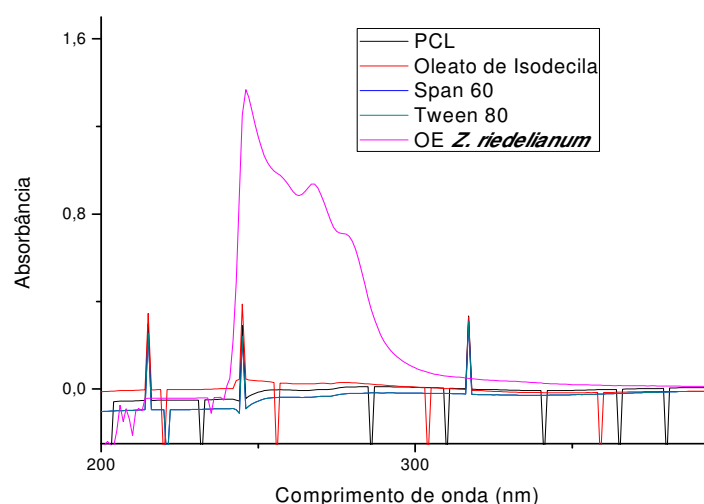
No presente trabalho foram preparadas diferentes formulações de nanocápsulas (NC1, NC2, NC3, NC4 e NC5) e nanoesferas (NS1, NS2, NS3, NS4, NS5, NS6, NS7 e NS8) objetivando obter maior eficiência de encapsulação combinada com maior estabilidade do sistema. Nas formulações preparadas não se observou sobra de óleo essencial e uma aparentemente estável foi obtida, entretanto, as nanoesferas apresentaram um sistema mais homogêneo que as nanocápsulas.

### 5.5. Caracterização das nanopartículas

Com a varredura dos componentes das nanopartículas, conforme apresentado nas Figuras 18 e 19, foi observado que os componentes das nanopartículas não exercem qualquer influência nas análises quantitativas das mesmas, uma vez que não apresentaram nenhum pico de absorção na faixa de comprimento de onda trabalhado.



**Figura 18:** Espectro de varredura do óleo essencial de *Z. rhoifolium* ( $\lambda_{\max}=247,72$  nm) e dos componentes das nanopartículas (PCL, Span 60, Oleato de isodecila e Tween 80) em hexano.



**Figura 19:** Espectro de varredura do óleo essencial de *Z. riedelianaum* ( $\lambda_{\max}=245,93$  nm) e dos componentes das nanopartículas (PCL, Span 60, Oleato de isodecila e Tween 80) em hexano.

### 5.5.1. Resultados do pH, Diâmetro de Partículas (DP), Potencial Zeta (PZ), e eficiência de encapsulação (EE%)

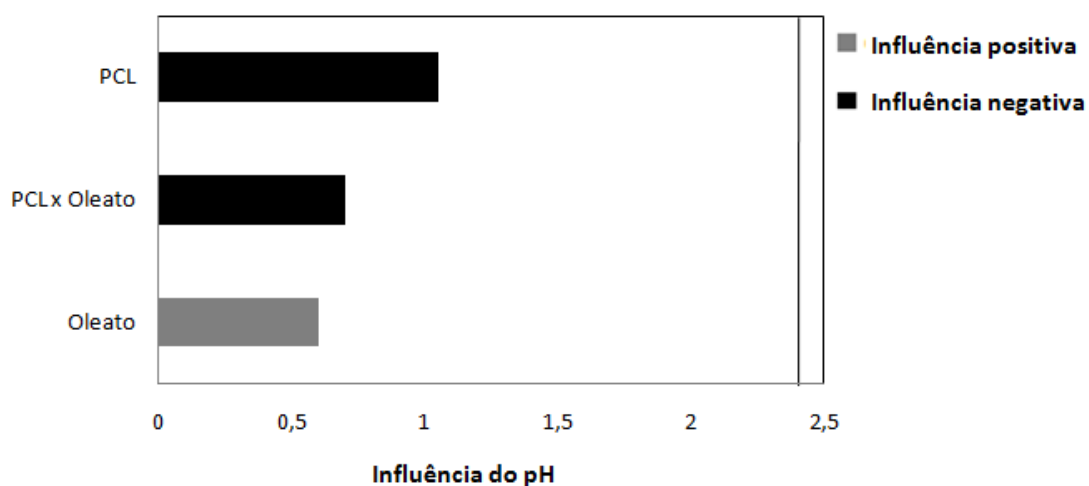
Todas as formulações preparadas foram caracterizadas observando parâmetros como pH, diâmetro de partículas, potencial zeta, eficiência de encapsulação. A Tabela 14 apresenta os resultados de pH, diâmetro de partículas (DP), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulação (EE%) para as diferentes formulações de nanopartículas.

**Tabela 14:** Resultados do pH, diâmetro de partículas (DP), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulação (EE%) para as diferentes formulações de nanopartículas ( $\pm$  Desvio Padrão).

Amostras	pH	DP (nm)	PZ (mv)	EE%
NC1	6,04 $\pm$ 1,62	539,3 $\pm$ 24,5	-24,99 $\pm$ 0,87	98,7 $\pm$ 0,85
NC2	5,86 $\pm$ 1,48	551,6 $\pm$ 18,5	-25,66 $\pm$ 2,13	98,7 $\pm$ 0,05
NC3	6,67 $\pm$ 0,22	555,0 $\pm$ 10,8	-25,86 $\pm$ 1,24	98,7 $\pm$ 0,01
NC4	5,83 $\pm$ 1,63	573,6 $\pm$ 25,7	-26,99 $\pm$ 1,08	98,6 $\pm$ 0,80

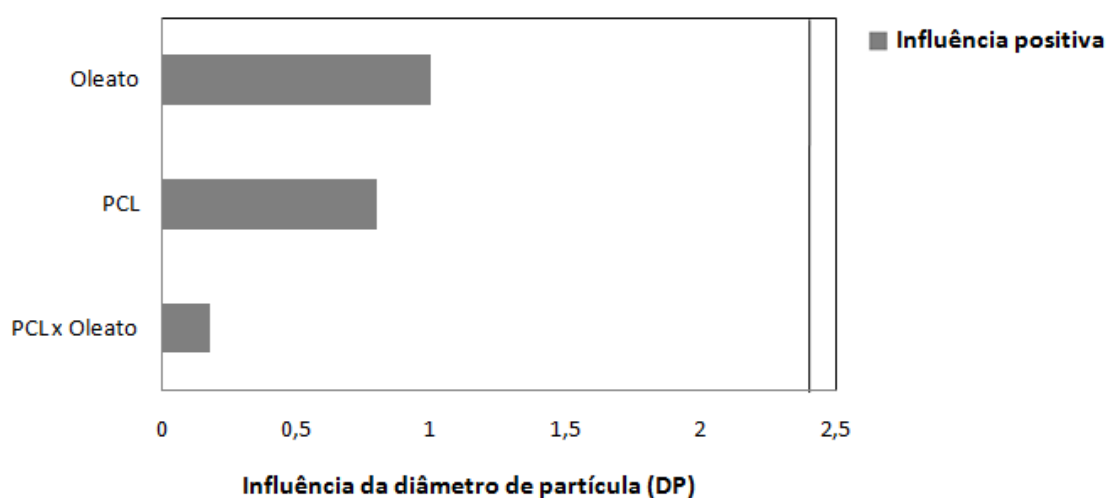
Nas Figuras 20, 21 e 22 observa-se que nenhum dos fatores avaliados (PCL e oleato de isodecila) foram estatisticamente significativos sobre o pH, diâmetro de partículas (DP) e potencial zeta (PZ).

O pH é um parâmetro importante na caracterização das nanopartículas, pois este está relacionado com a degradação do polímero e/ou de algum componente da amostra. As formulações preparadas no planejamento fatorial, apresentaram uma variação do pH próximo de 6, no entanto, de acordo com o gráfico de Pareto, os fatores avaliados não foram significativos estatisticamente (Figura 20).



**Figura 20:** Efeito de fatores sobre o pH das nanopartículas de PCL contendo óleo essencial de *Z. riedelianum*.

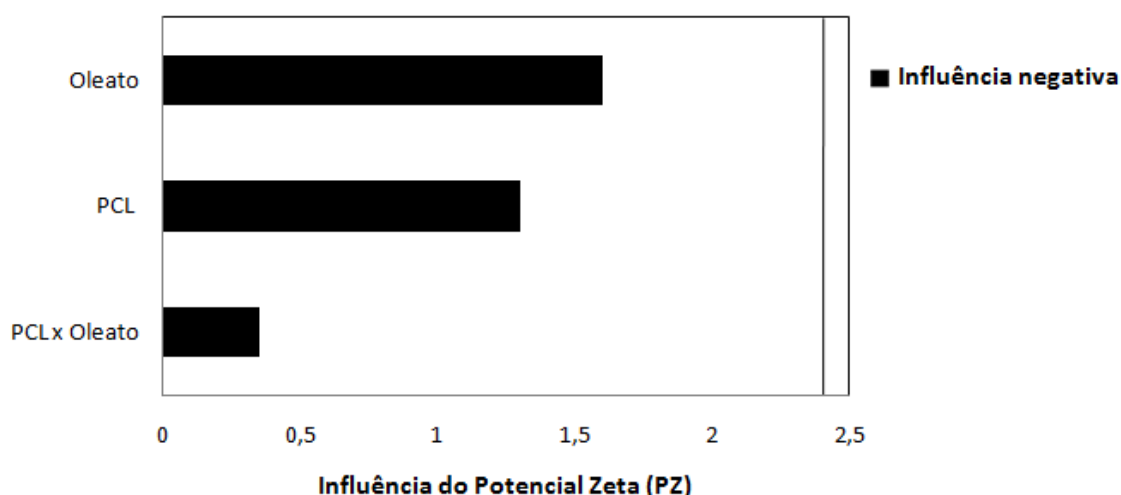
Outro parâmetro importante a ser avaliado é o diâmetro de partículas. As formulações de nanocápsulas apresentaram diâmetro médio em torno de 550 nm, sem diferenças significativas entre os fatores avaliados.



**Figura 21:** Efeito de fatores sobre o diâmetro de partículas (DP) das nanopartículas de PCL contendo óleo essencial de *Z. riedelianum*.

Resultados semelhantes foram reportados por Abreu *et al.*, (2012), em um estudo realizado com nanogéis de quitosana e goma de caju à base dos óleos essenciais de *L. sidoides*, no qual os autores verificaram um diâmetro de partículas médio entre 335 e 899 nm. O mesmo grupo de pesquisadores obteve um diâmetro de partículas entre 223 e 399 nm, nas nanopartículas de alginato e goma de caju com óleo essencial de *L. sidoides* (Oliveira *et al.*, 2014). Em outro trabalho, Hosseini *et al.*, (2013), sintetizaram nanopartículas de quitosana com óleo essencial de orégano com diâmetro entre 291 e 402 nm.

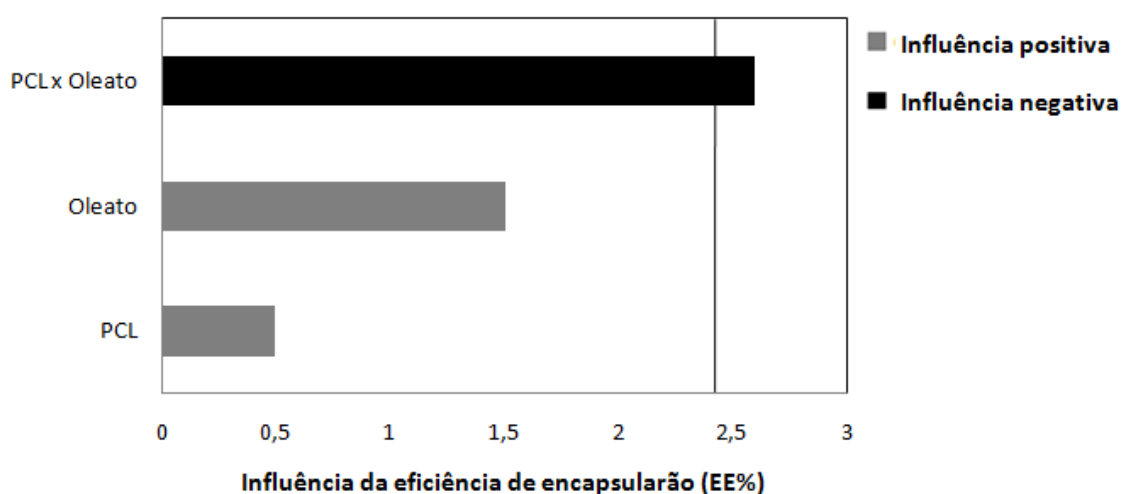
Por fim, o potencial zeta traz informações acerca das mudanças que podem ocorrer na interface entre as nanopartículas e o meio dispersante, refletindo no potencial de superfície das mesmas. Este parâmetro pode ser utilizado para avaliar a estabilidade das nanopartículas em suspensão, de modo que, quanto maior o potencial zeta, maior a estabilidade das partículas, pois estas carregadas repelem entre si, superando a tendência de agregação (CAZAL, 2011). No presente trabalho, o potencial zeta apresentou, em módulo, valores próximos de 20 mV em todas as formulações. De acordo com os resultados encontrados, o fator PCL não apresentou influência sobre o potencial zeta, uma vez que as formulações com maiores quantidades de PCL apresentaram valores similares de potencial zeta ao das formulações com menores quantidades de PCL, indicando uma boa estabilidade para todas as formulações.



**Figura 22:** Efeito de fatores sobre o potencial zeta (PZ) das nanopartículas de PCL contendo óleo essencial de *Z. riedelianum*.

Paula *et al.*, (2010), obtiveram resultados semelhantes com valores menores que 20 para o potencial zeta das nanopartículas de quitosana e goma de angico com óleo essencial de *L. sidoides*, e Abreu *et al.*, (2012), observaram valores acima de 35 para o potencial zeta dos nanogéis de quitosana e goma de caju com óleo essencial de *L. sidoides*, e Oliveira *et al.*, (2014) observaram nas nanopartículas de alginato e goma de caju com óleo essencial de *L. sidoides*, um potencial zeta acima de 30.

Pela análise do gráfico de Pareto, representado pela Figura 23, bem como os dados da Tabela 15, nota-se que apenas um fator apresentou influência estatisticamente significativa sobre a eficiência de encapsulação, ou seja, somente a interação PCL x Oleato apresentou efeito inferior a 0,05 indicando que este efeito é significativamente diferente de zero, com nível de confiança de 95,0%. O gráfico de Pareto (Figura 13), evidência a influência negativa da interação PCL x Oleato sobre a eficiência de encapsulação, ou seja, aumentar PCL e Oleato de isodecila ao mesmo tempo, diminui a eficiência de encapsulação.



**Figura 23:** Efeito de fatores sobre a eficiência de encapsulação (EE%) das nanopartículas de PCL contendo óleo essencial de *Z. riedelianum*.

**Tabela 15:** Estimativa dos efeitos e valores de  $p$  para variação de eficiência de encapsulação (EE%) das nanopartículas de PCL contendo óleo essencial de *Z. riedelianum*.

	<b>Efeito</b>	<b>Desvio Padrao</b>	<b>P</b>
<b>PCL</b>	0,02	0,03	0,6202
<b>Oleato</b>	0,05	0,03	0,1682
<b>PCL x Oleato</b>	-0,08	0,03	0,0401*

\* resultados obtidos com 95, 0 % de confiança.

Pelos resultados de caracterização das formulações de nanoesferas NS1 e NS2, não houve diferenças significativas com relação à variação do PCL. Quanto à capacidade de encapsulação do óleo essencial de *Z. riedelianum* utilizando 150 mg de PCL, as formulações NS3 e NS4, não apresentaram diferenças significativas com relação à variação da carga do óleo essencial. As nanoesferas de PCL contendo óleo essencial de *Z. riedelianum* apresentaram pH entre 4 e 7, com diâmetro de partículas em torno de 450 nm, potencial zeta próximo de -20 mV e eficiência de encapsulação de cerca de 98%. A Tabela 16 apresenta os resultados de pH, diâmetro de partículas (DP) e potencial zeta (PZ), eficiência de encapsulação (EE%) para as diferentes formulações de nanoesferas de PCL preparadas com o óleo essencial das folhas de *Z. riedelianum*.

**Tabela 16:** Resultados do pH, diâmetro de partículas (DP), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulação (EE%), para as diferentes formulações de nanoesferas de PCL preparadas com o óleo essencial das folhas de *Z. riedelianum* ( $\pm$  Desvio Padrão).

<b>Amostras</b>	<b>Ph</b>	<b>DP (nm)</b>	<b>PZ (mv)</b>	<b>EE%</b>
<b>NS1</b>	7,16 $\pm$ 0,23	472,3 $\pm$ 09,4	-24,52 $\pm$ 3,88	98,1 $\pm$ 0,22
<b>NS2</b>	3,94 $\pm$ 0,24	440,0 $\pm$ 06,6	-25,51 $\pm$ 1,15	98,9 $\pm$ 0,83
<b>NS3</b>	5,03 $\pm$ 0,04	471,6 $\pm$ 0,58	-27,27 $\pm$ 0,06	98,3 $\pm$ 0,10
<b>NS4</b>	5,01 $\pm$ 0, 01	446,2 $\pm$ 0,23	-26,79 $\pm$ 0,06	97,9 $\pm$ 0,21

A caracterização das nanoesferas de PCL contendo o óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium* apresentaram perfil semelhante às nanopartículas com o óleo de *Z. riedelianum*, sem diferenças significativas quanto aos parâmetros analisados, como pH próximo de 5, diâmetro de partículas em torno de 450 nm, potencial zeta de cerca de -20 mV e eficiência de encapsulação acima de 96% (Tabela 17).



**Tabela 17:** Resultados do pH, diâmetro de partículas (DP), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulação (EE%), para as diferentes formulações de nanoesferas de PCL preparadas com o óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium* ( $\pm$  Desvio Padrão).

Amostras	pH	DP (nm)	PZ (mv)	EE%
NS5	4,53 $\pm$ 0,31	464,6 $\pm$ 0,58	-26,54 $\pm$ 0,06	98,9 $\pm$ 0,08
NS6	5,04 $\pm$ 0,05	457,6 $\pm$ 0,58	-26,12 $\pm$ 0,10	97,8 $\pm$ 0,06
NS7	5,05 $\pm$ 0,07	460,4 $\pm$ 0,35	-28,40 $\pm$ 0,09	96,7 $\pm$ 0,10

Resultados similares foram verificados por Paula *et al.*, (2010), que verificaram eficiência de encapsulação de até 77,8% para as nanopartículas de quitosana e goma do angico à base do óleo de *L. sidoides*. Abreu *et al.*, (2012), também verificaram uma eficiência de encapsulação entre 60 e 70% para os nanogéis de quitosana e goma de caju com óleo essencial de *Lippia sidoides*. Oliveira *et al.*, (2014), em um estudo realizado com nanopartículas de goma de alginato e de caju para o encapsulamento do óleo essencial de *L. sidoides* obtiveram uma eficiência de encapsulação de 55%. Maji *et al.*, (2007), em estudo sobre a microencapsulação, em gelatina de glutaraldeído reticulado, do óleo essencial de *Z. limonella*, para aplicação como repelente, observaram eficiência de 98,2% para o óleo essencial de *Z. limonella* demonstrando que o óleo essencial deste gênero apresenta uma boa afinidade com a matriz polimérica.

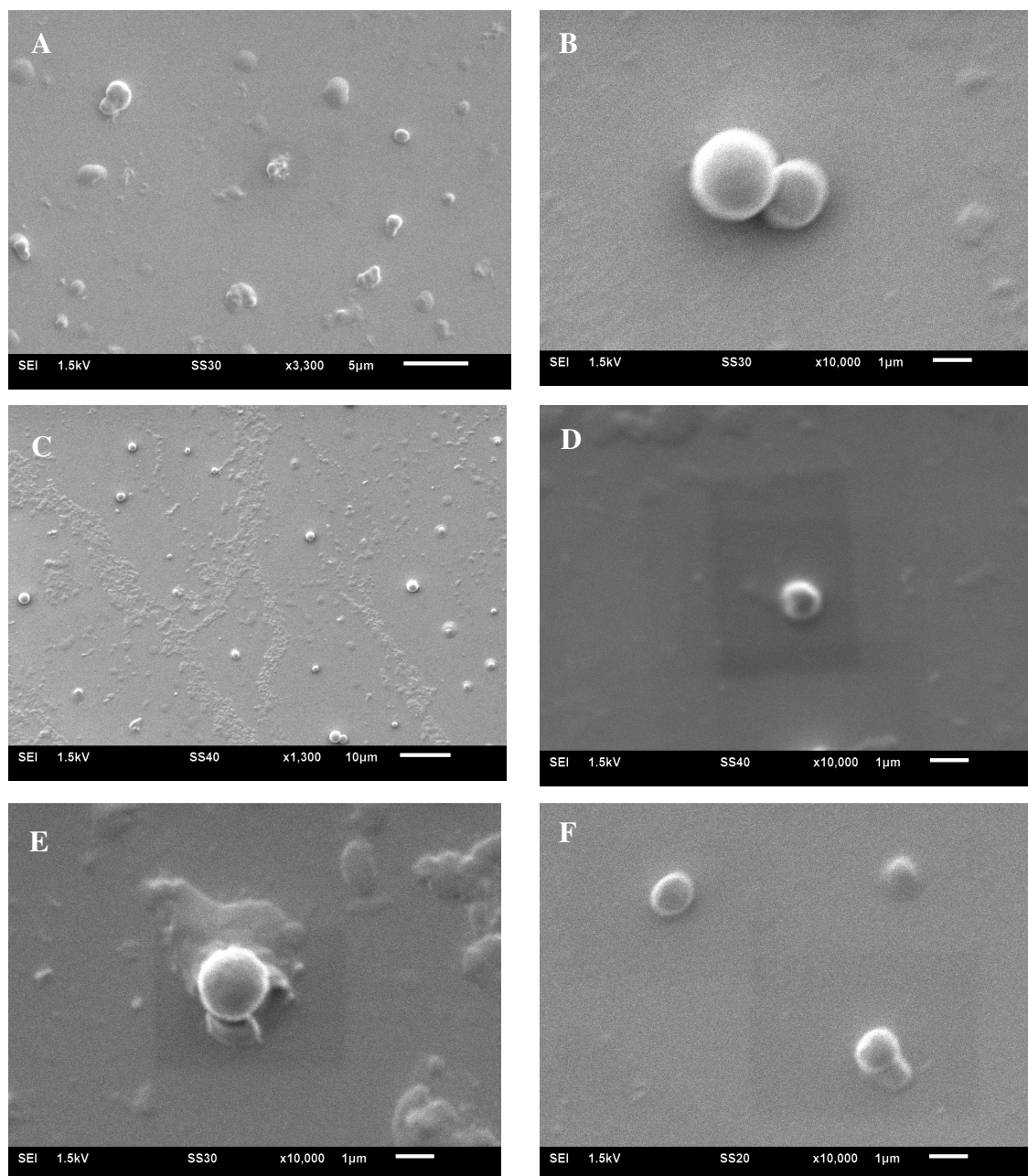
Diante destes resultados, optou-se por fazer os ensaios biológicos utilizando nanoesferas, uma vez que elas apresentaram eficiência de encapsulação semelhante às nanocápsulas e dispensam o uso de oleato de isodecila, sendo a formulação mais viável econômica e ambientalmente. Além disso, as nanoesferas se mostraram mais estáveis que as nanocápsulas.

### 5.5.2. Morfologia das nanopartículas

A avaliação morfológica das nanopartículas foi realizada com o objetivo de verificar a homogeneidade das suspensões coloidais e a morfologia das nanopartículas obtidas. Na Figura 24 é possível evidenciar a presença de nanopartículas esféricas, sem diferença superficial e morfológica entre as nanoesferas vazias (A e B) e nanoesferas dos óleos essenciais das folhas de *Z. riedelianum* (C e D), nanocápsulas de *Z. riedelianum* (E) e nanoesferas de *Z. rhoifolium* (F).

As formulações desenvolvidas com nanocápsulas e nanoesferas dos óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* apresentaram diâmetro médio de

500 e 400 nm, respectivamente, o que pôde ser confirmado através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Quanto à morfologia das nanocápsulas e nanoesferas foi observado uma forma esférica, com superfície lisa e pouca rugosidade.



**Figura 24:** Fotomicroscopia obtidas por MEV das suspensões de: nanoesferas vazias (A e B), nanoesferas com óleo essencial de *Z. riedelianum* (C e D), nanocápsulas de *Z. riedelianum* (E) e nanoesferas de *Z. rhoifolium* (F).

Resultados semelhantes foram reportados por Cazo *et al.*, (2012), que também confirmaram o diâmetro de partículas de PCL contendo hidrocortisona por meio do

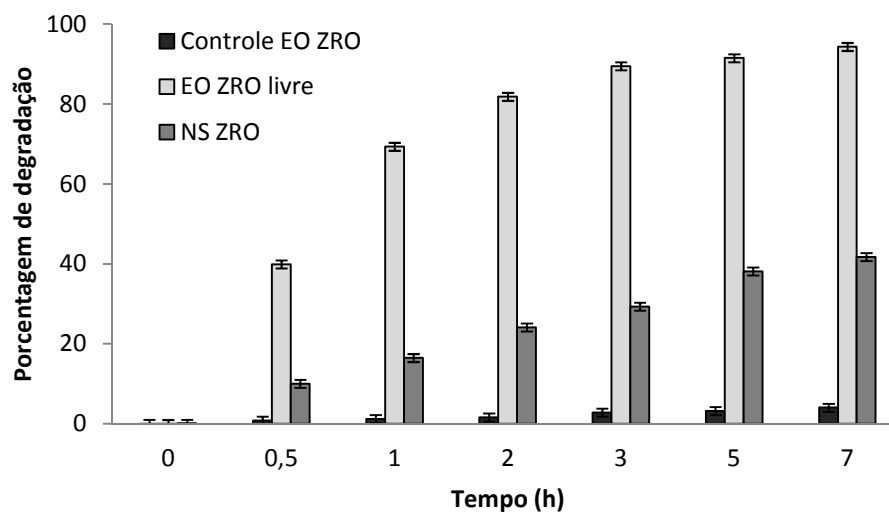
MEV, verificando a presença de nanopartículas esféricas com superfície regular e homogênea. Wu *et al.*, (2012), utilizaram o MEV para confirmar os resultados do diâmetro das nanopartículas dos óleos essenciais timol e carvacrol. As nanopartículas de quitosana e goma de caju à base do óleo essencial de *L. sidoides* foram analisadas em MEV por Paula *et al.*, (2011), e verificaram uma morfologia esférica e porosa de suas nanopartículas. O mesmo grupo de pesquisadores, reportado por Oliveira *et al.*, (2014) observaram nas nanopartículas de alginato e goma de caju com óleo essencial de *L. sidoides*, além do diâmetro, uma forma esférica, com superfície lisa e pouca rugosidade. Muller *et al.*, (2011), buscaram avaliar a morfologia interna e externa, o tamanho e a porosidade das micropartículas do óleo essencial de laranja. Estudos sobre a morfologia e tamanho das nanopartículas do óleo essencial de espécies do gênero *Zanthoxylum* também foram avaliadas pelo MEV. Maji *et al.*, (2007), verificaram a formação de um filme contínuo de gelatina com micropartículas esféricas do óleo essencial de *Z. limonella*, e Banerjee *et al.*, (2013), também verificaram a superfície externa e a morfologia esférica das micropartículas do óleo essencial de *Z. limonella*, confirmando os resultados encontrados sobre o diâmetro de partículas.

### **5.5.3. Estudo da degradação acelerada pela luz UV**

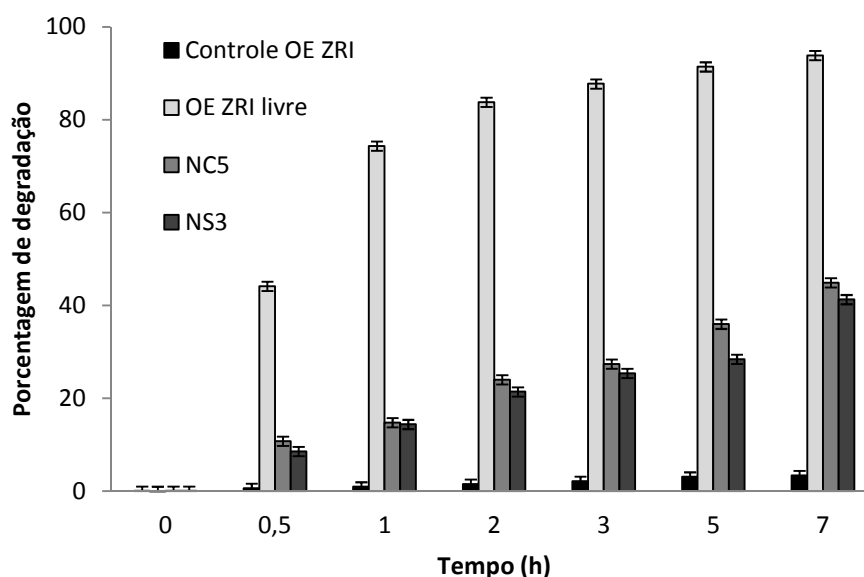
Um grande problema que dificulta a viabilidade da aplicação de inseticidas botânicos em campo é a fotodegradação. Os óleos essenciais na presença de luz, calor e umidade são muito instáveis, sofrendo inúmeras reações de degradação, dificultando a sua conservação, bem como, a viabilidade de aplicação em campo (SIMÕES, 2004). Essas reações de degradação podem alterar sua composição química, podendo interferir em sua atividade biológica, como inseticida, repelente e/ou deterrente. Dessa forma, um sistema de proteção contra degradação como as nanopartículas é de fundamental importância para aplicação desses ativos no campo.

Neste trabalho foi avaliada a proteção das nanoesferas e nanocápsulas de PCL na estabilidade dos óleos essenciais frente à fotodegradação. As Figuras 25 e 26 apresentam o perfil de degradação dos óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum*, respectivamente, *in natura* e nanoencapsulados. Analisando as figuras 25 e 26, observa-se que os óleos essenciais de ambas as plantas apresentam perfil de degradação semelhante, tanto *in natura* quanto nanoencapsulados, sendo a degradação *in natura* muito mais acelerada.

De acordo com o observado na Figura 25, em 7 horas de exposição à luz, o óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium in natura* sofreu uma degradação de 94,33%, enquanto as nanoesferas degradaram 44,76% neste mesmo intervalo de tempo. O controle foi mantido no mesmo ambiente e ao abrigo da luz, apresentando uma degradação 4,04% em 7 horas.



**Figura 25:** Média da degradação da luz ( $\pm$  desvio padrão) do óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium in natura* (OE ZRO) e das nanoesferas (NS4) à base desses óleos, além do controle (OE ZRO).



**Figura 26:** Média da degradação da luz ( $\pm$  desvio padrão) do óleo essencial das folhas de *Z. riedelianum in natura* (OE ZRI) e das nanocápsulas (NC5) e nanoesferas (NS3) à base desses óleos, além do controle (OE ZRI).

Para os óleos essenciais das folhas de *Z. riedelianum*, em 7 horas de exposição à luz, o óleo essencial *in natura* já havia degradado 93,83%, enquanto que as nanocápsulas e nanoesferas à base destes óleos essenciais degradaram 44,89 e 41,27%, respectivamente (Figura 26). Neste caso, o controle apresentou uma degradação 3,39% no mesmo intervalo de tempo.

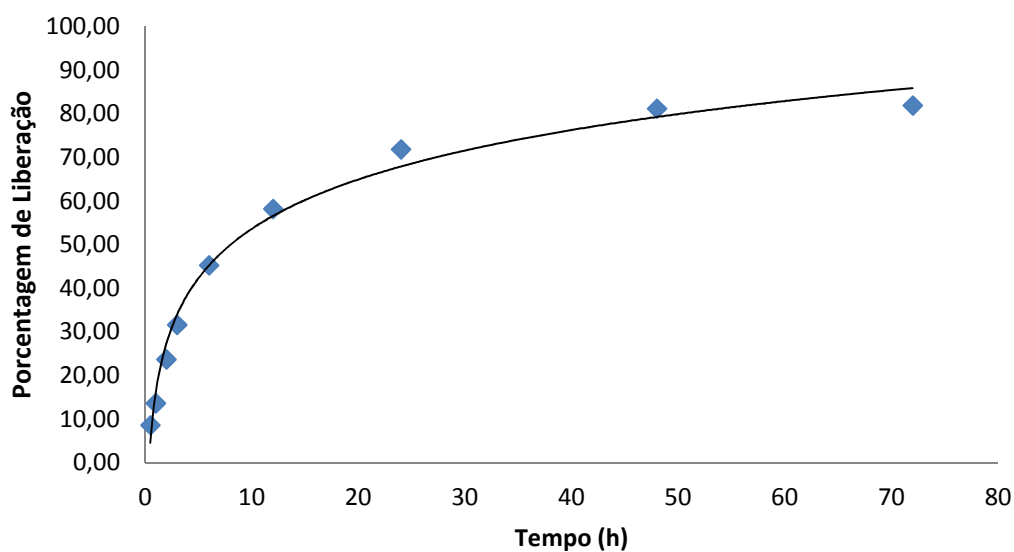
Resultados semelhantes foram encontrados por Simsen *et al.*, (2011a), ao avaliar a fotodegradação do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), verificaram a influência da luz na degradação, por meio de mudanças nas bandas de absorção do óleo. O mesmo grupo de pesquisadores avaliou o efeito da luz por 60 minutos sobre a fotodegradação do óleo essencial de sálvia (*Salvia officinalis* L.) constatando uma diminuição da absorvância na banda de 200 nm e a formação de nova banda de absorção (SIMSEN *et al.*, 2011b). Todos estes resultados corroboram com os encontrados no presente trabalho, no qual a encapsulação dos óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum*, ofereceu uma fotoproteção do óleo essencial, evidenciado com a redução da absorvância no comprimento de onda dos óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum*, evitando processos oxidativos e de decomposição.

#### **5.5.4. Estudo da liberação *in vitro***

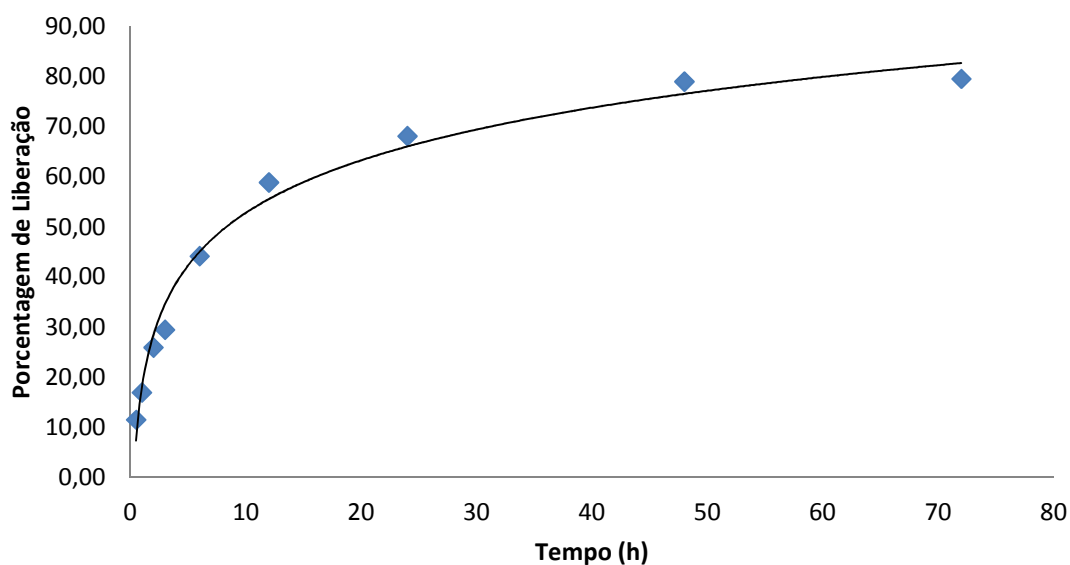
O estudo da liberação controlada permite determinar o mecanismo de liberação do princípio ativo (fármaco, inseticida ou repelente). Fatores como a desorção do princípio ativo na superfície das partículas; difusão do princípio ativo através da matriz das nanoesferas; difusão através da parede polimérica das nanocápsulas; e a erosão físico-química da matriz polimérica; estão diretamente relacionados com a liberação do princípio ativo (SOPPIMAT *et al.*, 2001).

O perfil de liberação das nanopartículas à bases dos óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e de *Z. riedelianum* estão representadas nas Figuras 27, 28 e 29, respectivamente. Os três sistemas apresentaram liberação inicial rápida seguida da liberação lenta a partir de 12 horas. A liberação bifásica, ou seja, liberação inicial rápida, seguida por liberação lenta, conforme observada no presente estudo pode estar relacionada com a quantidade de princípio ativo adsorvido à superfície das nanopartículas (CAZAL, 2011). Ao fim de 72 horas de ensaio, verificou-se a difusão do óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium* nas nanoesferas de 81,9% (Figura 27);

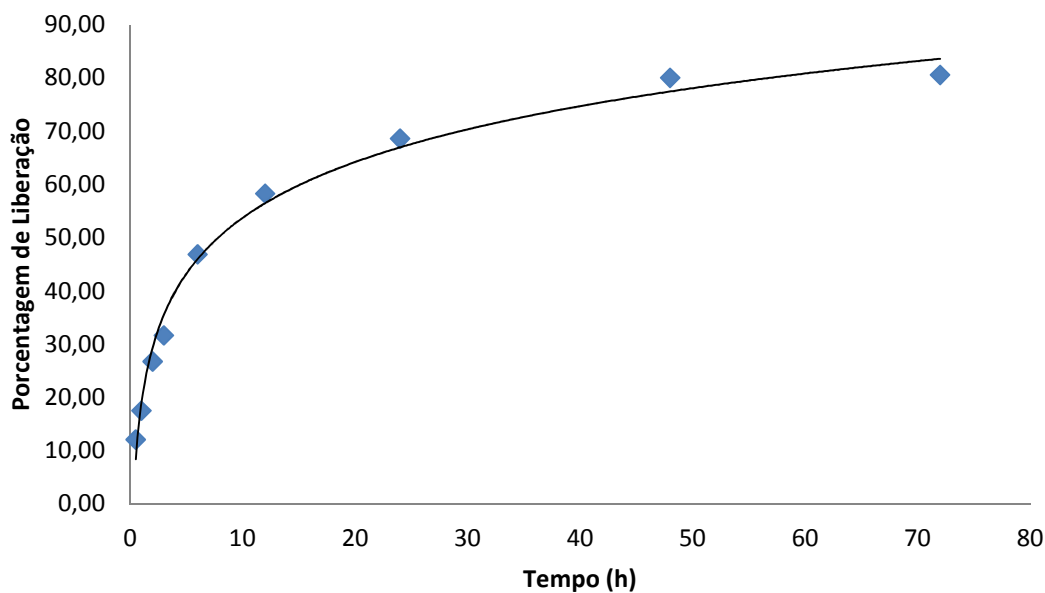
enquanto a difusão dos óleos de *Z. riedelianum* nas nanocápsulas foi de 79,51% (Figura 28) e de 80,6% nas nanoesferas (Figura 29).



**Figura 27:** Média do perfil de liberação *in vitro* do óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium* a partir da dispersão de nanoesferas seguida da sua difusão através do saco de diálise. A concentração teórica para dispersão é de 0,167 mg/mL.



**Figura 28:** Média do perfil de liberação *in vitro* do óleo essencial das folhas de *Z. riedelianum* a partir da dispersão de nanocápsulas seguida da sua difusão através do saco de diálise. A concentração teórica para dispersão é de 0,167 mg/mL.



**Figura 29:** Média do perfil de liberação *in vitro* do óleo essencial das folhas de *Z. riedelianum* a partir da dispersão de nanoesferas seguida da sua difusão através do saco de diálise. A concentração teórica para dispersão é de 0,167 mg/mL.

Resultados semelhantes foram encontrados na literatura para liberação de óleos essenciais encapsulados. O perfil de liberação *in vitro* de nanopartículas preparadas com quitosana e goma de caju com óleo essencial de *Lippia sidoides* foi verificado por Paula *et al.*, (2011) chegando a 67% em 24 horas de experimento. O mesmo grupo de pesquisadores verificou a difusão de 57% dos óleos essenciais de *L. sidoides* encapsuladas com quitosana e goma de angico (PAULA *et al.*, 2010). Abreu *et al.*, (2011), observaram liberação de até 74% após 24 horas, nas formulações de nanogéis de quitosana e goma de caju do óleo essencial de *L. sidoides*. Em outro trabalho, Oliveira *et al.*, (2014), verificaram, a partir de 30 horas de avaliação, uma liberação entre 45 e 95%, para as diferentes formulações de nanopartículas de goma de alginato e caju com óleo essencial de *L. sidoides*.

Segundo Maji *et al.*, (2007), o perfil de liberação pode estar relacionado com a espessura da parede das cápsulas e a quantidade de óleo essencial em seu interior. Ao realizar a caracterização das microcápsulas de gelatina reticulada de glutaraldeído contendo óleo essencial de *Z. limonella*, verificaram que o aumento da concentração do óleo essencial, proporcionava maior taxa de liberação (acima de 90%) em 72 horas, enquanto o aumento da espessura da parede reduzia a taxa de liberação para menos de 70%, no mesmo intervalo de tempo. Entretanto, no presente estudo, todas as

formulações avaliadas apresentaram a mesma proporção de polímero e a mesma concentração dos óleos essenciais, não apresentando variações entre o perfil de liberação.

## **5.6. Ensaio biológicos**

### **5.6.1. Ensaio biológico I**

Todos os tratamentos apresentaram uma ligeira redução do número de ovos e ninfas com o passar dos dias. No teste com escolha, os melhores resultados obtidos foram nas concentrações de 5 e 2% dos óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e de *Z. riedelianum*, que apresentaram a redução significativa de ovos e ninfas em relação aos controles, podendo inferir que os óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* nestas concentrações inibiram e/ou minimizaram a postura de ovos. O controle Tween 80, utilizado para dispersão do óleo essencial em água, pela sua característica lipossolúvel, não apresentou diferença significativa em relação ao controle água. A Tabela 18 apresenta as médias das contagens de ovos e ninfas e a eficiência dos tratamentos do 2º ao 12º daa.

A eficiência na redução da postura de ovos nas concentrações 5 e 2% foi de 96,5 e 83,9% para os óleos de *Z. rhoifolium*; e 93,3 e 78,0% para os óleos de *Z. riedelianum* no 2º daa. Em 8 daa houve a redução no número de ovos por causa da mudança para fase ninfa em todos os tratamentos, exceto para o tratamento Piriproxifem, que atua sobre as fêmeas adultas, impedindo a postura de ovos viáveis. O controle Piriproxifem foi utilizado, por ser bastante comum no controle de *B. tabaci*. Trata-se de um inseticida fisiológico juvenoide, regulador de crescimento de insetos, análogo ao hormônio juvenil, atuando principalmente sobre os ovos e ninfas provocando distúrbios no equilíbrio hormonal, impedindo que os insetos das formas jovens tornem-se adultos (ADAPAR, 2013).

Também foi verificada eficiência sobre as ninfas de 99,2; 87,2 e 66,7% para *Z. rhoifolium* e 97,5; 91,9 e 76,5% para *Z. riedelianum*, nas concentrações de 5, 2 e 1%, respectivamente, em 8 daa. No 12º daa a eficiência sobre as ninfas foi de 100,0; 72,5 e 44,3% para *Z. rhoifolium* e 92,9; 85,9 e 78,8% para *Z. riedelianum*, nas respectivas concentrações (Tabela 18). No entanto, o número reduzido de ninfas nestas concentrações se deve ao pequeno número de ovos encontrado no início das avaliações.



**Tabela 18:** Ensaio biológico I: Número médio de ovos (O) e ninfas (N) de *B. tabaci* e eficiência (E%) de controle em razão da aplicação do óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* em tomateiros, no teste com escolha.

Tratamentos		Dias após a aplicação (daa)					
Nomes	Dose %	2daa		8daa		12daa	
		O <sup>1;3</sup>	(E%) <sup>2</sup>	N <sup>1;3</sup>	(E%) <sup>2</sup>	N <sup>1;3</sup>	(E%) <sup>2</sup>
Controle Água	-	248,6a	-	161,8a	-	56,8abc	-
Controle Tween80	-	245,2a	-	157,8a	-	57,6abc	-
Controle Piriproxifem	1%	235,4a	-	1f	-	2,4fg	-
<i>Z. rhoifolium</i>	5%	8,6e	96,5	1,2f	99,2	0g	100,0
<i>Z. rhoifolium</i>	2%	40de	83,9	20,6def	87,2	15,6cdefg	72,5
<i>Z. rhoifolium</i>	1%	109,6abcd	55,9	53,8bcd	66,7	31,6bcdef	44,3
<i>Z. rhoifolium</i>	0,5%	171,6abc	31,0	92abc	43,1	38,8abcd	31,6
<i>Z. rhoifolium</i>	0,2%	212,6ab	14,5	107,6ab	43,7	51,4abcd	29,5
<i>Z. rhoifolium</i>	0,1%	239,6a	3,6	149,6a	7,5	97,4ab	-
<i>Z. riedelianum</i>	5%	16,6e	93,3	4,2f	97,5	4efg	92,9
<i>Z. riedelianum</i>	2%	54,6cde	78,0	16,8ef	91,9	14cdefg	85,9
<i>Z. riedelianum</i>	1%	77,6bcde	68,8	40cde	76,5	11,2defg	78,8
<i>Z. riedelianum</i>	0,5%	114abcd	54,1	53,6bcde	65,3	34,8bcde	47,1
<i>Z. riedelianum</i>	0,2%	187ab	24,8	111,2ab	36,9	74,2ab	-
<i>Z. riedelianum</i>	0,1%	247,6a	0,4	147,8a	11,0	92,8a	-
CV(%) <sup>4</sup>			(21,01)	(20,1)		(35,9)	

<sup>1</sup>Quantidade média de ovos e ninfas por folha.

<sup>2</sup>Eficiência de controle (Abbott, 1925).

<sup>3</sup>Médias nas colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si (P<0,05) (teste de Tukey).

<sup>4</sup>Dados transformados: raiz de (x+1).

Resultados semelhantes foram verificados no teste sem escolha. Neste teste também foi verificada a redução significativa do número de ovos em todos os tratamentos, com melhores resultados para as concentrações de 5 e 2% (Tabela 19).

Em 2 daa, houve a redução na postura de ovos de 91,0 e 82,4%, para os óleos de *Z. rhoifolium*; e 95,3 e 92,0% para os óleos de *Z. riedelianum*, nas concentrações de 5 e 2%, respectivamente. Ainda no teste sem escolha, em 8 daa verificou-se eficiência sobre as ninfas de 94,8; 90,1 e 88,5% para os óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e 98,4; 92,7 e 81,2% para os óleos de *Z. riedelianum*, nas concentrações de 5; 2 e 1%. No 12<sup>o</sup> daa, a eficiência foi de 94,1; 85,2 e 83,7% para *Z. rhoifolium* e 100,0; 100,0 e 77,0% para *Z. riedelianum*, nestas mesmas concentrações.

**Tabela 19:** Ensaio biológico I: Número médio de ovos (O) e ninfas (N) de *B. tabacae* eficiência (E%) de controle em razão da aplicação do óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* em tomateiros, no teste sem escolha.

Tratamentos		Dias após a aplicação (daa)					
Nomes	Dose %	2daa		8daa		12daa	
		O <sup>1;3</sup>	(E%) <sup>2</sup>	N <sup>1;3</sup>	(E%) <sup>2</sup>	N <sup>1;3</sup>	(E%) <sup>2</sup>
Controle Água	-	60,4a	-	38,4a	-	27a	-
Controle Tween 80	-	58,2a	-	40,4a	-	27,2ab	-
Controle Piriproxifem	1%	49,6ab	-	1d	-	0e	-
<i>Z. rhoifolium</i>	5%	5,4de	91,0	2d	94,8	1,6de	94,1
<i>Z. rhoifolium</i>	2%	10,6cde	82,4	3,8d	90,1	4cde	85,2
<i>Z. rhoifolium</i>	1%	18,6abcde	69,2	4,4cd	88,5	4,4cde	83,7
<i>Z. rhoifolium</i>	0,5%	34,4abc	43,0	22,2ab	42,2	10,4abcd	61,5
<i>Z. rhoifolium</i>	0,2%	41,2abc	31,8	20,4ab	46,9	10,8abcd	60,0
<i>Z. rhoifolium</i>	0,1%	52a	13,9	36a	6,3	11,4abc	57,8
<i>Z. riedelianum</i>	5%	2,8e	95,3	0,6d	98,4	0e	100,0
<i>Z. riedelianum</i>	2%	4,8e	92,0	2,8d	92,7	0e	100,0
<i>Z. riedelianum</i>	1%	16bcde	73,5	7,2bcd	81,2	6,2bcde	77,0
<i>Z. riedelianum</i>	0,5%	29,4abcd	51,3	18,6abc	51,5	11,6abc	57,0
<i>Z. riedelianum</i>	0,2%	36,8abc	39,0	22,8ab	40,6	12,8abc	52,5
<i>Z. riedelianum</i>	0,1%	53,4a	11,5	36,8a	4,1	14,8abc	45,1
CV(%) <sup>4</sup>		(28,18)		(26,6)		(41,7)	

<sup>1</sup>Quantidade média de ovos e ninfas por folha.

<sup>2</sup>Eficiência de controle (Abbott, 1925).

<sup>3</sup>Médias nas colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si (P<0,05) (teste de Tukey).

<sup>4</sup>Dados transformados: raiz de (x+1).

### 5.6.2. Ensaio Biológico II

No ensaio com escolha, todos os tratamentos, nas diferentes concentrações de óleo essencial (5; 2; 1; 0,5; 0,2; 0,1%) de ambas as plantas, apresentaram redução significativa do número de ovos quando comparados aos controles água, tween 80 e Piriproxifem, confirmando os resultados encontrados anteriormente. O controle Tween 80 não apresentou diferença significativa em relação ao controle água. A Tabela 20 apresenta as médias das contagens de ovos e ninfas e a eficiência dos tratamentos do 3º ao 16º daa.

No teste com escolha, todas as concentrações dos óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* apresentaram bons resultados na redução da postura de ovos e no desenvolvimento de ninfas de *B. tabaci* com uma eficiência em torno de 50%, conforme verificado na Tabela 20.

**Tabela 20:** Ensaio biológico II: Número médio de ovos (O) e ninfas (N) de *B. tabaci* e eficiência (E%) de controle em razão da aplicação do óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* em tomateiros, no teste com escolha.

Tratamentos	Dose	Dias após a aplicação (daa)							
		3 daa		6 daa		13 daa		16 daa	
Nome	%	O <sup>1:3</sup>	(E%) <sup>2</sup>	O <sup>1:3</sup>	(E%) <sup>2</sup>	N <sup>1:3</sup>	(E%) <sup>2</sup>	N <sup>1:3</sup>	(E%) <sup>2</sup>
Controle Água	-	102,4a	-	91a	-	52,4a	-	65,8a	-
Controle Tween80	-	103a	-	91,8a	-	52,4a	-	66,2a	-
Controle Piriproxifem	1%	99,2a	-	89,6a	-	0,4h	-	0i	-
<i>Z. rhoifolium</i>	5%	3,2h	96,9	2,2h	97,6	0,8h	98,5	0i	100,0
<i>Z. rhoifolium</i>	2%	13,2g	87,1	10,4g	83,6	3,8g	92,7	0,6hi	99,1
<i>Z. rhoifolium</i>	1%	22,8f	77,7	15,4f	83,1	5,4fg	89,7	1,8gh	97,3
<i>Z. rhoifolium</i>	0,5%	29,6e	71,1	24,2e	73,4	8,6e	83,6	4,4ef	93,3
<i>Z. rhoifolium</i>	0,2%	37d	63,9	30,6d	66,4	14,6cd	72,1	9cd	86,3
<i>Z. rhoifolium</i>	0,1%	47,6c	53,5	40,6c	55,4	22,6b	56,9	10,6c	83,9
<i>Z. riedelianum</i>	5%	2,8h	97,3	2,4h	97,4	0,6h	98,9	0i	100,0
<i>Z. riedelianum</i>	2%	10g	90,2	7,8g	91,4	3,6g	93,1	0,4hi	99,4
<i>Z. riedelianum</i>	1%	23,2f	77,3	17f	81,3	7,8ef	85,1	3,6fg	94,5
<i>Z. riedelianum</i>	0,5%	33,8de	67,0	27,6de	69,7	10,4de	80,2	7de	89,4
<i>Z. riedelianum</i>	0,2%	46,2c	54,9	41c	54,9	15,2c	71,0	10,6c	83,9
<i>Z. riedelianum</i>	0,1%	65,6b	35,9	57,8b	36,5	25,2b	51,9	16,4b	75,1
CV(%) <sup>4</sup>		(3,88)		(4,46)		(7,67)		(8,07)	

<sup>1</sup>Quantidade média de ovos e ninfas por folha.

<sup>2</sup>Eficiência de controle (Abbott, 1925).

<sup>3</sup>Médias nas colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si (P<0,05) (teste de Tukey).

<sup>4</sup>Dados transformados: raiz de (x+1).

No teste sem escolha, a eficiência na redução da postura de ovos foi em torno de 30% para as menores concentrações e de 80% para as maiores concentrações de óleos essenciais de ambas as plantas, conforme Tabela 21, demonstrando a eficiência desses óleos no controle de pragas agrícolas como *B. tabaci*.

Resultados semelhantes também foram verificados por autores que vêm estudando os efeitos dos óleos de diversas espécies de plantas em populações de *B. tabaci*. Yang *et al.*, (2010), realizaram um trabalho semelhante, no qual analisaram os óleos essenciais das folhas de *Thymus vulgaris*, *Pogostemon cablin* e *Corymbia citriodora* em ovos, ninfas, pupas (no efeito de contato) e adultos de *B. tabaci* (teste de repelência com e sem chance de escolha), e verificaram maior eficiência na repelência para o óleo essencial de *P. cablin* na concentração 0,5%, reduzindo a aproximação das

fêmeas em 69,3% e a oviposição em 74,5 % no teste com escolha; enquanto no teste sem chance de escolha, *T. vulgaris* apresentou melhor resultado reduzindo a aproximação das fêmeas em 63,1% e a oviposição em 46,4%. Já no teste de eficiência de contato, *T. vulgaris* reduziu a taxa de sobrevivência de ovos, ninfas e pupas de *B. tabaci* 73,4%; 79,0% e 58,2 %, respectivamente, em comparação com o controle.

**Tabela 21:** Ensaio biológico II: Número médio de ovos (O) e ninfas (N) de *B. tabaci* e eficiência (E%) de controle em razão da aplicação do óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* em tomateiros, no teste sem escolha.

Tratamentos		Dias após a aplicação (daa)							
Nome	Dose %	3 daa		6 daa		10 daa		13 daa	
		O <sup>1;3</sup>	(E%) <sup>2</sup>	O <sup>1;3</sup>	(E%) <sup>2</sup>	N <sup>1;3</sup>	(E%) <sup>2</sup>	N <sup>1;3</sup>	(E%) <sup>2</sup>
Controle Água	-	224,0a	-	194,4a	-	85,2a	-	106,2a	-
Controle Tween	-	226,0a	-	194,2a	-	55,6bc	-	105,8a	-
Controle Piriproxifem	1%	218,0a	-	193,6a	-	1,6h	-	0h	-
<i>Z. rhoifolium</i>	5%	39,0h	82,6	27,4j	85,9	7,4g	91,3	1h	99,1
<i>Z. rhoifolium</i>	2%	75,6f	66,3	57,6h	70,4	17,6f	79,3	9,2g	91,3
<i>Z. rhoifolium</i>	1%	92,4e	58,8	72,4g	62,8	26,8e	68,5	15,2f	85,7
<i>Z. rhoifolium</i>	0,5%	117,4d	47,6	105,8d	45,6	51,6cd	39,4	33,8c	68,2
<i>Z. rhoifolium</i>	0,2%	153,8c	31,3	123,8c	36,3	63b	26,1	47b	55,7
<i>Z. rhoifolium</i>	0,1%	185,4b	17,2	143,8b	26,0	63,6b	25,4	53,8b	49,3
<i>Z. riedelianum</i>	5%	16,4i	92,7	14,4k	92,6	7,2g	91,5	0,8h	99,2
<i>Z. riedelianum</i>	2%	46g	79,5	36,6i	81,2	18,2f	78,6	7,2g	93,2
<i>Z. riedelianum</i>	1%	73,8f	67,1	58,4h	70,0	25,2d	70,4	13,6f	87,2
<i>Z. riedelianum</i>	0,5%	95,6e	57,3	85,2f	56,2	44d	48,4	20,6e	80,6
<i>Z. riedelianum</i>	0,2%	123d	45,1	94,6e	51,3	44g	48,4	28d	73,6
<i>Z. riedelianum</i>	0,1%	155,6c	30,5	126,4c	35,0	56,4bc	33,8	36,2c	65,9
CV(%) <sup>4</sup>		(1,59)		(1,59)		(4,74)		(4,54)	

<sup>1</sup>Quantidade média de ovos e ninfas por folha.

<sup>2</sup>Eficiência de controle (Abbott, 1925).

<sup>3</sup>Médias nas colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si (P<0,05) (teste de Tukey).

<sup>4</sup>Dados transformados: raiz de (x+1).

Dados semelhantes foram encontrados na literatura para espécies do mesmo gênero estudado no referente trabalho, em que os óleos essenciais de *Z. piperitum* apresentaram atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* (PITASAWAT *et al.*, 2007; KAMSUK *et al.*, 2006). Outros autores verificaram a atividade repelente de *Z. piperitum* contra o *Aedes aegypti* (CHOOCHOTE *et al.*, 2007). Liu *et al.*, (2009), em um trabalho com extratos dos frutos de *Z. schinifolium* verificaram o efeito repelente e/ou

deterrente contra dois insetos de produtos armazenados *Tribolium castaneum* e *Sitophilus zeamais*.

Entre os inúmeros trabalhos encontrados na literatura utilizando óleos essenciais para o controle de pragas agrícolas, destacam o uso dos óleos essenciais de *Z. rhoifolium* com ação inseticida e fumigante contra *F. Oxysporum* e *C. Acutatum* (PIETRO,2011; TRONGTOKIT *et al.*, 2005).

No presente trabalho, foi possível verificar a inibição na postura de ovos, que pode ter sido ocasionada por um efeito de repelência e/ou deterrência, uma vez que ambos atuam interferindo na capacidade dos insetos de localizar alimentação ou ovipositar em suas plantas hospedeiras. Compostos repelentes atuam a distância, impedindo ou desorientando o movimento do inseto até a fonte, enquanto os compostos deterrentes inibem ou reduzem a alimentação ou oviposição. Portanto, pode-se afirmar que o óleo essencial das folhas de *Z. rhoifolium* reduziram a postura de ovos por *B. tabaci* em tomateiros.

O efeito repelente significativo de algumas plantas como os resultados obtidos no presente trabalho, tem sido apontado como forma muito eficiente em evitar a infestação de pragas em áreas agrícolas, reduzindo a postura e injúrias, e conseqüentemente, as perdas na produtividade, com benefícios econômicos para os agricultores (ANDRADE, *et al.*, 2013). No entanto, os óleos essenciais são compostos voláteis e muito instáveis na presença de oxigênio, luz, calor e umidade, podendo sofrer inúmeras reações de degradação durante o armazenamento e/ou durante a aplicação no campo (SIMÕES *et al.*, 2004). Contudo, a eficiência dos óleos essenciais pode ser melhorada pelo uso da nanotecnologia. Essa técnica é bastante utilizada no âmbito da agricultura, e promove o encapsulamento formando cápsulas em escala nanométrica, que liberam o princípio ativo de forma gradativa, reduzindo a necessidade de altas doses iniciais ou múltiplas aplicações, protege contra rápida degradação prolongando o efeito residual (DUCAN, 2011).

### **5.6.3. Ensaio Biológico III**

Todos os tratamentos, com nanoesferas nas diferentes concentrações de óleo essencial (5 e 2%) de ambas as plantas, apresentaram redução significativa do número de ovos quando comparados aos controles. Já o controle nano (com nanoesfera vazia) não apresentou diferença significativa em relação ao controle água. A Tabela 22 apresenta as médias das contagens de ovos e a eficiência dos tratamentos do 3º a 9º daa.

No teste com escolha, no 3º daa a eficiência das nanoesferas (NS) dos óleos de *Z. rhoifolium* foi de 95,6% e *Z. riedelianum* foi de 95,3% na concentração de 5%, enquanto na concentração de 2%, a eficiência das nanoesferas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* foi de 93,9 e 93,6%, respectivamente. Em 6 daa, a eficiência para NS de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* a 5% foi de 95,8 e 95,4%, e na concentração de 2% a eficiência foi de 94,4 e 94,7%, respectivamente. Quanto ao número de ninfas, no teste com escolha, no 9º daa, a eficiência foi de 97,2 e 96,8% para as nanoesferas na concentração de 5% e 95,9 e 95,9% na concentração de 2% dos óleos essenciais de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum*, respectivamente. Em 12 daa a eficiência, quando comparados aos controles, foi de 95,9 e 95,9% na concentração de 5% e 97,7 e 97,1% na concentração de 2% para as nanoesferas dos óleos essenciais *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum*, respectivamente (Tabela 22).

**Tabela 22:** Ensaio biológico III: Média do número de ovos (O) e ninfas (N) de *B. tabaci* e eficiência (E%) de controle em razão da aplicação das nanoesferas à base de óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* em tomateiros, no teste com escolha.

Tratamentos		Dias após a aplicação (daa)							
Nome	Dose %	3 daa		6 daa		9 daa		12 daa	
		O <sup>1;3</sup>	(E%) <sup>2</sup>	O <sup>1;3</sup>	(E%) <sup>2</sup>	N <sup>1;3</sup>	(E%) <sup>2</sup>	N <sup>1;3</sup>	(E%) <sup>2</sup>
Controle Água	-	72,4a	-	57a	-	43,6a	-	34,6a	-
Controle Nano	-	69,8a	-	59a	-	46,4a	-	32,4a	-
NS <i>Z. rhoifolium</i>	5%	3,2b	95,6	2,4b	95,8	1,2b	97,2	0,6b	98,3
NS <i>Z. riedelianum</i>	5%	3,2b	95,3	2,6b	95,4	1,4b	96,8	0,4b	98,8
NS <i>Z. rhoifolium</i>	2%	4,4b	93,9	3,2b	94,4	1,8b	95,9	0,8b	97,7
NS <i>Z. riedelianum</i>	2%	4,4b	93,6	3,0b	94,7	1,8b	95,9	1,0b	97,1
CV(%) <sup>4</sup>		(11,0)		(12,4)		(12,4)		(20,0)	

<sup>1</sup>Quantidade média de ovos e ninfas por folha.

<sup>2</sup>Eficiência de controle (Abbott, 1925).

<sup>3</sup>Médias nas colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si (P<0,05) (teste de Tukey).

<sup>4</sup>Dados transformados: raiz de (x+1).

A tabela 23 apresenta os resultados das médias das contagens de ovos e ninfas e a eficiência dos tratamentos no teste sem escolha.

No 3º daa a eficiência das nanoesferas à base de óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* foi de 95,4 e 95,1 na concentração de 5% e 91,6 e 92,2% na concentração de 2%. Em 6 daa a eficiência foi de 96,9 e 96,0% para as nanoesferas de

*Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* na concentração de 5%, e 93,6 e 93,9% para as respectivas nanoesferas na concentração de 2%.

Ainda no teste sem escolha, a eficiência na redução do número de ninfas no 9<sup>o</sup> daa foi de 94,3 e 95,0% para as nanoesferas dos óleos de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* na concentração de 5%, e 91,2 e 91,8% na concentração 2% respectivamente. Em 12 daa a eficiência das nanoesferas dos óleos de *Z. rhoifolium* foi de 97,2 e 95,8%, enquanto a eficiência das nanoesferas de *Z. riedelianum* foi 97,2 e 95,8%, nas concentrações 5 e 2%, respectivamente.

Estudos semelhantes constataram resultados positivos sobre redução da oviposição pelo uso de inseticidas de origem vegetal nanoencapsulados em diferentes pragas agrícolas. Ferreira *et al.*, (2012) analisaram a eficiência o óleo de *Azadirachta indicain in natura* e nanoencapsulados sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) e verificaram que as nanoformulações reduziram a sobrevivência das lagartas. Yang *et al.*, (2009), realizaram a encapsulação do óleo essencial de alho utilizando etileno glicol, e avaliaram sua atividade inseticida sobre adultos *Tribolium castaneum*, melhorando a eficiência no controle dessas pragas de produtos armazenados acima de 80% por cinco meses.

**Tabela 23:** Ensaio biológico III: Média do número de ovos (O) e ninfas (N) de *B. tabaci* e eficiência (E%) de controle em razão da aplicação das nanoesferas à base de óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* em tomateiros, no teste sem escolha.

Tratamentos		Dias após a aplicação (daa)							
Nome	Dose %	3 daa		6 daa		9 daa		12 daa	
		O <sup>1;3</sup>	(E%) <sup>2</sup>	O <sup>1;3</sup>	(E%) <sup>2</sup>	N <sup>1;3</sup>	(E%) <sup>2</sup>	N <sup>1;3</sup>	(E%) <sup>2</sup>
Controle Água	-	74,4a	-	66,4a	-	32,0a	-	28,6a	-
Controle Nano	-	75,0a	-	61,6a	-	31,2a	-	27,8a	-
NS <i>Z. rhoifolium</i>	5%	3,4b	95,43	2,0b	96,99	1,8b	94,38	0,8b	97,20
NS <i>Z. riedelianum</i>	5%	3,6b	95,16	2,6b	96,08	1,6b	95,00	0,8b	97,20
NS <i>Z. rhoifolium</i>	2%	6,2b	91,67	4,2b	93,67	2,8b	91,25	1,2b	95,80
NS <i>Z. riedelianum</i>	2%	5,8b	92,20	4,0b	93,98	2,6b	91,88	1,2b	95,80
CV(%) <sup>4</sup>		(14,3)		(15,0)		(25,77)		(25,0)	

<sup>1</sup>Quantidade média de ovos e ninfas por folha.

<sup>2</sup>Eficiência de controle (Abbott, 1925).

<sup>3</sup>Médias nas colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si (P<0,05) (teste de Tukey).

<sup>4</sup>Dados transformados: raiz de (x+1).

Adicionalmente, a eficiência de óleos essenciais de diversas espécies de plantas vem sendo estudadas. Há relatos na literatura, sobre as atividades biológicas de plantas do gênero *Zanthoxylum*, tais como a atividade repelente do óleo de *Z. limonella* encapsulados, melhorando assim sua eficiência no controle de mosquitos (MAJI *et al.*, 2007; BANERJEE, *et al.*, 2013). Solomon *et al.*, (2012), prolongaram o efeito repelente contra mosquitos pela microencapsulamento do óleo essencial de citronela. Paula *et al.*, (2010) observaram a eficiência na mortalidade das larvas de *A. aegypti* de até 92% após 48 horas de exposição as nanopartículas de quitosana e goma de angico com óleos essenciais de *L. sidoides*. O mesmo grupo de pesquisa, reportado por Paula, *et al.*, (2011), melhoraram o efeito larvicida contra *A. aegypti* por meio de nanopartículas de quitosana e goma de caju com óleo essencial de *L. sidoides*, atingindo a eficiência de 75% na mortalidade das larvas após 48 horas e chegando a 100% de mortalidade após 72 horas.

Óleos essenciais como pesticidas botânicos desenvolvem elevado potencial ecológico, por ter grandes chances de não apresentarem toxicidade, nem prejuízo ao meio ambiente (MATEUS *et al.*, 2008). Já as nanopartículas aperfeiçoam seu efeito por causa da proteção do princípio ativo, aumento da solubilidade no meio de dispersão, e a liberação gradual dos componentes ativos das nanopartículas, (YANG *et al.*, 2009). Dessa forma, a associação dos óleos essenciais com a nanotecnologia se torna uma ferramenta eficaz no controle de pragas agrícolas, podendo ser associado com as práticas de manejo integrado de pragas.

## 6. CONCLUSÃO

O método de nanoprecipitação se mostrou eficiente para encapsulação dos óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum*, sem diferença significativa entre nanocápsulas e nanoesferas, no entanto as nanoesferas se mostraram mais estáveis, pois não apresentaram precipitação de polímero, além de serem mais viáveis econômica e ecologicamente.

Os ensaios biológicos demonstraram que os óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum in natura* e as nanoesferas de PCL reduz e/ou inibe a postura de ovos e ninfas de *B. tabaci* com eficiência acima de 80% na redução da postura de ovos.



As nanoesferas de PCL contendo os óleos essenciais das folhas de *Z. rhoifolium* e *Z. riedelianum* otimizam o sistema de controle de *B. tabaci*, ofereceram maior proteção contra processos de degradação e oxidação desses óleos essenciais, aumentando a solubilidade no meio de dispersão, prolongando seu efeito residual, podendo assim favorecer os estudos para sua aplicação em campo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, **18**: 265-267, 1925.
- ABREU, F.O.M.S.; OLIVEIRA, E.F.; PAULA, H.C.B.; DE PAULA, R.C.M. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. *Carbohydrate Polymers* **89**: 1277– 1282, 2012.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. 4. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 804 p, 2007.
- ADAPAR – Agência de Defesa e Agropecuária do Paraná. **Agrotóxicos e inseticidas**. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/TIGER100EC.pdf>>. Acesso em: 20/09/2013, as 17:00hs.
- ALBERGARIA, N. M. M. S.; CIVIDANES, F. J. ECOLOGY, BEHAVIOR AND BIONOMICS: Exigências Térmicas de *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). *Neotropical Entomology*, **32**: 559-563, 2002.
- ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.; GURNY, R. Drug loaded poly (tactic acid) nanoparticles produced by a reversible salting-out process: purification of an injectable dosage form. *European Journal Pharmaceutcs Biopharmaceutics*, **39**: 13-18, 1993.
- ANDRADE, L. H. DE.; OLIVEIRA, J. V. DE.; LIMA, I. M. M.; SANTANA, M. F. DE.; BREDA, M. O. Efeito repelente de azadiractina e óleos essenciais sobre *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) em algodoeiro. *Revista Ciência Agronômica*, **44**: 628-634, 2013.
- ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Cartilha sobre Agrotóxicos, Série Trilhas do Campo**. Brasília, DF: Copyright, 2011. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9e0b790048bc49b0a4f2af9a6e94f0d0/Cartilha.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 30 junho, 2013.
- ANVISA- Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução nº 899, 2003.
- BAFI-YEBOA, A. N. F. A; ARNASON, J. T; BAKER, J.; SMITH, M. L. Antifungal constituent of northern Prickly Ash, *Zanthoxylum americanum* Mill. *Phytomedicine*, **12**:370-377, 2005.
- BALDIN, E. L. L.; SOUZA, D. R.; SOUZA, E. S. BENEDUZZI, R. A. Controle de mosca-branca com extratos vegetais, em tomateiro cultivado em casa de vegetação. *Horticultura Brasileira*, **25**: 602 – 606, 2007.
- BALDIN, E. L. L.; VENDRAMIM, J. D.; LOURENÇÃO, A. L. Resistência de genótipos de tomateiro à mosca-Branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). *Neotropical Entomology*, **34**: 435-441, 2005.

- BANERJEE, S.; CHATTOPADHYAY, P.; GHOSH, A.; GOYARY, D.; KARMAKAR, S. VEER. V. Influence of process variables on essential oil microcapsule properties by carbohydrate polymer–protein blends. *Carbohydrate Polymers*, **93**: 691– 697, 2013.
- BARROSO, G. M., PEIXOTO, A. L., COSTA, C. G., ICHASO, C. L. F. & GUIMARÃES, E. F., **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, **3**: 326, 1986.
- BELLOWS JUNIOR, T.S.; PERRING, T.M.; GILL, R.J.; HEADRICK, D.H. Description of a species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **87**: 195-206, 1994.
- BEZERRA, G. C. D. **Efeito de extratos brutos e frações meliáceas (Rutales: Meliaceae) na sobrevivência e no comportamento de Bemisia tabaci (Gennadius) biótipo B (Hemíptera: Aleyrodidae) em tomateiro**. Tese (Doutorado em Ciências) apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2009.
- BILBAO-S´AINZ, C.; CHIOU, B.; GLENN, G.M.; GREGORSKY, K.S.; WILLIAMS, T.G.; WOOD, D. F. KLAMCZYNSKI, A.P.; ORTS, W. J. Solid lipid particles in lipid films to control the diffusive release of 2-heptanone. *Pest Management Science*, **69**: 975-982, 2013.
- BIZZO, H.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, **32**: 588-594, 2009.
- BOEHME, A.K., NOLETTO, J.A HABER,. W.A., SETZER, W.N. Bioactivity and chemical composition of the leaf essential oils of *Zanthoxylum rhoifolium* and *Zanthoxylum setulosum* from Monteverde. Costa Rica. *Natural Product Research*, **22**:31-36, 2008.
- BUZZI, Z. J. **Entomologia Didática**. 5ª edição. Editora UFPR. Curitiba, 2010.
- CASTRO, D. P. de. **Atividade inseticida de óleos essenciais de Achilles millefolium e Thymus vulgaris sobre Spodoptera frugiperda e Schizaphis graminum**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) apresentada à Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2004.
- CAZAL, C. M. **Nanopartículas poliméricas associadas ao controle de formigas cortadeiras e busca de novas substâncias naturais com atividade antitumoral**. Tese (Doutorado em Ciências) apresentada à Universidade de Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- CAZO, N. A.; PEREIRA-FILHO, E. R.; SILVA, M. F. G. F. DA; FERNANDES, J. B. VIEIRA, P. C.; PUHL, A. C.; POLIKARPOV, I.; FORIM, M. R. Nanopartículas de poli-ε-(caprolactona) carregadas com hidrocortisona: preparação usando planejamento fatorial e sua avaliação. *Orbital-Electronic Journal of Chemistry*, **4**: 54-76, 2012.
- CHOOCHOTE, W.; CHAITHONG, U.; KAMSUK, K.; JITPAKDI, A.; TIPPAWANG-KOSOL, P.; TUETUN, B.; CHAMPAKAEW, D.; PITASAWAT, B. Repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*, **78**: 359, 2007.
- COHEN-SELA, E.; CHORNY, M.; KOROUKHOUV, N.; DANENBERG, H. D.; GOLOMB, G. J. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, **133**: 90-95, 2009.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil**. 1ª Ed. Imprensa Nacional. Rio de Janeiro, 1978.
- DOMINGUES, G. S.; GUTERRES, S. S. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. *Química Nova*, **31**: 1966-1972, 2008.

- DUCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, **363**, 1–24, 2011.
- DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C.; **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação.** Artliber Editora Ltda.: São Paulo, 2006.
- ERDOGAN, C.; MOORES, G. D.; M. GURKAN, O.; GORMAN, K. J.; DENHOLM, I. Insecticide resistance and biotype status of populations of the tobacco whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) from Turkey. *Crop Protection*, **27**: 600–605, 2008.
- FACUNDO, V. A.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; DE MORAIS, S. M.. Essential oil of *Zanthoxylum ekmanii* (Urb.) Alain Leaves. *Journal Essential Oil Research*, **15**: 1041-2905, 2003.
- FERNANDES, C. C.; VIEIRA, C. P.; SILVA, V. C. da; DALL’OGLIO, E. L.; SILVA, L. E. da; SOUSA JR, P. T. de. 6-Acetyl-N-methyl-dihydrodecarine, a New Alkaloid from *Zanthoxylum riedelianum*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **20**: 379-382, 2009.
- FERREIRA, F. T. R.; VENDRAMIM, J. D.; FORIM, M. R. Bioatividade de nanoformulações de nim sobre a traça-do-tomateiro. *Ciência Rural*, **42**: 1347-1353, 2012.
- FERRONATTO, R. **Análise química e antimicrobiana do óleo essencial de *Helietta apiculata* Benth. (Rutaceae).** Dissertação (Mestrado). Universidade Comunitária Regional de Chapecó, 2010.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N. BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, **55**: R1-R4, 1989.
- FONTES, F. V. H. M.; COLOMBO, C. A.; LOURENÇÃO, A. L. Structure of genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Scientia agrícola*, **69**: 47-53, 2012.
- GERLING, D.; HOROWITZ, A. R.; BAUMGAERTNER, J. Una reinterpretación sobre las moscas blancas. *Manejo integrado de plagas*, **63**: 13-21, 2002.
- GRILLO, R.; SANTOS, N.Z.P.; MARUYAMAC, C.R.; ROSA, A.H.; LIMA, R.; FRACETO, L.F. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. *Journal of Hazardous Materials*, **15**: 231– 232, 2012.
- GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. Poly-(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. *International Journal of Pharmaceutics*, **113**: 57-63, 1995.
- GUY, I.; CHARLES, B.; GUINAUDEAU, H.; FERREIRA, M. E.; ARIAS, A. R.; FOURNET, A. Essential oils from *Zanthoxylum chiloperone* and *Z. riedelianum* growing in Paraguay. *Pharmaceutical Biology*, **39**: 152, 2001.
- HILJE, L. & G.A. MORA. **Promissory botanical repellents/ deterrents for managing two key tropical insect pests, the whitefly *Bemisia tabaci* and the mahogany shootborer *Hypsipyla grandella***, p. 379- 403. In RAI, M. & CARPINELLA, M.C. (eds.). **Naturally occurring bioactive compounds.** Advances in phytomedicine, vol. 3, chapter 15. Elsevier, Amsterdam, Holland. 2006.
- HILJE, L.; MORALES, F. J. **Whitefly bioecology and management in Latin America.** In: CAPINERA, J. (ed.). **Encyclopedia of Entomology.** Springer, 4250-4260, 2008.

- HOROWITZ, A. R.; ISHAAYA, I. **Chemical controlo f Bemisia-management e application.** In: GERLING, D. & RICHARD, T. M. (Eds.) *Bemisia: Taxonomy, biology, damage, control and management.* Intercept, 1995.
- HOSSEINI, S. F.; ZANDI, M.; REZAEI, M.; FARAHMANDGHAHI, F. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers*, **95**: 50– 56, 2013.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. **Levantamento Sistemático Produção Agrícola.** Rio de Janeiro, **24**: 04-82, 2011.
- KAMSUK, K., CHOOCHOTE, W., CHAITHONG, U., JITPAKDI, A., TIPPAWANGKOSOL, P., RIYONG, D., PITASAWAT, B. Effectiveness of *Zanthoxylum piperitum*-derived essential oil as an alternative repellent under laboratory and field applications. *Journal of Parasitology Research*, **100**: 339–345, 2006.
- KIM J, GRATE JW, WANG P. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science*, **61**: 1017–1026. 2006.
- KOOLI, F.; KIYOZUMI, Y.; MIZUKAMY, F. Effect of alkali cations on the conversion of H-magadiite in tetramethylammonium hidroxude-water-1,4-dioxane system. *Materials Chemistry and Physics*, **77**: 134-140, 2002.
- KUMAR. P. Studies on loss of bio-efficacy of two indirect neem application over time (seed and soil) against *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) under semi-field conditions. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, **11**: 185–190, 2008.
- LACERDA, J. T.; CARVALHO, R. A. Discriminação e manejo integrado da mosca-branca (*Bemisia* spp.) transmissora de *geminivírus* em culturas econômicas. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, **2**: 15-22, 2008.
- LIMA, L. H. C.; QUEIROZ, P.R.; MORETZSOHN, M. de C.; LAGO, W. N. M.; CAMPOS, L.; OLIVEIRA, M. R. V. de. **Estudos da variabilidade genética da mosca branca *Bemisia tabaci* raça B (Hemiptera, Aleyrodidae) no Brasil.** Documentos 109. EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, 2003.
- LIMA, L. M.; PERAZZO, F. F.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory and analgesic activities of the ethanolic extracts from *Zanthoxylum riedelianum* (Rutaceae) leaves and stem bark. *Journal of Pharmacy Pharmacology*, **59**: 1151-1158, 2007.
- LIU, Z. L. CHU, S. S. JIANG, G. H. Feeding deterrents from *Zanthoxylum schinifolium* against two stored-product insects. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 10130-10133, 2009.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil.** Vol. 1, 4ª Ed. Instituto Plantarum. Nova Odessa, 2002.
- LOURENÇÃO, A. L.; NAGAI, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. *Bragantia*, **53**: 53-59, 1994.
- LUAN, J.; YAO, D.;ZHANG, T.; WALLING, L. L.; YANG, M.; WANG, Y.; LIU, S. Suppression of terpenoid synthesis in plants by a viruspromotes its mutualism with vectors. *Ecology Letters*, **16**: 390–398, 2013.
- MACHADO, B. F. M.; FERNANDES JÚNIOR, A. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. *Caderno Acadêmico Tubarão*, **3**: 105-127, 2011.
- MA, D.; GORMANC, K.; DEVINEC, G.;LUOA, W.; DENHOLM, I. The biotype and insecticide-resistance status of whiteflies, *Bemisia tabaci*(Hemiptera: Aleyrodidae), invading cropping systems in Xinjiang UygurAutonomous Region, northwestern China. *Crop Protection*, **26**: 612–617, 2007.
- MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. *Pharma Sciences*, **1**: 221-241, 1991.

- MAJI, T., BARUAH, I., DUBE, S., HUSSAIN, M.R. Microencapsulation of Zanthoxylum limonella oil (ZLO) in glutaraldehyde crosslinked gelatin for mosquito repellent application. *Bioresource Technology*, **98**: 840–844, 2007.
- MARTINEZ, S. S. **O Nim – Azadirachta indica: natureza, usos múltiplos, produção.** Londrina: IAPAR, 2002.
- MATEUS, C.; AMARO, F.; LOURO, D.; MEXIA, A. Presença e impacto de *Bemisia Tabaci* (genn.) (Homoptera: Aleyrodidae) em culturas hortícolas em Portugal/ Presence and impact of *Bemisia Tabaci* (genn.) (Homoptera: Aleyrodidae) in vegetable crops in Portugal. *Revista de Ciências Agrárias*, **31**: 163-172, 2008.
- MELO, M. DE F. F.; ZICKEL, C. S. Os gêneros *Zanthoxylum* L. e *Esenbeckia* Kunth (Rutaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Botanica*, **18**: 73-90, 2004.
- MENUT, C.; LAMATY, G.; BESSIERE, J. M.; MOLANGUI, T.; AYEDOUN, M. A.; SOSSOU, P. V.; SOHOUNHLOUE, K. D.; DJOSSOU, L.; HOUENON, J. G. Aromatic plants of tropical West Africa. X. Volatile constituents of *Zanthoxylum zanthoxyloides* Lam. leaves and fruit pericarps from Benin. *Journal Essential Oil Research*, **12**: 33-35, 2000.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, **385**: 113-142, 2010.
- MORAIS L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira*, **27**: 4050-4063, 2009.
- MOREL, A. F.; GONZAGA, W. A.; BURROW, R. A.; MAICHLE-MOSSMER, C.; STRAHLE, J. 6- Acetnyldihydroavicine. *Acta Crystallographica section*, **58**: 606-607, 2002.
- MOURA, N.F., STRAPAZZON, J. LORO, F. MOREL, A.F., FLACH, A. Composition of the leaf oils of Rutaceae: *Zanthoxylum hyemale* A. St. Hill. *Z. rhoifolium* Lam. and *Z. rugosum* A. St Hill et. Tul. *Journal of Essential Oil Research*, **18**: 4-5, 2006.
- MULLER, P. S. **Microencapsulação do óleo essencial de laranja.** Dissertação de Mestrado pela Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011.
- NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JÚNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira Farmacognosia*, **17**: 108-113, 2007.
- NAVA-CAMBEROS, U.; RILEY, D. G.; HARRIS, M. K. Temperature and host plant effects on development, survival, and fecundity of *Bemisia argentifolli* (Homoptera: /aleyrodidae). *Environmental Entomology*, **30**: 55 – 63, 2001.
- NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, **101**: 372–378, 2010.
- NGUYEN, H. M.; HWANG, I.; PARKC, J.; PARK, H. Photoprotection for deltamethrin using chitosan-coated beeswax solid lipid nanoparticles. *Pest Management Science*, **68**: 1062–1068, 2012.
- NOBES, G. A. R. & MARCHESSAULT, R. H. **“Enzymology of the synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates.”** IN IMAN, S. H.; GREENE, R. V.; ZAID, B. R. (Eds.). **Biopolymers utilizing nature’s advanced materials.** ACC Symposium Series 723. American Chemical Society. Washington, 1999.
- OLIVEIRA, E.F. DE.; PAULA, H. C.B.; DE PAULA, R.C.M. Alginate/cashew gun nanoparticles for essential oil encapsulation. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, **113**: 146-151, 2014.

- OLIVEIRA-FILHO, A.T.; CURI, N.; VILELA, E.A.; CARVALHO, D.A. Variation in tree community composition and structure with changes in soil properties within a fragment of semideciduous forest in south-eastern Brazil. *Edinburgh Journal of Botany*, **58**: 139-158, 2001.
- OSKAM, G. Metal oxide nanoparticles: synthesis, characterization and application. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, **37**:161–164. 2006.
- PADUCH, R. *et al.* Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, **55**: 315-327, 2007.
- PAULA, H. C.B.; SOMBRA, F. M.; ABREU, F.O.M.S.; DE PAULA, R.C.M. *Lippia sidoides* essential oil encapsulation by angico gum/chitosan nanoparticles. *Journal of Brazilian Chemical Society*, **21**: 2359-2366, 2010.
- PAULA, H. C.B., SOMBRA, F. M., CAVALCANTE, R.F., ABREU, F.O.M.S., DE PAULA, R.C.M. Preparation and characterization of chitosan/cashew gum beads oaded with *Lippia sidoides* essential oil. *Materials science and engineering*, **31**: 173-178, 2011.
- PEREIRA, S.S.; LOPES, L.S.; MARQUES, R.B.; FIGUEIREDO, K.A.; COSTA, D.A.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.C. Antinociceptive effect of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) in models of acute pain in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, **129**: 227–231, 2010.
- PERRING, T. M. The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Protection*, **20**: 725 – 737, 2001.
- PIETRO, J. A.; PATIÑO, O.; DELGADO, W. A.; MORENO, J. P.; CUCA, L. E. Chemical composition, insecticidal, and antifungal Activities of fruit essential oils of three Colombian *Zanthoxylum* species. *Chilean Journal of Agricultural Research*, **71**: 73-82. 2011.
- PINHEIRO, P. V.; QUINTELA, E. D.; OLIVEIRA, J. P. DE; SERAPHIN, J. C. Toxicity of neem oil to *Bemisia tabaci* biotype B nymphs reared on dry bean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **44**: 354-360, 2009.
- PIRANI, J. R. **Estudos Taxonômicos em Rutaceae: Revisão de *Helietta* e *Balfourodendron* (Pteleinae). Análise cladística de Pteleinae. Sinopse de Rutaceae no Brasil.** Tese de Livre Docência. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- PITASAWAT, B.; CHAMPAKAEW, D.; CHOOCHOTE, W.; JITPAKDI, A.; CHAITHONG, U.; KANJANAPOTHI, D.; RATTANACHANPICHAI, E.; TIPPAWANGKOSOL, P.; RIYONG, D.; TUETUN, B.; CHAIYASIT, D. Aromatic plant-derived essential oil: An alternative larvicide for mosquito control. *Fitoterapia*, **78**: 205–210, 2007.
- PONTES, W. J. T. **Efeito de extratos vegetais e óleos essenciais de espécies nativas de Pernambuco sobre o ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae).** Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.
- PRIMEL, E. D.; ZANELLA, R.; KURZ, M. H. S.; GONÇALVES, F. F.; MACHADO, S. O.; MARCHEZAN, E. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região Central do estado do rio grande do sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. *Química Nova*, **28**: 605-609, 2005.
- PUISIEUX, F.; BARRAT, G.; COUARAZE, G.; COUVREUR, P.; DEVISSAGUET, J.; DUBERNET, C.; FATTAL, E.; FESSI, H.; VAUTHIER, C.; BENITA, S. **Polymeric Biomaterials.** Dumitriu, S. (Ed.) Marcel Dekker: New York, 1994.
- PUOCI F, LEMMA F, SPIZZIRRI UG, CIRILLO G, CURCIO M, PICCI N. Polymer in agriculture: a review. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, **3**: 299–314. 2008.

- RÉ, M. I. & RODRIGUES, M. F. A. “**Polímeros biodegradáveis.**” IN DURAN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. (Eds.). **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação.** Artliber Editora, São Paulo, 2006.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.; COLLINS, C.; JARDIM, I.; MELO, L. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, **27**: 771-780, 2004.
- ROSA, D. S.; PANTANO FILHO, R.; CHI, Q. S. H.; CALIL, M. R.; GUEDES, C. G. F. The biodegradation of poly- $\beta$ -(hydroxybutyrate), poly- $\beta$ -(hydroxybutyrate-co- $\beta$ -valerate) and poly- $\epsilon$ -(caprolactone) in compost derived from municipal solid waste. *European Polymer Journal*, **39**: 233-237, 2003.
- ROUT, P.K.; NAIK, S.N.; RAOB, Y.R.; JADEJA, G.; MAHESHWARI, R.C. Extraction and composition of volatiles from *Zanthoxylum rhetsa*: Comparison of subcritical CO<sub>2</sub> and traditional processes. *Journal of Supercritical Fluids*, **42**: 334-341, 2007.
- SANTOS, A. S.; ALVES, S. M.; FIGUEIRÊDO, F. J. C.; ROCHA NETO, O. G. Descrição de sistemas e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. *EMBRAPA: Comunicado técnico*. Belém, 2004.
- SCARPELLINI, J. R. Danos e controle da mosca branca *Bemisia tabaci* biótipo B na cultura do feijoeiro. *Pesquisa & Tecnologia*, **7**, 2010.
- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, **26**: 726-737, 2003.
- SEAMAN, D. Trends in the formulation of pesticides-na overview. *Pesticide Science*, **29**: 437-449, 1990.
- SILVA JÚNIOR, M. C. **100 Árvores do Cerrado: Guia de Campo.** Ed. Rede de Sementes do Cerrado. Brasília, 2005.
- SILVA, C. V. DA. **Alcalóides benzofenantridinídnicos e outros metabólitos do caule e frutos de *Zanthoxylum tingoassuiba* ST. Hil.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.
- SILVA, I. A.; VALENTI, M, W.; SILVA-MATOS, D. M. Fire effects on the population structure of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam (Rutaceae) in a Brazilian savanna. *Brazilian Journal of Biology*, **69**: 813-818, 2009.
- SILVA, J.P.G.F.; ZACHÉ, R.R.C.; BALDIN, E.L.L.; OLIVEIRA, F.B.; VALTAPELI, E.R. Repelência e deterrência na oviposição de *Bemisia tabaci* biótipo B pelo uso de extratos vegetais em *Cucurbita pepo* L. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **14**: 76-83, 2012.
- SILVA, L.L.; PAOLI, A.A.S. Caracterização morfo-anatômica da semente de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam.- Rutaceae. *Revista Brasileira de Sementes*, **22**: 250-256. 2000.
- SILVA, S. L. da; FIGUEIREDO, P. M.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam leaves. *Acta Amazonica*, **37**: 281 – 286, 2007a.
- SILVA, S. L.; FIGUEIREDO, P. M. S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of the volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam leaves. *European Journal of Pharmacology*, **576**: 180–188, 2007b.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5ª ed., Ed. da UFSC: Porto Alegre, 2004.

- SIMSEN, V. L.; ANGNES, R. A.; AGUIAR, C. M.; COSTA, A. C. DOS S.; LOBO, V. DA S.; MONTANHER, S. F.; ROSA, M. F. DA. Estudo fotodegradativo do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Anais do III ENDICT Anais do III ENDICT III ENDICT Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica**. 2011a.
- SIMSEN, V. L.; ANGNES, R. A.; MARTENDAL, J. M. P.; COSTA, A. C. S.; LOBO, V. S.; MONTANHER, S. F.; AGUIAR, C. M.; ROSA, M. F. Estudo fotodegradativo do óleo essencial de sálvia (*Salvia officinalis* L.) e quantificação do óleo obtido durante a extração. **4º Encontro Nacional de Tecnologia Química**. 2011b.
- SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. **País Cresce no Mercado de Defensivos**. Disponível em: [http://www.sindag.com.br/noticia.php?News\\_ID=2331](http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2331). Acesso em: 20/06/2013a.
- SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. **Importação de Agrotóxicos Bate Recorde**. Disponível em: [http://www.sindag.com.br/noticia.php?News\\_ID=2323](http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2323). Acesso em: 22/07/2013b.
- SOARES, M.V. **Desenvolvimento e avaliação de nanopartículas de poli-ε-(caprolactona) contendo zinco (II) ftalocianina para uso na terapia fotodinâmica do câncer**. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
- SOLOMON, B.; SAHLE, F.F.; GEBRE-MARIAM, T.; ASRES, K.; NEUBERT, R.H.H. Microencapsulation of citronella oil for mosquito-repellent application: Formulation and *in vitro* permeation studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **80**: 61–66, 2012.
- SONG, X.; ZHAO, Y.; WU, W.; BI, Y.; CAI, Z.; CHEN, Q.; LI, Y.; HOU, S. PLGA nanoparticles simultaneously loaded with vincristine sulfate and verapamil hydrochloride: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *International Journal of Pharmaceutics*, **350**: 320-329, 2008.
- SOPPIRMATH, K. S., & AMINABHAVI, T. M. Water transport and drug release study from cross-linked polyacrylamide grafted guar gum hydrogel microspheres for the controlled release application. *European Journal of Pharmaceutical Biopharmacy*, **53**: 87–98. 2002.
- SOUZA, A. P. **Atividade inseticida e modo de ação de extratos de meliáceas sobre Bemisia tabaci (Genn., 1889) biótipo B**. Tese (Doutorado em Ciências) apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2004.
- SOUZA, A. P.; VENDRAMIM, J. D. Atividade ovicida de extratos aquosos de meliáceas sobre a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B em tomateiro. *Scientia Agricola*, **72**: 159-170, 2000.
- SOUZA, A. P.; VENDRAMIM, J. D. Atividade inseticida de extratos aquosos de meliáceas sobre a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). *Neotropical Entomology*, **30**: 133-137, 2001.
- SOUZA, P. S.; LOBO, F. A.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli-ε-(caprolactona) contendo o herbicida atrazina. *Química Nova*, **35**: 132-137, 2012.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para Identificação das Famílias de Angiospermas da Flora Brasileira Baseado em APG II**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2005.
- SPARKS, R. E. **Microencapsulation**. In: KIRK-OTHMER. **Encyclopedia of Chemical technology**, 3. Ed. John Willey and Sons, New York, 1981.
- TAN, W.; HOU, N.; PANG, S.; ZHU, X.; LI, Z.; WENB, L.; DUAN, L. Improved biological effects of uniconazole using porous hollow silica nanoparticles as carriers.



*Pest Management Science*, **68**: 437–443, 2012.

THEODORO, P. N. E. T. **Atividade in vitro de plantas da medicina tradicional do cerrado em dermatopfitos e leveduras**. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Brasília, 2009.

TRIPLEHORN, C. A.; JONNISON, N. F. **Estudo dos Insetos**. Tradução da 7ª edição de **Borror and DeLong's introduction to the study of insects**. Editora CENGAGE Learning. São Paulo, 2011.

TRONGTOKIT, Y.; RONGSRIYAM, Y.; KOMALAMISRA, N.; APIWATHNASORN, C. "Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites." *Phytotherapy Research*, **19**: 303-312, 2005.

TSAL, J. H.; WANG, K. Development and reproduction of *Bemisia argentifolli* (Homoptera, Aleyrodidae) on five host plants. *Environmental Entomology*, **25**: 810 – 816, 1996.

VIEIRA, M. G. S.; FREITAS, J. V. B. DE.; LIMA NETO, M. N. DE.; GRAMOSA, N. V. Constituintes químicos voláteis das folhas e galhos de *Zanthoxylum syncarpum* Tull. *Química Nova*, **32**: 391-393, 2009.

WATTS, P. J.; DAVIES, M. C.; MELIA, C. D. Microencapsulation using emulsification/solvent evaporation: An overview of techniques and applications. *Critical Reviews Therapeutic Drug Carrier Systems*, **7**: 235-259, 1990.

WU, Y.; LUO, Y.; WANG, Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. *LWT - Food Science and Technology*, **48**: 283-290, 2012.

YANG, F. L.; LI, X. G.; ZHU, F.; LEI, C. L. Structural characterization of Nanoparticles Loaded with Garlic Essential Oil and Their Insecticidal Activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 10156–10162, 2009.

YANG, N.W.; LI, A.L.; WAN, F.H.; LIU, W.X.; JOHNSON, D. Effects of plant essential oils on immature and adult sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* biotype B. *Crop Protection*, **29**: 1200-1207, 2010.

YUAN, L.; WANG, S.; ZHOU, J.; DU, Y.; ZHANG, Y.; WANG, J. Status of insecticide resistance and associated mutations in Q-biotype of whitefly, *Bemisia tabaci*, from eastern China. *Crop Protection*, **31**: 67-71, 2012.

ZUCCHI, R. A.; SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O. **Guia de identificação de pragas agrícolas**. FEALQ, Piracicaba, 1993.