



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS**



**TARIS MARIA MACEDO DE SANTANA**

**APERFEIÇOAMENTO DA HIDRODESTILAÇÃO,  
DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS *Lippia  
lasiocalycina* Cham. E *Lippia insignis* Moldenke E EFEITO DAS  
NANOEMULSÕES EM MOSCA DO MEDITERRÂNEO**

Feira de Santana - BA

2019

**TARIS MARIA MACEDO DE SANTANA**

**APERFEIÇOAMENTO DA HIDRODESTILAÇÃO,  
DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS *Lippia  
lasiocalycina* Cham. E *Lippia insignis* Moldenke E EFEITO DAS  
NANOEMULSÕES EM MOSCA DO MEDITERRÂNEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira

Co-Orientadora: Profa. Dra. Angélica Maria Lucchese

Feira de Santana - BA

2019

**Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado**

Santana, Taris Maria Macedo de

S223a Aperfeiçoamento da hidrodestilação, determinação da composição dos óleos *Lippia lasiocalycina* Cham. e *Lippia insignis* Moldenke efeito das nanoemulsões em mosca do mediterrâneo./ Taris Maria Macedo de Santana. – 2019.

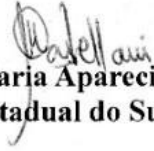
76f.: il.

Orientadora: Lenaldo Muniz de Oliveira Coorientadora:  
Angélica Maria Lucchese  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira  
de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos  
Genéticos Vegetais, 2019.

1.Ceratitis capitata. 2.Mosca do mediterrâneo. 3.Hidrodestilação.  
I.Oliveira, Lenaldo Muniz de, orient. II.Lucchese, Angélica Maria,  
coorient. III.Universidade Estadual de Feira de Santana. IV.Título.

CDU : 595.773.4

**BANCA EXAMINADORA**



**Prof. Dr.<sup>a</sup> Maria Aparecida Castellani**  
**(Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia)**



**Prof. Dr.<sup>a</sup> Rosana Lopes Lima Fialho**  
**(Universidade Federal da Bahia)**



**Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira**  
**(Universidade Estadual de Feira de Santana)**  
**Orientador e Presidente da Banca**

*A aqueles que permaneceram presentes entendendo a minha ausência.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Italva Mirtes e meu esposo Gabriel Macêdo por todo incentivo, pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho, desde colocar a mão nas folhas, nas gaiolas, nos textos... E por cuidarem do nosso lar e de mim, mesmo quando eu esquecia.

Ao meu orientador Lenaldo Muniz de Oliveira por ter acreditado em mim, mesmo sem referências ou indicações e por ter me guiado no processo de aprendizado que foram esses dois anos de mestrado. À minha Co-Orientadora Angélica Maria Lucchese por ter me acolhido e ajudado todos os dias (incluindo finais de semana e feriados). Sou grata pela paciência e admiro sua dedicação à pesquisa e aos orientandos. As definições de orientação foram atualizadas. Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica (LNFarm-LIKA) da UFPE, em especial a Prof. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães e Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior pela colaboração no desenvolvimento das emulsões.

Ao Laboratório de Entomologia Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, destacando Prof. Dra. Marilene e Dilson, por ceder as moscas para realização dos experimentos. A todos os professores que estiveram envolvidos em cada etapa da constituição desse trabalho. Desde os que estavam em sala de aula como Prof. Ranieri, Prof. Mauricio Lordelo, Prof. Hugo Brandão, Prof. Alone, Profa. Marilza e a nossa coordenadora, Profa. Claudineia, que é uma mãe para os estudantes e luta para manter o programa evoluindo.

Aos companheiros do LAPRON, que são uma ajuda física e psicológica. Em especial a Acsa, Edna e Jade que além de auxiliarem nas tarefas diárias, ajudando a discutir e executar os experimentos, são uma fonte de carinho e humanização.

Aos meus colegas de pós-graduação que fizeram com que a caminhada fosse mais leve e alegre, especialmente Itala, Izabela e Luane, que se tornaram mais que colegas. E a Dani Figueredo, Anne Ramos e Luma pelo suporte emocional e presencial.

Aos meus amigos e familiares, por me apoiarem e compreenderem a minha ausência. A minha tia Profa. Dra. Joselita Macedo (*in memoria*, e em lágrimas) por ser meu exemplo de profissional, pesquisadora, professora e mãe. E a todos que não precisam do meu muito obrigado para se sentirem agradecidos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001"

*“If we knew what it was we were doing, it would not be called research, would it?”*  
*“Se soubéssemos o que estamos fazendo, não se chamaria pesquisa, não é mesmo?”*

Albert Einstein

## RESUMO

O mercado de alimentos orgânicos está em crescimento, em razão da opção dos consumidores por produtos que não utilizam químicos sintéticos. Na agricultura comercial por sua vez, há um aumento significativo de pragas resistentes a agrotóxicos o que tem levado ao uso cada vez mais intensivo de pesticidas químicos. No Brasil, a mosca do Mediterrâneo (*Ceratitis capitata*) é um dos obstáculos que impedem o crescimento do comércio de frutas, principalmente com o mercado externo. Neste cenário, os biopesticidas vêm ganhando espaço e os óleos essenciais (OE) ocupam posição de destaque. *Lippia insignis* e *Lippia lasiocalycina* são espécies nativas do semiárido brasileiro que produzem óleos essenciais que já se mostraram eficazes contra *C. capitata*. Este estudo buscou aperfeiçoar a hidrodestilação de OE de *L. insignis* e *L. lasiocalycina* objetivando maior rendimento e melhor qualidade com o objetivo de sua utilização como inseticidas. Em virtude da grande volatilidade dos OEs a busca por formulações que possam melhorar a sua estabilidade e eficácia tem sido algo constante. Assim, esse estudo também objetivou desenvolver nanoemulsões dos OEs dessas espécies utilizando polisorbato e ultrassom como método para produzir nanoemulsões estáveis e eficientes contra adultos e larvas de *C. capitata*. Os resultados mostraram que o uso de menor quantidade de água e menor tempo de destilação aumenta o rendimento de OE das espécies e a composição química pode mudar em função dos fatores estudados (proporção solvente:biomassa e tempo). As nanoemulsões de *L. insignis* e *L. Lasiocalycina* mostraram ser estáveis e promissoras como inseticidas.

**Palavras-chave:** *C. capitata*, hidrodestilação, nanopartículas.



## ABSTRACT

The organic food market is growing, as consumers are increasingly opting for more natural products. In addition, there is an rise in crop pest resistance, which has led to the increasing use of chemical pesticides. In Brazil, Mediterranean fruit fly (*Ceratitidis capitata*) is one of the obstacles that hinders the growth of the fruit trade. In this scenario, biopesticides have been gaining ground, and essential oils (EO) occupy a prominent position. *Lippia insignis* and *Lippia lasiocalycina* are native semi-arid species that produce essential oils that have proven to be effective against *Ceratitidis capitata*. This study aimed to improve the hydrodistillation of OE of *L. insignis* and *L. lasiocalycina* aiming at higher yield and better quality to be used as insecticides. Due to the great volatility of the OEs, the search for formulations that can improve its stability and effectiveness has been constant. Thus, this study also aimed to develop nanoemulsions of the OEs of these species using polysorbate and ultrasound as a method to produce stable and efficient nanoemulsions against adults and *C. capitata* larvae. The results showed that the use of less water and less time increases the EO yield of the species and the chemical composition may change depending on the factors studied (solvent ratio: biomass and time). The nanoemulsions of *L. insignis* and *L. Lasiocalycina* have nanometric characteristics and have been shown to be stable and efficient as insecticides.

**Key words:** *C. capitata*, hydrodistillation, nanoparticles.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABRASFRUTAS	Associação Brasileira dos Produtores Exportadores de Frutas e Derivados
AChE	Acetilcolinesterase
AI	Índices analíticos
CarE	Carboxilesterase
CG	Cromatografia gasosa
EM	Espectrofotômetro de massas
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GABA	ácido gama-aminobutírico
GST	glutathione-S-transferase
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISO	Organização Internacional de Normalização
LNFarm	Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica
LAPRON	Laboratório de Produtos Naturais
MAD	Mosca/armadilha/dia
P450	Citocromo P450
OE	Óleo essencial
PNDF	Plano Nacional de Desenvolvimento da Fruticultura
ROAs	Receptores de octopamina
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Rendimento de óleo essencial .....	40
Equação 2. Fórmula de Abbott para corrigir mortalidade .....	62

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases do ciclo biológico de <i>Ceratitis capitata</i> (Wiedemann)(Diptera Tephritidae). A. ovos; B. larva; C. pupa; D. adulto. Fonte: THOMAS et al., 2010. ....	18
Figura 2. Avaliação global da distribuição sazonal de <i>Ceratitis capitata</i> (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Fonte: Szyniszewska e Tatem (2014).....	19
Figura 3. <i>Lippia lasiocalycina</i> Cham. A - cultivada; B – Folhas; C - Botões florais; D – Inflorescências; E – Flor; F - Disposição das folhas e inflorescências nos ramos. Feira de Santana-BA, Horto Florestal-UEFS, 2015. Fonte: Bispo, 2015.....	28
Figura 4. <i>Lippia insignis</i> Moldenke A - cultivada; B – Folhas; C - Botões florais; D – Inflorescência; E – Flor; F - Disposição das folhas e inflorescências nos ramos. Feira de Santana-BA, Horto Florestal-UEFS, 2015. Fonte: Bispo, 2015.....	29
Figura 5. Preparo do material vegetal. A. Coleta de <i>Lippia insignis</i> Moldenke. B. seleção do material. C. Secagem. D. Hidrodestilação. E. Detalhe da extração do OE de <i>Lippia insignis</i> Moldenke. F. Cromatógrafo a gás Shimadzu acoplado a detector de Massas.....	40
Figura 6. InteractionPlot mostrando que não houve interação entre os tratamentos razão solvente (ml): biomassa de folhas (g) e tempo na hidrodestilação do óleo essencial de <i>Lippia insignis</i> Moldenke. Feira de Santana-BA, 2019. ....	43
Figura 7. InteractionPlot mostrando que houve interação entre os tratamentos razão solvente (ml): biomassa de folhas (g) e tempo na hidrodestilação do óleo essencial de <i>Lippia lasiocalycina</i> Cham. Feira de Santana-BA, 2019.....	43
Figura 8. Experimento de toxicidade por contato de nanoemulsões de óleos essenciais de <i>Lippia lasiocalycina</i> Cham. e <i>Lippia insignis</i> Moldenke contra <i>Ceratitis capitata</i> (Wiedemann)(Diptera Tephritidae). Feira de Santana. A e B. Proteção contra outros insetos. C,D E. Gaiolas confeccionadas mostrando detalhes da cobertura, alimentação e papel filtro. ....	61
Figura 9. Microemulsão obtidas a partir do óleo essencial <i>Lippia insignis</i> Moldenke (A) e <i>Lippia lasiocalycina</i> Cham. (B) com razões tensoativo/óleo essencial 1:1. Feira de Santana, 2019. ....	65

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Efeito de Óleos essenciais obtidos de diferentes espécies vegetais testados contra <i>Ceratitis capitata</i> (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae).....	23
--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis avaliadas para otimização do rendimento de extração de óleo essencial de <i>Lippia insignis</i> Moldenke e <i>Lippia lasiocalycina</i> Cham., Feira de Santana, 2019. ....	41
Tabela 2. Rendimento de óleo essencial em amostras de folhas de <i>Lippia insignis</i> Moldenke em diferentes tempos de destilação e diferentes proporções volume de solvente/massa vegetal. Feira de Santana-BA, 2019.....	44
Tabela 3. Rendimento de óleo essencial em amostras de folhas de <i>Lippia lasiocalycina</i> Cham. em diferentes tempos de destilação e diferentes proporções volume de solvente/massa vegetal. Feira de Santana-BA, 2019. ....	44
Tabela 4. Porcentagem de constituintes encontrados no óleo essencial de folhas de <i>Lippia lasiocalycina</i> Cham. submetidas a diferentes parâmetros de extrações, Feira de Santana-BA, 2019. ....	46
Tabela 5. Comparação do percentual dos compostos majoritários do óleo essencial obtido de folhas de <i>Lippia lasiocalycina</i> Cham. em diferentes condições de extrações. Feira de Santana-BA, 2019.....	47
Tabela 6. Propriedades e estrutura dos compostos majoritários encontrados nos óleos essenciais de <i>Lippia lasiocalycina</i> Cham. e <i>Lippia insignis</i> Moldenke. Feira de Santana, 2019. ....	48
Tabela 7. Porcentagem de constituintes encontrados no óleo essencial de folhas de <i>Lippia insignis</i> Moldenke submetidas a diferentes parâmetros de extrações. Feira de Santana-BA, 2019. ....	49
Tabela 8. Comparativo do percentual de compostos majoritários do óleo essencial de <i>Lippia insignis</i> Moldenke obtidos em diferentes condições de extração. Feira de Santana-BA, 2019. ....	50
Tabela 9. Porcentagem dos constituintes encontrados nos óleos essenciais de folhas de <i>Lippia insignis</i> Moldenke e <i>Lippia lasiocalycina</i> Cham. Feira de Santana-BA, 2019.....	64
Tabela 10. Características das emulsões obtidas a partir de óleos essenciais das espécies de <i>Lippia insignis</i> Moldenke e <i>Lippia lasiocalycina</i> Cham. Feira de Santana, 2019. ....	65

Tabela 11. Taxa de mortalidade de <i>Ceratitis capitata</i> (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) frente a nanoemulsões obtidas a partir de óleos essenciais de <i>Lippia insignis</i> Moldenke e <i>Lippia lasiocalycina</i> Cham. Feira de Santana, 2019. ....	67
Tabela 12. Taxa de emergência de larvas em terceiro instar de <i>Ceratitis capitata</i> (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) frente a nanoemulsões obtidas a partir de óleos essenciais de <i>Lippia insignis</i> Moldenke e <i>Lippia lasiocalycina</i> Cham. Feira de Santana, 2019.....	68

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1	FRUTICULTURA .....	16
2.2	MOSCA DO MEDITERRÂNEO .....	17
2.3	ÓLEO ESSENCIAL COMO BIOPESTICIDA .....	20
2.4	NANOPESTICIDAS .....	25
2.5	ESPÉCIES AROMÁTICAS POTENCIAIS.....	26
2.6	REFERÊNCIAS.....	31
<b>3</b>	<b>CAPITULO I - APERFEIÇOAMENTO DA HIDRODESTILAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>LIPPIA LASIOCALYCINA</i> CHAM. E <i>LIPPIA INSIGNIS</i> MOLDENKE</b> .....	<b>38</b>
3.1	INTRODUÇÃO .....	38
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	40
3.2.1	<b>Material vegetal</b> .....	<b>40</b>
3.2.2	<b>Aperfeiçoamento do método de extração</b> .....	<b>41</b>
3.2.3	<b>Análise da composição dos OE</b> .....	<b>42</b>
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
3.4	CONCLUSÃO .....	51
3.5	REFERÊNCIAS.....	52
<b>4</b>	<b>CAPITULO II - DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES A PARTIR DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>LIPPIA LASIOCALYCINA</i> CHAM. E <i>LIPPIA INSIGNIS</i> MOLDENKE PARA USO COMO BIOPESTICIDAS NO CONTROLE DE MOSCA DO MEDITERRÂNEO</b> .....	<b>56</b>
4.1	INTRODUÇÃO .....	56
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	58
4.2.1	<b>Material vegetal</b> .....	<b>58</b>
4.2.2	<b>Preparo das nanoemulsões</b> .....	<b>59</b>
4.2.3	<b>Caracterização das nanoemulsões</b> .....	<b>60</b>
4.2.4	<b>Ensaio toxicidade OE contra <i>C. Capitata</i></b> .....	<b>60</b>
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	62
4.3.1	<b>Rendimento e Composição dos óleos essenciais</b> .....	<b>62</b>



<b>4.3.2</b>	<b>Preparo das nanoemulsões.....</b>	<b>65</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Ensaio de Toxicidade .....</b>	<b>67</b>
4.4	CONCLUSÃO .....	69
4.5	REFERÊNCIAS.....	70
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A fruticultura representa importante atividade no setor do agronegócio na economia brasileira, mas ainda tem muito potencial de crescimento, especialmente para exportação. Frutas como mangas, goiabas, mamões, acerolas, cajus, graviolas, representam grande impacto na balança comercial do Brasil, especialmente para o Nordeste do país, onde são fundamentais para a economia da região. A predominância de clima semiárido e utilização de diferentes sistemas de irrigação, especialmente no Vale do Rio São Francisco, tornam estas culturas relevantes economicamente, seja no agronegócio, seja para pequenos produtores rurais.

No Vale do São Francisco, 30% da produção é voltada para a exportação, com potencial para aumentar, mas os entraves fitossanitários ainda são uma barreira a ser vencida. Como exemplo, uma praga da família Tephritidae, uma das maiores dentro da Ordem Diptera - a mosca do mediterrâneo - *Ceratitis capitata* (Wiedemann). Após depositarem os ovos no interior dos frutos, suas larvas se desenvolvem alimentando-se da polpa, o que os torna impróprios para consumo, seja *in natura* ou mesmo na indústria, inviabilizando a sua comercialização. As diferentes técnicas de manejo até então utilizadas não estão sendo capazes de evitar prejuízos de milhões de dólares anuais pelos controles impostos por quase todos os países importadores.

Os agrotóxicos até então utilizados, em sua maioria, têm restrições quanto ao nível de impacto ao meio ambiente e à saúde do consumidor. Por esta razão, fontes alternativas naturais vêm sendo pesquisadas, com a utilização de controle biológico e de produtos isentos de agrotóxicos químicos. Dentro desta perspectiva busca-se no próprio ecossistema do semiárido, com características climáticas únicas e uma flora endêmica, uma possibilidade de combate à mosca do mediterrâneo.

O semiárido apresenta uma flora rica em espécies aromáticas, que produzem óleos essenciais, como atrativos para polinizadores, antiherbivorismo, contra fitopatógenos, transpiração, dentre outras funções, com destaque para as variedades da família Verbenaceae. Esses compostos estão sendo pesquisados para uso contra bactérias, fungos, insetos. Porém, o rendimento de extração desses óleos é normalmente baixo e por não serem miscíveis em água, dificultam o seu uso.

Nesse cenário, o presente trabalho visou padronizar o método de extração do óleo essencial de *Lippia insignis* e *Lippia lasiocalycina*, duas espécies endêmicas do semiárido, para desenvolver e avaliar a eficácia de uma nanoemulsão contra *Ceratitis*

*capitata*. Buscou-se avaliar desde o aumento do rendimento, à avaliação da composição química do óleo essencial de folhas de *Lippia insignis* e *Lippia lasiocalycina* cultivadas no Horto Florestal da UEFS, até a formulação de nanoemulsão e avaliação dos efeitos de toxicidade. As formulações com gotículas nanométricas aumentam a eficácia dos óleos essenciais e o rendimento e composição dos óleos essenciais sofrem influência da quantidade de biomassa e tempo de extração.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Fruticultura

O Brasil foi o terceiro maior produtor de frutas entre 2007 e 2017, sendo responsável por 4% da produção mundial em 2017, ficando atrás apenas da Índia com 11% e China com 32%, mas ocupa apenas a 23ª posição na lista de países exportadores. Segundo o Plano Nacional de Desenvolvimento da Fruticultura - PNDP (BRASIL, 2018) apesar dos avanços na citricultura, o país tem potencial para produção de qualidade e com segurança de inúmeras outras variedades frutíferas. Dentro deste contexto, algumas metas foram traçadas para os próximos dez anos e, dentre elas, o aumento das exportações e do consumo interno, mas, para isto, faz-se necessário atingir uma das prioridades mais urgentes: manter o Brasil livre de mosca do mediterrâneo.

A fruticultura brasileira conta com uma área de cultivo que supera 2 milhões de hectares, produzindo 44 milhões de toneladas ao longo do ano, possibilitando diferentes formas de crescimento econômico (BRASIL, 2018). Além de ser fonte de alimento, é um gerador de emprego e renda, considerando que cada hectare ocupado com a fruticultura, gera em média, diretamente, de três a seis empregos e indiretamente mais dois a três (BRASIL, 2018), sendo assim, a fruticultura brasileira gera nove milhões de empregos diretos. Em 2017, a receita gerada pela fruticultura brasileira foi da ordem de 26,5 bilhões de reais de frutas frescas e processadas (CARVALHO, 2017).

Dentre as lavouras permanentes; laranja (18.666.928 t), banana (7.185.903 t), uva (1.680.020 t), caju (134.580 t) e manga (179.601 t), todas são susceptíveis a infestação por moscas das frutas. Sem tratamento, as perdas chegam a 100% da produção dos pomares, inviabilizando a comercialização dos frutos frescos (HERNANDES, BLAIN e JUNIOR, 2013).

Segundo a Associação Brasileira dos Produtores Exportadores de Frutas e Derivados (ABRASFRUTAS, 2018) em 2017 houve aumento das exportações em 15,7% do valor monetário e 9,0% no volume, destacando-se uva, maçã, abacate e manga, somando mais de 200 milhões de dólares. Outras frutas também apresentaram aumento nas exportações, como o morango (394%) e banana (267%). Porém, esse comércio externo equivale somente a 2,5% do que é produzido internamente, sendo a Europa responsável por 70% e os Estados Unidos por 15% das importações de frutas do Brasil (ABRASFRUTAS, 2018).

As principais barreiras para exportação são fitossanitárias, principalmente por práticas de manejo adotadas pelo Brasil, como, por exemplo, uso de produtos químicos que têm restrições na maioria dos países importadores. Uma das alternativas estudadas por pesquisadores para aumentar a exportação de mangas foi a utilização de tratamento hidrotérmico, que consiste em mergulhar as frutas em água aquecida com temperatura e tempo controlados de acordo com o tamanho do fruto. Essa técnica elimina os ovos da espécie *C. capitata* do fruto, possibilitando ao país receber certificado fitossanitário dos principais mercados internacionais: Coreia do Sul, Japão, Chile, Argentina, Estados Unidos, União Europeia e, recentemente, da África do Sul, que já importou 25 toneladas da fruta em 2018 (EMBRAPA, 2019).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017), a Bahia é o segundo maior produtor de frutas e o terceiro estado brasileiro que mais exporta frutas, ficando atrás apenas do Ceará e Rio Grande do Norte (IBRAF, 2015). Em 2017, a Bahia foi o maior produtor de manga (281 mil toneladas - 41,6% da produção nacional), cacau (88,8 mil toneladas de cacau - 57,4% da produção nacional), maracujá (110 mil toneladas - 37,61% da produção nacional) e o terceiro na produção de banana (579,2 mil toneladas), uva (51,5 mil toneladas) e mamão (232 mil toneladas). O município que mais se destaca pela produção de frutas na Bahia é Juazeiro, no Vale do São Francisco, onde a *C. capitata* é responsável por 99% das ocorrências de moscas das frutas.

## 2.2 Mosca do mediterrâneo

Moscas adultas de *C. capitata* (Figura 1D) têm comprimento de 4 a 5 mm, são amarelas com tórax preto na face superior, asas transparentes, com listras amarelas.

Após acasalar as fêmeas ficam por um período de cerca de 10 dias se alimentando de proteínas para aumentar a fertilidade dos ovos.

Após o período de incubação dos ovos as moscas adultas buscam frutos com características e temperatura específicas, preferindo frutos no início do amadurecimento, mas os frutos verdes também são susceptíveis ao ataque. Os ovos (Figura 1 A) são alongados e esbranquiçados, com aproximadamente 1 mm, podendo uma fêmea depositar 10 ovos por oviposição e 300 a 1000 ovos durante toda a sua vida. A larva (Figura 1 B) mede aproximadamente 8 mm; amarelada, se alimenta da polpa dos frutos causando seu apodrecimento. A vida das larvas pode variar de 6 a 26 dias, a depender do fruto e das condições climáticas, e quando prestes a empupar vão para o solo, enterrando-se de 5 a 7cm. A pupa (Figura 1 C) tem coloração marrom-avermelhada e passam de 6 dias (em temperaturas de 24 a 27°C) a 20 dias (em temperaturas inferiores a 22°C) enterrada. Assim o ciclo de vida tem duração média de 30 dias, dependendo das condições ambientais (THOMAS et al., 2010).

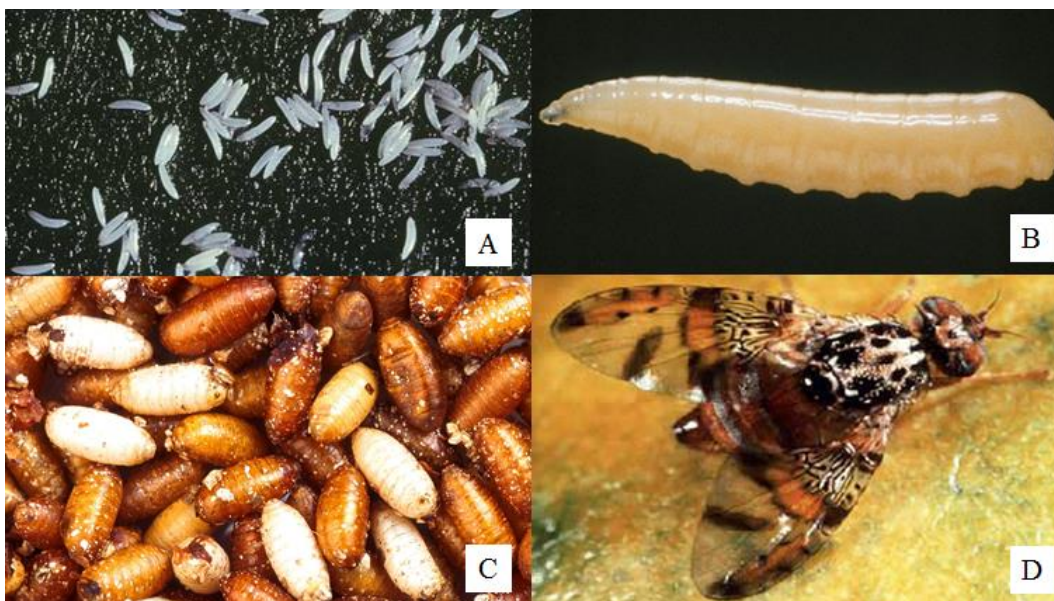


Figura 1. Fases do ciclo biológico de *Ceratitidis capitata* (Wiedemann)(Diptera Tephritidae). A. ovos; B. larva; C. pupa; D. adulto. Fonte: THOMAS et al., 2010.

As moscas das frutas são um grupo de várias espécies de importância quarentenária, que mais causam prejuízo aos produtores e de maior relevância econômica na fruticultura mundial, ocasionando perdas anuais de cerca de um bilhão de dólares (THOMAS et al., 2010). Isso porque o prejuízo ocorre de forma direta, afetando

tanto a qualidade quanto o volume da produção, com a consequente redução da comercialização e ainda na restrição dos mercados internacionais devido ao risco de inserir o inseto em países onde não há essa praga (BRASIL, 2018). Trata-se portanto, de insetos de grande importância econômica para a fruticultura brasileira, pois impede a exportação de frutas frescas (EMBRAPA, 2013).

Estudo realizado por Szyntyszewska e Tatem (2014) mapeou a existência de *Ceratitidis capitata* em 43 países (Figura 2), sendo os hospedeiros mais comuns: goiaba, pêssigo, frutas cítricas (laranjas e tangerinas), maçã. Estudos realizados na Baía de Tampa (EUA) demonstraram que os custos para impedir uma infestação desse inseto chegaram a 25 milhões de dólares (SZYNISZEWSKA, 2014), mas os valores para a sua erradicação seriam ainda maiores, caso ocorresse a invasão.

As infestações ocorrem muitas vezes através de frutas transportadas por passageiros transitando de avião, onde a fiscalização nos aeroportos é menor (SZYNISZEWSKA et al., 2016). Em 2013 a *C. capitata* era considerada erradicada dos EUA, mas estudo realizado em 2016 mostrou os riscos inerentes a esse trânsito aéreo. Os estados da Florida e Califórnia são os de maior risco para entrada de pragas através de voos que chegam da Colômbia, Brasil e Venezuela (SZYNISZEWSKA ET al., 2016). Esses dados revelam que existe uma demanda global para controle dessa espécie de mosca e o Brasil é polo de infestação e transmissão.

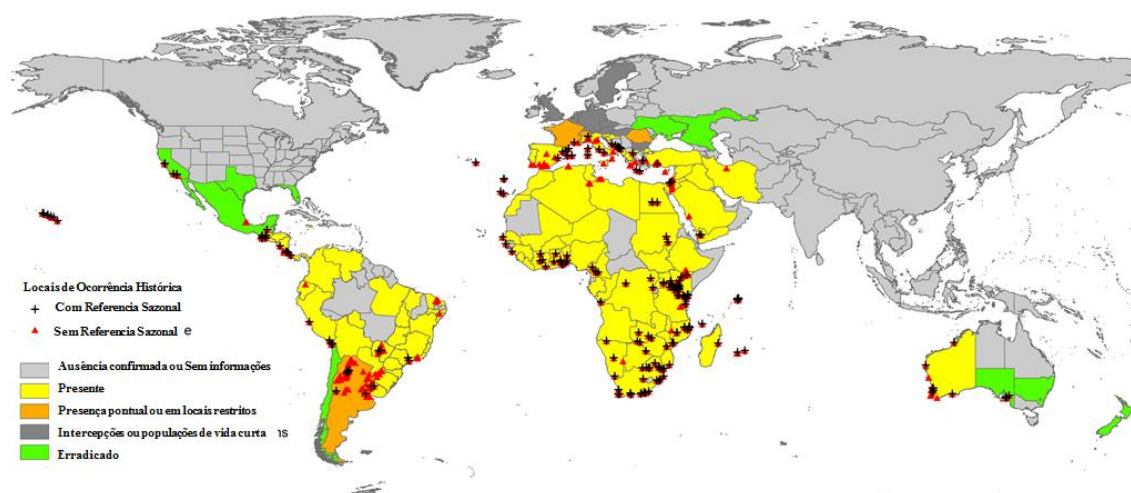


Figura 2. Avaliação global da distribuição sazonal de *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Fonte: Szyntyszewska e Tatem (2014).

No Brasil, a recomendação para controle de moscas das frutas é a aplicação de isca tóxica, que consiste em um alimento atrativo às moscas, tais como proteína

hidrolisada a 5% ou melaço a 7%, impregnado com inseticida. Essas iscas são colocadas em 25% da área plantada. Em casos de população elevada é recomendado pulverizações com inseticidas em todo pomar (BRASIL, 2018). Contudo, o número de inseticidas é restrito, não só pelo risco de contaminação da própria fruta, como do ser humano que manipula os produtos e do meio ambiente como um todo. Deve-se considerar, também, as exigências feitas pelos próprios consumidores, ao optarem por alimentos com menores quantidades de agrotóxicos. Somando-se a isto, existem barreiras impostas pelos países importadores quanto aos tipos de agrotóxicos utilizados e o limite máximo de resíduos destes.

A recomendação é que devem ser aplicadas técnicas de controle quando o índice MAD (mosca/armadilha/dia) for igual ou superior a 0,25. O monitoramento realizado com iscas determina o índice de infestação MAD. Para frutíferas a orientação é a utilização de uma armadilha Jackson/5 ha e uma McPhail/10 ha, na sombra, protegidas do sol e do vento. Para exportação, os pomares devem ser monitorados, no mínimo, por 6 meses e o MAD deve ser inferior a 1 na última semana antes da colheita. Esse controle pode ser cultural, com descarte correto de frutos contaminados ou controle químico, realizado com inseticidas adicionados à isca com atrativo alimentar ou pulverização desses pesticidas diretamente nas plantas (EMBRAPA, 2013).

Existem ainda formas de controle biológico, com parasitoides como, por exemplo, a vespa exótica *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidea), que parasita as larvas de *C. capitata* ou a técnica do inseto estéril, recomendada quando MAD for menor que 0,1, onde machos estéreis são liberados no meio ambiente e copulam com fêmeas selvagens, gerando ovos inviáveis, que não geram descendentes. Há também os tratamentos térmicos, com frio e calor, para inviabilizar possíveis ovos e larvas que estejam na polpa das frutas. Alternativa, mais recente, são os tratamentos com biopesticidas a base de plantas que apresentam atividade inseticida (EMBRAPA, 2013).

### **2.3 Óleo Essencial como Biopesticida**

Segundo a Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (2019) são “substancias de ocorrência natural (pesticidas bioquímicos), microrganismos que controlam pragas (pesticidas microbianos) e substancias pesticidas produzidas por plantas contendo material genético adicionado (protetores incorporados a plantas).” Com

o surgimento de novas leis para regulamentação de agrotóxicos e o aumento de resistência das pragas aos pesticidas sintéticos, surgiu a necessidade de desenvolvimento de novos produtos. Assim como na indústria farmacêutica, as pesquisas estão voltadas para utilização de substâncias encontradas na natureza, sejam organismos vivos ou parte destes ou produtos naturais (CHANDLER et al., 2011). Também definidos como “de ocorrência natural” os biopesticidas possibilitam a redução da utilização de agrotóxicos sintéticos que são na maioria das vezes mais danosos do que os naturais (CZAJA et al., 2014).

A procura por novos agrotóxicos e formulações que aumentem a eficácia e estabilidade dos compostos é um desafio constante no desenvolvimento de biopesticidas. Com isso, o uso de substâncias oriundas de produtos naturais como os óleos essenciais, que têm alta atividade contra micro-organismos, insetos e outras pragas da agricultura, tem sido alvo de pesquisa e desenvolvimento (EL-WAKEIL, 2013). Enquanto na maioria dos países houve uma retração na economia, o mercado de orgânicos continua apresentando crescimento médio de 12%. No Brasil o crescimento foi de 35% em 2015 e 30% em 2016 (ORGANICS BRASIL, 2017).

Segundo a 9ª edição da Farmacopeia Europeia, os OEs são definidos como: “Produto odorante, geralmente de composição complexa, obtido de uma matéria-prima vegetal botanicamente definida, seja por vapor d’água, seja por destilação seca ou por um método mecânico adequado, sem aquecimento. Um óleo essencial é geralmente separado da fase aquosa por um método físico que não leva à mudanças significativas em sua composição química”.

Os compostos minoritários parecem ter papel vital na atividade dos óleos essenciais, pois estudos conduzidos, comparando atividade dos óleos essenciais com misturas de seus componentes majoritários, os óleos tiveram maior atividade antibiótica (OLIVEIRA et al., 2014)

Uma análise das patentes de biopesticidas depositadas no período de 2000 a 2011 demonstra que o número dobrou, de 500 para mais de 1000 documentos por ano, e quem lidera o setor é a Monsanto Tech (RELECURA, 2013). Isso mostra a tendência que o mercado está seguindo, com grandes companhias de químicos investindo em biodefensivos. O mercado de biopesticida foi avaliado em 3,3 bilhões de dólares em 2017 e deve triplicar até 2025, chegando a 9,5 bilhões de dólares (BITCOIN, 2018). O Brasil tem se destacado na cena, liderando o mercado na América Latina, com receita de 103,5 milhões em 2017 (BITCOIN, 2018).



Nesse cenário, os óleos essenciais vêm se sobressaindo como compostos voláteis de plantas produzidos em resposta a insetos e fitopatógenos. Esses compostos já foram testados contra *C. capitata* com resultados positivos (Quadro 1). Os efeitos desses óleos são promissores tanto para quando ingeridos pelos insetos, inseridos na alimentação, quanto para aplicações por via tópica e seus efeitos são por contato.

Miguel et al. (2010), estudaram o efeito de dietas tratadas com 0.25% de óleo essencial de *Mentha pulegium* L., *Thymbra capitata* e *Thymus albicans* sobre adultos de *C. capitata* com 2-3 dias de vida. Verificaram após três dias, 100% de mortalidade com *M. pulegium*. Já nas primeiras horas foram observados sinais do efeito neurotóxico, com dificuldade de voar e perda de coordenação motora. Esses autores sugeriram que os componentes majoritários dos OE sejam os principais responsáveis pelos efeitos tóxicos: mentona e isomentona (14%), mentol (22%) e pulegona (27,3%). Porém, outros estudos com essas substâncias isoladas não encontraram a mesma eficácia, o que sugere efeito sinérgico e/ou antagônico de componentes presentes em menor quantidade (LEE et al., 2001; SAMPSON et al., 2005; MIRESMAILLI, BRADBURY e ISMAN, 2006).

Existe grande número de estudos para desenvolvimento de biopesticida para controle de insetos (PAVELA, 2015). Para controlar a traça do tomateiro, Campolo et al. (2017) utilizaram diferentes óleos essenciais de casca de citros como: Laranja Doce, Mandarin e Limão, nos quais o principal componente foi o limoneno; 88,7%, 59,2% e 52,8%, respectivamente. Eles foram testados contra larvas, demonstrando que OE de tangerina foi mais eficiente no controle de larvas de traça do tomateiro.

O óleo essencial de orégano (*Origanum compactum* Benth) cujos compostos majoritários do OE são carvacrol, timol,  $\gamma$ -terpineno e p-cimeno, foram aplicados como biopolímero tanto no tomateiro como no fruto para o controle do fungo *Rhizopus stolonifer*. Os resultados foram excelentes como proteção pós-colheita, reduzindo as perdas de peso durante o armazenamento (PERDONES et al., 2016).

Em outro estudo com óleo essencial de canela a 0,4% combinado com goma arábica a 10%, para prevenir a antracnose de banana e mamão causada por *Colletotrichum musae* e *Colletotrichum gloeosporioides* apresentou inibição do crescimento micelial de 73,4% e 70,0% e germinação de esporos de 88 % e 85%, respectivamente (MAQBOOL et al., 2011).

Quadro 1. Efeito de Óleos essenciais obtidos de diferentes espécies vegetais testados contra *Ceratitis capitata*(Wiedemann) (Diptera: Tephritidae).

Espécie	Compostos Majoritários	Concentração	Dias vida	Via de Aplicação	Mortes (%)	Tempo	Referencia
<i>Rosmarinus officinalis</i>	1,8-cineol (34.3%), a-pinene (11.9%); borneol (10.0%)	2.50%	10 a 12	Ingestão	100	96h	Benelliet al., 2012
		0.30 (mL/mosca)	10 a 12	Contato	100	24h	Benelliet al., 2012
		48.86 (mL/L ar)	10 a 12	Pulverização	100	24h	Benelliet al., 2012
<i>Lavandulaangustifolia</i>	linalol (36.5%), acetato de linalol (14.4%), canfora (8.5%) e 1,8-cineol (7.9%)	2.50%	10 a 12	Ingestão	100	96h	Benelliet al., 2012
		0.25 (mL/mosca)	10 a 12	Contato	100	24h	Benelliet al., 2012
		32.57 (mL/L ar)	10 a 12	Pulverização	100	24h	Benelliet al., 2012
<i>Hyptissuaveolens</i>	sabineno (34.0%), b-cariofileno (11.2%), terpinoleno (10.7%)	2.50%	10 a 12	Ingestão	100	96h	Benelliet al., 2012
		0.30 (mL/mosca)	10 a 12	Contato	100	24h	Benelliet al., 2012
		92.72 (mL/L ar)	10 a 12	Pulverização	100	24h	Benelliet al., 2012
<i>Thujaoccidentalis</i>	d-3-careno (33.2%), a-pineno (27.7%) e terpinoleno (5.7%),	2.50%	10 a 12	Ingestão	100	96h	Benelliet al., 2012
		0.30 (mL/mosca)	10 a 12	Contato	100	24h	Benelliet al., 2012
		92.72 (mL/L ar)	10 a 12	Pulverização	100	24h	Benelliet al., 2012
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	cinamaldeido (79.3%); eugenol (11.9%)	5%	Adulto	Ingestão	97	72h	Moretti et al., 1998
<i>Thymus herba barona</i>	carvacrol (44.6%) p-cimeno (6%).	5%	Adulto	Ingestão	92	72h	Moretti et al., 1998
<i>Thymuscapitatus</i>	carvacrol (68%)	1%	2 a 3	Ingestão	93	72h	Passinoet al., 1999
<i>ThymusherbaBorana</i>	carvacrol (44.5%)	1%	2 a 3	Ingestão	91	72h	Passino et al., 1999
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	cinamaldeido (79.3%)	1%	2 a 3	Ingestão	92	72h	Passinoet al., 1999

Fonte: Autora.

Para Priestley et al. (2003) existem quatro formas de ação dos OE: inibindo citocromos P450, ligação a receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), inibindo o sistema colinérgico (AChE) ou modulando o sistema octopaminérgico. Acredita-se que os compostos, como o timol, se ligam aos receptores GABA, através de um sítio não identificado. Esses receptores ligados aos canais de cloro da membrana dos neurônios pós-sinápticos interrompem o funcionamento da sinapse do GABA, resultado em sedação, anestesia e efeito ansiolítico (PRIESTLEY et al., 2003).

Estudo realizado por Shang et al. (2019) buscou avaliar o efeito acaricida de alguns compostos e o eugenol apresentou melhor desempenho, capaz de eliminar *Psoroptes cuniculi* Delafond (ácaro) dos coelhos, testado sem causar danos de citotoxicidade. Nesses ensaios foram testadas as atividades inibitórias da acetilcolinesterase (AChE), da glutatona-S-transferase (GST) e do citocromo P450 (P450). Como resultado, o eugenol foi capaz de inibir a atividade do P450, sendo este dose-dependente até 42,79%. A inibição da AChE foi moderada e GST se mostrou fracamente inibido. Assim, esse ensaio sugere que P450 e AChE são os responsáveis pelos efeitos tóxicos do eugenol no inseto.

A Inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi testada por López e Pascual-Villalobos (2010) através de um ensaio colorimétrico que ocorre a partir da reação química da enzima acetilcolinesterase, um substrato (iodeto de acetiltiocolina), o reagente de Ellman e diferentes monoterpênicos testados como inibidores. Os resultados mostraram que S-carvona, fenchona e linalol produziram a maior inibição enzimática, tendo, esses dois últimos, demonstrado uma inibição competitiva reversível, pelo menos no sítio ativo hidrofóbico da enzima. Porém, S-carvona, estragol e cânfora podem se ligar tanto à enzima livre, quanto ao complexo enzima-substrato, mas combinando-se a um local diferente do sítio ativo onde o substrato se liga. O fato de se ligar não quer dizer que esse seja o mecanismo de ação, até porque o efeito pode ser rapidamente revertido, mas sugere que é também uma forma de atuação.

O efeito de contato após pulverização do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel foi testado contra *Sitophilus zeamais* (gorgulho), e posterior verificação da inibição das enzimas glutatona S-transferase (GST), carboxilesterase (CarE), e a acetilcolinesterase (AChE). Foi feita uma análise comparativa através do sequenciamento do RNA de *S. zeamais* para identificar os genes que estavam sendo regulados. Os resultados mostraram que a maioria deles estava envolvida na

desintoxicação, e foram associados à respiração e metabolismo de xenobióticos, incluindo citocromo P450s, CarEs e GSTs (LIAO et al., 2016).

A modulação do sistema octopaminérgico específico dos invertebrados (Enan, 1998, 2001), um neurotransmissor, neuro-hormônio e neuromodulador, demonstra que os óleos essenciais são menos tóxicos para vertebrados em relação aos inseticidas químicos. Ao estudar as diferenças moleculares entre os receptores de octopamina ROAs em *Drosophila* e na barata americana em resposta a alguns óleos essenciais, Enan (2005) sugeriu que esses receptores são os mediadores das propriedades inseticidas dos compostos testados: álcool cinâmico, eugenol, trans-anetol e propionato de 2-feniletil e  $\alpha$ -terpineol contra a mosca *D. melanogaster*. O estudo destaca a importância da presença de um grupo eletronegativo, como o grupo hidroxila, para a atividade inseticida de óleos essenciais de plantas através do ROA.

## 2.4 Nanopesticidas

Para Kookana et al. (2014), “nanopesticidas” são qualquer tipo de formulação que “envolva partículas muito pequenas de um ingrediente ativo de pesticida ou outras pequenas estruturas de engenharia com propriedades pesticidas úteis”; a exemplo nanoemulsões e nanocápsulas. Os nanopesticidas surgem como alternativas viáveis para aumento da solubilidade, espalhabilidade e estabilidade de muitos compostos. São ainda uma forma de reduzir a quantidade de substâncias usadas e uma oportunidade para utilizar compostos químicos menos nocivos, que são pouco solúveis em água (KAH e HOFMANN 2014; IAVICOLI et al., 2017).

No preparo das emulsões, normalmente utiliza-se surfactantes não iônicos como, por exemplo, Tween<sup>®</sup> e Procetyl<sup>®</sup>, por conferir boa estabilidade, serem de baixo custo e em baixas doses não serem nocivos para saúde humana. Estudo realizado com nanoformulações de OE de *Lippia sidoides* e seu composto majoritário, o timol, utilizando Procetyl<sup>®</sup> como emulsificante, para controle de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), o gorgulho do milho, indicou que as nanoemulsões mantiveram estabilidade e atividade durante os sete meses do estudo (OLVEIRA et al., 2017). Verificou-se, ainda, que para o tratamento de grãos armazenados, as doses letais de nanoemulsões de OE de *L. sidoides* e timol necessárias para matar 50% das populações de *S. zeamais* variaram de 7,1 a 19,9  $\mu\text{g mg}^{-1}$  e de 17,1 a 25,7  $\mu\text{g mg}^{-1}$ , respectivamente.

Existe ainda a busca por emulsificantes de origem natural que além de cumprir o papel de formar nanopesticidas, são benéficos para os pomares como, por exemplo, a lecitina de soja, caseína, borato de sódio, quitosana e ciclodextrina (XUE, 2015). Dimaet al. (2014) avaliaram o efeito do OE de pimenta quando encapsulado com quitosana e perceberam que houve aumento da atividade antifúngica e antioxidante. Estudo realizado por Hosseinia et al. (2013) produziu uma nanoemulsão com OE utilizando quitosana e obteve tamanho de partícula de 40-80nm e com maior estabilidade térmica.

Sugumaret al. (2016) utilizaram o tamanho de partícula e estabilidade térmica para avaliar nanoemulsões de óleo essencial de laranja e Tween, produzidas com auxílio de ultrassom. O diâmetro na faixa de tamanho de 20 a 30 nm foi efetivo para conferir estabilidade à formulação. O estudo concluiu que esta é uma alternativa mais segura aos aditivos químicos para conservação de alimentos e bebidas. A caracterização de lipossomas preparados com óleo essencial *Melaleuca alternifolia* e Tween 80 foram realizadas usando Zetasizer para medir eficiência de retenção e liberação das nanopartículas. Os parâmetros avaliados foram tamanho da partícula (75 nm), índice de polidispersão (0.123) e potencial zeta (-7.45 mV). Ao verificar os efeitos dos lipossomas comparando com o óleo sem encapsular, observaram-se efeitos antimicrobianos superiores nos lipossomas (GE & GE, 2016).

## 2.5 Espécies aromáticas potenciais

O domínio fitogeográfico caatinga tem características climáticas únicas, extremos com longos períodos de seca e pouca chuva, o que levou ao desenvolvimento de uma flora rica e com grande diversidade de compostos bioativos. Esses compostos apresentam imenso potencial de exploração como antibióticos, antifúngicos, inseticidas e analgésicos, dentre outros. Brandão et al. (2017) desenvolveram uma metodologia e identificaram gêneros e espécies de Hyptidinae como fontes alternativas de podofilotoxina, composto usado para sínteses de etoposide, teniposide e etopophos, medicamentos usados no tratamento do câncer. Outro estudo mostrou os efeitos neuroprotetores e a estimulação da produção de neurônios dos flavonoides agatisflavona derivados de *Poincianellapyramidalis* (Tul.) (SOUZA et al., 2018). Trabalhos realizados com espécies da família Verbenaceae mostram como esta tem grande potencial como fonte de compostos bioativos. O óleo essencial de *Lippia origanoides*

H.B.K. teve atividade antidiarreica comprovada e óleo essencial de *Lippia thymoides* Mart. & Schauer sua atividade espasmolíticas (MENEZES et al., 2018a; MENEZES et al., 2018b).

A Família Verbenacea apresenta importantes espécies com múltiplos usos, ornamentais, a exemplo de espécies pertencentes aos gêneros *Duanta*, *Lantana*, *Petrea* e *Stachytarpheta*; culinária, como as do gênero *Aloysia*; e medicinais, como as espécies do gênero *Citharexylum* *Lippia* (MELO et al. 2010). Segundo Salimena e Múlgura (2015), a família é composta por 480 espécies com 32 gêneros, sendo que no Brasil são 16 gêneros e 281 espécies (FLORA DO BRASIL, 2018). O gênero *Lippia* é um dos maiores dessa família, com a maior parte das espécies encontradas no Brasil (O'LEARY et al. 2012). Na região semiárida do Nordeste brasileiro, há grande distribuição de Verbenacea e algumas espécies aromáticas com compostos ativos têm sido estudadas, dentre elas, *L. insignis* e *L. lasiocalycina*, popularmente conhecidas como alecrim, alecrim do mato, alecrim do campo, alecrim de tabuleiro e cidreira.

*L. lasiocalycina* Cham. (Figura 3) é uma espécie nativa, não endêmica, sendo registrada também na Bolívia, tendo como domínios fitogeográficos a Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. No Brasil ocorre nos estados da Bahia, Minas Gerais, Mato Grosso, Paraná e São Paulo (SALIMENA, MULGURA, 2015). É descrita botanicamente como arbusto com até 2 m de altura, ramos eretos e aromáticos. Folhas opostas, pecíolo com cerca de 1,6 cm de comprimento, piloso, lâmina com cerca de 5×3,5 cm, membranácea, ovada, base truncada, ápice atenuado, margem crenada, venação craspedródoma, face adaxial pilosa e abaxial pubescente. Inflorescências axilares, racemosas, brácteas com cerca de 0,5 cm de comprimento, lanceoladas, verde-claras; corola labiada, lilás (OLIVEIRA et al., 2014). O extrato etanólico de folhas e caule de *L. lasiocalycina* apresentou fenilpropanoides e verbacosídeos, sendo ausentes flavonoides na amostra analisada (FUNARI et al., 2012).



Figura 3. *Lippia lasiocalycina* Cham. A - cultivada; B – Folhas; C - Botões florais; D – Inflorescências; E – Flor; F - Disposição das folhas e inflorescências nos ramos. Feira de Santana-BA, Horto Florestal-UEFS, 2015. Fonte: Bispo, 2015.

*L. insignis* Moldenke (Figura 4) é uma espécie nativa e endêmica do Brasil, com distribuição geográfica na região Nordeste, no Estado da Bahia, ocorrendo nos domínios fitogeográficos caatinga e cerrado (SALIMENA et al., 2010). É um arbusto com até 2 metros de altura, pouco ramificado, aromático; folhas opostas, pecíolo com cerca de 1,5 cm de comprimento, piloso, lâmina com cerca de 3,5×3 cm, coriácea, ovada a deltóide, verde-escuras adaxialmente, base truncada, ápice arredondado, margem crenada, venação craspedródoma, face adaxial incana e abaxial pilosa. Inflorescências axilares, racemosas, brácteas com cerca de 0,6 cm de comprimento, ovadas, verdes; pedicelo



com cerca de 3 cm, corola labiada, lilás a magenta (SALIMENA et al., 2009; OLIVEIRA, 2014; MOLDENKE, 1965).



Figura 4. *Lippia insignis* Moldenke A - cultivada; B – Folhas; C - Botões florais; D – Inflorescência; E – Flor; F - Disposição das folhas e inflorescências nos ramos. Feira de Santana-BA, Horto Florestal-UEFS, 2015. Fonte: Bispo, 2015.

Funariet al. (2012a) avaliaram o perfil cromatográfico de diferentes espécies de *Lippia*, incluindo *L. lasiocalycina* e destacaram que essa espécie difere das *L. salviaefolia*, *L. balansae*, *L. velutina* e *L. sidoides* quanto à composição química. Ao avaliar a atividade antifúngica do extrato etanólico das partes aéreas de *L. lasiocalycina*, contra patógenos oportunistas *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. neoformans*, Funariet al. (2012b) não observaram inibição do crescimento fúngico.



Bispo et al. (2016) avaliaram o teor de óleo essencial de três espécies de *Lippia* nativas do semiárido sob cultivo e verificaram para *L. insignis* (2,27-2,85%) e *L. lasiocalycina* (1,00 -1,35%). Para *L. insignis* os compostos majoritários foram: E-ocimenona (23,15-27,25%), limoneno (12,17-15,40%),  $\beta$ -mirceno (12,39-13,45%), todos monoterpênicos. Para a espécie *L. lasiocalycina* foram: E-ocimenona (22,82-29,43%) e  $\beta$ -mirceno (27,36-31,36%), também monoterpênicos. Em estudos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa em plantas medicinais e aromáticas do semiárido, sediada na Universidade Estadual de Feira de Santana, tem se verificado que os OE de *L. insignis* e *L. lasiocalycina* são efetivos contra adultos, larvas e pupas de *C. capitata* (Tese em desenvolvimento da discente Luma Bispo - (PPGRGV), resultados ainda não publicados).

## 2.6 Referências

- ABRAFRUTAS, 2018. **Cenário Hortifruti Brasil 2018**. <http://abrafrutas.org/>
- ALVA, O. et al. 2015. Pollen morphology and boron concentration in floral tissues as factors triggering natural and GA-induced parthenocarpic fruit development in grapevine. **PLoS ONE**.10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139503>
- BENELLI, G., et al. 2012. Toxicity of some essential oil formulations against the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae). **Crop Protection** 42 223e229. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.05.024>
- BITCOIN, Mercado de biopesticidas para observar o desenvolvimento forte em 2025. **Bitcoin**. 2018. Disponível em: <<http://bitcoinpor.top/mercado-de-biopesticidas-para-observar-o/>> .Acesso em: 25 de novembro de 2018.
- BISPO et al. 2016. Effect of indolebutyric acid and cutting type on vegetative propagation of three *Lippia* species. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.46, n.8, p.1364-1367.
- BRANDÃO, H.N. 2917. Determination of podophyllotoxin and related aryltetralinlignans by HPLC/DAD/MS from Lamiaceae species. **Microchemical Journal**. V.130, p.179-184. doi:<https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.09.002>
- BRASIL. 2018. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano Nacional de Desenvolvimento da Fruticultura – PNDF**.
- CAMPOLO, O., et al. 2017. Citrus peel essential oil nanoformulations to control the tomato borer, *Tuta absoluta*: chemical properties and biological activity. **Scientific Reports**.7, 13036.10.1038/s41598-017-13413-0
- CARVALHO, C., et al. 2017. **Anuário brasileiro da fruticultura 2017**. Santa Cruz do Sul : Editora Gazeta Santa Cruz. 88 p.
- CHANDLER, D. et al. 2011. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. **Philosophical Transactions of The Royal Society B**. 366, 1987–1998. doi:10.1098/rstb.2010.0390
- CZAJA, et al., 2015. Biopesticides – towards increased consumer safety in the European Union. **Pest Management Science**.2015; 71: 3–6. doi:10.1002/ps.3829
- DIMA, C. et al. 2014. Microencapsulation of essential oil of pimento [*Pimentadivioica* (L) Merr.] by chitosan/k-carrageenan complex coacervation method. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** 22, 203–211. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.12.020>
- EKBIC, H.B.; GOKDEMIR, N.; ERDEM, H. 2018. Effects of boron on yield, quality and leaf nutrients of isabella (*Vitis labrusca* L.) grape cultivar. **Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus**. 17(1), 149-157. 10.24326/aspbc.2018.1.14

- EL-WAKEIL, N. E. 2013. Botanical Pesticides and Their Mode of Action. **Gesunde Pflanzen** 65, 125–149. DOI 10.1007/s10343-013-0308-3
- EMBRAPA. 2013. **Instruções Técnicas da Embrapa Semiárido**. ISSN 1809-0001. 111. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/97895/1/INT111.pdf>
- EMBRAPA. 2019. Tecnologia viabiliza exportação da manga brasileira para a África do Sul. <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/40944466/tecnologia-viabiliza-exportacao-da-manga-brasileira-para-a-africa-do-sul>
- ENAN, E.E. 1998. Insecticidal action of terpenes and phenols to the cockroaches: effect on octopamine receptors. **International Symposium on Crop Protection**, Belgium, May 5–10, 1998.
- ENAN, E.E. 2001. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**.130:325–337.
- ENAN, E.E. 2005. Molecular and Pharmacological Analysis of an Octopamine Receptor From American Cockroach and Fruit Fly in Response to Plant Essential Oils. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 59:161–171.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 2019. **Biopesticides**. Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>
- FLORA DO BRASIL. *Verbenaceae* in Flora do Brasil 2020 under construction. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Available at: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB246>>. Accessed on: 30 Nov. 2018
- FUNARI et al. (a) High resolution ultra high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian *Lippia* species. **Journal of Chromatography A**, 1259, p.167– 178. 2012.
- FUNARI et al.(b) Chemical and antifungal investigations of six *Lippia* species (Verbenaceae) from Brazil. **Food Chemistry**, 35, p.2086–2094. 2012.
- GE, Y.; GE, M. 2016. Distribution of *Melaleuca alternifolia* essential oil in liposomes with Tween 80 addition and enhancement of in vitro antimicrobial effect. **Journal of Experimental Nanoscience**. 11:5, 345-358, doi: 10.1080/17458080.2015.1065013
- HERNANDES, J.L.; BLAIN, G.; JUNIOR, M.J.P. 2013. Controle de moscas-das-frutas (diptera: tephritidae) em cultivo orgânico de ameixa pelo ensacamento dos frutos com diferentes materiais. **Revista Brasileira de Fruticultura**35(4):1209-1213. doi: 10.1590/S0100-29452013000400032
- HOSSEINIA, S.F. et al. (2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. **Carbohydrate Polymers** 95 50– 56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.031>
- IAVICOLLI, I.; LESO, V.; BEEZHOLD, D.H.; SHVEDOVA, A.A. 2017. Nanotechnology in agriculture: Opportunities, toxicological implications, and

occupational risks. **Toxicology and Applied Pharmacology**. S0041-008X(17)30231-4. doi: 10.1016/j.taap.2017.05.025

IBRAF.2015. **O Sistema Agroalimentar de Frutas e Derivados. Anuário Brasileiro da Fruticultura 2015**. Editora Gazeta.

IBGE 2017. **Censo Agropecuário 2017**. <https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/>

KAH, M.; HOFMANN, T. 2014 Nanopesticide research: Current trends and future priorities. **Environment International**. 63, 224–235. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.11.015>

KOOKANA, R.S. et al. 2014. Nanopesticides: Guiding Principles for Regulatory Evaluation of Environmental Risks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 62, 19, 4227–4240. doi: 10.1021/jf500232f

KÖSE, C., GÜNEŞ, A., KAYA, Ö. et al. 2018. Freeze Injure and Antioxidant Enzyme Activity of Grapevine (*Vitis Vinifera*) Under Bio-Boron Fertilizer Applications. **Erwerbs-Obstbau**.1-8. <https://doi.org/10.1007/s10341-018-0370-1>

LEE, S.E., et al.2001. Fumigant toxicity of volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). **Pest Management Science**, 57: 548-553.

LIAO, M., et al. 2016. Insecticidal Activity of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil and RNA-Seq Analysis of *Sitophilus zeamais* Transcriptome in Response to Oil Fumigation. **PLoS ONE** 11(12): e0167748. doi:10.1371/journal.pone.0167748

LÓPEZ, M.D., PASCUAL-VILLALOBOS, M.J. 2010. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. **Industrial Crops and Products**. 31, 2, 284-288. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.11.005>

MAQBOOL, M., et al. 2011. Postharvest application of gum arabic and essential oils for controlling anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage. **Postharvest Biology and Technology** 62, 71–76.

MORETTI, M.D.L., BAZZONI, E., PASSINO, G., PROTA, R. (1998): Antifeedant Effects of Some Essential Oils on *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera, Tephritidae), **Journal of Essential Oil Research**, 10:4, 405-412. doi:<http://dx.doi.org/10.1080/10412905.1998.9700930>

MELO, J. I. et al. Verbenaceae *sensu lato* em um trecho da ESEC Raso da Catarina, Bahia, Brasil. **Revista Caatinga**. v. 23, p. 41-47. 2010.

MENEZES, P.M.N. 2018a. Spasmolytic and antidiarrheal activities of *Lippia thymoides* (Verbenaceae) essential oil. **Natural Product Research**. 1.3. 1478-6419. doi: 10.1080/14786419.2018.1457665

MENEZES, P.M.N. 2018b. Relaxant effect of *Lippia origanoides* essential oil in guinea-pig trachea smooth muscle involves potassium channels and soluble guanylyl cyclase. **Journal of Ethnopharmacology**. V.220, P. 16-25. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.03.040>

- MIGUEL et al. 2010. Toxic Effects of Three Essential Oils on *Ceratitis capitata*. **Journal of essential oil-bearing plants JEOP** 13(2):191-199. doi: 10.1080/0972060X.2010.10643811
- MIRESMAILLI, S., BRADBURY, R. and ISMAN, M.B. 2006. Comparative toxicity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and blends of its major constituents against *Tetrany chusurticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on two different host plants. **Pest Management Science**, 62: 366-371.
- MOLDENKE, H.N. Materials towards a monograph of the genus *Lippia* 5. **Phytologia**, v. 12, p. 252-312, 1965.
- OLIVEIRA, A.D.L., RODRIGUE, F.F.G., COUTINHO, H.D.M., COSTA, J.G.M., MENEZES, I.R.A. 2014. Chemical Composition, Modulatory Bacterial Resistance and Antimicrobial Activity of Essential Oil the *Hyptis martiusii* Benth by Direct and Gaseous Contact. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**. 9(3), e13521.
- OLIVEIRA, A.P. et al. 2017. Nanoformulation prototype of the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol to population management of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Industrial Crops & Products**. 107, 198–205. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.046>
- OLIVEIRA, A.R.M.F. et al. Agronomic and Morphological characterization of *Lippia* (Verbenaceae) species native from Brazilian semiarid region. **Brazilian Journal of Agriculture**. v.92, n.2, p. 147 -160, 2017
- OLIVEIRA, A.R.M.F.; OLIVEIRA, L. M. ; CARNEIRO, J. S. ; SILVA, T. R. S. ; COSTA, L. C. B. . Leaf Anatomy And Essential Oil Production Of *Lippia* Native Species. **Brazilian Journal of Agriculture**. v. 93, p. 324-335, 2018.
- ORGANICS BRASIL. 2017. **Brazilian Organic Market Trends And News Biofach 2017**. Organics Brasil.
- O'LEARY, N. et al . Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Londres, v. 170, p. 197–219, 2012.
- PASSINO, G.S. et al. 1999. Effects of essential oil formulations on *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae) adult flies. **Journal of applied entomology**. 123, 145-149.
- PAVELA, R. 2015. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. **Industrial Crops and Products** 76, 174–187.
- PERDONES, A., TUR, N., CHIRALT, A., VARGAS, M. 2016. Effect on tomato plant and fruit of the application of biopolymer–oregano essential oil coatings. **Journal of Science of Food and Agriculture**. 96, 4505–4513.
- PRIESTLEY, C. M., et al. 2003. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA(A) receptors and a homo-oligomeric

GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. **British journal of pharmacology**, 140(8), 1363-72.

RELECURA. Biopesticide Landscape Analysis. **Indus Techinnovations**.2013.

SALIMENA, F. R. G.; FRANÇA, F.; SILVA, T. R. S. **Verbenaceae**. In: GIULIETTI, A. M.; et al (Org.). Plantas Raras do Brasil. 1. ed. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2009. p. 399- 401.

SALIMENA, F. R. G. Uma nova espécie de *Lippia* L. (Verbenaceae) do cerrado brasileiro. **Acta Botânica Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 232-234, 2010.

SALIMENA, F.R.G.; MÚLGURA, M.E. Notas taxonômicas em Verbenaceae do Brasil. **Rodriguésia** 66(1): 191-197. 2015.

SAMPSON, B.J., et al. 2005. Insecticidal activity of 23 essential oils and their major compounds against adult *Lipaphis pseudobrassicae*(Davis)(Aphididae: Homoptera). **Pest Management Science**, 61: 1122-1128.

SHANG, X.F., et al. 2019.Acaricidal activity and enzyme inhibitory activity of active compounds of essential oils against *Psoroptesuniculi*. **Veterinary Parasitology**. 267, 54-59. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.01.013>

SOUZA. S.C. 2018. Agathisflavone, a flavonoid derived from *Poincianella pyramidalis* (Tul.), enhances neuronal population and protects against glutamate excitotoxicity. **NeuroToxicology**. V.65, P. 85-97. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.02.001>

SUGUMAR, S.; SINGH, S.; MUKHERJEE, M.; CHANDRASEKARAN, N. 2016. Nanoemulsion of orange oil with non ionic surfactant produced emulsion using ultrasonication technique: evaluating against food spoilage yeast. **Applied Nanoscience**. 6:113–120. doi: 10.1007/s13204-015-0412-z

SZYNISZEWSKA, A.M., TATEM, A.J. 2014 Global Assessment of Seasonal Potential Distribution of Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **PLoS ONE** 9(11): e111582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111582>

SZYNISZEWSKA et al. 2016. Analysis of seasonal risk for importation of the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), via air passenger traffic arriving in Florida and California. **Journal of Economic Entomology**. 2016;109:2317–2328. doi: 10.1093/jee/tow196.

THOMAS et al. 2010. *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Insecta: Diptera: Tephritidae) **DPI EntomologyCirculars**. 4, 230 and 273.[http://entnemdept.ufl.edu/creatures/fruit/mediterranean\\_fruit\\_fly.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/fruit/mediterranean_fruit_fly.htm)

XUE, J. 2015. **Essential Oil Nanoemulsions Prepared with Natural Emulsifiers for Improved Food Safety**. PhD dissertation. University of Tennessee.

## CAPÍTULO I

### APERFEIÇOAMENTO DA HIDRODESTILAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia lasiocalycina* Cham. E *Lippia insignis* Moldenke

SANTANA, T.M.M.<sup>1</sup>; OLIVEIRA, L. M.<sup>1</sup>; LUCCHESI, A. M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Feira de Santana; Feira de Santana, Bahia.

#### RESUMO

Óleos essenciais estão ganhando o mercado de produtos naturais e novas técnicas de extração têm sido estudadas. Contudo, a hidrodestilação ainda é o método mais utilizado pela indústria e ao otimizar os parâmetros de extração pode-se obter rendimentos semelhantes aos conseguidos com técnicas modernas. A partir de um planejamento fatorial, este estudo buscou a determinação das variáveis que mais influenciam no rendimento de óleo essencial de *Lippia insignis* e *Lippia lasiocalycina*. Além do rendimento, a composição química também foi identificada através de Cromatografia gasosa acoplada a Espectro de Massas e as porcentagens dos compostos identificados nos óleos extraídos por diferentes fatores foram comparados. *Lippia insignis* apresentou rendimento médio de  $2.33\% \pm 0.30$  e *L. lasiocalycina*  $1.00\% \pm 0.12$ . Não houve diferença significativa no rendimento com as diferentes proporções biomassa (g) /volume de água (mL), e o tempo de 120 minutos foi suficiente para proporcionar maior rendimento. Os principais componentes encontrados na amostra de *Lippia insignis* foram o g-terpineno ( $14.03 \pm 2.24\%$ ) e timol ( $38.50 \pm 8.80$ ) e em *Lippia lasiocalycina*  $\beta$ -mirceno ( $23.66 \pm 2.04\%$ ) e E-ocimenona ( $34.03 \pm 3.663\%$ ). Considerando-se o potencial desses óleos para uso como biopesticida contra mosca das frutas, ressalta-se que maiores concentrações de g-terpineno e timol devem levar a maior atividade inseticida, considerando estudos prévios com esses compostos isolados.

**Palavra-chave:** biopesticidas, Compostos voláteis, hidrodestilação, otimização.

### ABSTRACT

Essential oils are gaining the market of natural products and new extraction techniques have been studied. However, hydrodistillation is still the most widely used method by the industries and by optimizing the extraction parameters, similar results to those acquired by modern techniques can be obtained. This study is a method of searching for variables that influence the essential results of *Lippia insignis* and *Lippia lasiocalycina*, using a factorial design. In addition to the yield, the composition of essential oil was also identified through Gas Chromatography coupled to Mass Spectrum. The percentage of compounds extracted using different factors were compared. The *Lippia insignis* had a mean yield of  $2.33\% \pm 0.30$  and *L. lasiocalycina*  $1.00\% \pm 0.12$ . No yield was achieved with increasing biomass (g) / volume of water (mL) ratios, and the time of 120 minutes was sufficient to increase yield. The major compounds found in the *Lippia insignis* sample were  $\gamma$ -terpinene ( $14.03 \pm 2.24\%$ ) and thymol ( $38.50 \pm 8.80$ ) and *Lippia lasiocalycina*  $\beta$ -myrcene ( $23.66 \pm 2.04\%$ ) and E-ocimene ( $34.03 \pm 3.663\%$ ). Considering the potential of these oils for use as a biopesticide against fruit fly, it is important to emphasize that higher concentrations of  $\gamma$ -terpinene and thymol should lead to higher insecticidal activity, considering previous studies with these isolated compounds.

**Keywords:** biopesticides, volatile compounds, hydrodistillation, optimization.



### 3 **CAPITULO I - APERFEIÇOAMENTO DA HIDRODESTILAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia lasiocalycina* CHAM. E *Lippia insignis* MOLDENKE**

#### 3.1 **Introdução**

A escolha do método de extração é um fator crucial para a qualidade do óleo essencial (OE) devido à instabilidade desses compostos, altamente voláteis, termolábeis, fotossensíveis e que ainda podem sofrer oxidação. O método de extração pode alterar principalmente o rendimento e composição do OE, que para a maioria das plantas equivale a menos de 5% da massa seca (WENQIANG et al., 2007; PIRAS et al., 2012;). Em estudo realizado com extração de óleo essencial de sementes de cominho foi observado que as moléculas com maior ponto de ebulição e mais solúveis em água, destilam primeiro do que aquelas com maior ponto de ebulição e menos solúveis, como carvona (PE 231°C; Solubilidade 1,6 g/L) e limoneno (PE 175°C; Solubilidade 0,00042 g/L) (ASSAMI et al., 2012).

A Organização Internacional de Normalização (ISO) no seu Vocabulário de Materiais Naturais ISO 9235:1992, define um óleo essencial como “Produto feito por destilação com água ou vapor ou por processamento mecânico de cascas de citrinos ou por destilação a seco de materiais frescos”. Já a Farmacopeia Europeia (2013) define como “Produto odorante, geralmente de uma composição complexa, obtido a partir de uma matéria-prima vegetal, seja pela condução por vapor de água, seja por destilação a seco, seja por um método mecânico sem aquecimento. Um óleo essencial geralmente pode ser separado da fase aquosa por um método físico que não leva a mudanças significativas em sua composição química”. Porém, alguns autores discutem que para ser considerado OE a extração deve ser por destilação, sendo os produtos obtidos por outros métodos, como expressão e solvente orgânico, considerados essências ou absolutos.

Existem três princípios de extração de OE do interior das células: a expressão que consiste em extração por extrusão, ou seja, romper mecanicamente a parede celular do vacúolo que contém óleo essencial, fazendo com que este seja liberado; a destilação, na qual o calor provocado pelo contato do material com a água fervente ou vapor d'água leva a ruptura dos vacúolos e liberação dos compostos aromáticos e o vapor infundido com o óleo essencial é condensado e coletado; a extração por solvente, normalmente utilizado para materiais que não suportam temperaturas elevadas como flores e botões,

em que o material é submerso em solvente de baixa polaridade e ao romper a parede celular por diferença osmótica, os compostos aromáticos são liberados no solvente (CHEMANT, VIAN e CRAVOTTO, 2012; EL ASBAHANI et al., 2015).

Os métodos de extração de óleo essencial podem ser categorizados ainda em convencional - destilação a vapor e hidrodestilação; e moderno, como micro-ondas e fluido supercrítico (EL ASBAHANI et al., 2015).

Na hidrodestilação a planta é colocada em contato direto com água destilada e, em seguida, submetida ao aquecimento. O calor rompe as células liberando o óleo e quando a água evapora, essas substâncias aromáticas são carregadas e condensadas. Após o término da extração, entre 60-180 minutos, as fases oleosa e aquosa são separadas fisicamente.

Estudos mostram que o tempo de extração tem influência sobre o rendimento e a composição do óleo. O óleo essencial de endro (*Anethum graveolens*) após extração por 2 minutos demonstrou atividade contra *Leishmania donovani* (Laveran&Mesnil), inibindo 99.2% das promastigotas, enquanto a extração após 195 min apresentou inibição de 16.1% (SINTIM et al., 2015). Isso porque os compostos que primeiro volatilizam têm maior concentração de D-limoneno e capacidade antioxidante. Esse mesmo estudo mostrou que após 75 min, 0.98 g (equivalente a 86% do rendimento total (1.310 g)) já havia sido extraído, sugerindo que a extração poderia ter sido interrompida antes dos 180 minutos, com alta eficiência.

Para Busato et al. (2014) os três elementos que controlam a hidrodestilação e o arraste a vapor são: 1) a rápida vaporização do óleo da camada formada na superfície da planta com o vapor; 2) a passagem de óleo na corrente de vapor circundante; e 3) a destilação do óleo, desde os tricomas glandulares, até a película superficial do material vegetal. Segundo Teixeira et al (2016) para extração de óleo essencial de pinho (*Pinus taeda*), um subproduto da produção de papel e madeira de pinheiros, o tamanho da partícula e o tempo de secagem não influenciam no rendimento de extração. Já a quantidade de biomassa (proporção amostra-água) e tempo de extração tem efeito positivo sobre a quantidade de óleo extraída.

Pelo exposto verifica-se que aperfeiçoar as condições de técnicas simples, como a hidrodestilação, pode melhorar o rendimento e a composição dos óleos essenciais. Assim, o objetivo desse trabalho foi verificar os efeitos dos parâmetros relação biomassa/água e tempo na extração do óleo essencial das espécies, visando maior rendimento, menor energia e melhor qualidade dos OEs.

## 3.2 Materiais e Métodos

### 3.2.1 Material vegetal

Partes aéreas de *L. insignis* Moldenke (HUEFS 2432189, SISGEN Cadastro nº A1C1DEB) e *L. lasiocalycina* Cham. (HUEFS 240988, SISGEN Cadastro nº A1C1DEB) foram coletadas durante a manhã, em Janeiro de 2019, em plantas floridas e mantidas sob cultivo no Horto Florestal (12°16'10.3"S 38°56'18.8"W) (Figura 6A), na cidade de Feira de Santana, a 234 metros acima do nível do mar, com temperatura média anual de 24 ° C e uma taxa de precipitação média de 848mm por ano.



Figura 5. Preparo do material vegetal. A. Coleta de *Lippia insignis* Moldenke. B. seleção do material. C. Secagem. D. Hidrodestilação. E. Detalhe da extração do OE de *Lippia insignis* Moldenke. F. Cromatógrafo a gás Shimadzu acoplado a detector de Massas.

O material foi selecionado, excluindo as folhas secas ou aquelas que pareciam estar doentes ou atacadas por pragas (Figura 6B). As plantas foram secas à temperatura ambiente até peso constante (Figura 6C).

Na extração dos óleos, 100 g de folhas secas de cada espécie foram trituradas em liquidificador com água destilada e, em seguida, adicionadas em balão de vidro contendo água destilada em volume suficiente para cobertura total do material vegetal. O método de extração foi por hidrodestilação, utilizando-se o aparelho de Clevenger, acoplado a balões de vidro (Figura 6D), que foram aquecidos por mantas térmicas elétricas com termostato. A extração foi conduzida durante 3 horas, contadas a partir da condensação da primeira gota. Após a extração foi separado óleo da água (Figura 6E) adicionado ao óleo o sulfato de sódio anidro para eliminação da água residual. Posteriormente, com o uso da pipeta do tipo Pasteur, o óleo foi coletado e acondicionado em frascos de vidros, etiquetados e armazenados em congelador comercial a -23 °C até a realização da análise química (BISPO et al., 2016).

### 3.2.2 Aperfeiçoamento do método de extração

A partir do método de extração padrão (3h) procedeu-se a otimização dos parâmetros de extração, avaliando-se o tempo de extração (60; 120e 180 min) e a relação solvente / amostra (peso/peso) (10:1, 20:1), fixando-se a quantidade de material em 100g por análise (Tabela 1). Como resposta foi avaliado o rendimento em porcentagem de extração de óleo (p / p). O rendimento foi determinado usando a seguinte equação:

$$Y = 100 X \frac{m}{M} \quad (1)$$

Em que:

Y            percentual de óleo extraído;

m            massa do óleo.

M            Massa da folha seca.

Tabela 1. Variáveis avaliadas para otimização do rendimento de extração de óleo essencial de *Lippia insignis* Moldenke e *Lippia lasiocalycina* Cham., Feira de Santana, 2019.

Fator	Nível		
	1	2	3
A: Razão Volume de Água: amostra (mL:g)	10:1	20:1	
C: Tempo de extração (min)	60	120	180

### 3.2.3 Análise da composição dos OE

Para análise da composição química dos óleos essenciais utilizou-se a cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massas (CG/EM). Amostras dos OE (0.02 g) foram previamente diluídos em 1 ml de diclorometano. As análises foram realizadas em Cromatógrafo Shimadzu® GC-2010 acoplado ao Espectrômetro de Massa Shimadzu® CG / MS-QP 2010, coluna capilar DB-5ms (30 m x 0,25 mm), micrômetros com espessura de 0,25  $\mu\text{m}$ , temperatura do injetor de 220 ° C, gás carreador de hélio (1 mL.min<sup>-1</sup>), temperatura da interface e fonte de ionização 240 ° C, energia de ionização 70 eV, corrente de ionização 0,7 kV, com o programa de temperatura do forno 60–240°C a 3 °C min<sup>-1</sup> mantido a 240°C por 20 min, corrida total de 60 minutos. 1 $\mu\text{L}$  das amostras foram injetadas automaticamente, uma razão de divisão da amostra de 1: 100.

A identificação dos compostos foi realizada comparando-se os índices analíticos (AI) com a literatura (ADAMS, 2007) e com os dados espectrais de massa de padrões autênticos, bem como comparando os mesmos dados com uma biblioteca espectral (NIST 11). Os resultados finais foram expressos em porcentagem relativa de cada composto, calculada pela normalização de cada área de pico cromatográfico.

O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso, com três repetições no esquema fatorial duplo (duas proporções água:biomassa x três tempos de extração).

Os dados de rendimento foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knot ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram feitas no software R.

### 3.3 Resultados e Discussão

As análises dos resultados demonstraram que não houve interação entre os fatores proporção solvente (mL): biomassa (g) e tempo de extração (h) para *L. insignis* (Figura 6), mas houve para *L. lasiocalycina* (Figura 7). Para esta espécie nota-se que, as extrações com duas horas e proporção 10:1 resultaram em maior rendimento de óleo essencial (1.13  $\pm$  0.02) do que 20:1 (0.96  $\pm$  0.06). No entanto, para as extrações com três horas, a proporção 20:1 apresentou maior rendimento (1.11  $\pm$  0.03) do que 10:1 (1.09  $\pm$  0.03), porém essa diferença não foi significativa.

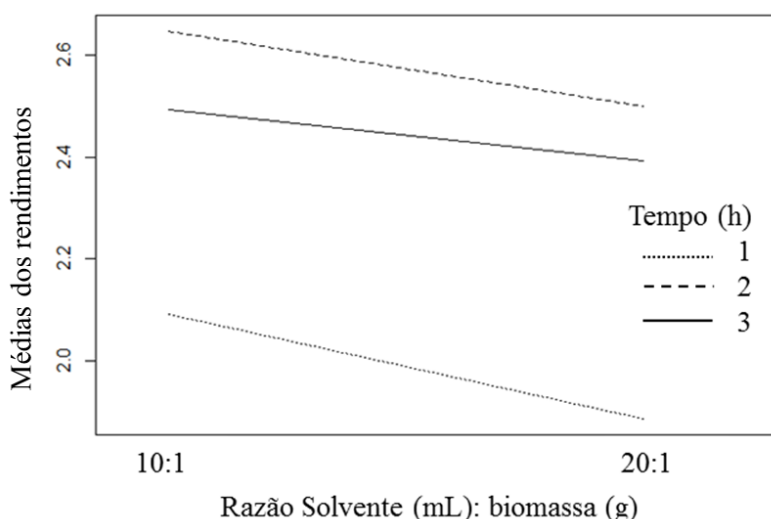


Figura 6. InteractionPlot mostrando que não houve interação entre os tratamentos razão solvente (ml): biomassa de folhas (g) e tempo na hidrodestilação do óleo essencial de *Lippia insignis* Moldenke. Feira de Santana-BA, 2019.

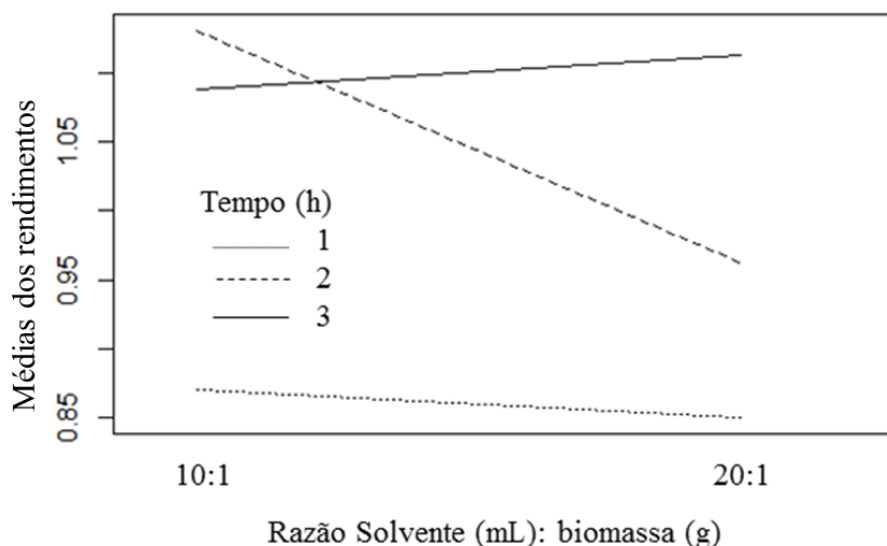


Figura 7. InteractionPlot mostrando que houve interação entre os tratamentos razão solvente (ml): biomassa de folhas (g) e tempo na hidrodestilação do óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* Cham. Feira de Santana-BA, 2019.

Os resultados da extração de OE de *L. insignis* mostraram um rendimento médio de  $2.33\% \pm 0.30$  (Tabela 2) e para *L. lasiocalycina* média de rendimento de  $1.00\% \pm 0.12$  (Tabela 3).

Para as duas espécies, as extrações com 1h possibilitaram rendimento significativamente menor em relação aos tempos de 2 e 3h de destilação, não havendo diferenças significantes entre esses últimos. Em relação à razão entre quantidade de solvente (água destilada) e biomassa, a análise dos dados aponta que pode-se utilizar a proporção 10:1 (solvente: biomassa), considerando que não houve diferenças

significativas entre os resultados obtidos, também para as duas espécies (Tabela 2 e Tabela 3).

Tabela 2. Rendimento de óleo essencial em amostras de folhas de *Lippia insignis* Moldenke em diferentes tempos de destilação e diferentes proporções volume de solvente/massa vegetal. Feira de Santana-BA, 2019.

Razão solvente (mL) :biomassa (g)	Tempo de extração			
	1h	2h	3h	Média
10:1	2.09 ± 0.19 Ab	2.65 ± 0.15 Aa	2.49 ± 0.09 Aa	2.41 ± 0.28 a
20:1	1.89 ± 0.13 Ab	2.5 ± 0.20 Aa	2.39 ± 0.14 Aa	2.26 ± 0.31 a
Média	1.99 ± 0.19 b	2.57 ± 0.18 a	2.44 ± 0.12 a	2.34 ± 0.30

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância, minúscula para linha e maiúscula m coluna.

Tabela 3. Rendimento de óleo essencial em amostras de folhas de *Lippia lasiocalycina* Cham. em diferentes tempos de destilação e diferentes proporções volume de solvente/massa vegetal. Feira de Santana-BA, 2019.

Razão solvente (mL) :biomassa (g)	Tempo de extração			
	1h	2h	3h	Média
10:01	0.87 ± 0.02 Ab	1.13 ± 0.02 Aa	1.09 ± 0.03 Aa	1.03 ± 0.12 a
20:01	0.85 ± 0.06 Ab	0.96 ± 0.06 Aab	1.11 ± 0.03 Aa	0.97 ± 0.12 a
Média	0.86 ± 0.04 b	1.05 ± 0.10 a	1.10 ± 0.03 Aa	1.00 ± 12

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância, minúscula para linha e maiúscula m coluna.

Considerando que os principais elementos que influenciam a hidrodestilação são: 1. a volatilização do óleo presente na área de interação entre o material vegetal e o vapor circundante; 2. a transferência de óleo na corrente de vapor circundante; e 3. a destilação do óleo do interior dos tricomas glandulares até a superfície do material vegetal (BUSATO et al., 2014) os resultados demonstram que a proporção de solvente e biomassa avaliada 1000 mL para 100g (10:1) mostrou ser suficiente tanto para volatilização do OE da interface, quanto para a transferência de OE na corrente, não sendo necessárias quantidades superiores de água, para as duas espécies vegetais.

Casselet al. (2009) entendem que o principal fenômeno que comanda a destilação é a difusão no interior das folhas e, depois que começa a extração, a resistência à transferência de massa da superfície da planta para o vapor desaparece. Isso justifica não só o fato de não haver diferença significativa entre a quantidade de

água utilizada como também do tempo de extração. Ammar, Abdeslam-Hassen e Zagrouba (2014) observaram que por conta das partículas sólidas (consideradas o óleo) estarem em suspensão no líquido, admite-se uma mistura perfeita na fase líquida, e distribuição homogênea do OE, com coeficiente de difusão constante. Então, se o sistema está em equilíbrio, o processo é linear e atinge o máximo entre 60 e 120 minutos, não sendo necessário submeter o sistema a 180 minutos de extração.

Outro parâmetro avaliado foi a composição desses óleos essenciais por cromatografia gasosa, sendo identificados 98% dos constituintes de *L. insignis* (Tabela 6) e 93% dos compostos de *L. lasiocalycina* (Tabelas 4). Para *L. insignis* os compostos majoritários foram g-terpineno ( $14.03 \pm 2.24\%$ ) e timol ( $38.50 \pm 8.80$ ). Comparando-se com os valores encontrados por Bispo et al. (2016), que encontraram para essa espécie E-ocimenona (23,15-27,25%), limoneno (12,17-15,40%),  $\beta$ -mirceno (12,39-13,45%), observa-se uma mudança na proporção dos constituintes. Contudo, sabe-se que fatores genéticos, ambientais, estágio de colheita e adubação podem alterar rendimento e a composição dos óleos essenciais (SINTIM et al., 2015).

Segundo Bouvier, Rachier e Camara (2005), ocimenona está relacionado ao papel de defesa contra herbívoros, resistência a patógenos e a altas temperaturas. Apesar das temperaturas mais amenas no período chuvoso, essa é uma época que favorece fitopatógenos, como fungos, o que pode estar ligado a um aumento de ocimenona no período chuvoso. O timol também tem sido descrito como defesa química contra fitopatógenos, tendo resultados positivos contra fungos e bactérias (NUMPAQUE et al., 2011).

Já na espécie *L. lasiocalycina* os constituintes majoritários foram  $\beta$ -mirceno ( $23.66 \pm 2.04\%$ ) e E-ocimenona ( $34,03 \pm 3,66\%$ ), mantendo-se os constituintes majoritários já identificados para a espécie: E-ocimenona (22,82-29,43%) e  $\beta$ -mirceno (27,36-31,36%) (BISPO et al., 2016), havendo, contudo, uma inversão na proporção.



Tabela 4. Porcentagem de constituintes encontrados no óleo essencial de folhas de *Lippia lasiocalycina* Cham. submetidas a diferentes parâmetros de extrações, Feira de Santana-BA, 2019.

Composto			R1T1		R1T2		R1T3		R2T1		R2T2		R2T3	
	IAlit	IAcalc	Média ±	DV	Média ±	DV	Média ±	DV	Média ±	DV	Média ±	DV	Média ±	DV
$\alpha$ -tujeno	924	928	0.21 ±	0.00	0.32 ±	0.05	0.32 ±	0.05	0.20 ±	0.04	0.24 ±	0.04	0.28 ±	0.01
$\alpha$ -pineno	932	931	0.06 ±	0.08	0.22 ±	0.09	0.27 ±	0.04	Traços		0.17 ±	0.05	0.20 ±	0.07
Sabineno	969	977	0.95 ±	0.15	0.93 ±	0.09	0.96 ±	0.05	0.83 ±	0.10	0.92 ±	0.02	0.91 ±	0.05
<b><math>\beta</math>-mirceno</b>	<b>988</b>	<b>992</b>	<b>23.03 ±</b>	<b>2.69</b>	<b>24.29 ±</b>	<b>1.99</b>	<b>25.46 ±</b>	<b>0.66</b>	<b>20.82 ±</b>	<b>1.53</b>	<b>23.75 ±</b>	<b>1.03</b>	<b>24.61 ±</b>	<b>0.98</b>
$\alpha$ -terpineno	1014	1021	0.87 ±	0.08	1.01 ±	0.16	0.92 ±	0.10	0.89 ±	0.11	0.84 ±	0.10	0.88 ±	0.08
<b>p-cimeno</b>	<b>1020</b>	<b>1031</b>	<b>7.00 ±</b>	<b>0.54</b>	<b>5.96 ±</b>	<b>0.59</b>	<b>5.69 ±</b>	<b>0.09</b>	<b>6.46 ±</b>	<b>0.45</b>	<b>6.27 ±</b>	<b>0.29</b>	<b>5.64 ±</b>	<b>0.14</b>
Limoneno	1024	1034	0.31 ±	0.05	0.35 ±	0.06	0.30 ±	0.02	0.29 ±	0.02	0.38 ±	0.08	0.28 ±	0.05
Z- $\beta$ -ocimeno	1032	1038	0.12 ±	0.00	0.15 ±	0.01	0.15 ±	0.01	0.12 ±	0.02	0.13 ±	0.01	0.14 ±	0.01
E- $\beta$ -ocimeno	1044	1049	0.66 ±	0.03	0.86 ±	0.07	0.86 ±	0.04	0.69 ±	0.06	0.76 ±	0.02	0.85 ±	0.04
<b>g-terpineno</b>	<b>1054</b>	<b>1063</b>	<b>2.84 ±</b>	<b>0.99</b>	<b>4.54 ±</b>	<b>1.76</b>	<b>4.01 ±</b>	<b>0.87</b>	<b>3.31 ±</b>	<b>0.85</b>	<b>2.93 ±</b>	<b>1.07</b>	<b>3.86 ±</b>	<b>0.57</b>
Linalol	1098	1106	1.22 ±	0.13	1.20 ±	0.23	1.20 ±	0.07	1.27 ±	0.17	1.54 ±	0.24	1.41 ±	0.05
<b>Mircenona</b>	<b>1145</b>	<b>1155</b>	<b>9.12 ±</b>	<b>0.29</b>	<b>6.86 ±</b>	<b>1.98</b>	<b>6.40 ±</b>	<b>2.46</b>	<b>5.87 ±</b>	<b>0.25</b>	<b>4.83 ±</b>	<b>0.53</b>	<b>4.16 ±</b>	<b>0.21</b>
<b>Z-ocimenona</b>	<b>1226</b>	<b>1242</b>	<b>3.79 ±</b>	<b>0.22</b>	<b>3.79 ±</b>	<b>0.31</b>	<b>3.89 ±</b>	<b>0.22</b>	<b>3.52 ±</b>	<b>0.18</b>	<b>3.41 ±</b>	<b>0.36</b>	<b>3.31 ±</b>	<b>0.22</b>
<b>E-ocimenona</b>	<b>1235</b>	<b>1250</b>	<b>34.55 ±</b>	<b>1.34</b>	<b>30.97 ±</b>	<b>3.21</b>	<b>30.30 ±</b>	<b>0.35</b>	<b>40.21 ±</b>	<b>0.50</b>	<b>35.15 ±</b>	<b>1.40</b>	<b>32.99 ±</b>	<b>1.82</b>
<b>Timol</b>	<b>1289</b>	<b>1303</b>	<b>2.66 ±</b>	<b>2.51</b>	<b>4.16 ±</b>	<b>3.45</b>	<b>3.11 ±</b>	<b>1.85</b>	<b>2.89 ±</b>	<b>0.43</b>	<b>2.00 ±</b>	<b>1.92</b>	<b>2.79 ±</b>	<b>1.72</b>
Carvacrol	1298	1312	Traços		Traços		Traços		Traços		Traços		Traços	
Piperitenona	1340	1356	0.00		0.14 ±	0.06	0.14 ±	0.04	Traços		0.14 ±	0.02	0.15 ±	0.02
$\alpha$ -copaeno	1374	1381	0.05 ±	0.07	0.12 ±	0.01	0.15 ±	0.01	Traços		0.14 ±	0.04	0.17 ±	0.02
$\beta$ -elemeno	1389	1395	Traços		Traços		0.10 ±	0.01	Traços		0.11 ±	0.02	0.12 ±	0.02
<b>E-cariofileno</b>	<b>1417</b>	<b>1426</b>	<b>1.60 ±</b>	<b>0.08</b>	<b>2.24 ±</b>	<b>0.08</b>	<b>2.69 ±</b>	<b>0.16</b>	<b>1.58 ±</b>	<b>0.37</b>	<b>2.46 ±</b>	<b>0.49</b>	<b>3.06 ±</b>	<b>0.34</b>
$\alpha$ -guaieno	1437	1441	0.88 ±	0.10	1.16 ±	0.04	1.49 ±	0.07	0.83 ±	0.27	1.37 ±	0.35	1.77 ±	0.25
$\alpha$ -humuleno	1452	1464	0.60 ±	0.04	0.80 ±	0.02	0.96 ±	0.05	0.58 ±	0.13	0.91 ±	0.16	1.11 ±	0.10
germacreno D	1484	1489	0.14 ±	0.02	0.23 ±	0.04	0.45 ±	0.33	0.13 ±	0.04	0.25 ±	0.03	0.30 ±	0.05
$\alpha$ -bulneseno	1509	1509	0.32 ±	0.04	0.48 ±	0.06	0.60 ±	0.03	0.31 ±	0.09	0.54 ±	0.15	0.69 ±	0.06
Espatulanol	1577	1590	0.96 ±	0.10	1.07 ±	0.17	1.26 ±	0.08	0.98 ±	0.18	1.43 ±	0.17	1.45 ±	0.06
óxido de cariofileno	1582	1595	1.38 ±	0.15	1.43 ±	0.26	1.70 ±	0.13	1.44 ±	0.34	2.04 ±	0.25	1.91 ±	0.13
Total de compostos identificados			93.24 ± 0.29		93.25 ± 0.55		93.39 ± 0.07		93.24 ± 0.37		92.66 ± 0.14		93.03 ± 0.33	

IAlit - Índice Analítico da literatura; IAcalc - Índice Analítico calculado de acordo com padrão

Tabela 5. Comparação do percentual dos compostos majoritários do óleo essencial obtido de folhas de *Lippia lasiocalycina* Cham. em diferentes condições de extrações. Feira de Santana-BA, 2019.

Compostos	Razão solvente:biomassa		Tempo (h)		
	10:1	20:1	1	2	3
$\beta$ -mircenos	24.26 A	23.06 A	21.93 b	24.02 ab	25.03 a
<i>p</i> -cimeno	6.22 A	6.12 A	6.73 a	6.12 ab	5.67 b
$\gamma$ -terpineno	3.79 A	3.36 A	3.07 a	3,73 a	3.93 a
Mircenona	7.46 A	4.95 B	7.49 a	5.85 b	5.28 b
Z-ocimenona	3.82 A	3.41 B	3.65 a	3.60 a	3.60 a
E-ocimenona	31.94 B	36.12 A	37.39 a	33.06 b	31.64 b
Timol	3.51 A	2.56 A	3.08 a	3.08 a	2.95 a
E-cariofileno	2.18 A	2.37 A	1.57 c	2.35 b	2.88 a

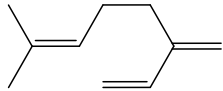
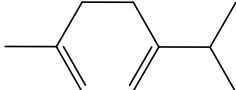
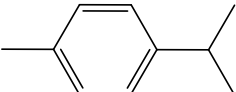
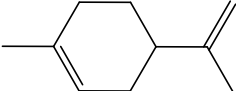
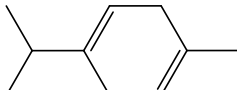
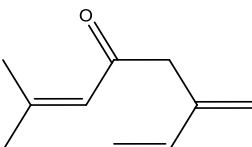
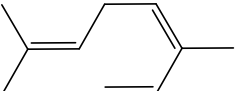
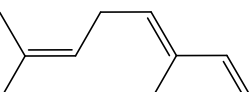
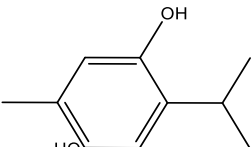
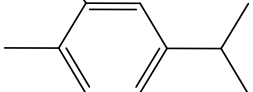
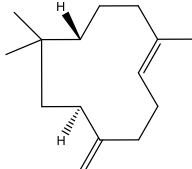
Médias seguidas por letras distintas, comparando em coluna, maiúscula para biomassa e minúscula tempo de extração, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

Os compostos que apresentaram concentração superior a 2% foram submetidos ao teste de média Scott-Knott a 5% de erro, para avaliar se existem diferenças na composição, de acordo com os tratamentos distintos. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 5 e 8, para *L. lasiocalycina* e *L. insignis*, respectivamente.

A maioria dos componentes dos óleos essenciais tem ponto de ebulição entre 120 e 300°C, superior aos 100°C da água. Contudo, o que determina a vaporização durante a hidrodestilação é a pressão de vapor (PV). Para dois líquidos imiscíveis, como óleo essencial e água, a pressão de vapor total é sempre igual à soma de suas pressões parciais (CASSEL et al., 2009; AMMAR, ABDESLAM-HASSEN E ZAGROUBA 2014). Assim, mesmo que os OEs possuam alto ponto de ebulição (PE) (Tabela 6), estes são evaporados em uma proporção tal que sua pressão de vapor combinada à do solvente seja igual à pressão atmosférica.

Para o óleo essencial de *L. lasiocalycina* oito constituintes tiveram percentual superior a 2%. Com diferença significativa no fator razão (solvente: biomassa) para os compostos mircenona, Z-ocimenona e E-ocimenona (Tabela 5). Em relação ao tempo de extração, só não foram constatadas diferenças significativas para os compostos timol, Z-ocimnona e  $\gamma$ -terpineno. Stanojevicet al. (2015), também encontraram alterações na composição dos óleos essenciais de *Anethifructus* (semente de endro) de acordo com a proporção de água e biomassa, com predominância do composto majoritários.

Tabela 6. Propriedades e estrutura dos compostos majoritários encontrados nos óleos essenciais de *Lippia lasiocalycina* Cham. e *Lippia insignis* Moldenke. Feira de Santana, 2019.

Compostos	Ponto Ebulição (°C)	Pressão de Vapor (mmHg)	Massa Molecular	Estrutura
$\beta$ -mirceno	167	7	136.23	
$\alpha$ -terpineno	173-175	NA	136.23	
<i>p</i> -cimeno	176-178	1.5	134.22	
limoneno	176-177	1 - 4.7	136.23	
$\gamma$ -terpineno	182	0.7	136.23	
mircenona	NA	NA	150.22	
Z-ocimenona	65-66	13	136.23	
E-ocimenona	65-66	13	136.23	
Timol	232	1 (a 64°C)	150.22	
carvacrol	236-237	NA	150.22	
E-cariofileno	129-130	14	204.35	

Fonte: Autora

Tabela 7. Porcentagem de constituintes encontrados no óleo essencial de folhas de *Lippia insignis* Moldenke submetidas a diferentes parâmetros de extrações. Feira de Santana-BA, 2019.

Composto	IA <sub>lit</sub>	IA <sub>calc</sub>	R1T1			R1T2			R1T3			R2T1			R2T2			R2T3		
			Média	±	DP	Média	±	DP	Média	±	DP	Média	±	DP	Média	±	DP	Média	±	DP
α-tujeno	924	928	0.76	±	0.12	0.77	±	0.10	0.67	±	0.09	0.61	±	0.07	0.71	±	0.07	0.61	±	0.12
α-pineno	932	937	0.15	±	0.00	0.14	±	0.03	0.13	±	0.02	0.10	±	0.01	0.12	±	0.01	Traços		
Sabineno	969	977	0.11	±	0.00	0.10	±	0.01	0.16	±	0.03	0.11	±	0.01	Traços			0.16	±	0.02
<b>β-mirceno</b>	<b>988</b>	<b>992</b>	<b>6.13</b>	±	<b>0.43</b>	<b>4.92</b>	±	<b>0.56</b>	<b>6.70</b>	±	<b>0.53</b>	<b>6.76</b>	±	<b>0.18</b>	<b>4.76</b>	±	<b>0.17</b>	<b>6.29</b>	±	<b>0.49</b>
<b>α-terpineno</b>	<b>1014</b>	<b>1022</b>	<b>2.23</b>	±	<b>0.46</b>	<b>2.34</b>	±	<b>0.17</b>	<b>1.97</b>	±	<b>0.17</b>	<b>1.75</b>	±	<b>0.13</b>	<b>2.24</b>	±	<b>0.13</b>	<b>1.92</b>	±	<b>0.25</b>
<b>p-cimeno</b>	<b>1020</b>	<b>1031</b>	<b>10.97</b>	±	<b>0.53</b>	<b>10.01</b>	±	<b>1.02</b>	<b>9.89</b>	±	<b>0.45</b>	<b>10.39</b>	±	<b>1.23</b>	<b>9.93</b>	±	<b>1.63</b>	<b>10.02</b>	±	<b>0.50</b>
<b>Limoneno</b>	<b>1024</b>	<b>1034</b>	<b>3.01</b>	±	<b>0.95</b>	<b>1.92</b>	±	<b>0.26</b>	<b>3.16</b>	±	<b>0.50</b>	<b>4.00</b>	±	<b>0.07</b>	<b>1.71</b>	±	<b>0.46</b>	<b>2.98</b>	±	<b>0.31</b>
E-β-ocimeno	1044	1049	0.55	±	0.04	0.55	±	0.03	0.65	±	0.02	0.50	±	0.01	0.55	±	0.04	0.67	±	0.01
<b>g-terpineno</b>	<b>1054</b>	<b>1063</b>	<b>14.72</b>	±	<b>3.05</b>	<b>16.21</b>	±	<b>1.16</b>	<b>13.15</b>	±	<b>1.15</b>	<b>11.41</b>	±	<b>1.09</b>	<b>15.72</b>	±	<b>0.62</b>	<b>12.94</b>	±	<b>1.93</b>
Linalol	1095	1107	1.42	±	0.47	0.65	±	0.13	1.33	±	0.22	2.10	±	0.21	0.55	±	0.32	1.25	±	0.26
Ipsdienol	1140	1150	0.38	±	0.08	0.26	±	0.04	0.36	±	0.06	0.52	±	0.05	0.26	±	0.03	0.35	±	0.05
<b>Mircenona</b>	<b>1145</b>	<b>1156</b>	<b>7.32</b>	±	<b>2.44</b>	<b>3.14</b>	±	<b>1.31</b>	<b>5.69</b>	±	<b>0.97</b>	<b>7.59</b>	±	<b>0.68</b>	<b>3.03</b>	±	<b>0.29</b>	<b>4.35</b>	±	<b>0.57</b>
terpinen-4-ol	1174	1192	0.44	±	0.04	0.40	±	0.03	0.32	±	0.02	0.40	±	0.04	0.43	±	0.06	0.34	±	0.02
α-terpineol	1186	1204	0.16	±	0.05	0.10	±	0.02	0.14	±	0.02	0.26	±	0.04	Traços			0.13	±	0.03
<b>Z-ocimenona</b>	<b>1226</b>	<b>1242</b>	<b>1.91</b>	±	<b>0.64</b>	<b>1.11</b>	±	<b>0.35</b>	<b>2.00</b>	±	<b>0.26</b>	<b>2.19</b>	±	<b>0.42</b>	<b>0.93</b>	±	<b>0.15</b>	<b>1.81</b>	±	<b>0.48</b>
<b>E-ocimenona</b>	<b>1235</b>	<b>1250</b>	<b>5.45</b>	±	<b>1.74</b>	<b>4.04</b>	±	<b>0.79</b>	<b>7.53</b>	±	<b>1.87</b>	<b>10.48</b>	±	<b>1.18</b>	<b>4.79</b>	±	<b>0.19</b>	<b>8.53</b>	±	<b>1.90</b>
<b>Timol</b>	<b>1289</b>	<b>1303</b>	<b>34.65</b>	±	<b>3.92</b>	<b>45.71</b>	±	<b>1.81</b>	<b>38.90</b>	±	<b>1.80</b>	<b>27.37</b>	±	<b>4.14</b>	<b>45.00</b>	±	<b>1.33</b>	<b>39.35</b>	±	<b>0.89</b>
<b>Carvacrol</b>	<b>1298</b>	<b>1311</b>	<b>5.59</b>	±	<b>0.15</b>	<b>3.57</b>	±	<b>0.87</b>	<b>2.73</b>	±	<b>1.16</b>	<b>8.86</b>	±	<b>4.11</b>	<b>4.25</b>	±	<b>1.31</b>	<b>2.29</b>	±	<b>0.64</b>
E-cariofileno	1417	1427	0.89	±	0.10	1.17	±	0.12	1.18	±	0.04	0.81	±	0.32	1.24	±	0.45	1.61	±	0.64
α-humuleno	1452	1464	0.25	±	0.00	0.31	±	0.03	0.28	±	0.03	0.22	±	0.10	0.31	±	0.12	0.42	±	0.16
germacreno D	1484	1489	0.20	±	0.03	0.17	±	0.01	0.30	±	0.07	0.26	±	0.11	0.20	±	0.09	0.39	±	0.13
Viridifloreno	1496	1499	0.12	±	0.02	0.18	±	0.04	0.17	±	0.01	0.13	±	0.02	0.21	±	0.12	0.27	±	0.13
Biciclogermacreno	1500	1504	0.33	±	0.01	0.26	±	0.01	0.35	±	0.06	0.44	±	0.22	0.33	±	0.16	0.46	±	0.16
β-bisaboleno	1505	1515	0.13	±	0.02	0.19	±	0.10	0.14	±	0.02	Traços			0.22	±	0.11	0.26	±	0.11
Espatulenol	1577	1590	0.23	±	0.08	0.22	±	0.01	0.44	±	0.07	0.29	±	0.05	0.30	±	0.07	0.59	±	0.16
óxido de cariofileno	1582	1595	Traços			0.11	±	0.02	0.15	±	0.01	0.10	±	0.01	0.14	±	0.03	0.25	±	0.06
Total de compostos identificados			98.10	±	0.12	98.43	±	0.35	98.48	±	0.13	97.62	±	0.18	98.01	±	0.35	98.29	±	0.13

IA<sub>lit</sub> - Índice Analítico da literatura; IA<sub>calc</sub> - Índice Analítico calculado de acordo com padrão

Tabela 8. Comparativo do percentual de compostos majoritários do óleo essencial de *Lippia insignis* Moldenke obtidos em diferentes condições de extração. Feira de Santana-BA, 2019.

Compostos	Razão solvente:biomassa		Tempo (h)		
	10:1	20:1	1	2	3
$\beta$ -mirceno	5.92 A	5.94 A	6.44 a	4.84 b	6.49 a
$\alpha$ -terpineno	2.18 A	1.97 A	1.99 a	2.29 a	1.94 a
<i>p</i> -cimeno	10.29 A	10.12 A	10.68 a	9.97 a	9.95 a
Limoneno	2.69 A	2.90 A	3.51 a	1.81 b	3.07 a
$\gamma$ -terpineno	14.69 A	13.35 A	13.06 b	15.96 a	13.05 b
Mircenona	5.38 A	4.99 A	7.45 a	3.09 c	5.02 b
Z-ocimenona	1.67 A	1.64 A	2.05 a	1.02 b	1.91 a
E-ocimenona	5.67 B	7.93 A	7.96 a	4.41 b	8.03 a
Timol	39.75 A	37.24 A	31.01 c	45.36 a	39.12 b
Carvacrol	3.96 A	5.13 A	7.22 a	3.91 b	2.51 b

Médias seguidas por letras distintas, comparando em coluna, maiúscula para biomassa e minúscula tempo de extração, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância

Estudo realizado com hidrodestilação de óleo essencial da madeira de Agar (*Aquilariacrassna*) avaliou diferentes temperaturas 120, 100 e 80 ° C e os principais compostos encontrados foram Aromadendrenepoxide, Aristolene e Agarospirol, respectivamente. Indicando que a temperatura influenciou a composição do óleo. Quanto mais alta, maior a proporção dos compostos com maior PE (PORNPUNYAPAT, CHETPATTANANONDH e TONGURAI, 2011).

Altas temperaturas também podem causar isomerização, o que pode estar relacionado com a menor quantidade de E-ocimenona tanto nas extrações com menor quantidade de água (10:1), quanto, quando submetido a maior tempo de aquecimento (2 e 3h).A ação prolongada da água quente pode causar hidrólise de alguns constituintes dos óleos essenciais, como ésteres, que reagem com a água a altas temperaturas para formar ácidos e álcoois (GUENTHER, 1960, RANITHA et al., 2014).

Com exceção do  $\beta$ -mircenoe E-cariofileno, todos os compostos apresentaram concentração igual ou superior nas extrações com 60 minutos. Essas mesmas moléculas estão em maior quantidade nas extrações de 3h, sugerindo que precisam de maior energia para volatilização. A volatilidade dos compostos é inversamente proporcional ao tamanho da molécula, justificando a menor quantidade de E-cariofileno encontrada na extração de 1h e maior com 3h.

Para *L. insignis* dez constituintes tiveram percentual superior a 2%, com diferença significativa no fator razão (solvente:biomassa) somente para E-ocimenona,

que apresentou menor percentual com a utilização da proporção de 1000 mL de água para 100 g de massa seca (10:1) (Tabela 8). Resultado semelhante foi obtido para o OE de *L. lasiocalycina*, o que sugere que este composto pode ser mais sensível a sofrer isomerização devido a altas temperaturas quando há menor quantidade de água, pois as folhas não ficam flutuando no líquido e a maior temperatura do balão de vidro facilita reações de isomerização. Megawati et al. (2019) também encontraram semelhança nas composições qualitativamente, mas diferenças quantitativas quando comparados óleos essenciais extraídos de *Myristicaearillus* por hidrodestilação com manta de aquecimento e hidrodestilação assistida por micro-ondas.

Em relação ao tempo de extração, a análise só não detectou diferenças significativas entre os compostos  $\alpha$ -terpineno e *p*-cimeno (Tabela 8). É importante destacar a diferença significativa da quantidade de timol entre 60 e 120 minutos, sendo inversamente proporcional ao seu isômero carvacrol. Houve aumento de 15% de timol entre 1h e 2h de extração. A quantidade de oxigênio pode ser indicativo da qualidade dos óleos essenciais (Moradiet al., 2018), assim, as quantidades mais elevadas de monoterpenos oxigenados como timol e carvacrol com tempo de extração de duas horas sugerem melhor qualidade desses óleos. A atividade inseticida do carvacrol foi descrita por Passino et al. (1999), portanto, altas concentrações de timol e carvacrol devem favorecer atividade contra *C. capitata* do óleo essencial de *L. insignis*.

### 3.4 Conclusão

O rendimento e a composição dos óleos essenciais de *L. insignis* e *L. lasiocalycina* sofrem influência do tempo e da proporção de solvente para biomassa quando extraídos por hidrodestilação.

A proporção de água (mL): biomassa de folhas (g) de 10:1 com extração em no máximo 120 minutos proporciona melhor rendimento e estabilidade na composição.

Os componentes majoritários para *L. insignis* são  $\alpha$ -terpineno (14.03 $\pm$ 2.24%) e timol (38.50 $\pm$ 8.80) e *L. lasiocalycina*  $\beta$ -mirceno (23.66 $\pm$ 2.04%) e E-ocimenona (34,03 $\pm$  3,66%).

### 3.5 Referências

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry**. 4th. ed. Carol Stream: Allured Publ., 2007. 804 p.

AMMAR, A.H.; ABDESLAM-HASSEN, M.; ZAGROUBA, F. 2014. Experimental Study and Modeling of Essential Oil Extraction from Plants by Hydrodistillation. **Chemical Engineering technology**. 37, No. 7, 1235–1242. doi: 10.1002/ceat.201300367

ASSAMI, K. et al. 2012. Ultrasound induced intensification and selective extraction of essential oil from *Carum carvi* L. seeds. **Chemical Engineering and Processing**. 62. 99– 105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2012.09.003>

BISPO et al. Effect of indolebutyric acid and cutting type on vegetative propagation of three *Lippia* species. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.46, n.8, p.1364-1367, ago, 2016.

BOUVIER, F., RAHIER, A., CAMARA, B. 2005 Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. **Progress in Lipid Research**. V.44, I.6, 357-429. doi:<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2005.09.003>

BUSATO, N.V., SILVEIRA, J.C., SOUZA da COSTA, A.O., COSTA JUNIOR, E.F. 2014. Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.9, p.1574-1582. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20121330>

CASSEL, E. et al. 2009. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, v.29, p.171-176. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.04.017>

CHEMAT, F.; VIAN, M.A.; CRAVOTTO, G. 2012. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. **International Journal of Molecular Sciences**. 13(7), 8615-8627. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms13078615>

EL ASBAHANI, et al. 2015. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**. v.483, 1–2, p.220-243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>

**European Pharmacopoeia**. Council of Europe. 9th ed. Strasbourg: 2013.

GÜNTHER, E. 1960. **The Essential Oils**: History and origin in plants production analysis. Vol.1. 4a.ed. D.Van Nostrand Company, Inc., Princeton, New Jersey. USA. p. 235-240.

ISO 9235:2013 - Aromatic natural raw materials – Vocabulary

MEGAWATI, et al., 2019. Kinetics of mace (*Myristicae arillus*) essential oil extraction using microwave assisted hydrodistillation: Effect of microwave power. **Industrial Crops & Products**. 131. 315–322. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.067>

MORADI, S., FAZLALI, A., HAMED, H., 2018. Microwave assisted hydrodistillation of essential oil from Rosemary: comparison with traditional distillation. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**. 10, 22–28. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5742650/pdf/AJMB-10-22.pdf>

NUMPAQUE, M.A., et al. 2011. Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. **Tropical Plant Pathology**, 36(1), 3-13. <https://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762011000100001>

PASSINO, G.S. et al. 1999. Effects of essential oil formulations on *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae) adult flies. **Journal of applied entomology**. 123, 145-149.

PIRAS, A., et al. 2012. Extraction and Separation of Volatile and Fixed Oils from Seeds of *Myristica fragrans* by Supercritical CO<sub>2</sub>: Chemical Composition and Cytotoxic Activity on Caco-2 Cancer Cells. **Journal of Food Science**. 77: C448–C453. [doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02618.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02618.x)

PORNPUNYAPAT, J.; CHETPATTANANONDH, P.; TONGURAI, C. 2011. Mathematical modeling for extraction of essential oil from *Aquilaria crassna* by hydrodistillation and quality of agarwood oil. **Bangladesh Journal of Pharmacology**. 6: 18-24. [doi:10.3329/bjp.v6i1.7902](https://doi.org/10.3329/bjp.v6i1.7902)

RANITHA, M., ABDURAHMAN, H.N., ZIAD, A.S., AZHARI, H.N., THANA, R.S., 2014. A comparative study of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil extracted by microwave-assisted hydrodistillation (MAHD) and conventional hydrodistillation (HD) method. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**. 5, 104–108. <https://doi.org/10.7763/IJCEA.2014>.

SINTIM, H.Y. et al. 2015. Hydrodistillation time affects dill seed essential oil yield, composition, and bioactivity. **Industrial Crops and Products**. V.63, 190-196. [doi:https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.058](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.058)

STANOJEVIC, L.P., et al., 2015. The yield, composition and hydrodistillation kinetics of the essential oil of dill seeds (*Anethii fructus*) obtained by different hydrodistillation techniques. **Industrial Crops and Products**. V. 65. P. 429-436. [doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.067](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.067)

TEIXEIRA, S.D. 2016. Investigation on chemical composition and optimization of essential oil obtainment from waste *Pinus taeda* L. using hydrodistillation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 59, e16150043. <https://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2016150043>

TELES S. et al. Geographical origin and drying methodology may affect the essential oil. **Industrial Crops and Products**. v. 37, p. 247-252, 2012.

WENQIANG et al. 2007. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. **Food Chemistry**. v.101, 4, p.1558-1564. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.009>



## CAPÍTULO II

### DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES A PARTIR DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia lasiocalycina* Cham. E *Lippia insignis* Moldenke PARA USO COMO BIOPESTICIDAS NO CONTROLE DE MOSCA DO MEDITERRÂNEO

SANTANA, T.M.M.<sup>1</sup>; OLIVEIRA, L. M.<sup>1</sup>; LUCHESE, A. M.<sup>1</sup>; FANCELLI, M.<sup>2</sup>; MAGALHÃES, N.S.S.<sup>3</sup>; XAVIER-JÚNIOR, F.H.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Feira de Santana; Feira de Santana; <sup>2</sup> Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas; <sup>3</sup>Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica (LNFarm-LIKA) UFPE.

#### RESUMO

A mosca do mediterrâneo *Ceratitis capitata* (Wied), é uma praga de considerável importância econômica no Brasil, pois ataca importantes pomares de frutas, reduzindo as safras e limitando as exportações. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo formular nanoemulsões a partir dos óleos essenciais de *Lippia insignis* e *Lippia Lasiocalycina*, utilizando polisorbato 80 como surfactante e ultrassom. Após a formulação, avaliou-se as características físicoquímicas, como tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta das emulsões. E, por fim, testou-se a atividade inseticida dessas emulsões sobre adultos, pupas e larvas de mosca do mediterrâneo. Os resultados da extração de OE de *L. insignis* demonstraram um rendimento médio de  $2.39 \pm 0.14$  e os compostos majoritários foram E-ocimenona ( $23.54 \pm 0.2\%$ ), limoneno ( $14.12 \pm 0.37\%$ ),  $\beta$ -mirceno ( $12.97 \pm 0.17\%$ ) e p-cimeno ( $13.67 \pm 0.31\%$ ). Para *L. lasiocalycina* média de rendimento foi  $1.11 \pm 0.03$  e os compostos majoritários foram  $\beta$ -mirceno ( $24.60 \pm 0.98\%$ ) e E-ocimenona ( $32.98 \pm 1.81\%$ ). As formulações obtidas tiveram características nanométricas, tamanho de partícula (44,5 – 47,4 nm), índice de polidispersão (0,162 – 0,174) e carga de superfície (-8,6 a -9,1 mV). Os óleos essenciais e as formulações de ambas as espécies tiveram efeito inseticida contra adultos e larva. As nanoemulsões apresentaram maior eficiência contra as larvas no terceiro instar. As nanoemulsões de óleo essencial de *Lippia insignis* e *Lippia Lasiocalycina* têm potencial para uso como biopesticidas contra mosca do mediterrâneo.

**Palavra-chave:** *Ceratitis capitata*, agrotóxicos, produto natural.

### ABSTRACT

The med fruit fly *Ceratitis capitata* (Wied) is a pest of considerable economic importance in Brazil, as it attacks significant fruit orchards, reducing yields and limiting exportations. Thus, this work aimed to formulate nanoemulsions from the essential oils of *Lippia insignis* and *Lippia Lasiocalycina*, using polysorbate 80 as surfactant and ultrasound. After the formulation, the physicochemical characteristics, such as particle size, polydispersity index and zeta potential of the emulsions were evaluated. Finally, the insecticidal activity of these emulsions on adults, pupae and fruit fly larvae was tested. The results of *L. insignis* OE extraction showed an average yield of  $2.39 \pm 0.14$  and the major compounds were E-ocimene ( $23.54 \pm 0.2\%$ ), limonene ( $14.12 \pm 0.37\%$ ),  $\beta$ -myrcene ( $12.97 \pm 0.17\%$ ), and p-cymene ( $13.67 \pm 0.31\%$ ). For *L. lasiocalycina* mean yield was  $1.11 \pm 0.03$  and the major compounds were  $\beta$ -myrcene ( $24.60 \pm 0.98\%$ ) and E-ocimene ( $32.98 \pm 1.81\%$ ). The formulations obtained had nanometric characteristics, particle size (44.5 - 47.4 nm), polydispersity index (0.162-0.174) and surface charge (-8.6 to -9.1 mV). Essential oils and formulations of both species had an insecticidal effect against adults and larvae. Nanoemulsions showed higher efficiency against larvae in the third instar. The essential oil nanoemulsions of *Lippia insignis* and *Lippia Lasiocalycina* have potential for use as agricultural defenses against fruit fly.

**Keywords:** *Ceratitis capitata*, crop protection, natural product.

## 4 CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES A PARTIR DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia lasiocalycina* CHAM. E *Lippia insignis* MOLDENKE PARA USO COMO BIOPESTICIDAS NO CONTROLE DE MOSCA DO MEDITERRÂNEO

### 4.1 Introdução

A exposição dos agricultores e dos consumidores aos resíduos de agrotóxicos sintéticos tem aumentado a demanda por produtos livres de pesticidas, orgânicos e “verdes” (SEIBER et al., 2018). Diante desse cenário, de demanda interna e externa crescente por produtos mais saudáveis, os biopesticidas surgem como mais uma possibilidade, que juntamente com outras formas de controle, como seleção de variedades resistentes, manejo da cultura, controle biológico, entre outras, poderá levar a fruticultura nacional a um patamar mais competitivo. Como exemplo de biopesticida temos os óleos essenciais, que mesmo em baixas concentrações têm efeito antibiótico, antifúngico e inseticida, e em doses adequadas não trazem riscos para humanos (MOSSA, 2016). Os efeitos tóxicos dos óleos essenciais na mosca do mediterrâneo (*Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae)) têm sido estudados e comprovados, tanto para adultos como larvas e pupas. Os OEs demonstraram eficácia de ingestão, quando adicionado à dieta (MIGUEL, et al., 2010; BENELLI et al., 2012; PAPANASTASIOU et al., 2017), e efeito de contato (BENELLI et al., 2012; OVIEDO et al., 2017). Papanastasiou et al. (2017) destacam a importância da dose para induzir mortalidade, pois quantidades subletais de limoneno levaram ao aumento de longevidade e fecundidade. Não foram encontrados dados na literatura de OEs testados contra *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), inimigo natural da *C. capitata*.

Os OEs são metabólitos vegetais lipofílicos e altamente voláteis e apesar de terem bom efeito de contato, são de baixa durabilidade, devido a rápida evaporação e degradação dos compostos ativos (TUREK e STINTZING, 2013). Existem alguns fatores que podem ser limitantes quando avaliados para produção em larga escala, tais como instabilidade dos óleos essenciais, que são altamente voláteis, sensibilidade à temperatura, possibilidade de oxidação e outras reações, como isomerização (RANITHA et al., 2014).

Métodos de encapsulação adequados, síntese de nanopartículas e uma compreensão das relações sinérgicas, podem resultar em um aumento da atividade

biológica das formulações de OE (PAVELA e BENELLI, 2016). Portanto, o desenvolvimento de formulações adequadas visa melhorar a persistência, estabilidade e biodisponibilidade desses OE.

Como demonstrado por Ghosh (2014) as emulsões estabilizam os óleos essenciais, por formarem micelas que protegem as moléculas de óleo. As nanoemulsões são dispersões coloidais de óleo e água com tamanho de gotícula na faixa de 10-200 nm (MASON, 2006; GHOSH, 2014). Essas formulações têm sido muito utilizadas devido as suas vantagens como gotículas muito pequenas, transparência e estabilidade física em longo prazo (MASON, 2006).

As nanoemulsões representam uma nova alternativa para viabilizar o uso de óleos essenciais como biopesticidas, pois a formação de micelas protege o óleo, reduz degradação e os glóbulos formados em escala nanométrica (10-200nm) podem aumentar a atividade biológica (ATHANASSIOU et al., 2018). Além de ser um veículo mais apropriado para uso na lavoura, pois é possível controlar sua viscosidade, espalhabilidade e permanência.

Encapsulamento é o processo no qual um componente ativo é aprisionado ou revestido por uma parede de matriz. Esta matriz isola a molécula bioativa do ambiente circundante até a sua liberação em resposta a condições externas como, pH, pressão e temperatura (TUREK e STINTZING, 2013) Contudo, o método utilizado para encapsular pode afetar a eficácia e estabilidade das soluções, à medida que os óleos forem encapsulados (CAMPOLO et al., 2017). Os métodos mais utilizados são homogeneizadores de alta pressão, ultrassom, inversão de fases e emulsificação espontânea (PAVELA e BENELLI, 2016).

O encapsulamento por ultrassom é muito eficiente para obtenção de tamanhos de partícula pequenos e alta estabilidade (JAISWAL et al., 2015), visto que este apresenta nanoemulsões com alta biodisponibilidade e estabilidade. Silva et al (2015) desenvolveram nanoemulsão com auxílio de ultrassom, avaliando tempo (0,5 – 5 min) e potência (160 – 640 W) e observaram que quanto maior o tempo e a potência, menor tamanho de partículas e maior a estabilidade da emulsão. Como já demonstrado por diversos estudos, o uso de ultrassom como método para emulsificar óleos essenciais associados a surfactantes não iônicos, tem resultados positivos sobre estabilidade e atividade dos óleos contra insetos (GHOSH, MUKHERJEE e CHANDRASEKARAN, 2013), fungos (SUGUMAR, et al., 2016) e bactérias (LU et al., 2018). O surfactante não iônico Tween® não apresentou fitotoxicidade contra citros (ERDEMIR e ERLER,

2017), folhas e brotos de pera (PEHLEVAN e KOVANCI, 2016), uvas (SONKER, PANDEY e SINGH, 2015) nem mangueiras e acerolas (dados não publicados).

Assim, o presente trabalho buscou desenvolver nanoemulsões com óleos essenciais de *Lippia insignis* e *Lippia lasiocalycina*, de modo a possibilitar o uso desses óleos essenciais na agricultura, avaliar as características físico-químicas das nanoemulsões, bem como realizar os testes *in vitro* para determinar atividade das nanoemulsões contra a *C. capitata*.

## 4.2 Materiais e métodos

### 4.2.1 Material vegetal

Partes aéreas de *L. insignis* Moldenke (HUEFS 2432189, SISGEN Cadastro nº A1C1DEB) e *L. lasiocalycina* Cham. (HUEFS 240988, SISGEN Cadastro nº A1C1DEB) foram coletadas durante a manhã, em Junho de 2018, em plantas floridas e mantidas sob cultivo no Horto Florestal (12°16'10.3"S 38°56'18.8"W), na cidade de Feira de Santana, a 234 metros acima do nível do mar, com temperatura média anual de 24 ° C e uma taxa de precipitação média de 848mm por ano. O material foi selecionado, excluindo as folhas secas ou aquelas que pareciam estar doentes. As plantas foram secas à temperatura ambiente até peso constante.

A extração e análise dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Na extração dos óleos, 100 g de folhas secas de cada espécie foram trituradas em liquidificador com água destilada e, em seguida, adicionadas em balão de vidro contendo água destilada em volume suficiente para cobertura total do material vegetal. O método de extração foi por hidrodestilação, utilizando-se o aparelho de Clevenger, acoplados a balões de vidro, que foram aquecidos por mantas térmicas elétricas com termostato. A extração foi conduzida durante 3 horas, contadas a partir da condensação da primeira gota. Após a extração foi adicionado ao óleo o sulfato de sódio anidro para eliminação da água residual. Posteriormente, com o uso da pipeta do tipo Pasteur, o óleo foi coletado e acondicionado em frascos de vidros, etiquetados e armazenados em congelador comercial a -23°C até a realização da análise química e dos testes biológicos (BISPO et al., 2016).

Para análise da composição química dos óleos essenciais utilizou-se a cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massas (CG/EM). Amostras dos OE (0.02 g) foram previamente diluídos em 1 ml de diclorometano. As análises foram realizadas em Cromatógrafo Shimadzu® GC-2010 acoplado ao Espectrômetro de Massa Shimadzu® CG / MS-QP 2010, coluna capilar DB-5ms (30 m x 0,25 mm), micrômetros com espessura de 0,25  $\mu\text{m}$ , temperatura do injetor de 220 ° C, gás carreador de hélio (1 mL.min<sup>-1</sup>), temperatura da interface e fonte de ionização 240 ° C, energia de ionização 70 eV, corrente de ionização 0,7 kV, com o programa de temperatura do forno 60–240°C a 3 °C min<sup>-1</sup> mantido a 240°C por 20 min, corrida total de 60 minutos. 1 $\mu\text{L}$  das amostras foram injetadas automaticamente, uma razão de divisão da amostra de 1: 100.

A identificação dos compostos foi realizada comparando-se os índices analíticos (AI) com a literatura (ADAMS, 2007) e com os dados espectrais de massa de padrões autênticos, bem como comparando os mesmos dados com uma biblioteca espectral (NIST 11). Os resultados finais foram expressos em porcentagem relativa de cada composto, calculada pela normalização de cada área de pico cromatográfico.

#### 4.2.2 Preparo das nanoemulsões

O preparo das emulsões foi realizado no Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica (LNFarm) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O método utilizado para emulsificar os OEs foi ultrassom, o emulsificante utilizado foi o Tween 80 (Polissorbato 80; Monoleato de Sorbitano PEG20, HLB=15), As concentrações foram testadas e as características monitoradas através de parâmetros macroscópicos, como cor, aspecto visual, separação de fases e físico-químicos, como turbidez e tamanho da partícula.

As nanoemulsões dos óleos essenciais em água foram formuladas adicionando-se água à fase orgânica, que consistiu de óleo essencial e um surfactante não iônico (Tween 80). Estes foram misturados em proporções de 1: 2 e 1: 1. A emulsão foi inicialmente misturada com um agitador magnético a 140 rpm sob temperatura ambiente durante 20 minutos. Esta solução foi então submetida a um método de alta energia, sonda de ultrassom a uma frequência de 20 kHz com 750 W (Sonics&Materials, Inc., Newtown, EUA) com a ponta da haste medindo 13 mm de diâmetro. As emulsões foram sonicadas à temperatura ambiente por 10 min, em que

cada ciclo consiste de 30 segundos ativos de pulsos e 1 segundo sem pulso. Os tubos foram mantidos em banho de gelo durante todo o período de sonicação para neutralizar o efeito do calor gerado (KHAN et al., 2018).

#### 4.2.3 Caracterização das nanoemulsões

Foram quantificados o tamanho das gotículas, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta. O diâmetro das partículas, o índice de polidispersividade e o potencial zeta foram determinados no aparelho MALVERN ZETASIZER (modelo ZS), temperatura constante de 25°C, em triplicata. As amostras foram diluídas em água deionizada em 1:100 (v/v).

Os tamanhos de gotas de óleo foram analisados por espalhamento dinâmico de luz utilizando um Analisador de Distribuição de Tamanho de Partícula por Difração a Laser. O aparelho é equipado com um laser de 4 mW HeNe (633 nm), célula de medição, fotomultiplicador e correlator. Antes da medição, as amostras foram diluídas (1: 400) num ultrafiltrado de água destilada e colocadas em cubetas de 10 mm de diâmetro. Usando uma avalanche de detector de fotodíodos ajustada a 25 ° C, mediu-se a intensidade de dispersão a um ângulo de 173 ° em relação à fonte. As funções de auto correlação de intensidade foram analisadas pelo Algoritmo de Finalidade Geral (integrado no software) para determinar a distribuição do coeficiente de difusão de translação das partículas, DT (m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>). O parâmetro DT e o raio hidrodinâmico (Rh) das partículas estão relacionados através da equação de Stokes-Einstein:  $DT = kBT / 6\pi\eta Rh$ . Na dispersão, as partículas movem-se em um movimento Brownian aleatório constante, assim como a intensidade da luz dispersada flutuando em função do tempo. Por conseguinte, as dimensões das gotículas são medidas com base na função de correlação estabelecida pelo software de tecnologia de dispersão (DTS). O índice de refração (RI) e a absorvância foram ajustados respectivamente a 25 ° C e as medições foram repetidas cinco vezes.

#### 4.2.4 Ensaio toxicidade OE contra *C. Capitata*

##### 4.2.4.1 Efeito de contato em adultos

Este ensaio teve por finalidade reproduzir a presença do pesticida em campo, quando o mesmo for aplicado nos pomares. Atividade tóxica das nanoemulsões contra

moscas adultas com 3 a 5 dias de vida, assexuadas foi determinada utilizando a técnica de papel filtro impregnado, desenvolvido por Dorla (2017) e Palacios (2009), com modificações. Um pedaço de papel de filtro foi embebido em 1 mL da nanoemulsão 1% e da solução de óleo essencial a 1% (controle positivo) e após evaporação, dez moscas de ambos os sexos com idade de 3-5 dias, foram colocados em recipientes plásticos de 250 mL aerados, cobertos com tecido do tipo “filó”, que permite ventilação (Figura 8), com água e comida *ad libitum*.

Como controle negativo foi utilizado o emulsificante Tween 80 1% e com água destilada. O ensaio foi mantido a  $25 \pm 1$  ° C e fotoperíodo natural (12h de luz e 12h escuro). Cada teste foi replicado cinco vezes e a mortalidade em cada grupo foi verificada em 24, 48 e 72 horas, considerando mortos os animais sem resposta ao toque.

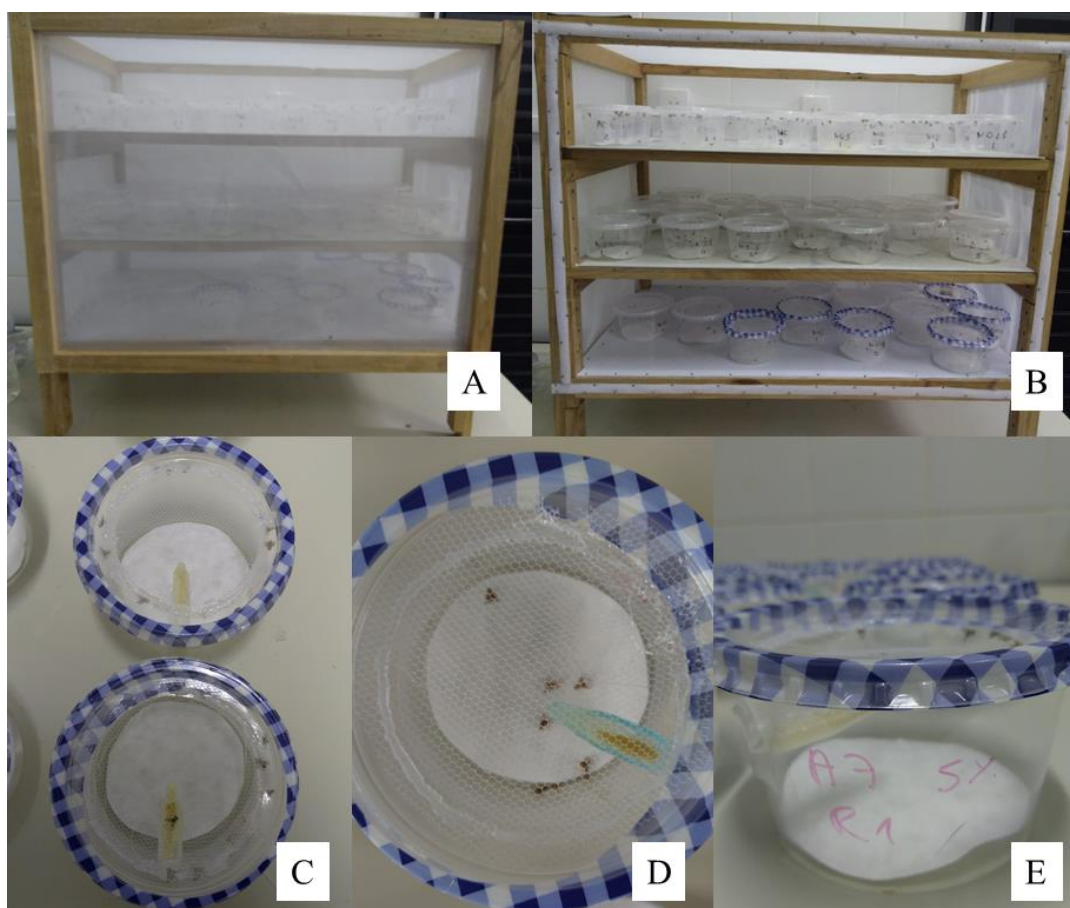


Figura 8. Experimento de toxicidade por contato de nanoemulsões de óleos essenciais de *Lippia lasiocalycina* Cham. e *Lippia insignis* Moldenke contra *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae). Feira de Santana. A e B. Proteção contra outros insetos. C, D E. Gaiolas confeccionadas mostrando detalhes da cobertura, alimentação e papel filtro.



#### 4.2.4.2 Efeito de contato em larvas e pupas

Pupas com idade entre 5 e 8 dias e larvas terceiro instar foram acondicionadas em gaiolas confeccionadas com plástico de poliestireno com capacidade para 250 mL, capa parcela foi pulverizada com 500µL das formulações a 1%, nanoemulsões e óleo essencial (controle positivo), emulsificante Tween 80 1% e água destilada (controle negativo). Foi então adicionado vermiculita e fechado com tecido tipo “filó” na sua parte superior e mantidas em condições naturais. Cada unidade amostral foi constituída de 20 larvas no terceiro instar e com cinco repetições, o mesmo para as pupas com idades entre cinco e oito dias. A avaliação das larvas e pupas foi realizada após sete dias da instalação do experimento. Para as larvas, foram avaliados o percentual de pupas formadas bem como análise de adultos inviáveis e para pupas o percentual de adultos emergidos e de adultos com defeito (apresentavam deficiência nas asas, que mantiveram a casca da pupa presa ou qualquer outro tipo de anomalia).

A mortalidade foi corrigida de acordo com a fórmula de Abbott (1925), descrita a seguir:

$$M_c = \frac{(\%M_o - \%M_t) \times 100}{100 - \%M_t} \quad (2)$$

Em que:

Mc	mortalidade corrigida;
Mo	mortalidade observada;
Mt	mortalidade da testemunha.

Os dados de mortalidade corrigida foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

### 4.3 Resultados e Discussão

#### 4.3.1 Rendimento e Composição dos óleos essenciais

Os resultados da extração de OE de *L. insignis* tiveram um rendimento médio de  $2.39 \pm 0.14$  e para *L. lasiocalycina* média de rendimento de  $1.11 \pm 0.03$ . Na análise da composição dos óleos essenciais, para *L. insignis* os compostos majoritários foram E-ocimenona ( $23.54 \pm 0.2\%$ ), limoneno ( $14.12 \pm 0.37\%$ ),  $\beta$ -mirceno ( $12.97 \pm 0.17\%$ ) e p-cimeno ( $13.67 \pm 0.31\%$ ) (Tabela 9). Para a espécie *L. lasiocalycina* os constituintes

majoritários foram  $\beta$ -mirceno ( $24.60 \pm 0.98\%$ ) e E-ocimenona ( $32.98 \pm 1.81\%$ ) (Tabela 9). Esses valores estão de acordo com os achados por Bispo et al. (2016).

Tabela 9. Porcentagem dos constituintes encontrados nos óleos essenciais de folhas de *Lippia insignis* Moldenke e *Lippia lasiocalycina* Cham. Feira de Santana-BA, 2019.

Composto	IA <sub>lit</sub>	IA <sub>calc</sub>	<i>L. insignis</i>			<i>L. lasiocalycina</i>		
			Média	±	DP	Média	±	DP
α-tujeno	924	928	0.27	±	0.02	0.28	±	0.01
α-pineno	932	937	0.23	±	0.01	0.20	±	0.07
Sabineno	969	977	0.15	±	0.01	0.91	±	0.05
β-mirceno	988	992	12.97	±	0.17	24.61	±	0.98
α-terpineno	1014	1022	0.81	±	0.02	0.88	±	0.08
p-cimeno	1020	1031	13.67	±	0.31	5.64	±	0.14
Limoneno	1024	1034	14.12	±	0.37	0.28	±	0.05
□-β-ocimeno	1032	1038		---		0.14	±	0.01
□-β-ocimeno	1044	1049	1.15	±	0.01	0.85	±	0.04
□-terpineno	1054	1063	2.73	±	0.04	3.86	±	0.57
Linalol	1095	1107	4.17	±	0.09	1.41	±	0.05
Ipsdienol	1140	1150	0.84	±	0.04		---	
Mircenona	1145	1156	9.00	±	0.06	4.16	±	0.21
terpinen-4-ol	1174	1192	0.15	±	0.04		---	
α-terpineol	1186	1204	0.58	±	0.02		---	
Z-ocimenona	1226	1242	7.94	±	0.05	3.31	±	0.22
E-ocimenona	1235	1250	23.54	±	0.20	32.99	±	1.82
Timol	1289	1303	0.25	±	0.01	2.79	±	1.72
Carvacrol	1298	1312		---			Traços	
Piperitenona	1340	1356		---		0.15	±	0.02
α-copaeno	1374	1381		---		0.17	±	0.02
β-elemeno	1389	1395		---		0.12	±	0.02
E-cariofileno	1417	1427	0.93	±	0.05	3.06	±	0.34
α-guaieno	1437	1441		---		1.77	±	0.25
α-humuleno	1452	1464	0.22	±	0.03	1.11	±	0.10
germacreno D	1484	1489	0.67	±	0.02	0.30	±	0.05
biciclogermacreno	1500	1504	0.51	±	0.02		---	
α-bulneseno	1509	1509		---		0.69	±	0.06
Espatuleno	1577	1590	1.47	±	0.06	1.45	±	0.06
óxido de cariofileno	1582	1595	0.27	±	0.02	1.91	±	0.13
Total de compostos identificados			96.63	±	0.37	93.03	±	0.33

IA<sub>lit</sub> - Índice Analítico da literatura; IA<sub>calc</sub> - Índice Analítico calculado de acordo com padrão

#### 4.3.2 Preparo das nanoemulsões

A triagem inicial da produção dos sistemas coloidais foi realizada usando diferentes razões tensoativo/óleo essencial. Amostras com proporção tensoativo/óleo essencial maior que 2 apresentaram aspecto macroscópico branco/turvo, característico de sistema com tamanho de gotícula superior à 150nm. Portanto, as formulações finais foram produzidas usando proporção 1:1 tensoativo: óleo essencial. As duas microemulsões produzidas apresentaram aspecto amarelo transparente (Figura 9) tamanho nanométrico (44,5 – 47,4 nm), com baixo índice de polidispersão (0,162 – 0,174) e carga de superfície negativa (-8,6 - -9,1 mV) (Tabela 10).

Tabela 10. Características das emulsões obtidas a partir de óleos essenciais das espécies de *Lippia insignis* Moldenke e *Lippia lasiocalycina* Cham. Feira de Santana, 2019.

Microemulsão	Aspecto macroscópico	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
<i>L. lasiocalycina</i>	Transparente	44,5± 1,3	0,162	- 8,6 ± 1,6
<i>L. insignis</i>	Transparente	47,4± 1,2	0,174	- 9,1 ± 0,9

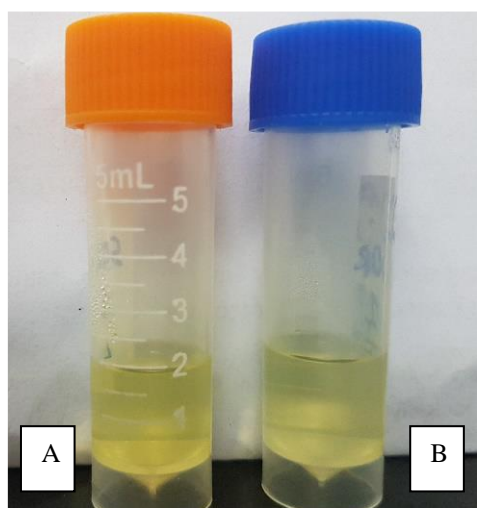


Figura 9. Microemulsão obtidas a partir do óleo essencial *Lippia insignis* Moldenke (A) e *Lippia lasiocalycina* Cham. (B) com razões tensoativo/óleo essencial 1:1. Feira de Santana, 2019.

O índice de polidispersão indica a qualidade da separação dos glóbulos da formulação medida pela distribuição dos diâmetros dos glóbulos, podendo variar de 0,1 à 1,0. Valores mais próximos de 1,0 indicam sistema heterogêneo, com diâmetros distintos das partículas em suspensão (JAFARI et al., 2008; KLANG, et al., 2012).

Portanto, os baixos valores de PDI e mais próximos de 0,2 demonstram que estas apresentaram boa homogeneidade granulométrica.

O potencial Zeta tem influência direta sobre a estabilidade da emulsão, através da avaliação do grau da repulsão ou da atração eletrostática ou ainda das cargas entre partículas. Valores entre 30 mV e -30 mV indicam que a emulsão pode sofrer floculação, pois quanto maior a repulsão, maior a estabilização eletrostática para manter a repulsão dos glóbulos e evitar separação de fases. Essas características indicam que a formulação pode ter maior tempo de prateleira mantendo a composição química e atividade dos compostos.

Gonzalez et al. (2014), testaram nanopartículas formadas com óleo essencial de gerânio e bergamota e polietilenoglicol 600 (10%), contra dois insetos que atacam de cereais armazenados *Triboliumcastaneum* (H.) e *Rhyzoperthadominica* (Fabr.). Foram realizados teste de contato e os resultados mostram que as nanopartículas aumentaram a eficiência dos óleos e inibiram degradação diâmetro médio <235 nm (PDI <0,280) As nanopartículas produziram toxicidade de contato durante 16 e 12 semanas, enquanto os OEs isoladamente produziram toxicidade apenas por 4 e 2 semanas, respectivamente, para gerânio e bergamota. As nanoformulações têm a capacidade de produzir efeitos prolongados devido a liberação gradativa dos ativos encapsulado.

Nanoemulsões de óleo essencial de *Citrus sinensis* (laranja) e polisorbato 80, também produzidas com agitação magnética seguida de ultrassom à frequência de 20 kHz por 10 min, com ciclos de 30 s de pulsos 1 s de pausa. Produzindo nanoemulsão com tamanho de gotícula de 20 a 30 nme o índice de polidispersão foi menor que 0.2. A formulação foi testada contra *Saccharomycescerevisia* para efeito anti-levedura, tanto em meio de cultura, quanto em suco de maçã. Os resultados mostram que além de efetivas e estáveis as formulações fizeram com que as leveduras começassem a perder viabilidade com 30 minutos de contato, resultando em 100% inviáveis em 24h (SUGUMAR et al., 2016).

Ge e Ge (2016) apresentaram lipossomas preparados com óleo essencial *Melaleucaalternifolia* e Tween 80 e seus efeitos antimicrobianos contra três cepas, *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positiva), *Escherichia coli* (bactéria Gram-negativa) e *Candida albicans* (fungo). As formulações com características nanométricas: tamanho de partícula (75 nm), índice de polidispersão (0.123) e potencial zeta (-7.45 mV) foram mais eficientes contra os microrganismos testados do que o OE não encapsulado.

### 4.3.3 Ensaios de Toxicidade

Os ensaios realizados em indivíduos de *C. capitata* em fase adulta mostram efeito significativo dos OEs e das nanoemulsões das espécies *Lippia insignis* e *Lippia lasiocalycina* a partir das primeiras 24h, promovendo morte de quase 50% das moscas (Tabela 11), aumentando significativamente nas avaliações realizadas após 48 e 72h. As nanoemulsões apresentaram efeitos superiores em relação aos OEs apenas na avaliação realizada após 24h.

Tabela 11. Taxa de mortalidade de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) frente a nanoemulsões obtidas a partir de óleos essenciais de *Lippia insignis* Moldenke e *Lippia lasiocalycina* Cham. Feira de Santana, 2019.

Tratamento	% de mortalidade de adultos a 1%		
	24h	48h	72h
Nano OE <i>L. insignis</i>	48,0bA	50,0bA	56,0 aA
OE <i>L. insignis</i>	30,0bB	50,0aA	50,0aA
Nano OE <i>L. lasiocalycina</i>	46,0bA	48,0bA	54,0aA
OEL <i>Lasiocalycina</i>	24,0 bC	50,0aA	50,0aA
Controle (água)	0,0	0,0	0,0
Controle (água e Tween)	0,0	0,0	0,0
CV (%)	10,68%	8,42%	12,19%

Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância. Letra maiúscula para coluna e minúscula para linha.

Os valores do coeficiente de variação (CV) ocuparam intervalo de 8,42 a 12,29%, indicando elevado controle experimental e maior sensibilidade aos testes de média (PIMENTEL-GOMES, 2009).

As nanoemulsões a 1% não apresentaram efeito sobre pupas, considerando a emergência e a viabilidade dos adultos, sugerindo que é preciso uma concentração mais elevada para conseguir impedir a emergência. Oviedo et al. (2017) testaram o efeito inseticida dos óleos essenciais de *Baccharisdracunculifoliae Pinus elliottii* 8% frente a pupas de *C. capitata* e os resultados mostram que os óleos foram eficazes, conseguindo inibir 100% de emergência. Os compostos majoritários foram  $\beta$ -pineno (22.69%) e limoneno (19.07%) para *Baccharisdracunculifolia* e  $\alpha$ -pineno (39.25%) e  $\beta$ -pineno

(34.79%) para *Pinus elliottii*. Assim, acredita-se que sejam necessárias concentrações mais elevadas de OE para conseguir efeito sobre pupas.

Outro estudo verificou o efeito de óleos essenciais e nanoemulsões como inseticida contra pragas pós-colheita de grãos, utilizando o método de fumigação. Os autores verificaram que o óleo essencial de *Ageratumconyzoides* apresentou atividade contra adultos de *Callosobruchusmaculatus* (besouro do caupi) com LC50s variando de 19,2 a 77,8 ml / l de ar, enquanto as nanoemulsões (48.6 e 136.3 nm) apresentaram LC50s de 4,5 a 24,3 ml / l ar (NENAAH, IBRAHIM e AL-ASSIUTY, 2015).

Considerando a mortalidade de larvas no terceiro instar, após tratamento com soluções de OE de *L. insignis* e *L. lasiocalcina* e nanoemulsões a 1%, observou-se apenas 32% de emergência, enquanto com OE de promoveu 61%, para *L. Insignis* (Tabela 12). Para *L. lasiocalcina* verificou-se 59% de emergência e, destes, 50% eram inviáveis, enquanto o OE possibilitou 78% de emergência. Já nos controles negativos verificou-se emergência de mais de 90% (Tabela 12). Esses resultados indicam a maior eficiência das nanoemulsões frente a larvas terceiro instar, consequência do aumento da polaridade, fazendo com que seja mais fácil os OEs serem absorvidos pelas larvas. Foram observados efeitos subletais como asas grudadas no dorso, não emergência total, com parte da casca da pupa ainda acoplada ao corpo, tornando adultos inviáveis.

Tabela 12. Taxa de emergência de larvas em terceiro instar de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) frente a nanoemulsões obtidas a partir de óleos essenciais de *Lippia insignis* Moldenke e *Lippia lasiocalcina* Cham. Feira de Santana, 2019.

Formulação a 1%	Taxa emergência (%)	Adultos viáveis (%)
Nano OE <i>L. insignis</i>	32,00 A	50,00 A
OE <i>L. insignis</i>	61,00B	100,00 B
Nano OE <i>L. lasiocalcina</i>	59,00 B	50,00 A
OEL. <i>Lasiocalycina</i>	78,00 C	100,00 B
Controle (água)	95,00 D	100,00 B
Controle (água e Tween)	90,00 D	100,00 B
CV (%)	33%	

Médias seguidas por letras distintas, comparando em coluna, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

Duarte et al. (2015) avaliaram a atividade larvicida de nanoemulsão de óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. a 5%, preparada com surfactante não iônico polisorbato 20. Os testes foram realizados contra larvas de *Aedes aegypti* e verificaram 90% de mortalidade com 48h. A nanoemulsão apresentou diâmetro inferior a 200 nm e

PDI  $-0.6351$ . Outro estudo determinou a eficácia larvívora de nanoemulsão contendo óleo essencial de *Mentha longifolia* L. contra *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), traça de farinha. Os autores verificaram LC<sub>50</sub> de 21352 ppm para OE enquanto que para nanoemulsão foi de 14068 ppm. A nanoemulsão com tamanho de partículas 234 nm foi mais efetiva e teve maior durabilidade (LOUNI, SHAKARAMI, NEGAHBAN, 2018).

As nanoemulsões são uma solução viável para reduzir as dificuldades encontradas para uso de óleos essenciais como biopesticidas, pois aumentam a permanência, a estabilidade e a biodisponibilidade desses óleos. Permitindo assim atuar também em organismos com barreiras mais hidrofílicas, como larvas de insetos.

#### **4.4 Conclusão**

As nanoemulsões obtidas a partir de óleos essenciais de *Lippia insignis* e *Lippia lasiocalycina*, com Tween® como surfactante e usando ultrassom apresentam-se promissoras no controle da mosca do mediterrâneo. As nanoemulsões apresentam características físico-químicas desejáveis para se alcançar maior atividade e estabilidade, possibilitando o uso desses óleos essenciais na agricultura. Os testes de atividade de toxicidade de contato contra mosca do mediterrâneo apresentaram efeito tóxico acima de 50% em adultos e larvas, mesmo em baixa concentração (1%).



#### 4.5 Referências

ABBOTT, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide.

**Journal of Economic Entomology**.v.18, n.2, p.265-266, 1925.doi:

<http://dx.doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry**. 4th. ed. Carol Stream: Allured Publ., 2007. 804 p.

ATHANASSIOU, C. G. et al. 2018. Nanoparticles for pest control: current status and future Perspectives. **Journal of Pest Science**. 91, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0898-0>

BALI, V.; ALI, M.; ALI, J. 2010.Study of surfactant combinations and development of a novel nanoemulsion for minimising variations in bioavailability of ezetimibe.

**Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 76(2):410-20. doi:

10.1016/j.colsurfb.2009.11.021.

BENELLI, G., et al. 2012. Toxicity of some essential oil formulations against the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae).**Crop Protection** 42 223e229.doi: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.05.024>

BISPO et al. 2016.Effect of indolebutyric acid and cutting type on vegetative propagation of three *Lippia* species. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.46, n.8, p.1364-1367.

CAMPOLO, O., et al. 2017.Citrus peel essential oil nanoformulations to control the tomato borer, *Tuta absoluta*: chemical properties and biological activity. **Scientific Reports**.7, 13036. [10.1038/s41598-017-13413-0](https://doi.org/10.1038/s41598-017-13413-0)

DORLA, E., et al., 2017.Insecticidal activity of the leaf essential oil of *Peperomia borbonensis* Miq. (Piperaceae) and its major components against the melon fly *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). **Chemistry Biodiversity**.14(6). [10.1002/cbdv.201600493](https://doi.org/10.1002/cbdv.201600493).

DUARTE, J.L. et al. 2015. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 25, 89–192. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.02.010>

ERDEMIR, T.; ERLER, F. 2017. Repellent, oviposition-deterrent and egg-hatching inhibitory effects of some plant essential oils against citrus mealybug, *Planococcus citri* Risso (Hemiptera: Pseudococcidae). **Journal of Plant Diseases and Protection**. doi: [10.1007/s41348-017-0112-x](https://doi.org/10.1007/s41348-017-0112-x)

GE, Y.; GE, M. 2016. Distribution of *Melaleuca alternifolia* essential oil in liposomes with Tween 80 addition and enhancement of in vitro antimicrobial effect. **Journal of Experimental Nanoscience**. 11:5, 345-358, doi: [10.1080/17458080.2015.1065013](https://doi.org/10.1080/17458080.2015.1065013)

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. 2013.Formulation and Characterization of Plant Essential Oil Based Nanoemulsion: Evaluation of its

Larvicidal Activity Against *Aedes aegypti*. **Asian Journal of Chemistry**; V. 25.S321-S323.

GHOSH.V. et al. 2014. Ultrasonic emulsification: reduces droplet diameter and enhances stability. **Journal of Pure applied Ultrason.**36, 13.-16.

GONZÁLEZ, J.O.W.; GUTIÉRREZ, M.M.; FERRERO, A.A.; BAND, B.F. 2014. Essential oils nanoformulations for stored-product pest control – Characterization and biological properties. **Chemosphere.** 100, 130–138. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.11.056>

JAFARI, S.M. et al. 2008. Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. **Food Hydrocolloids.**22 (7). pp. 1191-1202.

JAISWAL , M. et al. 2015. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **Biotech** 5, 123-127. 10.1007/s13205-014-0214-0

KHAN, I. et al. 2018. In vitro and in vivo antitumor potential of carvacrol nanoemulsion against human lung adenocarcinoma A549 cells via mitochondrial mediated apoptosis. **Scientific Reports**, 8:144.

KLANG, V. et al. 2012. Electron microscopy of nanoemulsions: an essential tool for characterization and stability assessment. **Micron.** 43(2-3):85-103. doi: 10.1016/j.micron.2011.07.014

LOUNI, M.; SHAKARAMI, J.; NEGAHBAN, M. 2018. Insecticidal efficacy of nanoemulsion containing *Mentha longifolia* essential oil against *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of crop protection.**7 (2): 171-182

LU, W.C. et al. 2018. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. **Journal of food and drug analysis.** 26, 82-89. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.12.018>

MASON, T.G. et al. 2006. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics.: Condensed Matter.** 18, 635-666.

MIGUEL et al. 2010. Toxic Effects of Three Essential Oils on *Ceratitis capitata*. **Journal of essential oil-bearing plants JEOP** 13(2):191-199. doi: 10.1080/0972060X.2010.10643811

MOSSA, A. 2016. Green Pesticides: Essential Oils as Biopesticides in Insect-pest Management. **Journal of Environmental Science and Technology.** ISSN 1994-7887. doi: 10.3923/jest.2016.354.378

NENAAH, G.E.; IBRAHIM, S.I.A.; AL-ASSIUTY, B.A. 2015. Chemical composition, insecticidal activity and persistence of three Asteraceae essential oils and their nanoemulsions against *Callosobruchus maculatus* (F.). **Journal of Stored Products Research.** 61, 9-16. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jspr.2014.12.007>

OVIEDO, A.; NIEUWENHOVE, G.V.; NIEUWENHOVE, C.V.; RULL, J. 2017. Biopesticide effects on pupae and adult mortality of *Anastrepha fraterculus* and

- Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Austral Entomology**. V.57, i.4. 457-464. doi:<https://doi.org/10.1111/aen.12296>
- PALACIOS, S.M., et al., 2009. Efficacy of Essential Oils from Edible Plants as Insecticides Against the House Fly, *Musca Domestica* L. **Molecules**. 14, 1938-1947. 10.3390/molecules14051938
- PAPANASTASIOU, S.A. et al., 2017. Toxic and hormetic-like effects of three components of citrus essential oils on adult Mediterranean fruit flies (*Ceratitis capitata*). **PLoS ONE** 12(5): e0177837. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177837>
- PAVELA, R.; BENELLI, G. 2016. Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. **Trends in Plant Science**. V.21, N.12. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.005>
- PEHLEVAN, B.; KOVANCI, O.B. 2016. Laboratory Evaluation of Tween 20 for Potential Use in Control of *Cacopsylla pyri* L. Eggs and Nymphs (Homoptera: Psyllidae). **Journal of Biological and Environmental Sciences**. 10(29), 39-43.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 15. ed. Piracicaba: Fealq, 2009. 451 p.
- RAI, V.K. et al. 2018. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. **Journal of Control Release**. 270:203-225. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.11.049.
- RANITHA, M., ABDURAHMAN, H.N., ZIAD, A.S., AZHARI, H.N., THANA, R.S., 2014. A comparative study of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil extracted by microwave-assisted hydrodistillation (MAHD) and conventional hydrodistillation (HD) method. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**. 5, 104–108. <https://doi.org/10.7763/IJCEA.2014>.
- SEIBER, J.N.; COATS, J.; DUKE, S.O.; GROSS, A.D. 2018. Pest management with biopesticides. **Frontiers of Agricultural Science and Engineering**. 2018, 5(3): 295–300. doi: <https://doi.org/10.15302/J-FASE-2018238>
- SONKER, N.; PANDEY, A.K.; SINGH, P. 2015. Efficiency of *Artemisia nilagirica* (Clarke) Pamp. essential oil as a mycotoxicant against post-harvest mycobiota of table grapes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 95: 1932–1939. doi: 10.1002/jsfa.6901
- SUGUMAR, S.; SINGH, S.; MUKHERJEE, M.; CHANDRASEKARAN, N. 2016. Nanoemulsion of orange oil with non ionic surfactant produced emulsion using ultrasonication technique: evaluating against food spoilage yeast. **Applied Nanoscience**. 6:113–120. doi: 10.1007/s13204-015-0412-z
- TUREK, C.; STINTZING, F.C. 2013. Stability of essential oils: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. 12, 40–53. doi: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do presente trabalho conclui-se que as nanoemulsões obtidas a partir dos óleos essenciais de *Lippia insignis* e *Lippia lasiocalycina* são promissores para controle de adultos e larvas da mosca do mediterrâneo. O estudo destaca a importância de buscar formulações mais eficientes, que permitam estabilização dos óleos e possibilitem a comercialização para uso como defensivo agrícola. Assim, faz-se necessário dar continuidade a essas pesquisas para obtenção de biopesticidas advindos de recursos naturais.

Os resultados alcançados, além de contribuir para a redução do uso de agrotóxicos que impedem o comércio internacional da fruticultura, com melhoria da qualidade das frutas e menor impacto ambiental, estimularão o cultivo e exploração sustentável de duas espécies aromáticas nativas (*Lippia insignis* Moldenke e *Lippia lasiocalycina* Cham), adaptadas ao semiárido, criando novas oportunidades de renda para os agricultores regionais.

Para viabilizar a comercialização desses biopesticidas, é necessidade buscar parcerias com indústrias que possam financiar pesquisas aplicadas e distribuição para os grandes, médios e pequenos produtores de frutas do Brasil.