



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LUANA ALBUQUERQUE LIMA

Avaliação da atividade repelente de nanoemulsões a base de óleo essencial de *Baccharis reticularia* e de três constituintes contra *Tribolium castaneum*

Macapá
2020

LUANA ALBUQUERQUE LIMA

Avaliação da atividade repelente de nanoemulsões a base de óleo essencial de *Baccharis reticularia* e de três constituintes contra *Tribolium castaneum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Dr. Rodrigo Alves Soares Cruz
Coorientadora: Dra. Gisele da Silva Botas Cruz

**Macapá
2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborada por Cristina Fernandes – CRB-2/1569

Lima, Luana Albuquerque.

Avaliação da atividade repelente de nanoemulsões a base de óleo essencial de *Baccharis reticularia* e de três constituintes majoritários contra *Tribolium castaneum*. / Luana Albuquerque Lima; orientador, Rodrigo Alves Soares Cruz; co-orientadora, Gisele da Silva Botas Cruz. – Macapá, 2020.
80 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amapá,
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Pragas agrícolas. 2. Controle de pragas. 3. Inseticidas botânicos. 4. Atividade inseticida. I. Cruz, Rodrigo Alves Soares, orientador. II. Cruz, Gisele da Silva Botas, co-orientadora. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

595.77098116 L732a
CDD. 22 ed.

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Amapá**

BANCA EXAMINADORA

Aluna: LUANA ALBUQUERQUE LIMA

Orientador: RODRIGO ALVES SOARES CRUZ

Coorientadora: GISELE DA SILVA BOTAS CRUZ

Rodrigo Alves Soares Cruz / Presidente
Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.

Cicero Brasileiro de Mello Neto / Membro Titular
Universidade Federal Fluminense, UFF.

Leandro Machado Rocha / Membro Titular
Universidade Federal Fluminense, UFF.

Data: 08/09/2020

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais Rejayne e Luiz e ao meu noivo Raigon, que me incentivam a buscar o melhor de mim e acreditam no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Agradecer dentre seus vários sentidos significa ser grato a algo que não dependeu somente de você. Desta forma, é imprescindível agradecer Àquele que me proporcionou ser da forma que sou, que me deu forças nos momentos que mais precisei, meu Aba Pai. Assim como me deu tranquilidade para enfrentar o mestrado sem tanto desgaste emocional.

Aos meus pais e Rejayne e Luiz, junto com meus irmãos Fernanda e Arthur que sempre me deram todo incentivo, me proporcionando conforto e as ferramentas necessárias para que eu conseguisse conquistar mais essa etapa em minha vida.

Ao meu noivo Raigon que sempre me ajudou, esteve comigo nos momentos difíceis e me incentivou a conquistar essa titulação, demonstrando todo amor e compreensão durante essa trajetória.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Rodrigo Cruz e Prof. Dra. Gisele Botas pela orientação, apoio, amizade e pela confiança que depositam em mim. Agradeço também ao Gustavo, que trouxe mais leveza e alegria refletindo também na orientação que recebi.

À Prof. Dra. Raquel que não limitou esforços para me dar o suporte que precisava, com todo comprometimento e dedicação.

Aos amigos dos laboratórios Nanofito, Arthrolab e Fármacos que me deram todo suporte e estrutura que precisava para desenvolver essa pesquisa que apresentou resultados muito promissores.

À amiga Farmacêutica Paula, que não mediu esforços para me ajudar no desenvolvimento do projeto.

Ao CNPq/FAPEAP pela bolsa de estudos que possibilitou durante um período da Pós-graduação dedicação integral ao programa.

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 AS PRAGAS AGRÍCOLAS E OS DESAFIOS DO SETOR AGRÍCOLA NO BRASIL	14
1.2 <i>Tribolium castaneum</i> , uma PRAGA AGRÍCOLA	17
1.2.1 Controle do <i>T. castaneum</i>	19
1.3 GÊNERO <i>Baccharis</i>	22
1.3.1 <i>Baccharis reticularia</i>	24
1.4 NANOEMULSÕES	28
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.1.1 Objetivos Específicos	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 MATERIAL BOTÂNICO	32
3.2 ÓLEO ESSENCIAL	32
3.3 OBTENÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS NO ÓLEO ESSENCIAL	33
3.4 DETERMINAÇÃO DO EQUILÍBRIO HIDROFÍLICO-LIPOFÍLICO DAS NANOEMULSÕES (EHL)	34
3.5 PREPARO DAS NANOEMULSÕES	34
3.5.1 Caracterização das nanoformulações	35
3.6 INSETOS <i>Tribolium castaneum</i>	36
3.7 ENSAIO BIOLÓGICO DE REPELÊNCIA FRENTE <i>Tribolium castaneum</i>	36
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 ATIVIDADE REPELENTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis reticularia</i> FRENTE AO <i>Tribolium castaneum</i>	39
4.2 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE FORMULAÇÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>B. reticularia</i> E DE SUAS SUBSTÂNCIAS MAJORITÁRIAS	41
4.2.1 Formulações contendo óleo essencial de <i>B. reticularia</i>	44
4.2.2 Formulações de α-pineno	49
4.2.3 Formulações contendo β-pineno	53
4.2.4 Formulações contendo R-(+)-limoneno	60
4.3 ATIVIDADE REPELENTE DAS NANOEMULSÕES FRENTE AO <i>Tribolium castaneum</i>	70

5 CONCLUSÃO.....74

6 REFERÊNCIAS.....75

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

Figura 1: Produção de grãos no Brasil.....	14
Figura 2: Mapa de perdas por grãos avariados no Brasil (em RS milhões).....	17
Figura 3: Fases do <i>T. castaneum</i>	18
Figura 4: Alguns produtos naturais usados no controle físico de <i>Tribolium castaneum</i>	20
Figura 5: Produtos sintéticos e suas estruturas químicas.....	21
Figura 6: Distribuição geográfica do gênero <i>Baccharis</i> no Brasil.....	23
Figura 7: <i>Baccharis reticularia</i>	24
Figura 8: Estrutura química R-(+)-limoneno.....	26
Figura 9: Formação dos isômeros β pineno e α pineno.....	27
Figura 10: Estrutura química α pineno.....	28
Figura 11: Mapa de localização do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba	32
Figura 12: Ilustração de um sistema de hidrodestilação semelhante ao usado por Botas e colaboradores (2017).....	33
Figura 13: Ilustração da diluição realizada para atingir as concentrações.....	36
Figura 14: Representação da divisão do papel de filtro	37

Figura 15: Aspecto visual das formulações	42
Figura 16: Nanoemulsões e seus determinados EHL escolhidos.....	65
Tabela 1: Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de <i>B. reticularia</i>	25
Tabela 2: Composição das nanoemulsões.....	35
Tabela 3: Representação do desenho experimental dos ensaios de ação repelente	37
Tabela 4: Atividade repelente (%) do óleo essencial de <i>Baccharis reticularia</i> contra <i>Tribolium castaneum</i>	40
Tabela 5: Os valores de EHL que geraram as nanoemulsões com as melhores propriedades durante os primeiros 7 dias após o preparo	44
Tabela 6: Tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações contendo óleo essencial de <i>B. reticularia</i>	46
Tabela 7: Tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações contendo α -pineno.....	50
Tabela 8: Tamanho médio das gotículas, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações contendo R-(+)-limoneno	61
Tabela 9: Atividade Repelente contra <i>T. castaneum</i>	70
Gráfico 1: Tamanho e índice de polidispersão das formulações com óleo essencial de <i>B. reticularia</i>	47
Gráfico 2: Potencial Zeta (mV) das nanoemulsões preparadas com óleo essencial de <i>B. reticularia</i>	48
Gráfico 3: Tamanho e índice de polidispersão das formulações com α -pineno.....	51
Gráfico 4: Potencial Zeta de nanoemulsões com α -pineno.....	52

Gráfico 5: Tamanho médio das gotículas e índice de polidispersão das formulações com β -pineno.....	55
Gráfico 6: Potencial Zeta de nanoemulsões com β -pineno.....	57
Gráfico 7: Tamanho médio das gotículas e índice de polidispersão das nanoemulsões de β -pineno.....	59
Gráfico 8: Potencial zeta das nanoemulsões de β -pineno.....	59
Gráfico 9: Tamanho e índice de polidispersão das formulações com R-(+)-limoneno.....	62
Gráfico 10: Potencial Zeta (mV) das nanoemulsões preparadas com R-(+)-limoneno.....	63
Gráfico 11: Acompanhamento do tamanho médio das gotículas (nm), índice de polidispersão e potencial zeta (mV) da nanoemulsão contendo óleo essencial de <i>B. reticularia</i> (EHL 15).....	66
Gráfico 12: Acompanhamento do tamanho médio das gotículas (nm), índice de polidispersão e potencial zeta (mV) da nanoemulsão contendo α -pineno (EHL 13) ..	67
Gráfico 13: Acompanhamento do tamanho médio das gotículas (nm), índice de polidispersão e potencial zeta (mV) da nanoemulsão contendo β -pineno (EHL 15) ..	67
Gráfico 14: Acompanhamento do tamanho das gotículas (nm), índice de polidispersão e potencial zeta (mV) da nanoemulsão contendo R-(+)-limoneno (EHL 15)	69

Avaliação da atividade repelente de nanoemulsões a base de óleo essencial de *Baccharis reticularia* e de três constituintes majoritários em *Tribolium castaneum***RESUMO**

Introdução A utilização de produtos químicos para controle das pragas agrícolas é bastante difundida atualmente. Dessa forma, estudos voltados ao uso de óleos essenciais e substâncias extraídas de plantas com atividade biológica tem se tornado promissor para controle de pragas, como *Tribolium castaneum*. Atividades que envolvem ação inseticida e repelente encontradas em plantas são de grande interesse para combater esses insetos. Considerado que a praga agrícola, *T. castaneum* presente em grãos armazenados causam grande perda financeira para os produtores de grãos, faz-se necessárias novas estratégias que possam proporcionar o manejo ecológico desses insetos-pragas. **OBJETIVO:** Assim, o objetivo foi desenvolver nanoformulações a base de óleo essencial da *Baccharis reticularia* DC. e de três de seus principais constituintes, R-(+)-limoneno, α -pineno e β -pineno, e avaliar ação repelente frente ao inseto *Tribolium castaneum*. **Metodologia:** Foram desenvolvidas e avaliadas as estabilidades das quatro nanoemulsões em períodos determinados para cada uma. Assim como foi feita a avaliação dessas nanoemulsões com possível atividade repelente em concentrações diferentes frente ao *T. castaneum*. **Resultados e discussões:** Os resultados foram promissores, as nanoemulsões apresentaram estabilidade cinética por um período maior do que geralmente é avaliado em estudos, o que comprovou a possibilidade de desenvolvimento de um produto em grande escala a base de óleo essencial, com maior biodisponibilidade e especificidade. As concentrações testadas frente ao *T. castaneum* tiveram ótimos resultados principalmente nas concentrações maiores, como 17,6 e 8,8 $\mu\text{g cm}^{-2}$, classificados por McDonalds com o maior índice de repelência (Classe V). **Conclusões:** O óleo essencial de *Baccharis reticularia* e suas substâncias majoritárias são importantes fontes de ação repelente contra *T. castaneum*, sendo uma alternativa promissora aos atuais repelentes sintéticos usados no controle desse inseto.

Palavras-chave: Alecrim-da-praia; Besouro castanho; Pragas agrícolas; Nanoformulações.

EVALUATION OF THE REPELLENT ACTIVITY OF NANOEMULSIONS BASED ON ESSENTIAL OIL OF *Baccharis reticularia* AND THREE MAJOR CONSTITUENTS IN *Tribolium castaneum*

Introduction: The use of chemical products to control agricultural pests is widespread today. Thus, studies on the use of essential oils and substances extracted from plants with biological activity have become promising for pest control, such as *Tribolium castaneum*. Activities that involve insecticidal and repellent action found on plants are of great interest to combat these insects. Considering that the agricultural pest, *T. castaneum* present in stored grains causes great financial loss for grain producers, new strategies **Objective:** Thus, the objective was to develop nanoformulations based on essential oil from *Baccharis reticularia* DC. and three of its main constituents, R-(+)-limonene, α -pinene and β -pinene, and to evaluate repellent action against the insect *T. castaneum*. **Methodology:** The stabilities of the four nanoemulsions were developed and evaluated in specific periods for each one. As well as the evaluation of these nanoemulsions with possible repellent activity in different concentrations against *T. castaneum*. **Results and discussion:** The results were promising; the nanoemulsions showed kinetic stability for a longer period than is generally evaluated in studies, which proved the possibility of developing a large scale product based on essential oil, with greater bioavailability and specificity. The concentrations tested against *T. castaneum* had excellent results, mainly at higher concentrations, such as 17.6 and 8.8 $\mu\text{g cm}^{-2}$, classified by McDonalds with the highest repellency index (Class V). **Conclusions:** The essential oil of *B. reticularia* and its major substances are important sources of repellent action against *T. castaneum*, being a promising alternative to the current synthetic repellents used to control this insect.

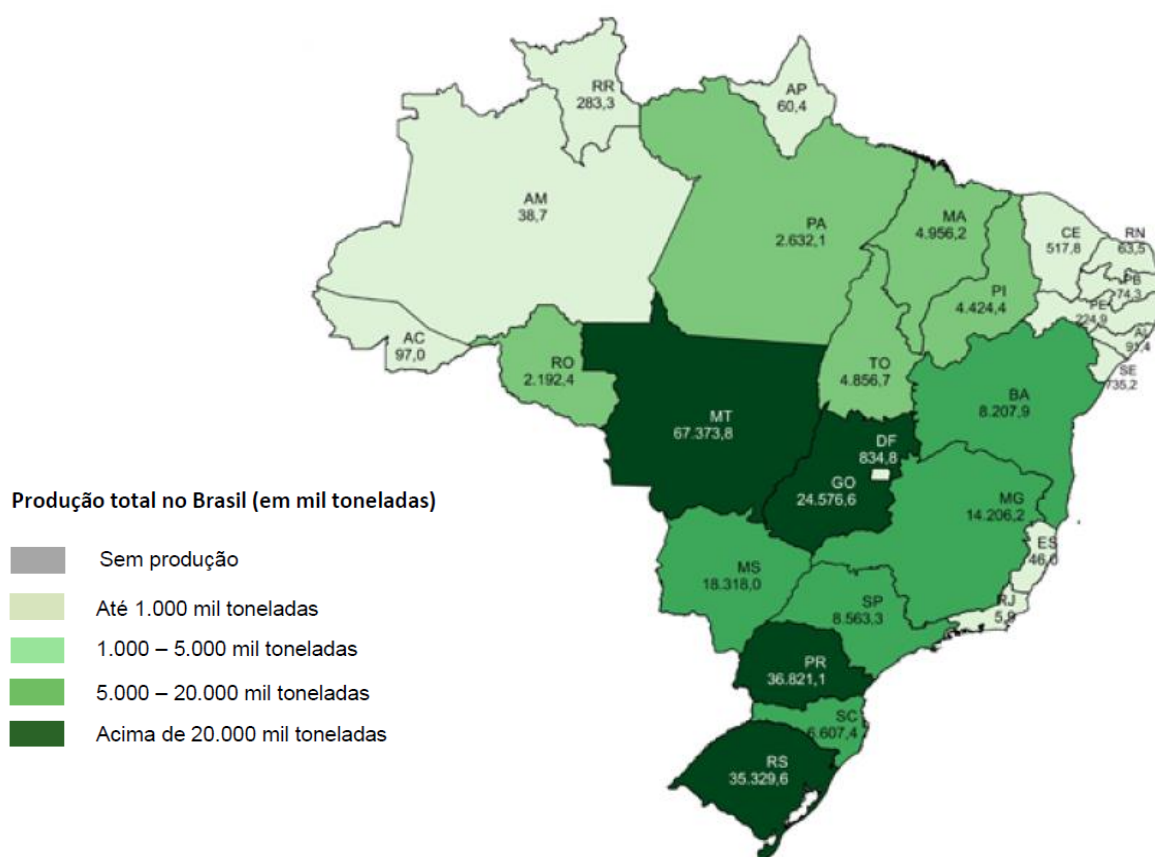
Keywords: Rosemary-of-the-beach; Brown beetle; Agricultural pests; Nanoformulations.

1.1 AS PRAGAS AGRÍCOLAS E OS DESAFIOS DO SETOR AGRÍCOLA NO BRASIL

Devido ao crescimento populacional e a grande procura por grãos no país se fazem necessários investimentos para suprir a demanda da população. A influência no setor econômico do ramo agrícola promove impacto positivo no PIB brasileiro. De acordo com a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA), cerca de 21% do PIB brasileiro foi decorrente das atividades do agronegócio em 2017. Em 2018 esse percentual se manteve e as previsões até o final do ano de 2019 era de uma alta de 1,57% nesse índice.

Na produção de grãos houve um crescimento de 6,4%, passando de 227,7 em 2017/18, para 242,1 milhões de toneladas na safra atual distribuídos em todo país (Figura 1) (CONAB, 2019).

Figura 1: Produção de grãos no Brasil



Fonte: Conab (2019)

Os principais grãos produzidos no Brasil são soja, milho e arroz. Nos anos 2018 e 2019 a produção de soja atingiu 115 milhões de toneladas, acompanhada pelo milho com produção de 99,98 milhões e o arroz com 10,4 milhões (CONAB, 2019). No mercado internacional apresenta destaque, estando na posição de primeiro maior produtor mundial de soja com 123 milhões de toneladas para safra de 2019/20 e como terceiro maior produtor de milho com 101 milhões de toneladas. No país o consumo de soja é equivalente a 46,5 e de milho 68 milhões de toneladas. Perceber a importância e a influência econômica que a indústria de grãos tem para o Brasil agregam valor a cadeia produtiva. No ano de 2018 a safra totalizou 226,5 milhões de toneladas, em 2019 a produção foi de 242,1 milhões de toneladas, cerca de 3,1% a mais que em 2018, e para 2020 a estimativa é de 246,6 milhões de toneladas, com aumento de cerca de 1,9% em relação à safra anterior (CONAB, 2019).

Esse aumento na produção de grãos exige maior elaboração de estratégias para manter a qualidade do mesmo, isso inclui as etapas de produção até a chegada dos grãos a mesa do consumidor e, uma dessas etapas é o processo de armazenamento. Dentro da produção de grãos existe sequência de operações como limpeza, secagem, tratamento fitossanitário, transporte e classificação que influenciam diretamente na qualidade do grão (ELIAS, 2003). Esse processo se torna indispensável, pois é responsável em receber a produção, conservar em condições físicas, químicas e biológicas controladas para então redistribuir para o consumidor (PATURCA, 2014). Existem órgãos, como Conab (Companhia Nacional de Abastecimento), e leis que avaliam e fiscalizam o sistema de armazenagem desses produtos (LEI 9.973, DE 29 DE MAIO DE 2000) dispondo de critérios que caracterizam as condições corretas para armazenagem dos grãos.

Dessa forma, devido a exigência das legislações e do mercado foram criados Procedimentos Operacionais Padronizados (POP's) e guias que elaboram um roteiro, possibilitando o acompanhamento e controle de todas as operações realizadas (BORGES, 2015). Essas operações visam manter padrões de qualidade desejáveis como baixo teor de umidade, baixo índice de degradação, pouca susceptibilidade à quebra e baixa porcentagem de grãos danificados, alto peso específico, alto índice de viabilidade de sementes e ausência de microrganismos e pragas (REGINATO et al., 2010). No entanto, devido a problemas enfrentados na prática inadequada durante o armazenamento tem se registrado anualmente no Brasil perdas muito grandes na qualidade dos grãos (JÚNIOR et al., 2012).

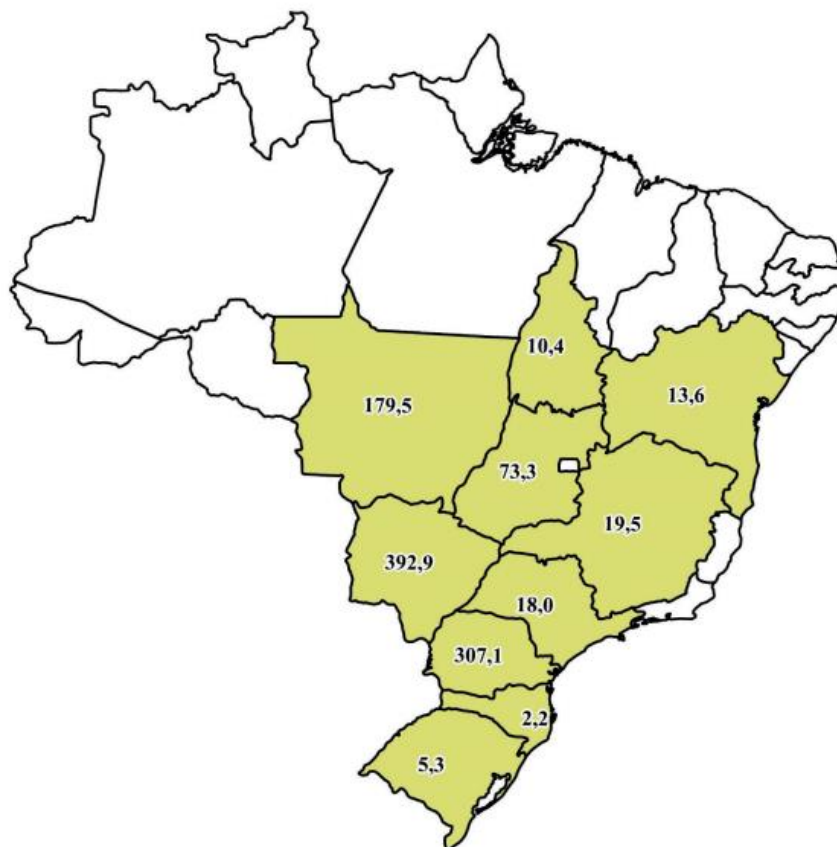
Essas perdas de grãos podem acontecer em algumas etapas, como durante o armazenamento na fazenda e na movimentação para os portos (COSTABILE, 2017).

Devido ao fato da capacidade de armazenagem não condizer com a capacidade de produção de grãos, a logística de operação para transporte e armazenamento gera perdas (PATINO et al., 2013). Além desses fatores, existem outros problemas que acometem os grãos como grãos mofados, fermentados e danificados. Em estudo realizado por (HIRAKURI; LORINI; KRZYZANOWSKI, 2019) analisando a safra de 2014 a 2017 foi possível concluir que a perda da produção soja nos 10 estados avaliados afetou em cerca de 1,0 bilhão de reais a economia do Brasil (Figura 2). Cerca de 84,6% de grãos são acometidos por pragas, verificando a influência direta na economia do país e o impacto causado pelas pragas de grãos.

Na safra dos anos 2000 houve um estudo pioneiro que analisou as principais perdas de grãos no Brasil, que atingiu 10% da colheita. Uma das principais causas foi a infestação por pragas (BRASIL, 2005). Atualmente as causas mais comuns continuam sendo a exposição de grãos às condições climáticas, roedores e pragas como o besouro *Tribolium castaneum* (PATINO et al., 2013). As pragas agrícolas são classificadas em primárias e secundárias. As pragas primárias infestam os grãos saudáveis podendo estar instaladas na parte interna ou externa. Quando as pragas primárias penetram os grãos, completam seu desenvolvimento se alimentando do interior do mesmo e possibilitam a instalação de pragas secundárias que se aproveitam dessa infestação. As pragas primárias internas podem ser *Rhyzopertha dominica* (Fabricius, 1972), *Sitophilus oryzae* (Linnaeus, 1763) e *Sitophilus zeamais* (Motschulsky, 1855) e a externa *Plodia interpunctella* (Hübner, 1813).

Cryptolestes ferrugineus (Stephens, 1831), *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus, 1758) e *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) são pragas secundárias que não têm capacidade de atingir o grão saudável, pois não apresentam características anatômicas que os permite romper o tegumento dos grãos. Desta forma, devido ao dano realizado pelas pragas primárias os insetos pragas têm acesso ao interior do grão possibilitando os mesmos de se alimentarem e multiplicarem (LORINI et al., 2015).

Figura 2: Mapa do Brasil com as perdas em reais de grãos avariados (em RS milhões)



Fonte: HIRAKURI; LORINI; KRZYZANOWSKI, 2019.

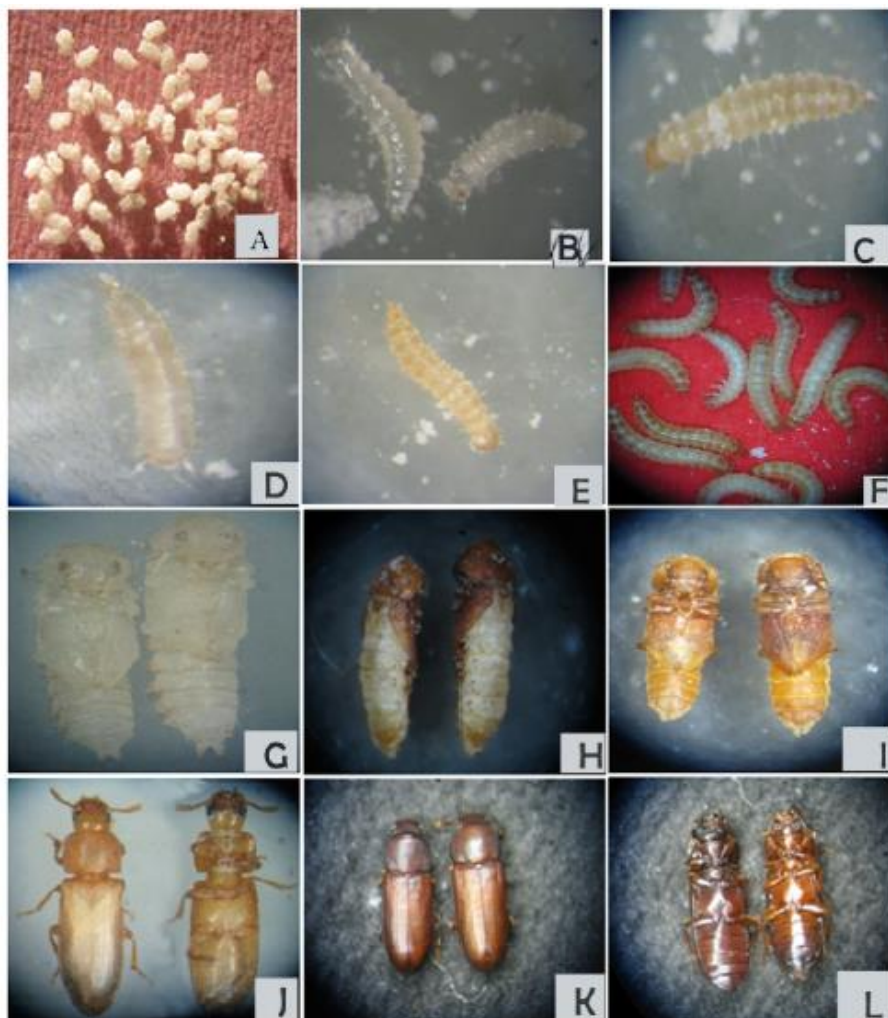
1.2 *Tribolium castaneum*, uma PRAGA AGRÍCOLA

A espécie *Tribolium castaneum* pertence à grande família Tenebrionidae que apresenta cerca de 10 mil espécies de insetos, no qual 100 estão relacionados a produtos armazenados (FRABETTI, 2009; FARIAS, 2010). Popularmente são conhecidos como “besouros vermelhos” por ser uma das suas características a coloração castanho avermelhada. Essa espécie é considerada uma praga secundária por se alojar em grãos previamente danificados por pragas primárias e desenvolver seu ciclo biológico dentro do grão.

Em estudo feito por Devi e colaboradores (2017), o ciclo biológico do *T. castaneum* foi avaliado em temperatura de 29°C e umidade relativa de 59%. Nesse estudo foi comprovada a duração do ciclo de vida total de um besouro de 164 a 194 dias. Além disso, observando o comportamento dos *T. castaneum* verificou-se a postura no primeiro dia de aproximadamente 24 ovos por fêmeas com período de 4 a 5 dias. Seus estágios como larva duraram média de 76 dias com posterior evolução para pupa, que permaneceram nesse

estágio por média de 8 dias. Os machos adultos viveram de 45 a 67 dias e as fêmeas de 75 a 89 dias (Figura 3).

Figura 3: Fases de desenvolvimento do *T. castaneum*



Legenda: A: Ovos; B: Estágio primário larval. C: Estágio secundário larval; D: Estágio de muda da segunda fase. E: Terceiro estágio. F: Estágio maduro. G: Estágio de pré pupa – macho e fêmea. H: Estágio de pós pupa, macho e fêmea, parte dorsal. I: Pós pupa, parte ventral, macho e fêmea. J: Estágio inicial adulto. K: Parte dorsal, adulto macho e fêmea. L: Parte ventral adulto - macho e fêmea.

Fonte: Devi e Devi, 2015

Os problemas causados por esses insetos são de ocorrência mundial, atingindo cereais como arroz, milho e trigo (FRABETTI, 2009; FARIAS, 2010). Em estudo realizado por Alencar e colaboradores (ALENCAR *et al.*, 2011) comprovaram que os danos causados pelo *T. castaneum* associado com *Sitophilus zeamais* são irreversíveis ao grão. Reduzem a qualidade final do produto, com aumento do teor de impurezas, perdas de massa dos grãos de milho, aumento da infestação e a presença de fragmentos dos insetos, além de perder qualidade química, nutricional.

Alguns estudos mostram que os impactos causados pela presença desse inseto podem causar diversos efeitos em animais teste, como alta taxa de toxicidade (EL-HASSANEEM, 2003) e efeito carcinogênico (EL-MOFTY, 1989). Esses resultados podem estar relacionados à presença de benzoquinonas, produzidas em glândulas abdominais desse inseto, que funcionam como forma de defesa praticada pelos insetos (EL-DESOUKY et al., 2018). Além disso, a presença de insetos em armazenamento de grãos facilita a presença de outros microrganismos (PIMENTEL et al., 2011) que produzem micotoxinas, como as aflatoxinas, causando também toxicidade e produção de substâncias potencialmente alergênicas (WESTON, 2000).

Outro fator importante que deve ser levado em consideração é o local e tempo de armazenamento. Atta e colaboradores (2019) comprovaram que o trigo apresenta maior impacto de perda de qualidade e quantidade quando armazenado em todos os tipos de sacas, exceto em sacolas herméticas. Sendo assim, é indicada para agricultores a utilização desse tipo de sacola para reduzir a infestação por *T. castaneum*.

Desta forma, todos esses parâmetros analisados quantitativos e qualitativos são utilizados para cotação do produto, podendo caracteriza o mesmo como abaixo dos padrões para comercialização, apresentando uma desvalorização do produto no mercado (ALENCAR et al., 2011) e causando perdas financeiras de investimento, influenciando diretamente no setor econômico do país. Para solucionar e diminuir o impacto causado por esses insetos existem estratégias de controle de pragas que funcionam para combater a proliferação e desenvolvimento dos mesmos.

1.2.1 Controle do *T. castaneum*

Os métodos de controle de pragas são classificados como físico, químico ou biológico que podem ser utilizados isoladamente ou combinados (LORINI et al., 2015). Os físicos consistem em métodos de controle de temperatura, umidade relativa do ar e atmosfera. Uma das técnicas para controle físico do *T. castaneum* pode ser a utilização de inseticida natural à base de terra de diatomáceas (LORINI et al., 2015). Diatomáceas são substâncias provenientes de algas marinhas fossilizadas, que apresentam naturalmente uma fina camada de sílica no qual seus minerais são extraídos, purificados, moídos e peneirados para posteriormente serem misturados ao grão. Uma das principais substâncias para esse tipo de controle é a sílica, que atua desidratando os insetos pelas cutículas,

causando morte dos mesmos (ROSSATO, 2013). No Brasil existem dois produtos comerciais à base de diatomáceas: *Insecto*® e *Keepdry*® (Figura 4).

Figura 4: Alguns produtos naturais usados no controle físico de *T. castaneum*

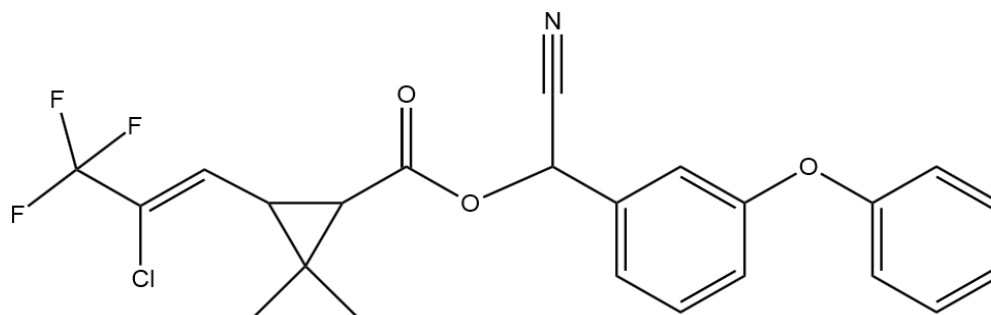


Legenda: A: Keepdry; B: Insecto.

Fonte: Google fotos

Além do controle físico, existe também o controle feito através de inseticidas químicos. Os mais utilizados atualmente são realizados através de aplicações diferentes com inseticidas de classe piretroide (Figura 5) e fosfeto de alumínio. Sua aplicação pode ser de caráter preventivo, caso não haja a infestação; ou curativo com a intenção de reduzir e/ou eliminar a quantidade de insetos pragas (LORINI et al., 2015). A técnica preventiva consiste no emprego de inseticida líquido sobre os grãos através da correia transportadora e através de pulverização. Nessa técnica se faz necessário à distribuição de equipamentos por todo o armazém para que os grãos possam receber de forma igual a impregnação do inseticida (LORINI, 2002). Já a forma curativa é realizada através de expurgo ou fumigação, que consiste na liberação de um gás tóxico (fosfina gerada a partir do fosfeto) em uma concentração letal para todas as fases do inseto. Esse gás é liberado no interior do lote de forma distribuída por todo local de armazenamento sendo necessária vedação (LORINI, 2009).

Figura 5: Estrutura química do piretroide cialotrina



Fonte: A autora.

As vantagens dos métodos físicos e químicos são o período longo de intervalo entre as aplicações e a eficiência dos mesmos. Tendo em vista que em estudo realizado tanto as algas diatomáceas e a utilização do inseticida químico *Fertox*® (Figura 6) a base de fosfina duraram cerca de 7 meses, não afetaram a qualidade fisiológica das sementes de trigo e não permitiram o desenvolvimento do *T. castaneum* (FERREIRA, 2012). Além disso, foi comprovado que, após aplicação de fosfina houve redução da infestação para quantidade inferior a 1% durante o armazenamento e a qualidade fisiológica do grão foi mantida a partir de seis meses quando comparado com os grãos não tratados (JÚNIOR; USBERT, 2007).

Figura 6: Produtos usados no controle de *T. castaneum*: *Fertox*® e *Gastoxin*®



Fonte: Google fotos

O uso incorreto e indiscriminado de produtos químicos inseticidas tem desencadeado problemas como acúmulo de resíduos tóxicos em alimentos, contaminação do meio ambiente, intoxicação dos produtores e seleção de pragas resistentes (CORRÊA; SALGADO, 2011). A resistência a inseticidas tem se tornado um dos principais problemas para combater as pragas de grãos na atualidade e o *T. castaneum* tem apresentado genes resistentes à fosfina (CHEN et al., 2015). No Brasil, o besouro tem a maior seleção de

insetos resistentes já documentada. Essa seleção está diretamente relacionada com genes específicos, em alterações dos aminoácidos P45S das enzimas (HUBHACHEN et al., 2019) e citocromo P450 (HUANG et al., 2019) o que ocasiona um grande problema na indústria de grãos, pois uma das principais formas de combate ao inseto é a utilização de inseticidas do grupo fosfina.

As plantas tem sido estudadas como uma alternativa promissora para descoberta de novos ativos para combate a pragas agrícolas, com menor risco à saúde, menor toxicidade, por serem biodegradáveis e com ação relativamente em períodos semelhantes aos inseticidas sintéticos.

1.3 GÊNERO *Baccharis*

Baccharis pertence à família Asteraceae e possui grande representação com cerca de 23.600 espécies distribuídas no mundo (PANERO, 2008). Esse gênero apresenta 500 espécies distribuídas pelo norte, centro e sul dos continentes americanos, presentes principalmente em regiões com características de clima temperado e tropical, como Brasil, Chile, México e Colômbia (ABAD; BERMEJO, 2006).

No Brasil, dividida em 179 espécies (ZAPPI, 2015), localiza-se na região caatinga, cerrado, assim como na Mata Atlântica, Pampa e Pantanal, distribuído no norte, nordeste, centro-oeste, sudeste e no sul do país (Figura 7) que, com uma área rica em exemplares, é considerado um provável polo de origem do gênero (VERDI, 2005; CAMPOS *et al.*, 2016). Caracterizada por serem arbustos com tamanho de 50 cm a 4 m, as espécies de *Baccharis* são utilizadas nas regiões de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul. Devido à grande diversidade, ampla distribuição e utilização (HEIDEN; SCHNEIDER, 2015) há o despertar na procura por conhecimentos mais aprofundados de suas atividades biológicas (EMERENCIANO et al., 2001; VERDI et al., 2005).

Figura 7: Distribuição geográfica do gênero *Baccharis* no Brasil



Fonte: REFLORA, 2018.

Suas atividades biológicas estão diretamente relacionadas com seus metabólitos secundários. Portanto, a *Baccharis trimera* já foi estudada afim de se avaliar o efeito repelente e inseticida contra insetos pragas de grãos de feijão, com ação comprovada em cerca de 90% de ação inseticida e repelente para as formulações mais concentradas (MOSSI et al., 2015). Além disso, é utilizada tradicionalmente como agente protetor gástrico, doenças na próstata, diabetes, anemias, verminoses, ação antioxidante. Também apresenta um potencial ação para tratar de pacientes diabéticos, desconfortos no fígado e estômago, analgésico, indicada para inflamações (VERDI et al., 2005), e atividade antiviral (CORRÊA, 1984; KORBES, 1995; ABAD; GARCÍA et al., 2002; BERMEJO, 2006^a; SARIKURKCU et al., 2009; STOJKOVIĆ et al., 2011; RASHID et al., 2013; LIMA et al., 2014). Envolve também ação antibacteriana para bactérias gram-negativas e positivas (MIRANDA et al., 2016), antimicrobiana contra a *Staphylococcus aureus* (PEREIRA, 2017), assim como atividade antifúngica para fungos patogênicos (FONSECA et al., 2015).

Estudos realizados por Oliveira (2012) comprovaram que o óleo essencial de *B. trimera* apresenta ação antiparasitária em larvas adultas de *Schistosoma mansoni*, *Baccharis salicifolia* tem atividade repelente contra larvas de *T. castaneum* (GARCÍA et al., 2005). *Baccharis darwinii* tem ação contra insetos, assim como apresenta propriedades antifúngicas (KURDELAS et al., 2012). Em estudos realizados, óleo essencial das folhas de *Baccharis dracunculifolia* também apresentou ação contra larvas de *Culex*

quinquefasciatus (ALVES et al., 2018), *B. trimera* contra larvas de *Aedes aegypti* (SILVEIRA, 2018). Com ação antimalárica, anti-tripanosossoma e inseticida encontramos a espécie *Baccharis microdonta* e com atividade repelente contra percevejo a espécie *Baccharis sphenophylla* (BUDEL et al., 2018).

Para exercer as ações citadas acima, existem substâncias bioativas presentes nas plantas que são responsáveis por essa atividade. O estudo das mesmas identifica quais metabólitos secundários estão diretamente envolvidos na atividade biológica, sendo de extrema importância o estudo e descoberta das substâncias presentes em plantas. Dessa forma, nos últimos 11 anos em estudos de análise química das espécies do gênero, foram encontrados os grupos principais de metabólitos secundários substâncias fenólicas e terpenoides. Durante esse período 27 espécies forneceram 139 diferentes substâncias (CAMPOS et al., 2016). No geral as principais substâncias encontradas são flavonoides e diterpenoides (VERDI et al., 2005). Apesar da maioria das substâncias isoladas serem diterpenoides, os mais ativos biologicamente são as substâncias fenólicas e os constituintes do óleo essencial (ABAD; BERMEJO, 2006).

1.3.1 *Baccharis reticularia*

B. reticularia conhecida popularmente como alecrim da areia, tem sinônimos heterotípicos que são *B. arctostaphyloides* Baker, *B. bahiensis* Baker e *B. micropoda* Baker. É uma espécie endêmica e nativa do Brasil e está presente em regiões de caatinga e cerrado, assim como na Mata Atlântica. Estando distribuídos nordeste, centro oeste, sudeste e no sul do país (REFLORA, 2018).

Os aspectos botânicos de *B. reticularia* são caracterizados por serem arbustos de 1 a 2 metros de altura, ramificado com ramos cilíndricos, estriados e com folhas alternas e espiraladas (BORGES; FORZZA, 2008), de acordo com a figura 8.

Figura 8: *Baccharis reticularia*



Fonte: Gisele da S. B. Cruz, 2012.

Rica em óleos essenciais a *B. reticularia*, em estudo realizado por Santana (2013) e por Budel (2018), contém monoterpenos e sesquiterpenos como os principais constituintes químicos. As substâncias majoritárias analisadas nas três regiões de coleta do estudo de Santana (2013) foram β -pineno, β -felandreno, biciclogermacreno, germacreno-D, espatulenol. Todavia, substâncias como α -pineno e caureno também foram encontradas, mas em quantidades menores. Em estudo realizado por Ferreira e colaboradores (2012) o mesmo identificou como componentes majoritários o α -pineno mais sabineno (39,85%), β -felandreno (27,09%), mirceno (4,71%), germacreno D (4,05%) e biciclogermacreno (6,41%). No entanto, para Botas e colaboradores (2017) a análise do óleo essencial indicou que a substância majoritária encontrada foi o R(+)-limoneno (25,7%), um precursor da biossíntese de monoterpenos, além da presença do caureno (0,7%), sendo esse um componente incomum em óleos essenciais (Tabela 1).

Tabela 1: Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *B. reticularia*

IR	Substância	%
937	α-pineno	7,3
976	Sabineno	0,9
981	β-pineno	8,4
991	β -mirceno	8,5
1026	ρ -cimeno	0,5
1034	R(+)-limoneno	25,7
1177	Terpin-4-ol	0,5
1389	β -elemento	1,2
1418	(E)-Cariofileno	24,6
1481	D-Germacreno	1,7
1494	Biciclogermacreno	11,3
1518	δ -Cardineno	1,1
1580	Spatulenol	3,2
1588	Globulol	0,8
1596	Viridiflorol	0,8
2047	Caureno	0,7

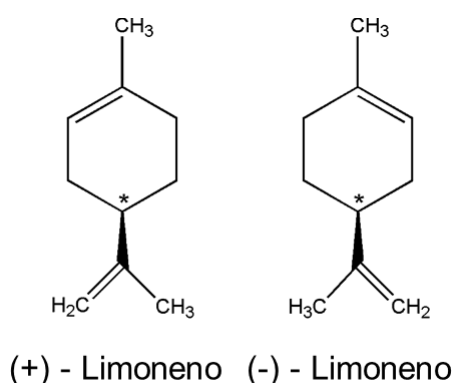
Legenda: IR: índice de retenção; %: Concentração em porcentagem (%)

Fonte: Botas *et al.*, 2017.

As atividades biológicas do óleo essencial de *B. reticularia* estão sendo estudadas, porém existem poucos artigos científicos relacionados a essa espécie. Entretanto, *B. reticularia* demonstrou atividade antitripanossoma, inseticida contra percevejo, e mostrou potencial ação contra *Plasmodium falciparum*, no qual as substâncias que podem ser responsáveis por essa atividade são monoterpenos, β -pineno e R-(+)-limoneno (BUDEL et al., 2018). Atividade larvica tem se mostrado promissora e apresentou bons resultados em estudo realizado por Botas e colaboradores (2017). Nesse estudo, com análise do óleo essencial e a extração do componente majoritário R-(+)-limoneno foram desenvolvidas nanoformulações, que exibiram altas taxas de mortalidade com 48 horas de exposição.

Uma das substâncias majoritárias do óleo essencial da *B. reticularia* é o R-(+)-limoneno (4-isopropenil-1-metilciclo-hexeno), um terpeno precursor da biossíntese de monoterpenos, com forma molecular de $C_{10}H_{16}$ e estrutura química a seguir (Figura 9). Este é bastante encontrado em plantas do gênero *Citrus*, como laranjas, limões e tangerinas (ESPINA et al., 2011).

Figura 9: Estrutura química R-(+)-limoneno

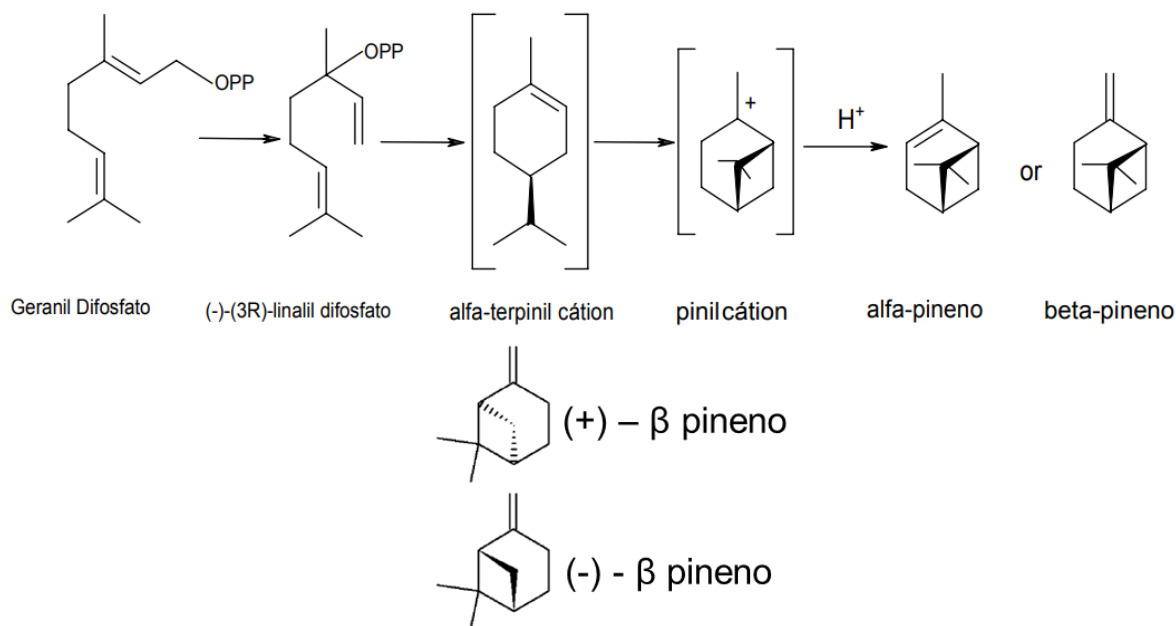


Fonte: A autora.

R-(+)-limoneno tem apresentado diferentes atividades biológicas, como larvica contra larvas de *Anisakis* um parasita nematodo que atinge animais marítimos que quando consumido por humanos podem causar infecção (GIARRATANA et al., 2015). A atividade antiácara contra carrapatos bovinos foi demonstrado por Peixoto e colaboradores (2015), assim como ação antimicrobiana usada para preservação de alimentos (HAÇ-WYDRO et al., 2017) e atividade contra câncer de pulmão, causando a indução de apoptose das células malignas (YU et al., 2018). Apesar de todas as atividades biológicas que o R-(+)-limoneno pode ser aplicado ainda não existem estudos que comprovem ação repelente contra *T. castaneum*.

Além do R-(+)-limoneno presente no óleo essencial, existe também com alta significância a substância β -pineno. Os pinenos são caracterizados por estarem presentes geralmente em pinheiros, alecrim e lavanda, pertence à classe dos terpenos e pode se diferenciar em isômeros β -pineno e α -pineno. Os isômeros são produzidos através do difosfato de geranila (Figura 10), por ciclização do difosfato de linalila e perda de um próton do carbocátion (DEWICK, 2002).

Figura 10: Formação dos isômeros β -pineno e α -pineno



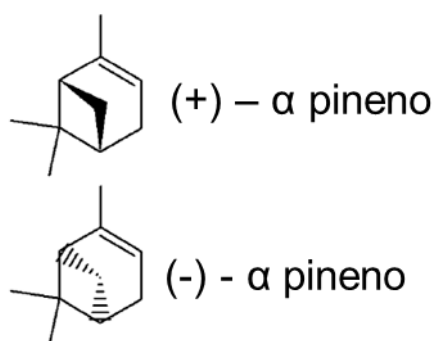
Fonte: DEWICK, 2002.

Em estudo realizado por Andrade (2017), o β -pineno foi capaz de reduzir significativamente o crescimento de *Candida albicans* e também apresentou atividade biológica antibacteriana contra bactérias gram-negativas e positivas (MAGWA et al., 2006). Além disso, atividades biológicas estão correlacionadas diretamente com a presença de pinenos, atribuindo ação inseticida natural. Estudo feito por Li e colaboradores (2015) comprovou ação inseticida e pesticida contra *Ostrinia furnacclis*, uma espécie de mariposa, que está presente na cultura do milho.

O α -pineno é um monoterpeneo bicíclico bastante encontrado em pinheiros e derivado biossinteticamente do geranil difosfato (Figura 11). Difere do seu isômero β pela orientação espacial do carbono da ponte. Biologicamente, o α -pineno tem atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (SOUZA, et al., 2019) e antitumoral contra câncer de cólon (PADUCH, et al., 2016). O óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, com composição de até 38% de α -pineno também apresentou ação antifúngica,

inibidor enzimático (SATYAL et al., 2017), assim como larvicida contra *Aedes aegypti*, com 9,4% de α -pineno presente no óleo essencial (DUARTE et al., 2015). O óleo essencial de *Curcuma longa* apresentou ação fumegante contra as pragas de grãos *Sitophilus oryzae* e *Rhyzopertha dominica*, contendo α -pineno em sua composição química (GANGWAR; TIWARI, 2017).

Figura 11: Estrutura química α -pineno



Fonte: Google fotos, 2019.

Apesar das atividades biológicas do óleo essencial e de suas substâncias majoritárias serem biologicamente ativas, existem desvantagens na aplicação e utilização dos mesmos. Os óleos essenciais por serem sensíveis a fatores ambientais, imiscíveis em água e altamente voláteis, resulta seu efeito em um curto período de tempo, além de apresentar limitações para aplicação com diferentes finalidades. Sendo assim, a nanotecnologia surge como uma alternativa para melhorar a estabilidade e aplicação dos óleos.

1.4 NANOEMULSÕES

As nanoemulsões são uma classe de emulsões compostas por uma mistura de água, óleo e tensoativos, que possuem tamanho de partícula na escala nanométrica, geralmente entre 20 e 500 nm (SOLÉ et al., 2006). Esse tamanho reduzido atribui diversos benefícios, como aumento da estabilidade, liberação controlada de ativos e aumento da eficácia (MCCLEMENTS, 2011; HARWANSH; DESHMUKH; RAHMAN, 2019).

As nanoemulsões são sistemas metaestáveis, ou seja, suas fases tendem a separar-se ao longo do tempo devido a uma variedade de mecanismos de desestabilização, como a separação por gravidade, coalescência, floculação e maturação de Ostwald

(MCCLEMENTS, 2011). Baseado na lei de *Stokes*, o menor tamanho de partícula nas nanoemulsões proporciona melhor estabilidade à separação gravitacional e agregação das gotículas do que as emulsões convencionais. Para a preparação de emulsões estáveis e que empregam tensoativos sintéticos (como spans e tweens) a combinação correta dos tensoativos é de extrema importância. A utilização do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) pode ser empregada. O valor de EHL é uma escala semi-empírica para a seleção de tensoativos criada por *Griffin*. Neste, um número de EHL é atribuído a um tensoativo, que reflete sua polaridade. Quando os valores de EHL dos tensoativos são próximos ao valor do EHL requerido pela fase oleosa, obtém-se uma emulsão mais estável (FERNANDES et al., 2013), onde as gotículas dispersas mantêm após um determinado tempo suas características iniciais que pode ser verificado através da medida do tamanho da gotículas assim como da sua carga superficial.

A preparação de nanoemulsões requer um método para desenvolvimento, uma vez que estas não se formam espontaneamente. Nos métodos de preparo de alta energia, forças mecânicas são aplicadas ao sistema para deformar e quebrar as gotículas da fase interna em glóbulos ainda menores. Diferentes equipamentos podem ser empregados como homogeneizadores de alta pressão, como microfluidizadores ou ultrassom. Nos métodos de baixo consumo de energia, a maior parte da energia associada à formação de emulsões vem de processos físico-químicos. A emulsificação espontânea é um exemplo deste método que emprega o gotejamento de uma fase orgânica em um recipiente contendo uma fase aquosa. Já o método de inversão da fase envolve a adição de uma fase aquosa em uma fase orgânica sob agitação. Quando a fase aquosa é adicionada inicialmente na fase orgânica, é formada uma emulsão de água em óleo (A/O) e em seguida a nanoemulsão óleo em água (O/A) final com a adição do restante de água (MCCLEMENTS, 2011). Possuem vantagens em relação aos métodos de alta energia como a fácil implementação, baixo custo e não necessitarem de aquecimento, que pode levar à degradação ou volatilização de componentes sensíveis.

Vários estudos têm mostrado que óleos vegetais, como oleorresina (OLIVEIRA et al., 2017) e óleos essenciais (BOTAS et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017; LU et al., 2018) podem ser nanoemulsionados por métodos de baixa energia. A possibilidade de usar nanoemulsões a base de óleos vegetais como larvicida (BOTAS et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017) e repelente (SAROUKOLAI; MOHARRAMIPOUR; MESHKATALSADAT, 2010; HASHEM et al., 2018) tem atraído a atenção de muitos pesquisadores. A ação larvicida de nanoemulsões de óleo essencial de *B. reticularia* e de limoneno contra *Aedes aegypti* foi

reportada na literatura por Botas e colaboradores (2017). No entanto, não existe até o momento nenhum estudo sobre a ação repelente do óleo essencial da *B. reticularia* ou de seus constituintes majoritários nanoemulsionados contra *T. castaneum*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanoformulações a base de óleo essencial da *Baccharis reticularia* DC e de três de seus principais constituintes e avaliar ação repelente frente ao inseto *Tribolium castaneum*.

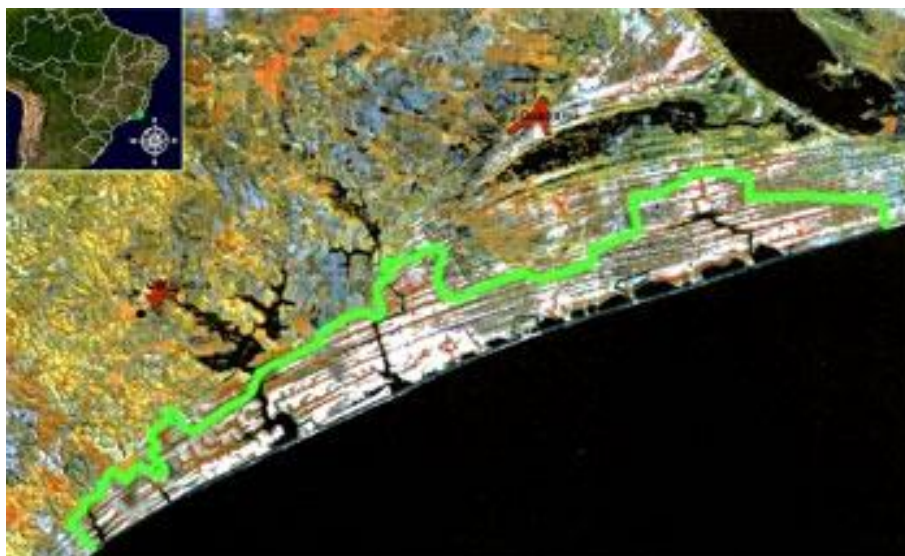
2.1.1 Objetivos Específicos

- Desenvolver e caracterizar físico-quimicamente, nanoformulações do óleo essencial de *B. reticularia*, de α -pineno, β -pineno e R-(+)-limoneno;
- Analisar estabilidade cinética das nanoemulsões;
- Analisar a capacidade repelente das nanoformulações frente ao inseto *T. castaneum*;
- Avaliar a persistência da ação repelente do óleo essencial e da nanoemulsão do óleo essencial.

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

O material botânico constituído de folhas e de caules de *Baccharis reticularia* DC. foi anteriormente coletado por Botas e colaboradores (2017) em seu habitat natural no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, localizado na costa nordeste do Rio de Janeiro (Figura 12), com autorização do Ministério do Meio Ambiente (13659-9), na região compreendida sob as coordenadas S 22° 14.105'WO 41° 35.822'. A exsicata (RFFP 2149) foi depositada no Herbário da Faculdade de Formação de Professores da Universidade do Estado do Rio de Janeiro pelo Botânico Prof. Dr. Marcelo Guerra.

Figura 12: Mapa de localização do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba



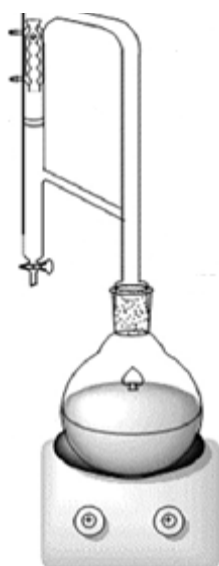
Fonte: http://www.museunacional.ufrj.br/laplaq/img/projetodepesquisa/proj3_restinga.jpg

3.2 ÓLEO ESSENCIAL

A extração do óleo foi previamente realizada por Botas e colaboradores (2017). Resumidamente, as folhas e galhos frescos foram submetidos à hidrodestilação (Figura 13), utilizando aparelho do tipo Clevenger modificado. O material vegetal foi turbolizado

com água destilada e transferido para um balão de 5 L contendo pérolas de vidro. Uma quantidade extra de água destilada suficiente para cobrir todo conteúdo vegetal foi adicionada. O balão foi interligado ao aparelho de Clevenger, e o conteúdo vegetal extraído por 4 h, a partir da condensação da primeira gota de destilado. Ao final da destilação, o óleo foi recolhido em frasco de vidro, centrifugado; seco com sulfato de sódio anidro e, então, pesado e estocado a -18 °C. As análises quantitativas e qualitativas da composição química foram realizadas por cromatografia em fase gasosa com detecção por ionização de chamas e com espectrometria de massas, respectivamente. A identificação dos constituintes foi realizada pela comparação dos espectros de massa com o banco de dados do aparelho, além da avaliação dos tempos de retenção com a literatura (VAN DEN DOOL, 1963; ADAMS, 2007).

Figura 13: Ilustração de um sistema de hidrodestilação semelhante ao usado por **Botas e colaboradores (2017)**



Fonte: A autora.

3.3 OBTENÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS NO ÓLEO ESSENCIAL

A extração das folhas de *B. reticularia* por hidrodestilação obteve 0,30% (p/p) de óleo essencial com aparência ligeiramente esverdeada. A quantificação dos constituintes foi feita por cromatografia em fase gasosa com detecção por ionização de chamas. A identificação dos componentes químicos da amostra de óleo essencial foi feita por cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG/EM). Os constituintes dos óleos foram identificados por comparação de seus espectros descritos por

Adams (2007), bem como, por comparação do índice de retenção de Kovats com dados da literatura (ADAMS, 2007). O índice de Kovats foi calculado através da equação de Kovats, utilizando-se uma solução padrão de hidrocarbonetos C9 a C25. A análise cromatográfica revelou a presença de 16 substâncias, como β -pineno, α -pineno e R-(+)-limoneno, sendo essa metodologia realizada anteriormente por Botas e colaboradores (2017). Essas substâncias identificadas no óleo foram compradas da empresa *Sigma Aldrich* e mantidas em temperatura de 4 a 8°C até o período de utilização.

3.4 DETERMINAÇÃO DO EQUILÍBRIO HIDROFÍLICO-LIPOFÍLICO DAS NANOEMULSÕES (EHL)

Dois tensoativos não-iônicos com baixo (mais lipofílico) e alto valor (mais hidrofílico) de EHL foram combinados para alcançar uma ampla faixa de valores de HLB (8,0-15,0) de acordo com equação abaixo:

$$EHLr = \frac{(EHLA \times mA) + (EHLB \times mB)}{mA + mB}$$

Onde: mA = massa usada do tensoativo hidrofílico;

mB = massa usada do tensoativo lipofílico;

EHLA = Equilíbrio hidrofílico-lipofílico do Span 80;

EHLB = Equilíbrio hidrofílico-lipofílico do Tween 20 ou Tween 80;

EHLr = Equilíbrio hidrofílico-lipofílico requerido.

O valor de EHLr do óleo essencial de *B. reticularia* e de seus principais constituintes foram determinados pelo valor EHL de tensoativos que foi capaz de induzir a formação da nanoemulsão com menor tamanho de gotícula e estável em 7 dias. Foram utilizados:

- polissorbato 20 (Tween 20) com EHL de 16,7;
- polissorbato 80 (Tween 80) com EHL de 15 e
- monooleato de sorbitano (Span 80) com EHL de 4,3.

3.5 PREPARO DAS NANOEMULSÕES

As nanoemulsões foram preparadas de acordo com um método sem aquecimento e de baixo aporte de energia (SOLANS, 2012; BOTAS et al., 2017; VALENTIM et al., 2017).

A fase oleosa foi composta por tensoativos não iônicos e o óleo essencial ou substância majoritária e vigorosamente misturada em um frasco utilizando um agitador do tipo vórtex por um minuto. Em seguida, água deionizada foi adicionada sob gotejamento contínuo a este sistema sob agitação contínua usando agitador do tipo vórtex até a formação de nanoemulsão translúcida com o reflexo azulado. A massa final da nanoemulsão foi de 2 g e a proporção tensoativo/óleo foi de 1:1 ou 2:1. A nanoemulsão preparada continha 2,5% (p/p) de óleo essencial, 2,5% (p/p) de tensoativo e 95% (p/p) de água.

Tabela 2: Composição das nanoemulsões

EHL	Polissorbato 20 (g)	Polissorbato 80 (g)	Monooleato de Sorbitano (g)	Óleo (g)	Água (mL)
10	-	0,0250	0,0250	0,050	1,90
11	-	0,0325	0,0175	0,050	1,90
12	-	0,0350	0,0150	0,050	1,90
13	-	0,0400	0,0100	0,050	1,90
14	-	0,0450	0,0050	0,050	1,90
15	-	0,0500	-	0,050	1,90
15 ^A	0,0250	-	0,0250	0,050	1,90
15 ^A	0,0500	-	0,0500	0,050	1,85

Legenda: ^A Usado somente para β -pineno.

3.5.1 Caracterização das nanoformulações

Foi realizada a avaliação macroscópica com intuito de avaliar sinais de instabilidade como cremação ou de separação de fases após o preparo das formulações. Além disso, a distribuição do tamanho das nanoemulsões foi determinada físico-quimicamente pelo método de espalhamento dinâmico da luz (EDL), realizada através do Zetasizer Nano ZS, (Malvern Instruments, Malvern, UK) equipado com um laser vermelho de 10 mW ($\lambda = 632,8$ nm). O potencial zeta foi determinado por microeletroforese associada à anemometria de laser Doppler utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS, (Malvern Instruments, Malvern, UK). As amostras foram medidas em um ângulo detector 90° imediatamente após a preparação (dia 0) e para avaliação de estabilidade nos dias 1, 7, 14, 28 e 60 até 150 dias para β -pineno e óleo essencial de *B. reticularia*. As amostras contendo α -pineno e R-(+)-

limoneno foram acompanhadas por 120 e 28 dias, respectivamente. As amostras foram diluídas com água deionizada (1:25, v/v) para análise em triplicata e os resultados expressos como a média do diâmetro \pm desvio padrão.

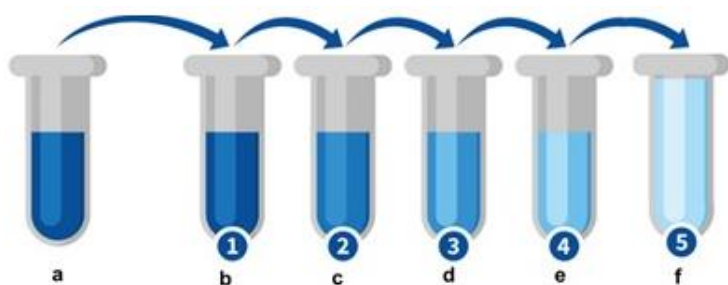
3.6 INSETOS *Tribolium castaneum*

Insetos foram criados e mantidos no Arthrolab - Laboratório de Arthropoda da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP, Macapá-AP, com temperatura e umidade relativa controladas, cerca de 28 a 30°C e 70 a 80%, respectivamente. Os insetos foram criados em recipientes de vidro (0,5 L) contendo farinha de trigo com 12 a 13% de umidade misturada com fermento (10:1, p/p). Os insetos utilizados nos experimentos foram adultos com cerca de 7 dias de idade.

3.7 ENSAIO BIOLÓGICO DE REPELÊNCIA FRENTE *Tribolium castaneum*

O ensaio de repelência foi baseado no método usado por Hu e colaboradores (2018) com algumas modificações. Os ensaios foram realizados sob condições controladas de temperatura ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa ($70 \pm 5\%$). O óleo essencial foi solubilizado em acetona na concentração de $0,025\text{ mg mL}^{-1}$. As nanoemulsões ($0,025\text{ mg mL}^{-1}$) foram diluídas serialmente em água destilada nas concentrações de 0,0125; 0,0625; 0,03125; 0,000625 e 0,0000625 mg mL^{-1} , gerando concentrações finais de 17,6, 8,8, 4,4, 1,1 e 0,1 $\mu\text{g cm}^{-2}$, respectivamente. Os respectivos controles foram produzidos usando as mesmas metodologias substituindo o óleo essencial por água destilada (nanoemulsões) ou acetona (óleo essencial não nanoemulsionado). As diluições aconteceram de forma seriada, partindo de uma solução mãe conforme imagem a seguir:

Figura 14: Ilustração da diluição realizada para atingir as concentrações

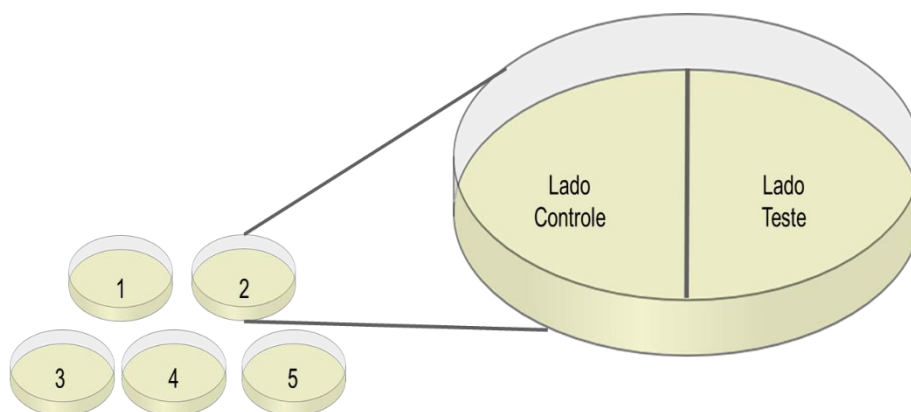


Legenda: Tubo a: Solução pura; b: formulação na concentração $0,0125\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$; tubo c: $0,0625\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$; tubo d: $0,03125\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$; tubo e: $0,000625\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$; tubo f: $0,0000625\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$.

Fonte: Google fotos.

Utilizou-se papel de filtro com 8,5 cm de diâmetro interno sobre uma placa de Petri. Metade do papel foi tratada com 400 µL de cada amostra e a outra metade com o respectivo controle (Figura 15). Quando se usou acetona como solvente, esperou-se o tempo necessário para a evaporação da mesma com a placa aberta. Após a finalização da etapa de impregnação do papel de filtro, vinte insetos adultos macho e fêmea foram transferidos para o centro de cada placa, que foi imediatamente fechada. A porcentagem de repelência foi calculada 2 e 4 h após o início do ensaio, baseando-se na porcentagem de insetos encontrados em cada metade da placa. O experimento foi constituído de cinco repetições por amostra (Anexo 1).

Figura 15: Representação da divisão do papel de filtro dentro da placa de Petri



Fonte: A autora.

Durante o teste foram feitos experimentos para analisar o comportamento dos insetos para padronizar uma possível ação repelente. Dessa forma, leituras feitas com análises visuais também foram levadas em consideração. Sendo assim, na tabela 3 é possível verificar como os experimentos foram executados e o motivo a se levar em consideração para cada amostra testada, definindo ação repelente quando houve uma distribuição aleatória dos insetos pela placa.

Tabela 3: Representação do desenho experimental dos ensaios de ação repelente

Amostras em cada metade		Motivo
Teste	Controle	
Água destilada	Água destilada	Determinar o comportamento aleatório*
Tensoativos	Água destilada	Determinar possível ação repelente dos tensoativo
Óleo essencial	Acetona	Determinar ação repelente do óleo essencial

Nanoemulsões	Água + tensoativo	Determinar ação repelente de cada nanoemulsão
--------------	-------------------	---

Legenda: *sem repelência

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância (ANOVA de dois fatores) seguida pelo teste de Tukey foram conduzidas usando o Software GraphPad Prism 8.4.3 (San Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ATIVIDADE REPELENTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis reticularia* FRENTE AO *Tribolium castaneum*

Estudo anteriormente realizado o óleo essencial de *B. reticularia* apresentou ação repelente e inseticida contra insetos (BOTAS, *et al.*, 2017). A partir disso, houve a motivação para analisar esse comportamento repelente contra outro tipo de inseto, o *Tribolium castaneum*. Sendo assim, as fases iniciais de teste do óleo essencial, foram baseadas na caracterização da ausência de repelência de acordo com a metodologia de ensaio repelente já definido (HU *et al.*, 2019). Para isso, foram realizados testes branco para verificar se haveria ação repelente do resíduo de solvente utilizado para carrear o óleo essencial mediante o comportamento dos insetos dentro da placa.

Sendo assim, foi observado que a disposição aleatória dos insetos dentro da placa de Petri, durante as horas de leitura, indicava ausência de atividade, pois tal comportamento foi verificado em placas contendo apenas água dos dois lados do papel. Tal aleatoriedade foi evidenciada pela ocorrência de altos valores de desvio padrão entre as replicatas. Após essa etapa inicial, foram realizados os testes com óleo essencial de *B. reticularia* em concentrações baseadas no artigo de You e colaboradores (2017). Nesse artigo, eram utilizados óleos essenciais para análise da atividade repelente contra *T. castaneum* em concentrações superiores às escolhidas no presente trabalho. Como anteriormente óleo essencial de *B. reticularia* já apresentava efeitos tóxicos em altas concentrações contra *Aedes aegypti* (BOTAS, *et al.*, 2017) decidiu-se utilizar metade das concentrações máximas usadas no artigo citado. Para carrear o óleo essencial, a acetona foi escolhida como solvente, pois de acordo com a literatura analisada (SALEM *et al.*, 2018), apresentava características favoráveis na aplicação do teste. As vantagens do uso da acetona, como alta volatilidade, ótimo carreador de óleos essenciais e o fato de evaporar sem deixar resíduos, a torna assim a primeira opção a ser utilizada.

Os resultados foram satisfatórios, demonstraram que o óleo essencial foi extremamente ativo nas primeiras horas de ensaio, repelindo 100% dos insetos.

Como não houve diferença significativa no tempo entre 2 e 4 horas, é possível analisar que estatisticamente o óleo essencial atingiu o máximo de atividade repelente nas primeiras 2 horas de ensaio, que permaneceu durante as 4 horas na segunda leitura (Tabela 4). Esses resultados foram semelhantes ao apresentado por You e colaboradores (2017) que analisaram nas primeiras 2 horas de leitura, 100% de atividade repelente no óleo essencial de *Murraya euchrestifolia*. Para Salem e colaboradores (2018) os mesmos tiveram resultados em cerca de 80% de atividade repelente contra *T. castaneum* nas primeiras horas de leitura utilizando acetona como solvente.

Tabela 4: Atividade repelente (%) do óleo essencial de *Baccharis reticularia* contra *Tribolium castaneum*

Amostra	Concentração ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Porcentagem de Repelência (%)		Classificação ¹	
		2 h	4 h	2 h	4 h
Óleo Essencial	17,6	100 ($\pm 0,0$)***	100 ($\pm 0,0$)***	Classe V	Classe V

Legenda: ¹: Classificação da atividade repelente de acordo com (McDonald *et al.*, 1970). *** indica diferença significativa ($p < 0,001$) em comparação a 0,1% (valor máximo de porcentagem de repelência para amostras inativas).

Os resultados de atividade repelente do óleo essencial de *B. reticularia* contra *T. castaneum* mostraram ser promissores pois em tempo curto de exposição, mostrou ser repelente. Mesmo com ótimos resultados, existem limitações para formulações com óleos essenciais chegarem ao mercado como produto. As limitações seriam ligadas à necessidade de uso de grandes quantidades de solventes, aumentando o custo, a toxidez tanto ambiental durante o processo de aplicação, além de maior possibilidade de incêndios, por serem substâncias inflamáveis. Essas limitações podem ser solucionadas com outras alternativas, visando a diminuição de custos e riscos durante aplicação e utilização de solventes não tóxicos. A substância que apresenta todas essas características é a água. Todavia, substâncias lipofílicas, como os constituintes de óleos essenciais, não solubilizam em água, sendo essa uma grande restrição para desenvolvimento de produtos naturais a base de substâncias lipofílicas.

Uma das ferramentas que vão sendo aplicadas para resolução dessa limitação é o desenvolvimento de nanoformulações. Nanoformulações de óleos essenciais têm sido desenvolvidas para aplicação desses óleos em meio aquoso. Isso atribui ótima forma de liberação de ativos com atividades biológicas, características físico-químicas controladas, atribuindo vantagens também na estabilidade cinética e especificidade ao organismo alvo.

4.2 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE FORMULAÇÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *B. reticularia* E DE SUAS SUBSTÂNCIAS MAJORITÁRIAS

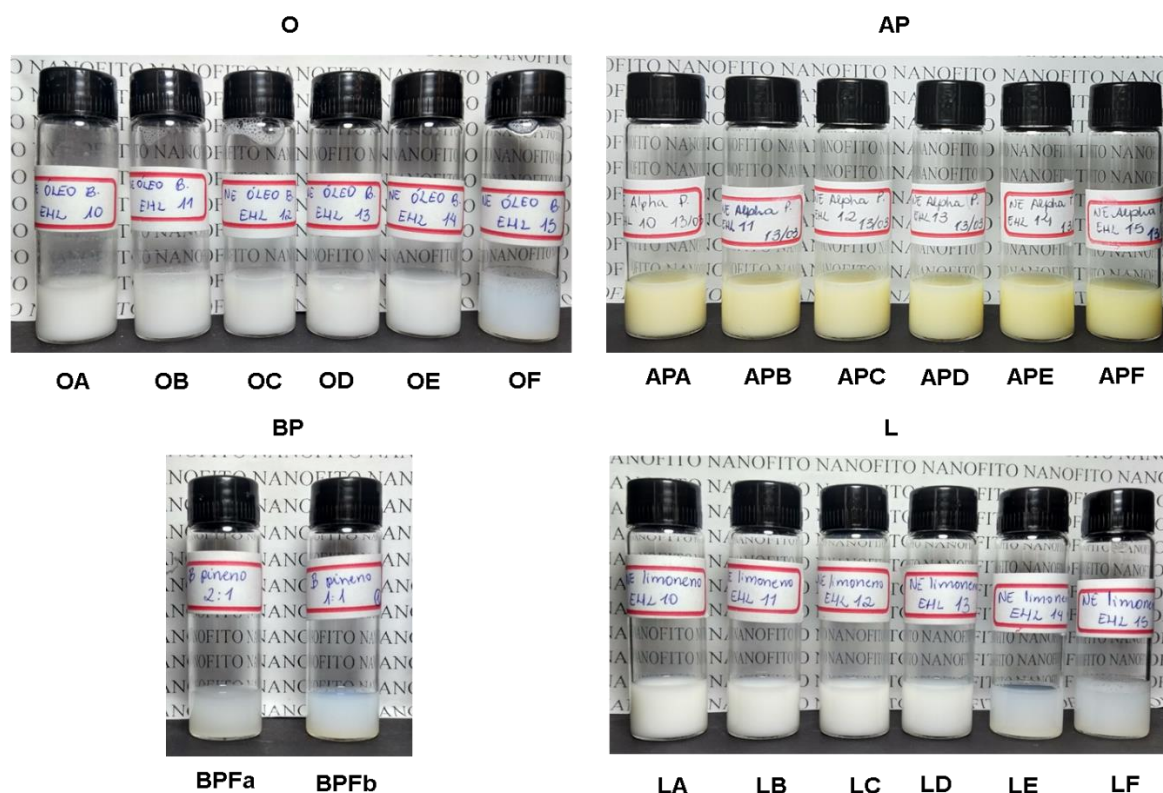
Óleos essenciais e substâncias voláteis isoladas têm sido um foco de interesse de diversos estudos biotecnológicos (ASADINEZHAD *et al.*, 2019; MARTIN-PIÑERO *et al.*, 2019; RYU *et al.*, 2019; ADAK *et al.*, 2020; DAS *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2020). Todas as formulações produzidas neste trabalho foram obtidas utilizando o método de baixo aporte de energia e sem aquecimento que se mostrou simples e reprodutível. Esta metodologia se contrapõe às usadas em alguns estudos que utilizam aquecimento no preparo de nanoformulações contendo substâncias voláteis (MARIA *et al.*, 2017; MOGHIMI *et al.*, 2016). Altas temperaturas favorecem a evaporação dos constituintes mais voláteis das formulações, o que pode ocasionar mudanças na ação biológica do produto final. Dessa forma, a metodologia empregada neste trabalho é adequada a esse tipo de produto natural, mantendo sua composição e, por conseguinte, sua atividade biológica.

Além disso, um dos parâmetros mais importantes desse processo é determinar o equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) dos tensoativos para desenvolvimento de uma formulação estável, visando encontrar o equilíbrio entre a fase aquosa e oleosa da emulsão (SCHMIDTS, *et al.*, 2010). Inicialmente foram avaliados os EHL de 10 a 15 com intuito de obter a melhor formulação e observar macroscopicamente suas características e microscopicamente o tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta, propriedades físico-químicas importantes para uma formulação. Desde o dia da preparação (dia 0) até o dia 7 as formulações do óleo essencial, β -pineno, α -pineno e R-(+)-limoneno foram mantidas em temperatura ambiente e acompanhadas para verificar qual de seus determinados EHL sugeriam maior estabilidade.

Inicialmente, seis formulações foram preparadas para cada amostra usando diferentes misturas dos tensoativos polissorbato 20, polissorbato 80 e monooleato de sorbitano (Tabela 5). Esses tensoativos foram escolhidos para fornecer valores de EHL entre 10 e 15 que, segundo a literatura, é a faixa na qual se encontram os valores de EHL requeridos para nanoemulsões de óleos essenciais (HASSAN et al., 2019; NIRMAL et al., 2018).

As formulações do óleo essencial, do R-(+)-limoneno e de β -pineno apresentaram aspecto leitoso nos valores de EHL entre 10 e 13, mas translúcido entre 14 e 15. Já as formulações de α -pineno tiveram aspecto amarelado, cor característica da solução de α -pineno utilizada, e leitoso entre os valores de EHL 10 e 14, porém, mais translúcido no EHL 15 (Figura 16). O aspecto mais translúcido das nanoemulsões produzidas com EHL 14 e 15 sugerem um menor tamanho das gotículas e estão de acordo com dados apresentados em estudos anteriores (Oliveira et al., 2016; 2017).

Figura 16: Aspecto visual das formulações



Legenda: O: Nanoformulações contendo óleo essencial de *B. reticularia*, onde OA: EHL 10; OB: EHL 11; OC: EHL 12; OD: EHL 13; OE: EHL 14; OF: EHL 15; AP: Nanoformulações contendo α -pineno onde APA: EHL 10; APB: EHL 11; APC: EHL 12; APD: EHL 13; APE: EHL 14; APF: EHL 15. BP: Nanoformulações contendo β -pineno onde BPFa: EHL 15 2:1; BPFb: EHL 15 1:1. L: nanoformulações

contendo R-(+)-limoneno onde LA: EHL 10; LB: EHL 11; LC: EHL 12; LD: EHL 13; LE: EHL 14; LF: EHL 15.

Um parâmetro importante para a classificação de nanoemulsões está relacionado ao tamanho das gotículas. Embora alguns autores considerem formulações com tamanhos de gotículas entre 100 e 600 nm como nanoemulsões (Bouchemal *et al.*, 2004; Sarker, 2005), neste trabalho escolhemos uma faixa de tamanho mais exigente, com maior possibilidade de gerar nanoemulsões cineticamente estáveis: 20 a 200 nm (MCCLEMENTS, 2012; SOLANS E SOLÉ, 2012). A diferença de densidade entre as fases dispersa e contínua favorece a separação de fases de uma emulsão. Porém, quanto menor o tamanho das gotículas da fase interna, menor o efeito que essa diferença causa na estabilidade do sistema. O R-(+)-limoneno, principal constituinte do óleo essencial de *B. reticularia*, tem uma densidade baixa em relação à água, (aproximadamente $0,84 \text{ g mL}^{-1}$ a 20°C). Isso evidencia a grande importância de se atingir um pequeno tamanho médio das gotículas durante o desenvolvimento das nanoemulsões. O índice de polidispersão é outro aspecto a ser levado em consideração em relação ao tamanho das gotículas, pois mede a não-uniformidade da distribuição de tamanho da formulação (MARTINEZ *et al.*, 2017).

A agregação de partículas deve ser prevenida para a manutenção da nanoemulsão. Quanto mais distante de zero for o valor do potencial zeta de uma nanoemulsão (o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento), maior a repulsão entre elas e, conseqüentemente, menor a probabilidade de se agregarem em partículas maiores. Tais fatores são importantes não só para a estabilidade das nanoformulações, podendo ainda influenciar sua ação biológica (DANAEI *et al.*, 2018).

A análise das formulações por espalhamento dinâmico da luz (EDL) indicou que elas apresentaram tamanho médio das gotículas inferior a 500 nm após a preparação, índice de polidispersão inferior a 0,6 e carga superficial (potencial zeta) negativo. A análise pormenorizada dos dados relacionados ao tamanho das gotículas, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações nos sete primeiros dias para as formulações contendo óleo essencial de *B. reticularia*, α -pineno e R-(+)-limoneno e 14 dias para β -pineno, após o preparo permitiu a seleção das melhores nanoformulações de cada ativo (Tabela 5).

Tabela 5: Os valores de EHL que geraram as nanoemulsões com as melhores propriedades durante os primeiros 7 dias após o preparo

Ativos	EHL escolhido
Óleo essencial	15
α -pineno	13
β -pineno	15
R-(+)-limoneno	15

4.2.1 Formulações contendo óleo essencial de *B. reticularia*

As análises físico-químicas das formulações contendo o óleo essencial de *B. reticularia* realizadas imediatamente após a preparação, demonstraram que as emulsões produzidas com valores de EHL 10 e 11 apresentaram os maiores tamanhos médios e índices de polidispersão (Tabela 6). As formulações recém-preparadas com EHL 10 apresentaram tamanho médio das gotículas de $406,6 \pm 172,7$ nm e índice de polidispersão de 0,74. O tamanho médio das gotículas das formulações com EHL 11 foi de $261,8 \pm 27,41$ e o índice de polidispersão foi de 0,84. De maneira geral, observou-se que os resultados se apresentaram um pouco melhores à medida que os valores de EHL aumentavam. As formulações produzidas com EHL 12, 13 e 14 apresentaram tamanhos iniciais entre 175,3 e 143,1 com índice de polidispersão de 0,69 a 0,33. Já a emulsão preparada com EHL 15 apresentou tamanho médio das gotículas inicial de $111,3 \pm 0,25$ e índice de polidispersão de 0,24. A análise estatística dos tamanhos médios de gotículas demonstrou haver dois grupos de formulações recém-preparadas: as de EHL 10 e 11 e as demais, que apresentaram os melhores resultados. Não houve diferenças significativas entre os índices de polidispersão entre essas formulações, tendo todas apresentado valores negativos de potencial zeta ao redor de -32 mV no dia de preparação (Gráfico 1).

Nos dias subsequentes, a formulação de EHL 14 sofreu mudanças significativas no tamanho médio de suas gotículas, enquanto as formulações preparadas com valores de EHL 12, 13 e 15 permaneceram sem alterações estatisticamente significativas. Como os valores de PDI das três formulações também não apresentaram diferenças estatísticas entre si e ambas apresentaram valores

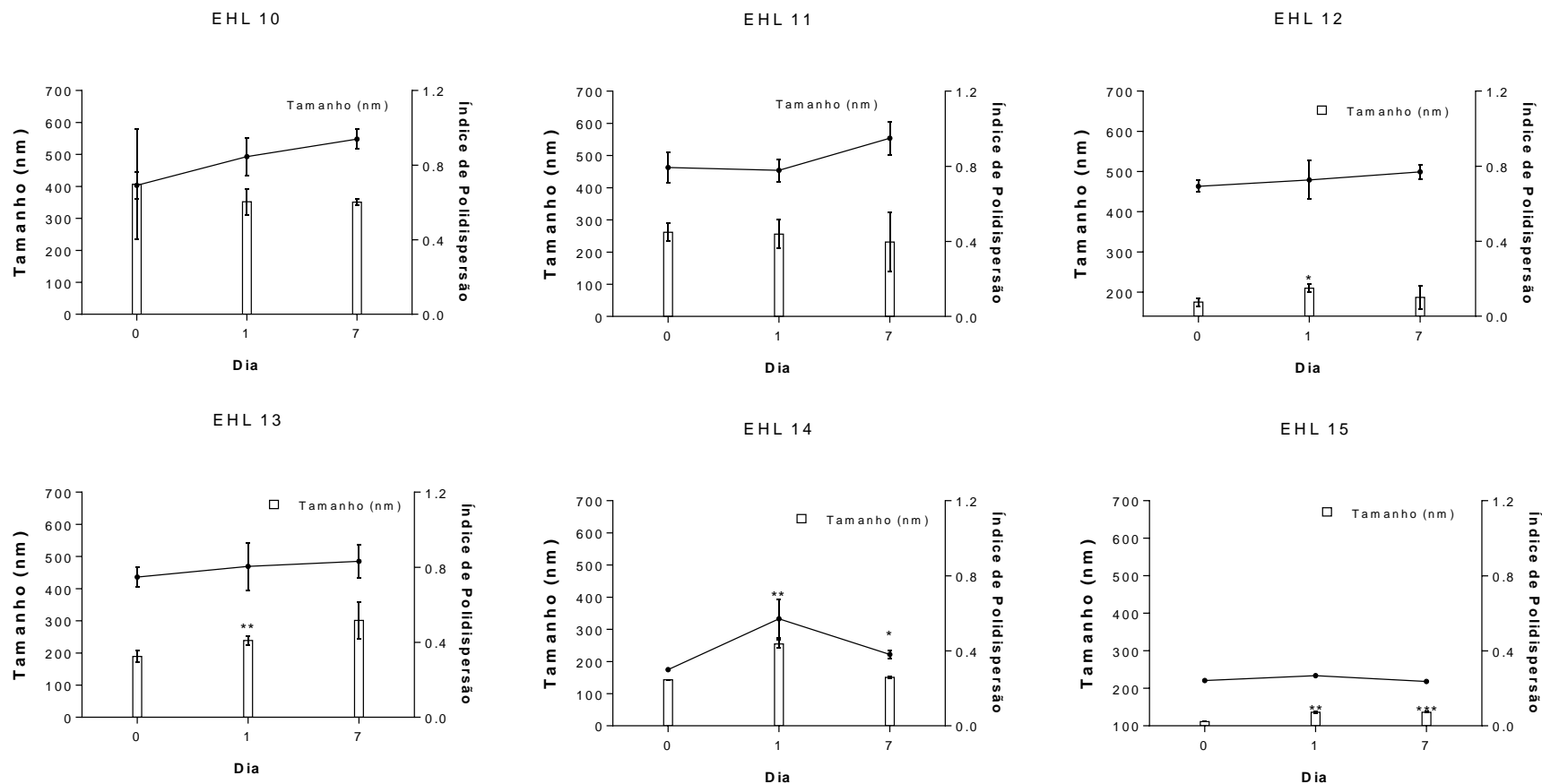
satisfatórios de potencial zeta, a escolha do melhor EHL para produzir nanoemulsões estáveis do óleo essencial foi baseada nos valores de desvio padrão obtidos em cada análise. As nanoformulações com EHL 15 apresentaram valores de desvio padrão menores do que sua contraparte e, por isso, esse foi o valor de EHL escolhido para uma análise de estabilidade de maior duração.

Tabela 6: Tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações contendo óleo essencial de *B. reticularia*

	Dia 0			Dia 1			Dia 7		
EHL	TAMANHO	IPD	P. ZETA	TAM.	IPD	P ZETA	TAM.	IPD	P ZETA
10	600,1	0,628	-32,0	361,1	0,788	-34,5	362,0	1000	-35,3
	351,8	0,770	-31,9	386,6	0,963	-35,8	341,9	0,899	-34,7
	268,0	0,677	-32,2	307,6	0,787	-35,8	349,1	0,919	-35,8
11	293,4	0,886	-30,8	307,0	0,815	-29,6	332,1	1000	-34,8
	244,5	0,745	-30,2	231,4	0,709	-28,1	207,9	1000	-35,7
	247,5	0,749	-31,2	229,2	0,811	-29,1	154,1	0,847	-37,1
12	186,8	0,657	-28,9	219,6	0,629	-32,4	198	0,813	-30,9
	169,8	0,704	-29,4	198,3	0,835	-34,2	207,9	0,750	-29,0
	169,2	0,718	-28,0	211,5	0,717	-34,1	154,1	0,745	-30,3
13	209,5	0,686	-24,7	253,3	0,662	-28,0	362,1	0,750	-24,6
	185,0	0,770	-24,7	235,3	0,847	-27,9	249,5	0,928	-24,9
	172,8	0,787	-24,2	227,4	0,903	-28,4	291,7	0,818	-24,8
14	143,4	0,310	-19,1	268,2	0,454	-25,5	151,2	0,359	-20,3
	142,8	0,298	-20,0	244,9	0,646	-24,8	153,1	0,380	-20,1
	143,1	0,290	-20,2	250,6	0,611	-25,0	148,8	0,404	-21,0
15	111,5	0,240	-14,9	137,2	0,273	-16,9	136,1	0,232	-15,5
	111,0	0,248	-14,5	136,8	0,273	-17,2	137,6	0,237	-15,3
	111,3	0,237	-14,2	134,2	0,258	-16,9	135,4	0,240	-14,9

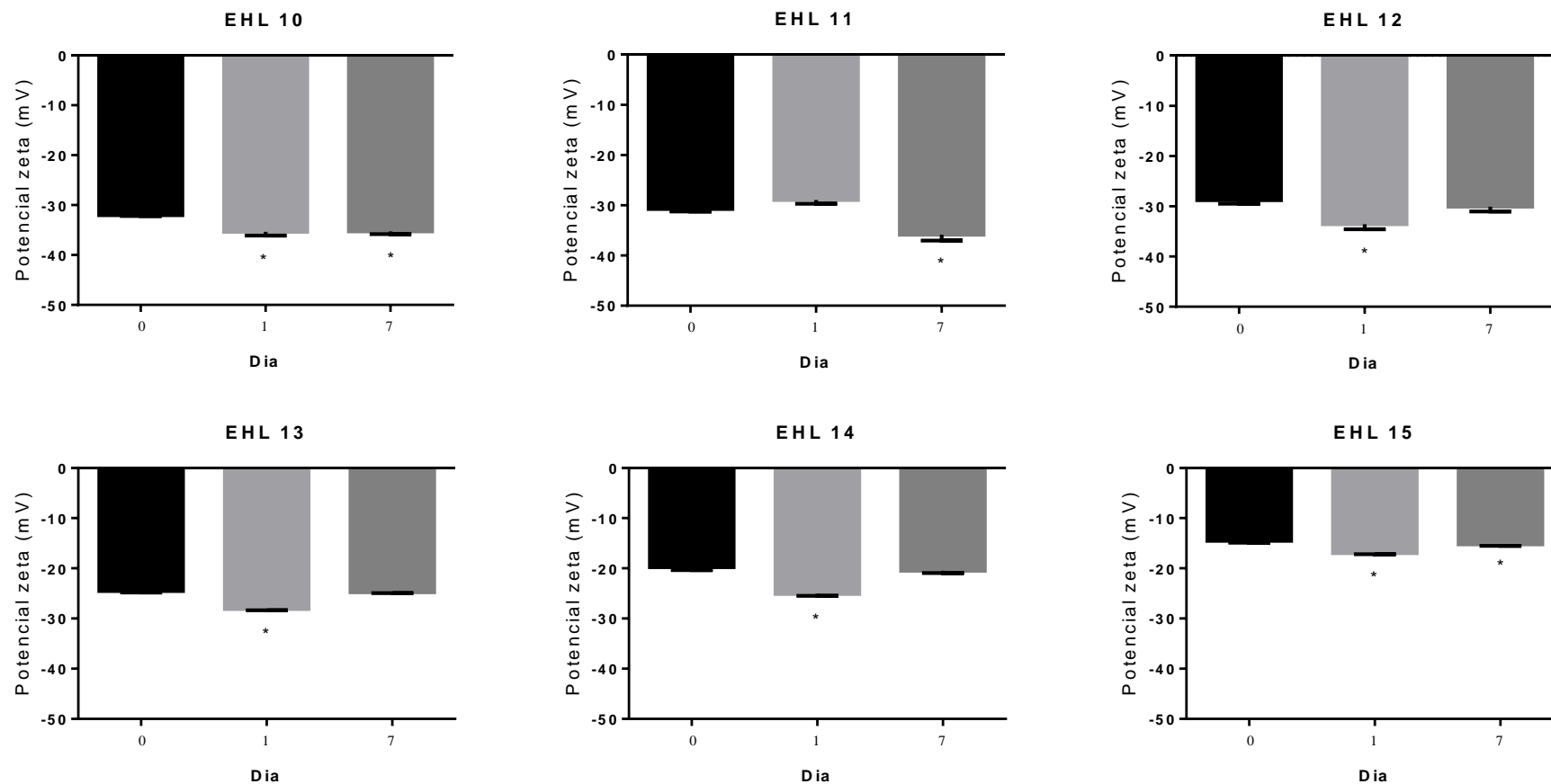
Legenda: IPD: Índice de Polidispersão; P. ZETA: Potencial Zeta.

Gráfico 1: Tamanho e índice de polidispersão das formulações contendo óleo essencial de *B. reticularia*



Legenda: * $p < 0,05$ em comparação com dia da preparação (dia 0); ** $p < 0,01$ em comparação com dia 0; *** $p < 0,001$ em comparação com dia 0; **** $p < 0,0001$ em comparação com dia 0. Barras: Tamanho (nm); Linhas: índice de polidispersão.

Gráfico 2: Potencial Zeta (mV) das nanoemulsões preparadas com óleo essencial de *B.reticularia*



Legenda: *: $p < 0,5$.

4.2.2 Formulações de α -pineno

Para as formulações contendo α -pineno nas análises realizadas imediatamente após o preparo (dia 0), observou-se maior tamanho médio das gotículas e índice de polidispersão nas emulsões preparadas com monooleato e polissorbato de sorbitano 80 (EHL 11 e 10) com valores de $305,2 \pm 3,3$ nm e $277,1 \pm 3,1$, índice de polidispersão 0,45 e 0,43, respectivamente (Tabela 7). Para as formulações com valores de EHL 12, 14 e 15 apresentaram tamanhos médios entre $226,6 \pm 4,7$ nm e $182,8 \pm 1,5$ nm e índice de polidispersão em média de 0,35. Diferente da formulação contendo óleo essencial de *B. reticularia* que apresentou uma evolução em relação ao tamanho médio das gotículas, a formulação contendo α -pineno preparada com EHL 13 apresentou menor tamanho de gotícula $151,1 \pm 5,1$ nm e índice de polidispersão de 0,25. Que, estatisticamente apresentou diferença entre todos os EHL analisados no dia da preparação. Em relação ao potencial zeta, todas as formulações apresentaram valores negativos ao redor de -16 mV no dia de preparação (Gráfico 4).

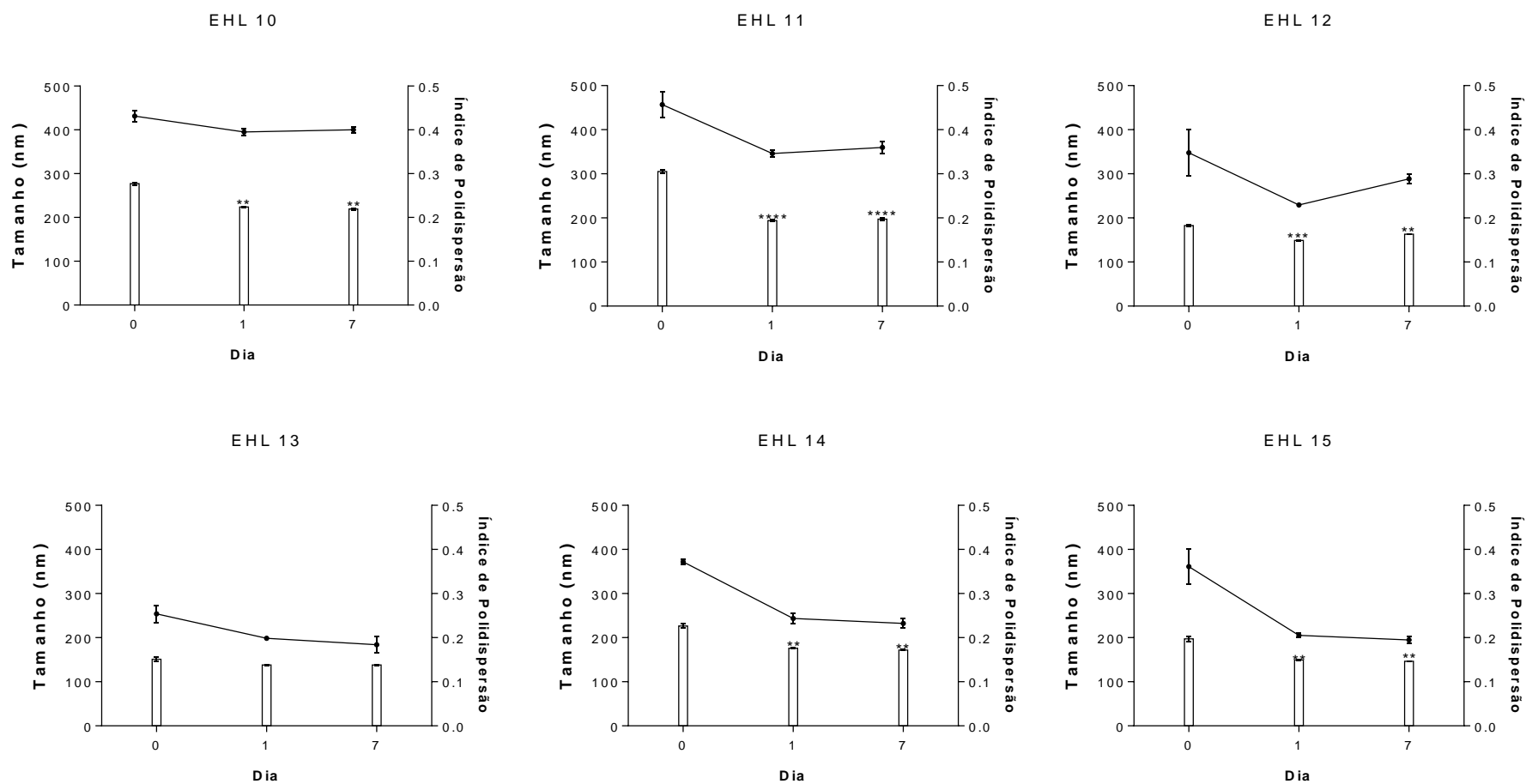
Estatisticamente comparando o dia 0 com o dia 1 e dia 7 houveram diferenças estatísticas entre todos os EHL analisados, tanto em relação ao tamanho quanto ao índice de polidispersão, exceto para EHL 13. De acordo com o passar dos dias, as formulações foram apresentando um pequeno aumento tanto de tamanho médio das gotículas, quanto de PDI e potencial zeta durante as medições dos dias 1 e 7. De acordo com o passar dos dias, as formulações foram apresentando um pequeno aumento tanto de tamanho médio das gotículas, quanto de PDI e potencial zeta durante as medições dos dias 1 e 7. A partir disso, foram sendo avaliadas características físico químicas da formulação de EHL 13 que apresentou menor tamanho médio das gotículas e índice de polidispersão, assim como menor desvio padrão durante as medições iniciais (Gráfico 3), foi escolhida para a avaliação da estabilidade em relação à distribuição do tamanho durante um tempo mais prolongado.

Tabela 7: Tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações contendo α -pineno

	Dia 0			Dia 01			Dia 07		
EHL	TAMANHO	IPD	P. ZETA	TAMANHO	IPD	P. ZETA	TAMANHO	IPD	P. ZETA
10	274,4	0,419	-18,4	223,0	0,386	-17,4	217,5	0,393	-38,1
	280,6	0,445	-18,7	223,0	0,401	-18,5	218,9	0,406	-35,7
	276,4	0,431	-18,2	225,3	0,399	-18,5	221,5	0,401	-39,1
11	301,4	0,480	-17,3	191,7	0,354	-15,2	194,6	0,375	-34,3
	307,6	0,424	-18,8	195,6	0,345	-14,9	200,4	0,349	-34,7
	306,6	0,466	-16,9	194,8	0,339	-14,6	196,9	0,355	-34,0
12	184,3	0,287	-16,9	149,0	0,231	-14,9	164,0	0,277	-32,6
	181,3	0,376	-16,8	148,8	0,228	-16,4	163,1	0,290	-33,3
	182,9	0,380	-16,6	149,5	0,229	-16,4	162,1	0,299	-32,8
13	145,2	0,233	-16,2	138,6	0,198	-15	137,8	0,196	-27,7
	153,7	0,258	-18,3	139,0	0,203	-16,4	137,7	0,163	-28,1
	154,4	0,271	-18,4	136,7	0,194	-14,6	138,9	0,193	-29,5
14	223,1	0,370	-15,2	174,6	0,238	-15,5	172,8	0,221	-27,1
	232,0	0,367	-15,2	177,4	0,257	-15,2	170,9	0,241	-27,0
	224,7	0,378	-14,4	176,1	0,236	-15,7	172,1	0,235	-28,0
15	190,4	0,330	-15,1	149,2	0,199	-13,3	146,6	0,201	-17,7
	200,4	0,348	-16,1	150,2	0,209	-13,3	146,8	0,186	-17,4
	200,5	0,405	-15,5	149,1	0,208	-13,2	146,0	0,197	-17,4

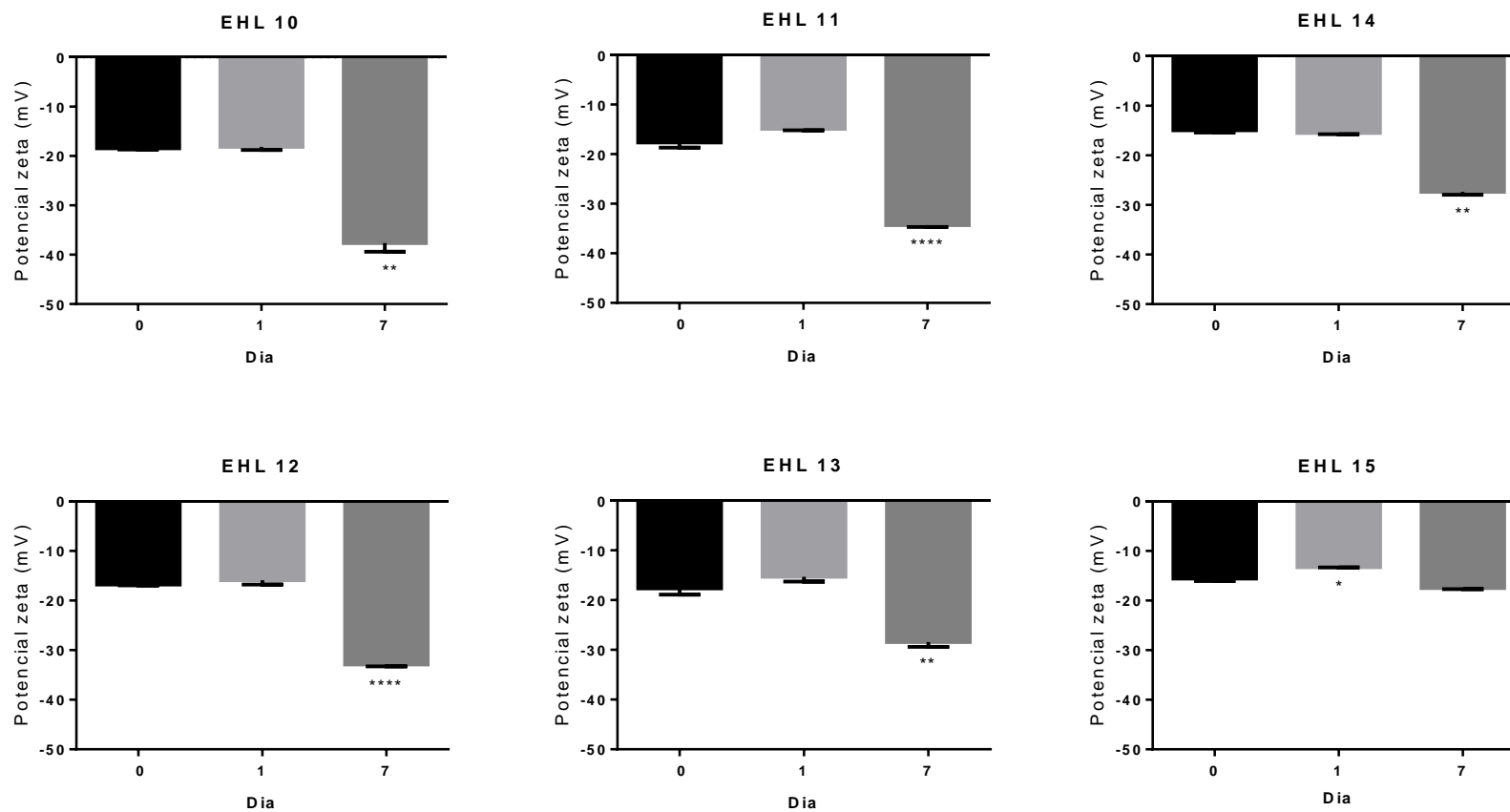
Legenda: IPD: Índice de Polidispersão; P. ZETA: Potencial Zeta.

Gráfico 3: Tamanho e índice de polidispersão das formulações contendo α -pineno



Legenda: * $p < 0,05$ em comparação com dia da preparação (dia 0); ** $p < 0,01$ em comparação com dia 0; *** $p < 0,001$ em comparação com dia 0; **** $p < 0,0001$ em comparação com dia 0. Barras: Tamanho (nm); Linhas: índice de polidispersão

Gráfico 4: Potencial Zeta (mV) de nanoemulsões contendo α -pineno



Legenda: * p<0,05 em comparação com dia da preparação (dia 0); ** p < 0,01 em comparação com dia 0; *** p < 0,001 em comparação com dia 0; **** p < 0,0001 em comparação com dia 0.

4.2.3 Formulações contendo β -pineno

A produção de formulações contendo β -pineno passou por duas etapas. A primeira, assim como com as formulações anteriores, foi a verificação do EHL mais adequado dentro da faixa de valores entre 10 e 15. Entretanto, mesmo nesse valor de EHL, a formulação apresentou propriedades satisfatórias, o que levou à segunda etapa: a procura de alterações na formulação para melhorar tais propriedades, como índice de polidispersão.

Observou-se maior tamanho médio das gotículas e índice de polidispersão (Gráfico 5) nas formulações recém preparadas com monooleato e polissorbato de sorbitano 80 nos EHL 10, 11, 12 e 13 com valores entre 788 e 306 nm e índice de polidispersão entre 1000 e 0,6 (Tabela 8). As preparações de EHL 14 e 15 apresentaram tamanhos de gotícula médios iniciais entre 327 e 177 nm e índice de polidispersão entre 1000 e 0,4. Para os valores de potencial zeta de todas as formulações apresentaram-se negativos no dia de preparação (Gráfico 6). Estatisticamente as formulações recém preparadas (dia 0) não apresentaram diferenças, tanto nos dias 1 e 7 para maioria dos EHL.

Em função do menor tamanho médio das gotículas e índice de polidispersão apresentado pela formulação EHL=15 foi escolhida para a avaliação da estabilidade cinética em relação à distribuição do tamanho durante um tempo mais prolongado. Estatisticamente ela se apresentou diferente de todos os EHL analisados, sendo esse um dos fatores que influenciaram também a escolha do EHL 15.

Apesar da nanoformulação produzida com EHL 15 apresentar as melhores propriedades físico-químicas dentre a série produzida, os valores do índice de polidispersão não estavam de acordo com o desejado. O valor do índice de polidispersão nas análises do dia 7 apresentou uma média de cerca de $0,46 \pm 0,05$. Por tanto, ficou evidente que, apesar de se ter conseguido encontrar o valor de EHL mais adequado para o desenvolvimento de uma nanoemulsão contendo β -pineno, outros fatores deveriam ser alterados para o aperfeiçoamento das propriedades da nanoformulação. Tendo em vista o fato de que a relação entre tensoativo e óleo promove alterações nas propriedades das nanoemulsões, a estrutura química do tensoativo é uma variável importante a se levar em consideração para o desenvolvimento de nanoformulações. As interações intermoleculares podem favorecer ou prejudicar a nanoencapsulação de amostras oleosas. Assim como,

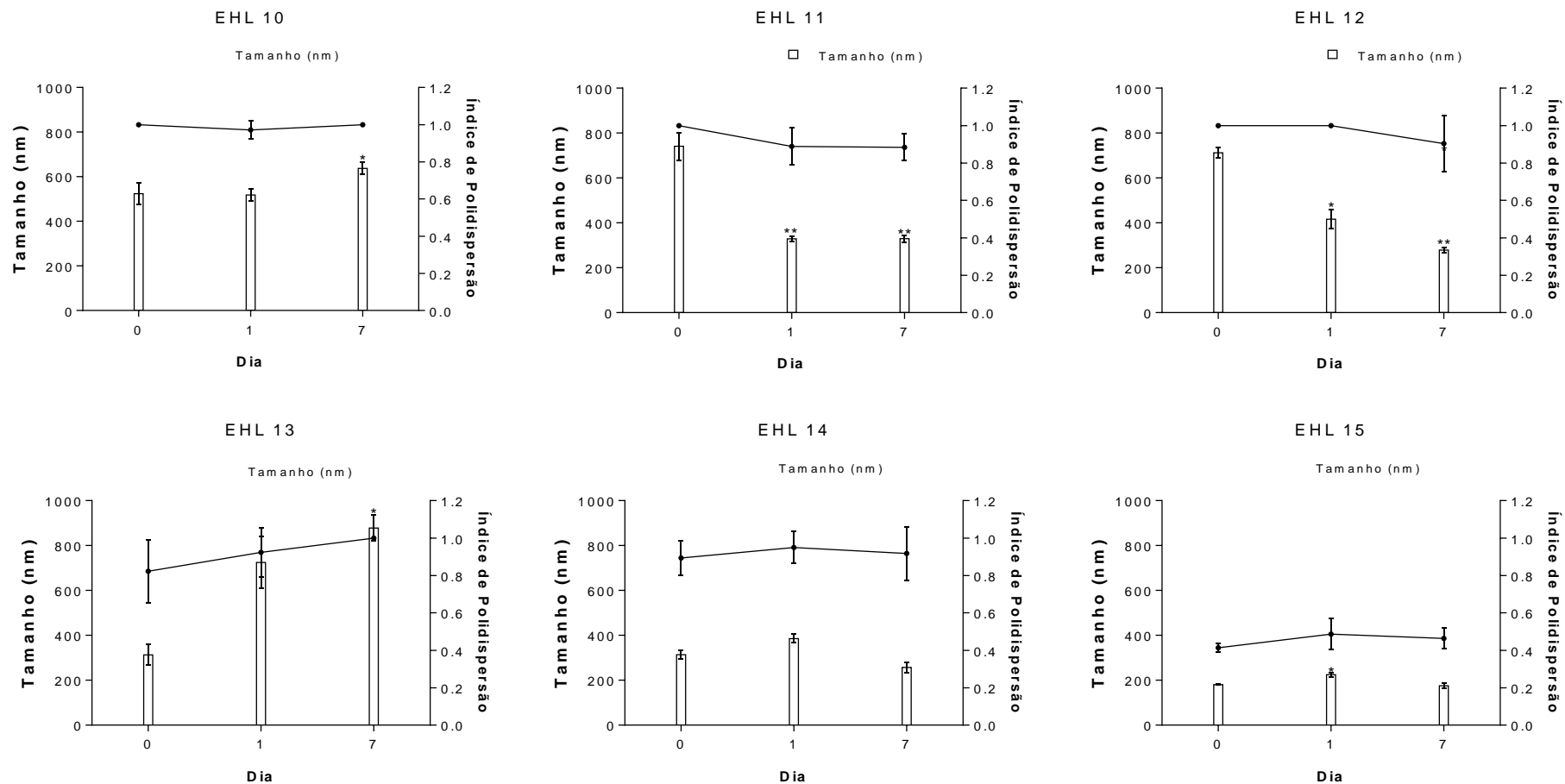
alterações no tensoativo em óleo podem ser usadas para produzir pequenas gotículas (OSTERTAG *et al.*, 2012; WALKER; DECKER; MCCLEMENTS, 2015). Assim, a fim de obter uma formulação melhor, duas outras nanoemulsões de β -pineno foram produzidas no EHL 15 usando polissorbato 20 / monooleato de sorbitano em vez de polissorbato 80. As novas nanoemulsões foram feitas com relações tensoativo:óleo de 2: 1 ou 1: 1. (Gráfico 7).

Tabela 8: Tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações contendo β -pineno

EHL	Dia 1			Dia 2			Dia 7		
	TAMANHO	IPD	P. ZETA	TAMANHO	IPD	P.ZETA	TAMANHO	IPD	P. ZETA
10	575,6	1,000	-47,1	536,7	1,000	-43,5	668,4	1,000	-38,1
	512,9	1,000	-47,5	484,9	1,000	-42,3	628,8	1,000	-35,7
	482,2	1,000	-49,5	533,4	0,916	-41,6	615,2	1,000	-39,1
11	788,8	1,000	-38,7	340,2	0,997	-35,4	328,7	0,954	-34,3
	763,3	1,000	-40,4	330,1	0,865	-35	346,1	0,889	-34,7
	671,9	1,000	-37	314,9	0,805	-36,1	314,6	0,809	-34
12	732,9	1,000	-25,1	389,1	1,000	-33	264,1	1,000	-32,6
	719,7	1,000	-25,9	465,9	1,000	-33,7	288,3	0,982	-33,3
	684,8	1,000	-25,4	395	1,000	-33,5	283,7	0,730	-32,8
13	269,7	1,000	-28,5	853,8	0,770	-30,2	893,3	1,000	-27,7
	362,1	0,666	-28,9	633	1,000	-33,7	813	1,000	-28,1
	306,8	0,801	-30,4	686,5	1,000	-32,3	927,3	1,000	-29,5
14	323	0,856	-20,1	362,9	1,000	-24	238,7	1,000	-27,1
	327,1	0,826	-20	399,5	1,000	-24,3	248,8	1,000	-27
	291,5	1,000	-20	395,0	0,850	-24,6	284,7	0,753	-28
15	184	0,442	-16,1	225,5	0,456	-14,4	186,8	0,406	-17,7
	180,9	0,406	-17,1	215,1	0,580	-15,4	175,6	0,514	-17,4
	177,6	0,394	-17	232,2	0,424	-15,4	162,6	0,471	-17,4

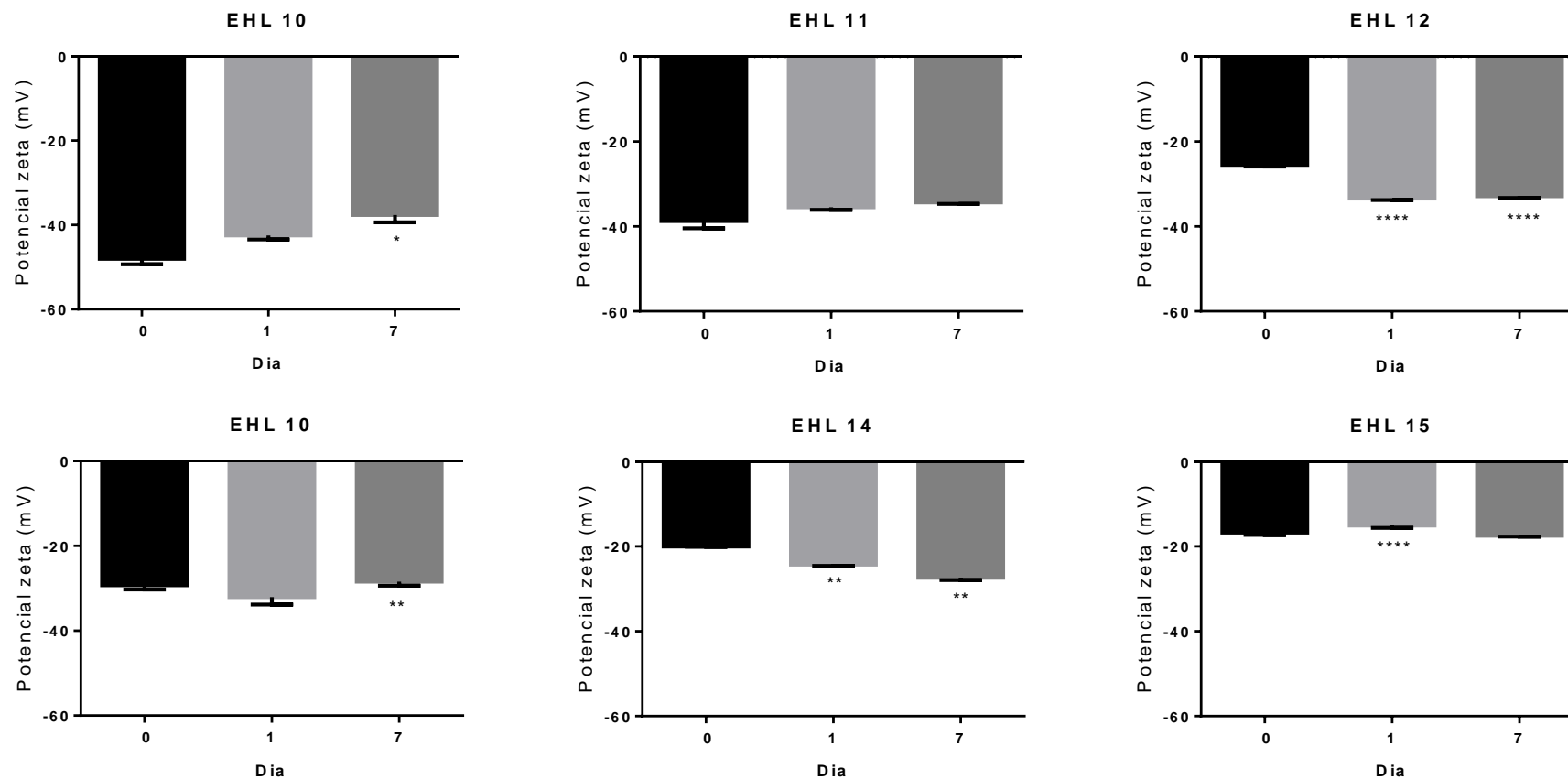
Legenda: IPD: Índice de Polidispersão; P. ZETA: Potencial Zeta.

Gráfico 5: Tamanho médio das gotículas e índice de polidispersão das formulações contendo β -pineno



Legenda: * $p < 0,05$ em comparação com dia da preparação (dia 0); ** $p < 0,01$ em comparação com dia 0; *** $p < 0,001$ em comparação com dia 0; **** $p < 0,0001$ em comparação com dia 0. Barras: Tamanho (nm); Linhas: índice de polidispersão

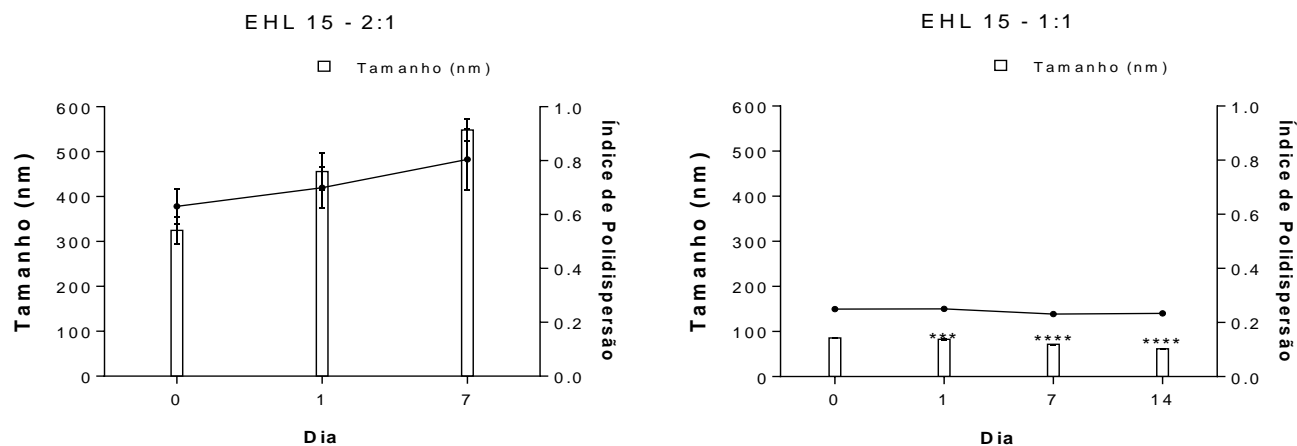
Gráfico 6: Potencial Zeta (mV) de nanoemulsões contendo β -pineno



Legenda: * $p < 0,05$ em comparação com dia da preparação (dia 0); ** $p < 0,01$ em comparação com dia 0; *** $p < 0,001$ em comparação com dia 0; **** $p < 0,0001$ em comparação com dia 0.

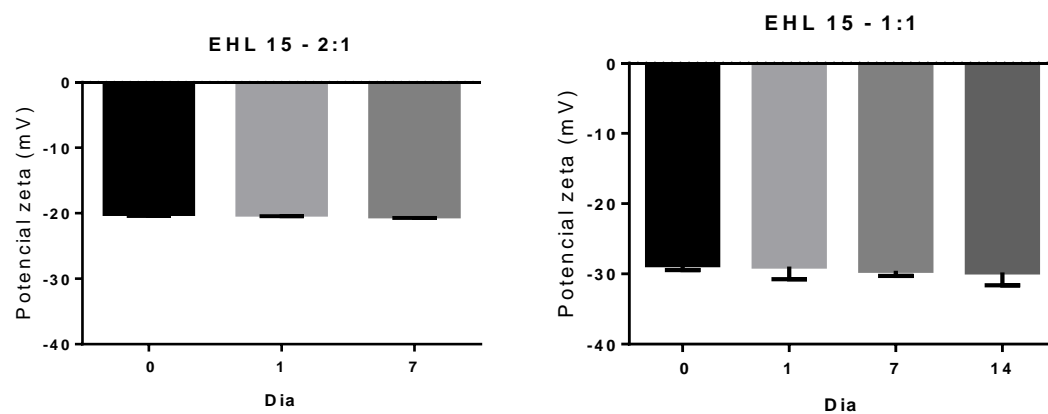
Nessa segunda etapa do desenvolvimento das novas nanoemulsões contendo β -pineno, foram feitas com relação surfactante para óleo 2:1 ou 1: 1. A nanoemulsão chamada EHL 15 - 2: 1 formou o maior tamanho médio das partículas (média em torno de 442 nm), que aumentou em um período de 7 dias ($P < 0,05$). No entanto, após 7 dias, as propriedades físico-químicas da nanoemulsão de β -pineno produzida com polissorbato 20 / monooleato de sorbitano EHL 15 - 1:1 ($d \approx 71$ nm, PDI 0,23) foram significativamente melhores do que a produzida, na primeira etapa, com polissorbato 80 EHL 15 ($d \approx 198,8$ nm, PDI 0,4). Assim, consideramos que a nanoemulsão de β -pineno preparada com polissorbato 20 / monooleato de sorbitano e EHL 15 - 1:1 é adequada para análises posteriores devido ao fato de também apresentar tamanho médio das partículas satisfatório baixo, PDI menor que 0,3 e sem alteração do potencial zeta ao longo do período analisado.

Gráfico 7: Tamanho médio das gotículas e índice de polidispersão das nanoemulsões de β -pineno



Legenda: * $p < 0,05$ em comparação com dia da preparação (dia 0); ** $p < 0,01$ em comparação com dia 0; *** $p < 0,001$ em comparação com dia 0; **** $p < 0,0001$ em comparação com dia 0. Barras: Tamanho (nm); Linhas: índice de polidispersão

Gráfico 8: Potencial zeta (mV) das nanoemulsões contendo de β -pineno



4.2.4 Formulações contendo R-(+)-limoneno

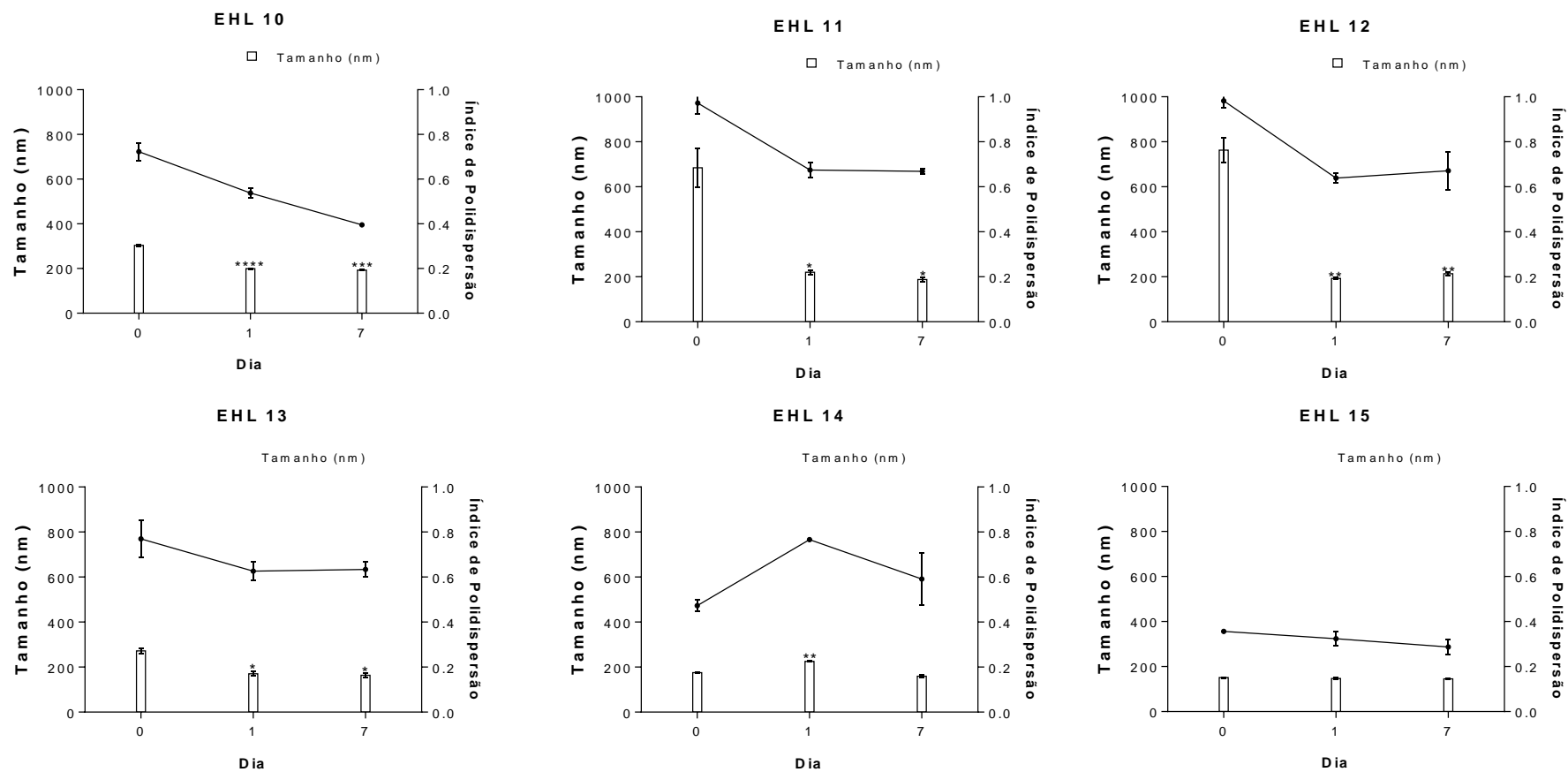
Nas análises realizadas contendo R-(+)-limoneno, pôde-se observar maior tamanho médio e índice de polidispersão (Tabela 9) nas formulações recém preparadas com monooleato e polissorbato de sorbitano 80. Essas formulações (EHL 11 e 12) apresentaram tamanho médio de gotículas de $684,4 \pm 84,8$ nm e $762,5 \pm 55,22$, índices de polidispersão de 0,97 e 0,98, respectivamente. Inicialmente as estatísticas comprovaram diferenças das formulações nos dias 0 e 1 de análise e entre os outros EHL analisados. As emulsões produzidas com valores de EHL de 10, 13 e 14 apresentaram tamanhos médios de gotícula iniciais de $304,1 \pm 4,8$, $272,2 \pm 12,33$ e $175,2 \pm 2,5$ e índice de polidispersão de 0,72, 0,77 e 0,47, respectivamente. Sendo estatisticamente diferentes entre si somente os EHL 10 e 14. As formulações produzidas com polissorbato 80 (EHL 15) apresentou tamanho médio de gotículas de inicial de $151,0 \pm 1,9$ nm e índice de polidispersão de 0,35, sem diferenças estatísticas entre os dias 0, 1 e 7 (Gráfico 9). Todas as formulações apresentaram valores de potencial zeta negativos e ao redor de -37 mV no dia de preparação (Gráfico 10). Em função do menor tamanho de gotícula e índice de polidispersão apresentados, a formulação de EHL15 foi escolhida para a avaliação da estabilidade em relação à distribuição do tamanho durante um tempo mais prolongado.

Tabela 9: Tamanho médio das gotículas, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações contendo R-(+)-limoneno

	Dia 0			Dia 1			Dia 7		
EHL	TAMANHO	IPD	P. ZETA	TAMANHO	IPD	P. ZETA	TAMANHO	IPD	P ZETA
10	302,4	0,754	-35,7	198,6	0,529	-38,0	191,7	0,392	-38,8
	309,6	0,737	-32,2	201,3	0,523	-37,9	191,7	0,392	-41,1
	300,3	0,677	-34,3	197,8	0,561	-38,4	195,0	0,403	-38,7
11	609,9	1,000	-36,6	225,2	0,711	-32,0	197,2	0,674	-27,5
	776,8	0,917	-33,5	227,3	0,658	-32,3	182,3	0,657	-27,8
	666,5	1,000	-36,9	209,3	0,654	-31,0	183,9	0,675	-27,8
12	699,3	1,000	-35,5	196,5	0,661	-34,5	219,7	0,753	-32,0
	786,8	1,000	-36,1	194,2	0,639	-34,8	216,6	0,584	-31,3
	801,4	0,946	-36,9	187,2	0,617	-35,3	205,0	0,676	-31,1
13	259,4	0,865	-28,3	181,2	0,613	-27,4	168,2	0,672	-27,6
	284,0	0,734	-26,4	167,4	0,671	-27,1	168,6	0,625	-26,6
	273,1	0,711	-26,3	161,7	0,594	-26,7	153,9	0,605	-26,3
14	172,2	0,481	-23,3	227,7	0,775	-13,4	168,4	0,470	-22,3
	176,4	0,493	-24,1	223,8	0,757	-13,7	154,3	0,603	-22,2
	176,9	0,444	-23,1	225,0	0,766	-15,0	156,2	0,700	-21,8
15	152,3	0,362	-20,1	145,7	0,338	-23,1	144,9	0,277	-19,5
	148,7	0,357	-20,4	149,7	0,290	-22,1	147,1	0,261	-19,0
	151,9	0,351	-20,6	146,1	0,344	-23,4	144,0	0,324	-19,0

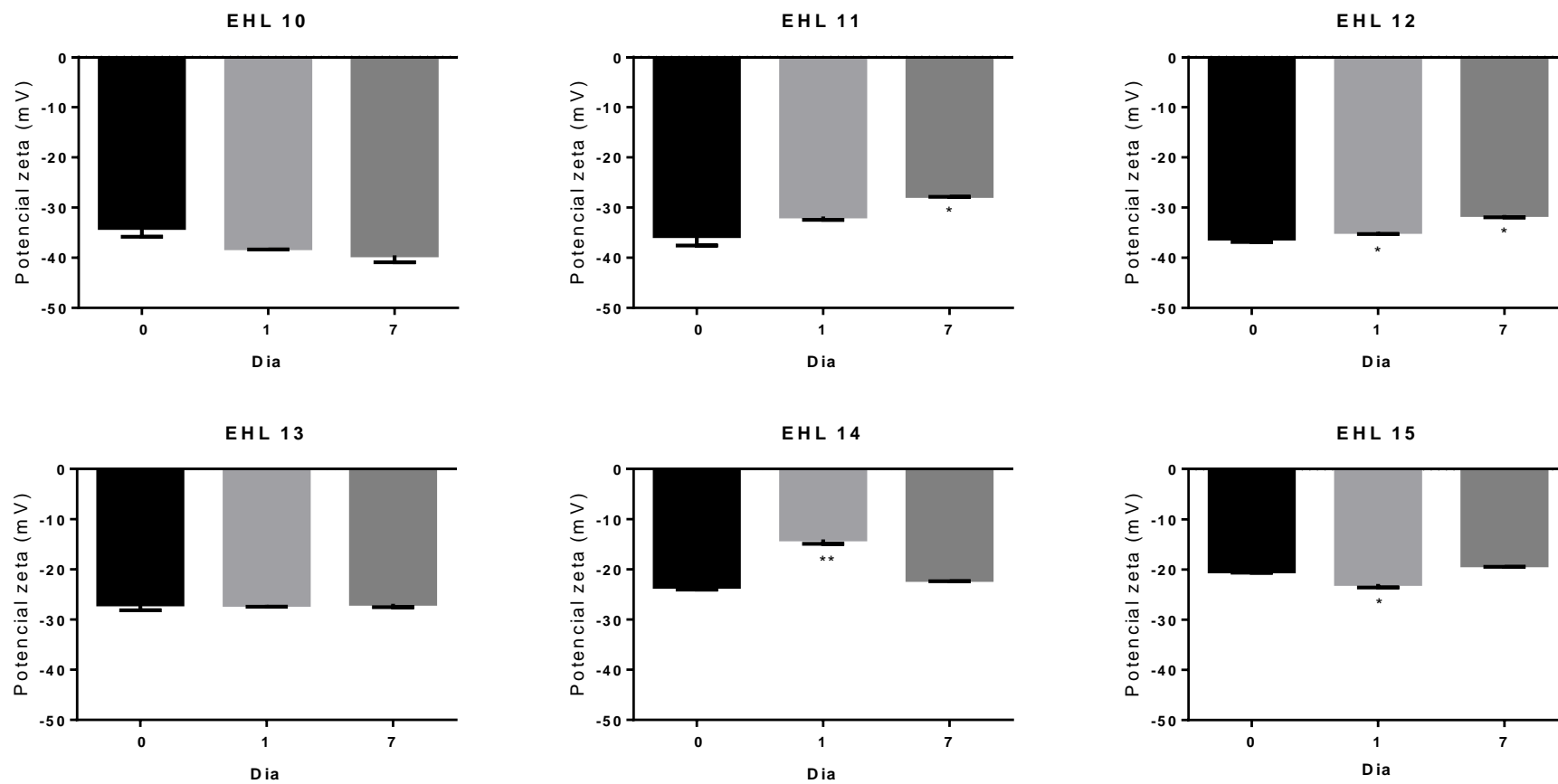
Legenda: IPD: Índice de Polidispersão; P. ZETA: Potencial Zeta.

Gráfico 9: Tamanho e índice de polidispersão das formulações contendo R-(+)-limoneno



Legenda: * $p < 0,05$ em comparação com dia da preparação (dia 0); ** $p < 0,01$ em comparação com dia 0; *** $p < 0,001$ em comparação com dia 0; **** $p < 0,0001$ em comparação com dia 0. Barras: Tamanho (nm); Linhas: índice de polidispersão

Gráfico 10: Potencial Zeta (mV) das nanoemulsões preparadas com R-(+)-limoneno



Legenda: * $p < 0,05$ em comparação com dia da preparação (dia 0); ** $p < 0,01$ em comparação com dia 0.

Nas análises realizadas acima verificou-se que óleo essencial, β -pineno e R-(+)-limoneno obtiveram os melhores valores de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta quando produzidas com EHL 15. Já o α -pineno apresentou melhores resultados com EHL 13. Os óleos essenciais geralmente requerem EHL na próximos de 15 (DUARTE, *et al.*, 2015; AMADO *et al.*, 2020). Entretanto, existem óleos essenciais com valores de EHL requeridos que fogem à essa regra (MAZAREI; RAFATI, 2019). De forma geral, o valor de EHL requerido para o desenvolvimento de uma nanoemulsão de um óleo essencial depende diretamente da sua composição química. A polaridade, a geometria e a presença de grupos funcionais específicos podem alterar a forma com a qual um constituinte de óleo essencial interage com as substâncias em sua volta (tensoativos) e determinar que tipo de emulsificação tal substância formará em cada ambiente químico. Dessa forma, é de se esperar que os constituintes químicos de um óleo essencial requeiram diferentes valores de EHL, tal como visto neste estudo.

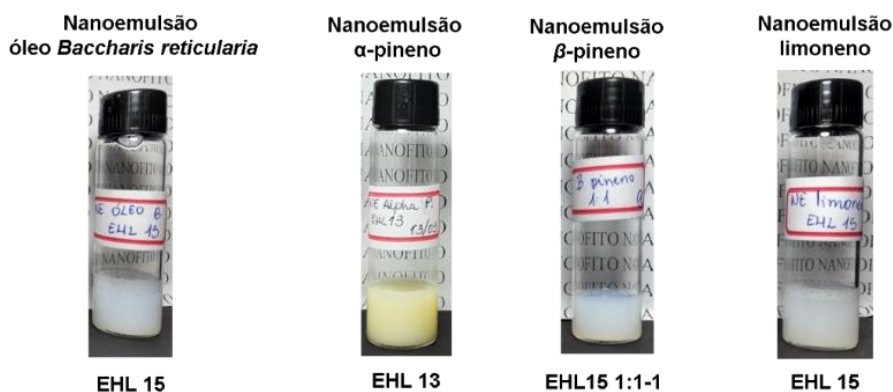
4.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE CINÉTICA DAS NANOEMULSÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *B. reticularia* E SEUS CONSTITUINTES

As formulações desenvolvidas nesse trabalho, são caracterizadas como nanoemulsões por apresentarem tamanho médio da gotícula de 20 a 200 nm (SOLANS; SOLÉ, 2012), o que as torna formulações promissoras, pois influencia diretamente na melhora da solubilidade, biodisponibilidade e funcionalidade de ativos hidrofóbicos (SILVA, 2012). Apesar das nanoemulsões não serem termodinamicamente estáveis, o que significa que elas têm uma tendência natural a sofrer separação de fases, a estabilidade cinética pode ser alcançada através do controle das propriedades físicas e químicas de uma nanoemulsão, que pode permanecer estável por muitos meses. Embora as nanoemulsões contendo o óleo essencial de *Baccharis reticularia* e seu constituinte principal, R-(+)-limoneno, tenham sido produzidas em estudos anteriores, sua estabilidade foi medida apenas nas primeiras 24 horas. O mesmo foi feito com o constituinte principal do óleo essencial, o β -pineno. No entanto, muitos dos eventos de perda de estabilidade das nanoemulsões são perceptíveis apenas após alguns dias ou semanas. Neste estudo, as nanoformulações selecionadas foram analisadas pelo tempo máximo possível, ou seja, até perderem suas propriedades de nanoemulsão.

As nanoemulsões contendo óleo essencial de *B. reticularia* (EHL=15), β -pineno (EHL=15), α -pineno (EHL=13) e R-(+)-limoneno (EHL=15), apresentaram um aspecto visual

levemente azulado (Figura 16), característico de nanoformulações com pequeno tamanho médio das partículas (FORGIARINI et al., 2000), sem separação de fases durante os dias analisados. Além disso, apresentaram características físico-químicas adequadas ao longo do tempo, incluindo o tamanho médio das partículas abaixo de 200 nm, índice de polidispersão abaixo de 0,4 e carga superficial negativa.

Figura 16: Fotografias das nanoemulsões preparadas

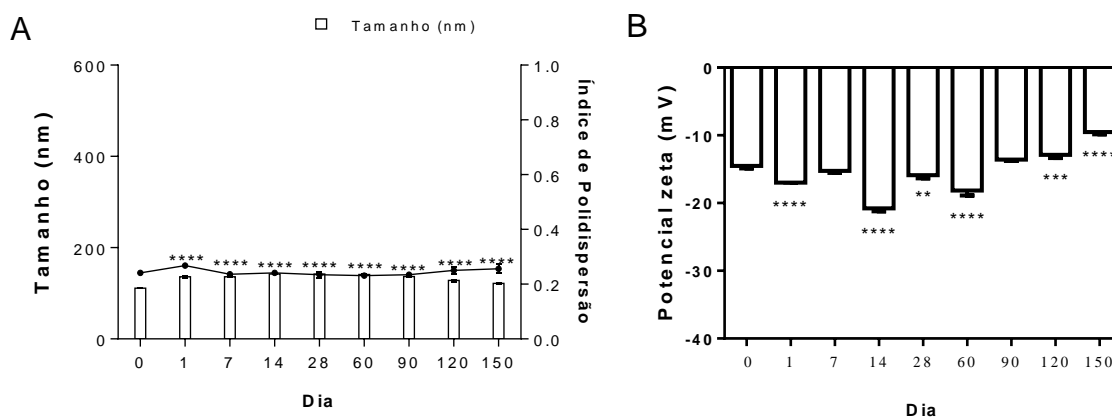


4.3.1 Nanoemulsão contendo óleo essencial de *B. reticularia*

A nanoemulsão de óleo essencial de *B. reticularia* mostrou um aumento significativo no tamanho das gotículas durante os primeiros 14 dias, seguido de um período de estabilidade até apresentar uma redução no tamanho entre os dias 90 e 120 (Gráfico 11). No final da análise de estabilidade, a nanoemulsão de óleo essencial mostrou um tamanho médio da gotícula entre os valores dos dias 0 e 1. Durante os 150 dias de análise, o tamanho médio das gotículas variou apenas 31,6 nm, o que demonstra uma boa estabilidade da nanoemulsão. Seus valores de PDI e potencial zeta também mostraram pouca variação.

Os dados de tamanho médio da gotícula do presente estudo corroboram com a literatura, de acordo com Oliveira e colaboradores (2016) após 7 dias de análise as nanoemulsões de óleo essencial de sucupira (*Pterodon emarginatus*) tiveram também um aumento de tamanho das gotículas. Botas e colaboradores (2017) avaliaram a nanoemulsão do óleo essencial de *B. reticularia* somente no dia da preparação e após 24 h com resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho, com tamanho médio da gotícula próximo a 93 nm, índice de polidispersão 0,4 e potencial zeta de -20 mV.

Gráfico 11: Acompanhamento do tamanho médio das gotículas (nm), índice de polidispersão e potencial zeta (mV) da nanoemulsão contendo óleo essencial de *B. reticularia* (EHL 15)



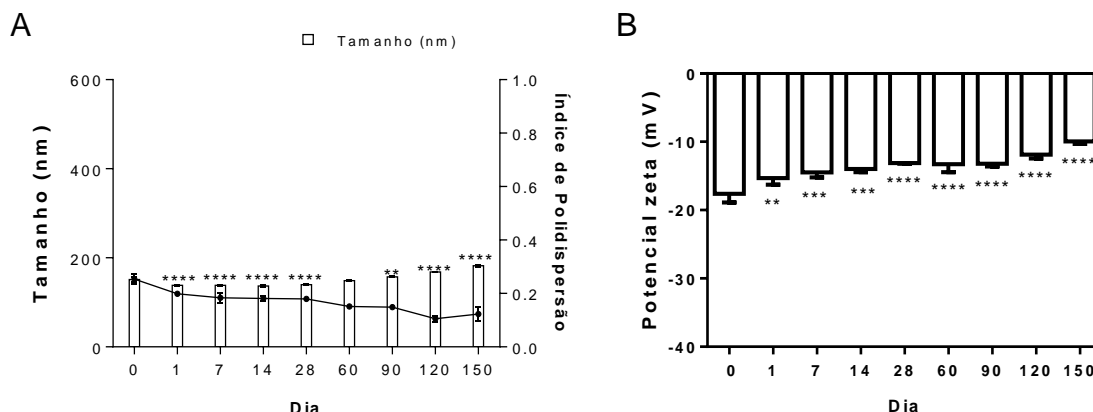
Legenda: Acompanhamento dos parâmetros físico-químicos da nanoemulsão do óleo de *Baccharis reticularia*. Significado: * $p < 0,05$ em comparação com dia da preparação (dia 0); ** $p < 0,01$ em comparação com dia 0; *** $p < 0,001$ em comparação com dia 0; **** $p < 0,0001$ em comparação com dia 0. A: Tamanho das gotículas (barras) e índices de polidispersão (linhas). B: Potenciais Zeta.

4.3.2 Nanoemulsão contendo α -pineno

A nanoemulsão de α -pineno, de EHL 13, também ficou estável por 150 dias. A diferença entre os valores máximo e mínimo de tamanho médio das gotículas foi de 45,3 nm. Após o dia 1, os valores de tamanho das gotículas permaneceram constantes até o dia 60, após o qual a nanoemulsão mostrou um aumento significativo e constante até o dia 150. O potencial zeta aumentou a partir do dia 90 e esse pode ser um dos fatores que favoreceu o aumento do tamanho médio das gotículas.

Estes dados estão de acordo com Oliveira *et al.* (2016), que após 7 dias de análise as nanoemulsões de óleo essencial de sucupira tiveram um aumento de tamanho para ambos EHL avaliados, assim como óleo de copaíba, que apresentou aumento de tamanho nos 30 dias avaliados (RODRIGUES, 2014).

Gráfico 12: Acompanhamento do tamanho médio das gotículas (nm), índice de polidispersão e potencial zeta (mV) da nanoemulsão contendo α -pineno (EHL 13)

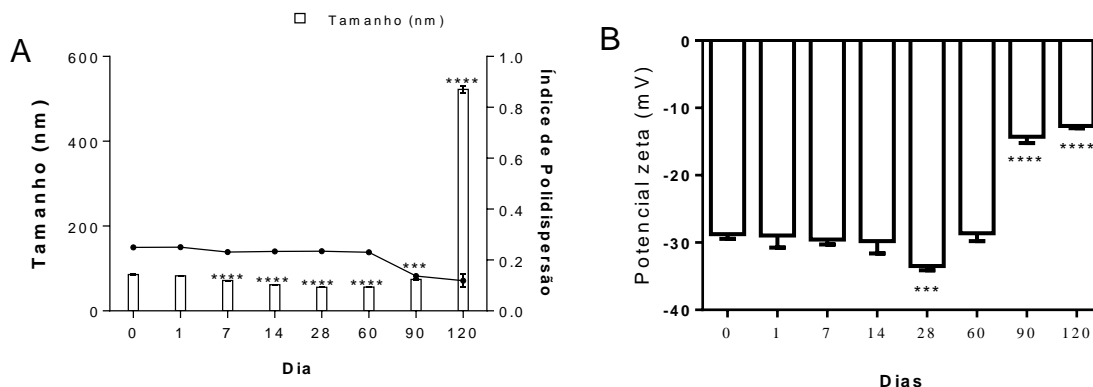


Legenda: Acompanhamento dos parâmetros físico-químicos da nanoemulsão com α -pineno. Significado: * $p < 0,05$ em comparação com dia da preparação (dia 0); ** $p < 0,01$ em comparação com dia 0; *** $p < 0,001$ em comparação com dia 0; **** $p < 0,0001$ em comparação com dia 0. A: Tamanho das gotículas (barras) e índices de polidispersão (linhas). B: Potenciais Zeta.

4.3.3 Nanoemulsão de β -pineno

A nanoemulsão de β -pineno manteve suas características de nanoemulsão até o dia 120, pelo menos. No entanto, o tamanho médio das gotículas no dia 150 aumentou significativamente para 522,033, um valor acima do limite para nanoemulsões. Os dados da literatura mostram que as nanoemulsões desenvolvidas com Tween 20 apresentam geralmente tamanho menor de partícula. Assim como, tamanho médio de gotícula de até 200 nm podem ficar estáveis durante seis meses, comprovando que a nanoemulsão de β -pineno atingiu parte do tempo previsto (ÁVALOS, 2017).

Gráfico 13: Acompanhamento do tamanho médio das gotículas (nm), índice de polidispersão e potencial zeta (mV) da nanoemulsão contendo β -pineno (EHL 15)

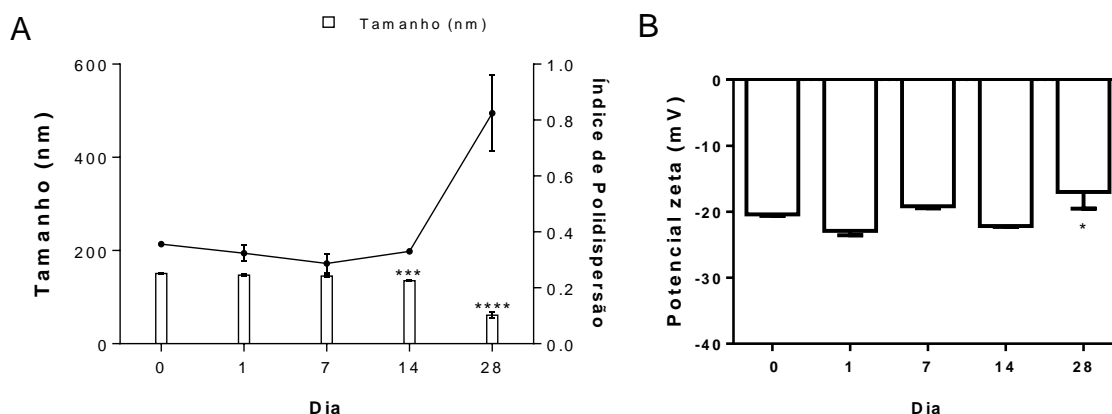


Legenda: Acompanhamento dos parâmetros físico-químicos da nanoemulsão com α -pineno. Significado: * $p < 0,05$ em comparação com dia da preparação (dia 0); ** $p < 0,01$ em comparação com dia 0; *** $p < 0,001$ em comparação com dia 0; **** $p < 0,0001$ em comparação com dia 0. A: Tamanho das gotículas (barras) e índices de polidispersão (linhas). B: Potenciais Zeta.

4.3.4 Nanoemulsão de R-(+)-limoneno

Em função do menor tamanho médio das gotículas e índice de polidispersão apresentado pela formulação de EHL15 esta foi escolhida para a avaliação da estabilidade em relação à distribuição do tamanho durante um tempo mais prolongado (Gráfico 15). Estes dados estão de acordo com Botas e colaboradores (2017) que produziram uma nanoemulsão de R-(+)-limoneno com tamanho médio das gotículas inicial de 135 nm e índice de polidispersão de 0,5. A nanoemulsão de R-(+)-limoneno analisando no presente trabalho apresentou acentuada redução de tamanho e o índice de polidispersão um aumento expressivo no 28º dia e, por isso, as medidas subsequentes não foram realizadas. Botas e colaboradores (2017) apresentaram resultados semelhantes, com acompanhamento da nanoemulsão somente no dia da preparação e 24 h depois, que demonstra que a nanoemulsão realizada no presente trabalho obteve resultados promissores.

Gráfico 14: Acompanhamento do tamanho das gotículas (nm), índice de polidispersão e potencial zeta (mV) da nanoemulsão contendo R-(+)-limoneno (EHL 15)



Legenda: Acompanhamento dos parâmetros físico-químicos da nanoemulsão contendo R-(+)-limoneno. Significado: * $p < 0,05$ em comparação com dia da preparação (dia 0); ** $p < 0,01$ em comparação com dia 0; *** $p < 0,001$ em comparação com dia 0; **** $p < 0,0001$ em comparação com dia 0. A: Tamanho das gotículas (barras) e índices de polidispersão (linhas). B: Potenciais Zeta.

As formulações do presente trabalho tiveram parâmetros físico-químicos de acordo com os previamente descritos para nanoemulsões de óleos essenciais em estudos presentes na literatura (DA BOTAS et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017; RODRIGUES et al., 2014). Na literatura também foram observadas estabilidade em média de 31 dias para caneleira verdadeira (CHUESIANG et al., 2019), 90 dias de caracterização e estabilidade do óleo de semente de romã (JUNIOR et al., 2013) e 180 dias para óleo essencial de tomilho (MOGHIMI et al., 2016). Existem variantes que influenciam diretamente no desenvolvimento de uma nanoemulsão, e uma dessas causas que está relacionada com estabilidade é a composição do óleo essencial.

Os pequenos tamanhos das partículas de uma nanoemulsão atribuem estabilidade à formulação, dificultando a separação de fases e agregação quando comparado a emulsões convencionais (MCCLEMENTS, 2011). As mesmas são estáveis a separação gravitacional, floculação, no entanto, são menos estáveis ao fenômeno chamado maturação de *Ostwald* (KOROLEVA; NAGOVITSINA; YURTOV, 2018). O que pode justificar a diferença nos tamanhos ao longo do tempo nas nanoemulsões avaliadas, pois esse fenômeno é encontrado em sistemas líquido-líquido, como as nanoemulsões, pela diferença de solubilidade e dos potenciais químicos entre partículas de tamanhos diferentes. Ocorrendo a difusão de gotículas individuais menores para gotículas maiores, caracterizando esse fenômeno devido a hidrossolubilidade de um óleo em uma gota

aumentar à medida que o tamanho da gota de óleo diminui, alterando então sua curvatura (MCCLEMENTS, 2011).

Na literatura foi comprovado que a maturação de *Ostwald* é o principal mecanismo para instabilidade a longo prazo de uma nanoemulsão (ABOOFAZELI, 2010) formada por tensoativos polissorbato 80 com EHL de 15 e monooleato de sorbitano. Esses tensoativos estabilizam a nanoemulsão por 5 a 10 dias após sua preparação, já para os dias posteriores o amadurecimento de *Ostwald* começa agir (KOROLEVA; NAGOVITSINA; YURTOV, 2018) podendo relacionar esse fenômeno com os resultados obtidos das nanoemulsões do óleo essencial e suas substâncias majoritárias.

Os resultados obtidos revelam um fato muito importante sobre o desenvolvimento de nanoemulsões, que às vezes é negligenciado: a importância de monitorar as características das nanoemulsões ao longo do tempo. Neste trabalho, todas as nanoemulsões apresentaram boas propriedades físico-químicas quando preparadas na hora e nos dias seguintes. Tais resultados podem levar a uma conclusão equivocada de que a nanoemulsão de β -pineno teria as mesmas ou até melhores propriedades que as nanoemulsões de óleo essencial da *B. reticularia* e α -pineno, devido ao seu pequeno tamanho médio de gotícula e ao potencial zeta altamente negativo. No entanto, a estabilidade das propriedades do óleo essencial e das nanoemulsões de α -pineno mostrou-se mais importante que os valores iniciais.

4.4 ATIVIDADE REPELENTE DAS NANOEMULSÕES FRENTE AO *Tribolium castaneum*

Todas as nanoemulsões apresentaram atividade repelente. Em concentrações de 4,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ou acima, a nanoemulsão do óleo essencial apresentou significativa atividade repelente, o que indica que a nanoencapsulação promoveu melhorias na miscibilidade em água do óleo essencial sem diminuir a atividade repelente em comparação à sua forma livre.

Tabela 10: Atividade Repelente contra *T. castaneum*

	Concentração ($\mu\text{g cm}^{-2}$) ¹	Porcentagem de Repelência (%)		Classificação ²	
		2 h	4 h	2 h	4 h
Nanoemulsão do	17,6	100 ($\pm 0,0$) ^{***}	100 ($\pm 0,0$) ^{***}	Classe V	Classe V

óleo essencial	8,8	98 ($\pm 4,5$) ^{***}	98 ($\pm 4,5$) ^{***}	Classe V	Classe V
	4,4	82 ($\pm 19,2$) ^{**}	78 ($\pm 19,2$) ^{**}	Classe V	Classe IV
	1,1	34 ($\pm 77,3$)	24 ($\pm 70,2$)	Inativo	Inativo
	0,11	-42 ($\pm 35,6$)	-22 ($\pm 31,2$)	Inativo	Inativo
Nanoemulsão de α -pineno	17,6	96 ($\pm 5,5$) ^{****}	96 ($\pm 5,5$) ^{****}	Classe V	Classe V
	8,8	92 ($\pm 8,4$) ^{****}	90 ($\pm 12,3$) ^{****}	Classe V	Classe V
	4,4	94 ($\pm 5,5$) ^{****}	90 ($\pm 10,0$) ^{****}	Classe V	Classe V
	1,1	78 ($\pm 13,0$) ^{****}	74 ($\pm 15,2$) ^{****}	Classe IV	Classe IV
	0,11	-2 ($\pm 57,6$)	-16 ($\pm 56,0$)	Inativo	Inativo
Nanoemulsão de β -pineno	17,6	76 ($\pm 28,8$) ^{**}	60 ($\pm 20,0$) [*]	Classe IV	Classe III
	8,8	48 ($\pm 26,8$)	64 ($\pm 20,7$) [*]	Inativo	Classe IV
	4,4	52 ($\pm 42,7$)	18 ($\pm 51,7$)	Inativo	Inativo
	1,1	-6 ($\pm 43,9$)	-8 ($\pm 31,1$)	Inativo	Inativo
	0,11	-14 ($\pm 57,3$)	-20 ($\pm 42,4$)	Inativo	Inativo
Nanoemulsão de R-(+)-limoneno	17,6	86 ($\pm 11,4$) ^{****}	82 ($\pm 21,7$) ^{****}	Classe V	Classe V
	8,8	72 ($\pm 17,9$) ^{****}	66 ($\pm 25,1$) ^{***}	Classe IV	Classe IV
	4,4	56 ($\pm 29,7$) ^{**}	46 ($\pm 15,2$) [*]	Classe III	Classe III
	1,1	44 ($\pm 16,7$) [*]	40 ($\pm 52,4$) [*]	Classe II	Classe II
	0,11	-20 ($\pm 23,5$)	8 ($\pm 19,2$)	Inativo	Inativo

Legenda: ¹: Concentração em microgramas de produto natural (óleo essencial, limoneno, α -pineno e β -pineno) por área (cm²) da superfície do papel de filtro. ²: Classificação da atividade repelente de acordo com (McDonald *et al.*, 1970). *, **, *** e **** indicam diferenças significativas (p < 0,05, 0,01, 0,001 e 0,0001, respectivamente) em comparação a 0,1% (valor máximo de porcentagem de repelência para amostras inativas).

As nanoemulsões de α -pineno, β -pineno e R-(+)-limoneno tiveram comportamento semelhante. Entretanto, apenas a nanoemulsão de α -pineno foi ativa na concentração de $1,1 \mu\text{g cm}^{-2}$. Por outro lado, seu isômero beta foi o menos ativo das amostras testadas, sendo inativo a $4,4 \mu\text{g cm}^{-2}$. Na verdade, não é incomum que isômeros de produtos naturais tenham atividades biológicas diferentes. R-(+)-limoneno e S-(-)-limoneno, por exemplo, mostraram atividades repelentes significativamente diferentes contra *Tribolium confusum* (MALACRINÒ et al., 2016). Isso sugere que, apesar de todos os três monoterpenos testados contribuírem para a ação repelente do óleo essencial, a extensão dessa contribuição depende das características estruturais de cada substância.

Enzimas, como a acetilcolinesterase, são alvos importantes para a ação de produtos naturais contra insetos e, portanto, o teste de atividade anticolinesterásica pode ser útil na elucidação dos mecanismos de ação envolvidos (RATTAN, 2010). Tanto o óleo essencial de *B. reticularia* quanto os monoterpenos testados são conhecidos agentes anticolinesterásicos, o que pode indicar o papel dessa atividade nas atividades repelentes (BOTAS et al., 2017; SAVELEV et al., 2003). Esse fato pode ajudar a explicar a diferença significativa entre α -pineno e β -pineno, uma vez que dados da literatura indicam que o α -pineno tem maior atividade anticolinesterásica (SEO et al., 2015). Dados da literatura mostram que formas livres (não nanoemulsificadas) de R-(+)-limoneno e β -pineno foram ativas contra *Tribolium castaneum* (LIANG et al., 2020; PAJARO-CASTRO; CABALLERO-GALLARDO; OLIVERO-VERBEL, 2017; TRIPATHI et al., 2009). No entanto, a alta volatilidade e hidrofobicidade dificultam o uso desses monoterpenos como agente de controle de pragas em larga escala. Neste trabalho, entretanto, a nanoemulsificação de monoterpenos e óleo essencial permitiu sua incorporação em uma matriz aquosa sem perder suas atividades repelentes. Isso está de acordo com Giunti e colaboradores (2019) que demonstrou repelência de uma nanoemulsão de óleo essencial de laranja doce, rica em limoneno, para outra espécie *T. confusum* de 710 a $10 \mu\text{g cm}^{-2}$.

A ação repelente é uma estratégia importante para o controle de pragas, pois permite proteger o material armazenado mesmo empregando baixas concentrações de substâncias bioativas. Além disso, o uso de produtos repelentes naturais reduz a possibilidade de um desequilíbrio em espécies da população não-alvo agindo como um controle de pragas ambientalmente correto. Porém, apesar dos resultados promissores na área de bioinseticidas, o estudo das nanoemulsões como forma de controle do *T.*

castaneum ainda é incipiente. Assim, este trabalho representa um avanço considerável ao combinar nanotecnologia e produtos naturais para proteção pós-colheita de culturas.

As nanoemulsões foram preparadas com sucesso com o método de baixa energia a fim de diminuir o impacto ambiental, o custo de produção e permitir maior escalabilidade. Além disso, o rEHL do óleo essencial e seus constituintes isolados foram determinados pela produção de nanoemulsões. O óleo essencial de *Baccharis reticularia* demonstrou atividade repelente e também nanoemulsão. Este estudo demonstrou o desenvolvimento de novas formulações repelentes com ação otimizada. A nanoemulsão de α -pineno seguida da nanoemulsão de R-(+)-limoneno apresentou a atividade repelente mais efetiva contra *T. castaneum*. A presença de α -pineno e R-(+)-limoneno pode estar relacionada à boa atividade repelente do óleo essencial. Este estudo mostrou que o óleo essencial de *B. reticularia* é uma importante fonte de repelentes contra *T. castaneum*, sendo uma alternativa promissora aos atuais repelentes sintéticos utilizados no controle desse organismo.

- ADAK, T., BARIK, N., PATIL, N.B., GOVINDHARAJ, G.-P.-P., GADRATAGI, B.G., ANNAMALAI, M., MUKHERJEE, A.K., RATH, P.C., 2020. Nanoemulsion of eucalyptus oil: An alternative to synthetic pesticides against two major storage insects (*Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst)) of rice. **Industrial Crops and Products**. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111849>
- ABAD, M. J.; BERMEJO, P. Baccharis (Compositae): a review update. **Arkivoc**, v. 2007, n. 7, p. 76, 5 set. 2006.
- ABOOFAZELI, R. Nanometric-scaled emulsions (nanoemulsions). **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 4, p. 325–326, 2010.
- ALENCAR, ERNANDES RODRIGUES DE, LÊDA RITA D'ANTONINO FARONI, LAÍNE GARCIA FERREIRA, A. R. DA C.; PIMENTEL, M. A. G. Qualidade de milho armazenado e infestado por. p. 9–18, [s.d.].
- ALVES, K. F. et al. Baccharis dracunculifolia (Asteraceae) essential oil toxicity to Culex quinquefasciatus (Culicidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 31, p. 31718–31726, 12 nov. 2018.
- ASADINEZHAD, S. et al. Effect of different parameters on orange oil nanoemulsion particle size: combination of low energy and high energy methods. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 13, n. 4, p. 2501–2509, 2019.
- ATHANASSIOU, C. G. et al. Insecticidal efficacy of diatomaceous earth against Sitophilus oryzae (L.) (Coleoptera: Curculionidae) and Tribolium confusum du Val (Coleoptera: Tenebrionidae) on stored wheat: Influence of dose rate, temperature and exposure interval. **Journal of Stored Products Research**, v. 41, n. 1, p. 47–55, 2005.
- ATTA, B. et al. Damage potential of Tribolium castaneum (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) on wheat grains stored in hermetic and non-hermetic storage bags. **International Journal of Tropical Insect Science**, 2019.
- BORGES, C. A. Sistema de Boas Praticas de Armazenagem da Casemg - SBPA. 2015.
- BORGES, R. A. X.; FORZZA, R. C. A tribo Astereae (Asteraceae) no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 26, n. 2, p. 131–154, 2008.
- BRASIL. **IBGE | Agência de Notícias | Perdas de grãos, no Brasil, chegam a cerca de 10% da colheita**. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/12911-asi-perdas-de-graos-no-brasil-chegam-a-cerca-de-10-da-colheita>>. Acesso em: 26 jun. 2019.
- BUDEL, J. et al. Essential Oils of Five Baccharis Species: Investigations on the Chemical Composition and Biological Activities. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2620, 12 out. 2018.
- CAMPOS, R. et al. Baccharis (Asteraceae): Chemical Constituents and Biological

Activities. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, p. 1–17, 2016.

CHEN, Z. et al. Diagnostic molecular markers for phosphine resistance in U.S. populations of *Tribolium castaneum* and *Rhyzopertha dominica*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–14, 2015.

CHUESIANG, P. et al. Antimicrobial activity and chemical stability of cinnamon oil in oil-in-water nanoemulsions fabricated using the phase inversion temperature method. **Lwt**, v. 110, n. March, p. 190–196, 2019.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira. **Companhia Nacional de Abastecimento**, v. 5, n. 4, p. 1–113, 2019.

CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: Revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 4, p. 500–506, 2011.

COSTABILE, L. T. ESTUDO SOBRE AS PERDAS DE GRÃOS NA COLHEITA E PÓS COLHEITA. v. Tese de Do, 2017.

DA BOTAS, G. S. et al. *Baccharis reticularia* DC. and Limonene Nanoemulsions: Promising Larvicidal Agents for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Control. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1–14, 2017.

DEVI, M. B.; DEVI, N. V. Biology of rust-red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Tenebrionidae: Coleoptera) . **Indian Journal of Entomology**, v. 77, n. 1, p. 81, 2015.

DUARTE, J. L. et al. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *rosmarinus officinalis* essential oil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 2, p. 189–192, 2015.

EL-DESOUKY, T. A. et al. Impact of Insect Densities *Tribolium Castaneum* on the Benzoquinone Secretions and Aflatoxins Levels in Wheat Flour During Storage Periods. **The Open Biotechnology Journal**, v. 12, n. 1, p. 104–111, 2018.

ELHASSANEEN, Y. A.; EL-MOATY, A. A. A. Blood Oxidant and Antioxidant Status in Rats Feeding with Insect-infested Wheat Flour. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 15, p. 1354–1360, 1 dez. 2003.

ELIAS, M. C. **Armazenamento e Conservação dos Grãos**PELOTAS, 2003.

EMERENCIANO, V. P. et al. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 9, p. 947–957, out. 2001.

ESPINA, L. et al. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food Control**, v. 22, n. 6, p. 896–902, 2011.

FERNANDES, C. P. et al. HLB value, an important parameter for the development of essential oil phytopharmaceuticals. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 108–114, 2013.

FERREIRA, R.; BIZZO, H. R.; REZENDE, C. M. DE. Estudo Da Composição Química Do Óleo Essencial Das Folhas De *Baccharis Reticularia* Dc . p. 528, 2012.

- FONSECA, M. C. M. et al. Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. **Rev. Bras. Pl. Med**, n. 1, p. 45–50, 2015.
- FORGIARINI, A. et al. Studies of the relation between phase behavior and emulsification methods with nanoemulsion formation. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 115, p. 36–39, 2000.
- GANGWAR, P; TIWARI, S. N. Insecticidal Activity of Curcuma longa Essential Oil and its Fractions against Sitophilus oryzae L. and Rhyzopertha dominica F. (Coleoptera). **International Journal of Pure & Applied Bioscience**, v. 5, n. 3, p. 912–921, 2017.
- GARCÍA, M. et al. Toxic and repellent effects of Baccharis salicifolia essential oil on Tribolium castaneum. **Pest Management Science**, v. 61, n. 6, p. 612–618, jun. 2005.
- GIARRATANA, F. et al. Activity of R(+) limonene against anisakis larvae. **Italian Journal of Food Safety**, v. 4, n. 4, p. 209–211, 2015.
- GIUNTI, G. et al. Repellence and acute toxicity of a nano-emulsion of sweet orange essential oil toward two major stored grain insect pests. **Industrial Crops and Products**, v. 142, n. November, p. 111869, 2019.
- HĄC-WYDRO, K.; FLASIŃSKI, M.; ROMAŃCZUK, K. Essential oils as food eco-preservatives: Model system studies on the effect of temperature on limonene antibacterial activity. **Food Chemistry**, v. 235, p. 127–135, 2017.
- HARWANSI, R. K.; DESHMUKH, R.; RAHMAN, A. Nanoemulsion : Promising nanocarrier system for delivery of herbal bioactives. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 51, n. January, p. 224–233, 2019.
- HASHEM, A. S. et al. Pimpinella anisum essential oil nanoemulsions against Tribolium castaneum—insecticidal activity and mode of action. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 19, p. 18802–18812, 2018.
- HASSAN, M. et al. Evaluation of critical parameters for preparation of stable clove oil nanoemulsion. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 3225–3230, 2019.
- HEIDEN, G., SCHNEIDER, A. Baccharis in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015.
- HIRAKURI, M. H.; LORINI, I.; KRZYZANOWSKI, F. C. Análise de aspectos econômicos sobre a qualidade de grãos de soja no Brasil. n. February, 2019.
- HU, J. et al. Industrial Crops & Products Chemical composition and biological activity against Tribolium castaneum (Coleoptera : Tenebrionidae) of Artemisia brachyloba essential oil. **Industrial Crops & Products**, v. 128, n. October 2018, p. 29–37, 2019.
- HUANG, Y. et al. Susceptibility of Tribolium castaneum to phosphine in China and functions of cytochrome P450s in phosphine resistance. **Journal of Pest Science**, v. 92, n. 3, p. 1239–1248, 2019.
- HUBHACHEN, Z. et al. A CAPS marker for determination of strong phosphine resistance in Tribolium castaneum from Brazil. **Journal of Pest Science**, n. 0123456789, 2019.

- JÚNIOR, A. F. DE L. et al. Controle de pragas de grãos armazenados: uso e aplicação de fosfetos. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v. 5, n. 4, 2012.
- JÚNIOR, L. S. R.; USBERT, R. QUALIDADE FÍSICA E FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE TRIGO EXPURGADAS COM FOSFINA DURANTE O ARMAZENAMENTO. v. 29, p. 45–51, 2007.
- JUNIOR2, E. DA S. et al. Formação De Nanoemulsões Do Tipo Óleo Em Água Contendo Óleo De Semente De Romã. **Disciplinarum Scientia | Naturais e Tecnológicas**, v. 14, n. 1, p. 115–122, 2013.
- KORBES, C. V. **Manual de plantas medicinais**. 48^a ed. ed. [s.l: s.n.].
- KOROLEVA, M.; NAGOVITSINA, T.; YURTOV, E. Nanoemulsions stabilized by non-ionic surfactants: Stability and degradation mechanisms. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, n. 15, p. 10369–10377, 2018.
- KURDELAS, R. R. et al. Chemical composition, anti-insect and antimicrobial activity of *Baccharis darwinii* essential oil from Argentina, Patagonia. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 261–267, 2012.
- LIANG, J. Y. et al. Toxicity and synergistic effect of *Elsholtzia ciliata* essential oil and its main components against the adult and larval stages of *Tribolium castaneum*. **Foods**, v. 9, n. 3, 2020.
- LORINI, I. et al. **Manejo Integrado de Pragas de Grãos e Sementes Armazenadas**. [s.l: s.n.].
- LU, W. C. et al. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 1, p. 82–89, 2018.
- MAGWA, M. L. et al. Chemical composition and biological activities of essential oil from the leaves of *Sesuvium portulacastrum*. v. 103, p. 85–89, 2006.
- MALACRINÒ, A. et al. Fumigant and Repellent Activity of Limonene Enantiomers Against *Tribolium confusum* du Val. **Neotropical Entomology**, v. 45, n. 5, p. 597–603, 2016.
- MARIA, A. et al. A novel ionic amphiphilic chitosan derivative as a stabilizer of nanoemulsions . Improvement of antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* essential oil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2017.
- MARTIN-PIÑERO, M. J. et al. Development of rosemary essential oil nanoemulsions using a wheat biomass-derived surfactant. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 173, p. 486–492, 2019.
- MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: Fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, n. 6, p. 2297–2316, 2011.
- MIRANDA, C. A. S. F. et al. Essential oils from leaves of various species: antioxidant and antibacterial properties on growth in pathogenic species. **REVISTA CIÊNCIA AGRONÔMICA**, v. 47, n. 1, p. 213–220, 2016.

- MOGHIMI, R. et al. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. **Food Chemistry**, v. 194, p. 410–415, 2016.
- MOSSI, A. J. et al. Efeito repelente e inseticida de *Baccharis trimera* (less) dc no controle de insetos (*Acanthoscelides obtectus*) em grãos de feijão armazenados. p. 7831–7836, 2015.
- NIRMAL, N. P. et al. Formulation, characterisation and antibacterial activity of lemon myrtle and anise myrtle essential oil in water nanoemulsion. 2018.
- OLIVEIRA, A. E. M. F. M. et al. *Pterodon emarginatus* oleoresin-based nanoemulsion as a promising tool for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) control. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. 2, 3 dez. 2017.
- PAJARO-CASTRO, N.; CABALLERO-GALLARDO, K.; OLIVERO-VERBEL, J. Neurotoxic Effects of linalool and β -pinene on *tribolium castaneum* herbst. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 1–12, 2017.
- PATINO, M. T. O. et al. Analysis and forecast of the storage needs of soybeans in brazil. **Engenharia Agricola**, v. 33, n. 4, p. 834–843, 2013.
- PATURCA, E. Y. **Caracterização da Estruturas de Armazenagem de Grãos: Um Estudo de Caso no Mato Grosso** Universidade De São Paulo Escola Superior De Agricultura Luiz De Queiroz PIRACICABA - SP, 2014.
- PAUL M DEWICK. Biosynthetic approach. In: **Medicinal Natural Products**. Second Edition. [s.l: s.n.]. p. 109–112.
- PEIXOTO, M. G. et al. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 210, n. 1–2, p. 118–122, 2015.
- PIMENTEL, M. A. G. et al. Recomendações de boas práticas de armazenamento de milho em espiga para agricultura familiar. 2011.
- RATTAN, R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Protection**, v. 29, n. 9, p. 913–920, 2010.
- REFLORA. **Baccharis in Flora do Brasil 2020 em construção**.
- REGINATO, M. P. et al. BOAS PRÁTICAS DE ARMAZENAGEM DE GRÃOS. . 2010.
- RODRIGUES, E. DA C. R. et al. Development of a larvicidal nanoemulsion with *Copaiba* (*Copaifera duckei*) oleoresin. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, n. 6, p. 699–705, 2014.
- RYU, V. et al. Impact of ripening inhibitors on molecular transport of antimicrobial components from essential oil nanoemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 556, p. 568–576, 2019.
- SALEM, N. et al. Fumigant and repellent potentials of *Ricinus communis* and *Mentha pulegium* essential oils against *Tribolium castaneum* and *Lasioderma serricorne*.

International Journal of Food Properties, v. 20, n. 3, p. S2899–S2913, 2018.

SANTANA, H. C. D. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis reticularia* DC. (ASTERACEAE) EM FUNÇÃO DE DIFERENTES PROCEDÊNCIAS E DA SAZONALIDADE NO DISTRITO FEDERAL. p. 73, 2013.

SAROUKOLAI, A. T.; MOHARRAMIPOUR, S.; MESHKATALSADAT, M. H. Insecticidal properties of *Thymus persicus* essential oil against *Tribolium castaneum* and *Sitophilus oryzae*. **Journal of Pest Science**, v. 83, n. 1, p. 3–8, 2010.

SATYAL, P. et al. Chemotypic Characterization and Biological Activity of *Rosmarinus officinalis*. **Foods**, v. 6, n. 3, p. 20, 2017.

SAVELEV, S. et al. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, n. 3, p. 661–668, 2003.

SEO, S. M. et al. Larvicidal and Acetylcholinesterase Inhibitory Activities of Apiaceae Plant Essential Oils and Their Constituents against *Aedes albopictus* and Formulation Development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 45, p. 9977–9986, 2015.

SILVEIRA, D. P. B.; 036.286.403-93; [HTTP://LATTES.CNPQ.BR/8089527149187407](http://LATTES.CNPQ.BR/8089527149187407). ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *Aedes aegypti* L. (Culicidae) E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE PARTES AÉREAS DE *Baccharis trimera* (Less) D.C. 7 maio 2018.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 246–254, 2012.

TRIPATHI, A. K. et al. Effect of *d*-Limonene on Three Stored-Product Beetles. **Journal of Economic Entomology**, v. 96, n. 3, p. 990–995, 2009.

VERDI, L. G. et al. Revisão. v. 28, n. 1, p. 85–94, 2005.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85–94, fev. 2005.

WALKER, R. M.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Physical and oxidative stability of fish oil nanoemulsions produced by spontaneous emulsification : Effect of surfactant concentration and particle size. **JOURNAL OF FOOD ENGINEERING**, v. 164, p. 10–20, 2015.

YU, X. et al. D-limonene exhibits antitumor activity by inducing autophagy and apoptosis in lung cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. 11, p. 1833–1847, 2018.