



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Larissa Frankenberger

Obtenção e caracterização de óleos essenciais de *Dysphania ambrosioides* L. (AMARANTHACEAE), *Cola nitida* (Vent.) Schott & Endl. (MALVACEAE) e *Mentha pulegium* (LAMIACEAE) para avaliação de atividade repelente e inseticida.

Florianópolis

2022

Larissa Frankenberger

Obtenção e caracterização de óleos essenciais de *Dysphania ambrosioides* L. (AMARANTHACEAE), *Cola nitida* (Vent.) Schott & Endl. (MALVACEAE) e *Mentha pulegium* (LAMIACEAE) para avaliação de atividade repelente e inseticida.

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutor em Farmácia.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Maique Weber Biavatti

Coorientador: Prof^ª. Dr^ª. Christiane Meyre da Silva Bittencourt

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra

Frankenberger, Larissa

Obtenção e caracterização de óleos essenciais de *Dysphania ambrosioides* L. (AMARANTHACEAE), *Cola nitida* (Vent.) Schott & Endl. (MALVACEAE) e *Mentha pulegium* (LAMIACEAE) para avaliação de atividade repelente e inseticida. / Larissa Frankenberger ; orientadora, Dra. Maique Weber Biavatti, coorientadora, Dra. Christiane Meyre da Silva Bittencourt, 2022.

158 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Farmacognosia. 3. Óleos essenciais. 4. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. 5. Hidroponia. I. Weber Biavatti, Dra. Maique . II. Meyre da Silva Bittencourt, Dra. Christiane . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

Larissa Frankenberger

Obtenção e caracterização de óleos essenciais de *Dysphania ambrosioides* L. (AMARANTHACEAE), *Cola nitida* (Vent.) Schott & Endl. (MALVACEAE) e *Mentha pulegium* (LAMIACEAE) para avaliação de atividade repelente e inseticida.

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Andrey Martinez Rebelo, Dr.

Instituição - Epagri

Prof. Flávio Henrique Reginatto, Dr.

Instituição – UFSC

Prof (a) Tânia Beatriz Creczynski Pasa, Dr.(a)

Instituição – UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Farmácia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Maique Weber Biavatti, Dr.(a)

Orientador(a)

Prof.(a) Chistiane Meyre da Silva Bittencourt, Dr.(a)

Coorientador(a)

Florianópolis, 2022.

Conrado Frankenberger (in memoriam), Maria de Lourdes Frankenberger e Allan Falchetti Magri, dedico este trabalho a vocês.

AGRADECIMENTOS

Obrigada à minha orientadora prof^a Dr^a Maique Weber Biavatti e minha coorientadora prof^a Dr^a Christiane Meyre da Silva Bittencourt que acreditaram em mim e prestaram todo o suporte necessário para a realização deste trabalho, além da dedicação, paciência e amizade.

Agradeço à oportunidade de trabalhar no Laboratório Central Analítica e no Laboratório Central de Cromatografia do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, com apoio financeiro da CAPES e CNPq. A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES.

Agradeço ao Dr. Pedro Fiaschi, Dr^a. Juliana de Paula-Souza e Silvia Venturi do Herbário FLOR (UFSC), ao Professor Dr. Jorge Luiz Barcelos de Oliveira e ao Laboratório de Hidroponia (LabHidro- UFSC) pelo uso do canteiro para cultivo, supervisão nas técnicas de cultivo, assim como pelo fornecimento do material vegetal da espécie *Mentha pulegium* e ao professor Dr. Louis Pergaud Sandjo pelo fornecimento da resina de *Cola nitida*.

Obrigada ao professor Dr. Alex Sandro Poltronieri, Dr^a. Sandra Faita e aos colegas do Laboratório de Entomologia Agrícola por ceder às instalações do laboratório; à EPAGRI, Centro de Ciências Agrárias- UFSC e LabHidro- UFSC pelo fornecimento dos insetos utilizados nos bioensaios.

Obrigada ao professor Dr. Tiago Caon, Dr^a. Débora Argenta e ao Laboratório de Farmacotécnica (UFSC) por ceder às instalações do laboratório, assim como pelo auxílio e atenção prestados aos meus experimentos; agradeço também à professora Dr^a. Tânia Beatriz Creczynski Pasa e ao Laboratório do Grupo de Estudos em Interações entre Micro e Macromoléculas por ceder o uso do equipamento ZetaSizer®.

Obrigada ao professor Dr. Flavio Reginatto, pelo acolhimento e atenção no estágio de docência. Obrigada ao professor Dr. Luis Augusto dos Santos Madureira e à aluna de doutorado Marina pelo empréstimo de materiais em momentos urgentes.

Agradeço à Universidade de Hohenheim e à SEARCA pela oportunidade de participar da escola de verão em Los Baños, Filipinas.

À minha família científica e amigos: Amanda, Erlon, Layzon, Larissa G., Luiz, Ingrid, Vivian, obrigada pelo carinho, torcida, companhia e aprendizado.

Ao meu amado Állan, que torceu e incentivou em todos os dias desta longa trajetória.

À minha família, principalmente à minha mãe Lourdes, Clarice, Sarinha, Felipe, Jader, Edson, meus sogros Sr. Euclides e D. Marlene, aos meus cunhados Sara e Talles, e amigos que apoiaram e torceram incansavelmente por mim.

À Deus, por me dar equilíbrio e ser o meu porto-seguro.

“A natureza é o único livro que oferece um conteúdo valioso em todas as suas folhas” (Johann Wolfgang von Goethe).

RESUMO

Os óleos essenciais têm sido empregados amplamente pela indústria, como flavorizantes e conservantes de alimentos, em produtos repelentes e inseticidas, no armazenamento de alimentos e na agricultura e revelam uma área de grande importância no desenvolvimento de produtos. O uso das nanoemulsões tem revelado sua importância pela capacidade de contribuir na estabilidade química dos insumos e no aumento da hidrossolubilidade. Este estudo teve como objetivo obter e caracterizar os óleos essenciais de três espécies vegetais: *Dysphania ambrosioides*, *Mentha pulegium* e *Cola nitida* e avaliá-los quanto ao potencial repelente e inseticida para o desenvolvimento de nanoemulsões. O material vegetal seco de *D. ambrosioides* e *M. pulegium* e o extrato resinoso concentrado de *C. nitida* foram submetidos ao processo de hidrodestilação para a obtenção dos respectivos óleos essenciais, sendo os mesmos caracterizados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas utilizando a biblioteca NIST-MS (2010, versão 2.0) e literatura para a identificação dos compostos. Também foi avaliada a possibilidade de obtenção da *D. ambrosioides* pelo cultivo hidropônico, visando à escala industrial. As nanoemulsões foram desenvolvidas pelo método de emulsificação espontânea utilizando tensoativos biodegradáveis. A atividade repelente e inseticida dos óleos essenciais obtidos foi avaliada frente ao *Sitophilus zeamais* utilizando o método de escolha em papel e em massa de grãos e a atividade inseticida dos óleos essenciais e das nanoemulsões frente ao *Brevycorine brassicae* e *Lipaphis pseudobrassicae* utilizando o método de toxicidade de contato. Os óleos essenciais de *M. pulegium* e *D. ambrosioides* apresentaram atividades promissoras tanto na forma livre como em nanoemulsão, mostrando potencial para a utilização no controle de pragas de estoque e na agricultura orgânica. As nanoemulsões desenvolvidas pelo método de emulsificação espontânea apresentaram estabilidade após 30 dias e promoveram atividade inseticida contra *B. brassicae* após 24 h, principalmente as formulações contendo o óleo essencial de *M. pulegium* (96,0%) e *C. nitida* (84,0%); contra *L. pseudobrassicae*, a nanoemulsão contendo óleo essencial de *D. ambrosioides* foi mais eficaz (70,0%). Os resultados sugerem que os óleos essenciais de *D. ambrosioides* e *M. pulegium* apresentam potencial para a utilização no controle de pragas de estoque e na agricultura orgânica.

Palavras-chave: CG-EM 1. ‘Erva-de-Santa-Maria’ 2. Poejo 3. Cola 4. Hidroponia 5. Afídeo 6. Gorgulho-do-milho 7.

ABSTRACT

Essential oils have been widely used by the industry, as food flavoring and preservative, in repellent and insecticide products, in food storage and in agriculture and reveal an area of great relevance in product development. The use of nanoemulsions has revealed its importance due to its ability to contribute to the chemical stability of products and to increase the water solubility. This research aimed to obtain and characterize the essential oils of three plant species: *Dysphania ambrosioides*, *Mentha pulegium* and *Cola nitida* and to evaluate their repellent and insecticidal potential for the development of nanoemulsions. The dried plant material of *D. ambrosioides* and *M. pulegium* and the crude resinous extract of *C. nitida* were submitted to the hydrodistillation process to obtain the respective essential oils, which were characterized by gas chromatography coupled to the mass spectrometer using the library NIST-MS (2010, version 2.0) and literature for the identification of compounds. The possibility of obtaining *D. ambrosioides* by hydroponics was also evaluated, aiming at obtaining it on an industrial scale. The nanoemulsions were developed by the spontaneous emulsification method using biodegradable surfactants. The repellent and insecticidal activity of the essential oils were evaluated against *Sitophilus zeamais* using the method of choice on paper and in grain mass and the insecticidal activity of the essential oils and nanoemulsions against *Brevycorine brassicae* and *Lipaphis pseudobrassicae* using the toxicity method of contact. The essential oils of *M. pulegium* and *D. ambrosioides* showed promising activities both in the crude form and in nanoemulsion, showing potential for use in controlling stock pests and in organic agriculture. The nanoemulsions developed by the spontaneous emulsification method showed stability after 30 days and promoted insecticidal activity against *B. brassicae* after 24 h, mainly the formulations containing the essential oil of *M. pulegium* (96.0%) and *C. nitida* (84.0%); against *L. pseudobrassicae*, the nanoemulsion containing essential oil of *D. ambrosioides* was more effective (70.0%). The results suggest that the essential oils of *D. ambrosioides* and *M. pulegium* have potential for use in controlling stock pests and in organic agriculture.

Keywords: GC-MS 1. ‘Erva-de-Santa-Maria’ 2. ‘pennyroyal’ 3. ‘cola’ 4. Hydroponics 5. Aphids 6. Maize weevil 7.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Inseto adulto de <i>Sitophilus zeamais</i>	30
Figura 2. Estruturas químicas da octopamina e dopamina.	31
Figura 3. Fêmea e ninfas de afídeos.	31
Figura 4. Estrutura química dos principais compostos encontrados no hidrolato de <i>M. pulegium</i> : óxido de piperitenona e carvacrol.	34
Figura 5. Flor e fruto (A) e planta inteira (B) de <i>D. ambrosioides</i>	35
Figura 6. Principais estruturas químicas encontradas no óleo essencial de <i>D. ambrosioides</i> : α -terpineno, <i>p</i> -cimeno e ascaridol.	36
Figura 7. Flores (A) e partes aéreas (B) de <i>M. pulegium</i>	38
Figura 8. Principais estruturas encontradas no óleo essencial de <i>M. pulegium</i> : pulegona, piperitenona, piperitona, isomentona e neoisomentol.	39
Figura 9. Localização geográfica da espécie domesticada <i>C. nitida</i>	40
Figura 10. Noz de cola (A), inflorescências (B), árvore (C) e folhas (D) de <i>C. nitida</i>	41
Figura 11. Método de emulsificação espontânea.	46
Figura 12. Exsicata de <i>D. ambrosioides</i>	49
Figura 13. Material vegetal de <i>D. ambrosioides</i> coletado do solo.	50
Figura 14. Canteiro vertical com mudas de <i>M. pulegium</i> utilizadas no estudo.	51
Figura 15. Visão geral do canteiro vertical com mudas de <i>M. pulegium</i> utilizadas no estudo.	51
Figura 16. Partes aéreas de <i>M. pulegium</i> no momento da coleta.	52
Figura 17. Extrato resinoso concentrado da resina de <i>C. nitida</i>	53
Figura 18. Criação de <i>S. zeamais</i> - sala de criação.	57
Figura 19. 1). Folha de couve infestada por afídeos; 2) Foto ampliada de <i>B. brassicae</i> adulto e ninfas.	58
Figura 20. Insetos adultos de <i>L. pseudobrassicae</i> , A. em folha infestada; B. Foto ampliada do inseto adulto e ninfas.	59
Figura 21. Repetição contendo papel-filtro e insetos inoculados.	60
Figura 22. Massa de grãos tratados.	62
Figura 23. Placas utilizadas para o ensaio de mortalidade em discos de couve.	64

Figura 24. Germinação de sementes de <i>D. ambrosioides</i> em espuma fenólica.	66
Figura 25. Cromatograma do óleo essencial de <i>D. ambrosioides</i> - cultivo em solo, obtido por CG-EM.1. geral; 2-4. expandido	78
Figura 26. Espectro de massas do composto em Tr 6,01 min., α -terpineno.....	80
Figura 27. Espectro de massa do composto em Tr 6,22 min, <i>p</i> -cimeno.....	81
Figura 28. Espectro de massa do composto em Tr 15,68 min, terpinoleno.....	81
Figura 29. Espectro de massa do composto em Tr 19,21 min, ascaridol.	82
Figura 30. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no óleo essencial de <i>D. ambrosioides</i> - cultivo em solo.....	82
Figura 31. Cromatograma do óleo essencial de <i>M. pulegium</i> obtido por CG-EM.1. geral. 2-3. Expandido.....	83
Figura 32. Espectro de massas do composto em Tr 12,11 min., isomentona.....	86
Figura 33. Espectro de massa do composto em Tr 13,81 min, pulegona.	86
Figura 34. Espectro de massa do composto em Tr 16,19 min, verbenona.	87
Figura 35. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no óleo essencial de <i>M. pulegium</i>	88
Figura 36. Cromatograma do óleo essencial de <i>C. nitida</i> obtido por CG-EM.1. geral; 2. expandido.....	89
Figura 37. Espectro de massas do composto em Tr 6,49 min., α -felandreno.....	90
Figura 38. Espectro de massas do composto em Tr 6,69 min., <i>p</i> -cimeno.	91
Figura 39. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no óleo essencial de <i>C. nitida</i>	92
Figura 40. Cromatograma do hidrolato de <i>M. pulegium</i> obtido por CG-EM.1. geral. 2. Expandido.....	93
Figura 41. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no hidrolato de <i>M. pulegium</i>	94
Figura 42. Cromatograma do hidrolato de <i>C. nitida</i> , obtido por CG-EM.1. geral. 2-4. expandido.....	95
Figura 43. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no hidrolato de <i>C. nitida</i>	99
Figura 44. Exemplo de canteiro hidropônico com hortaliças pelo método de leito fluidizado.....	101

Figura 45. Estudo-piloto de cultivo de <i>D. ambrosioides</i>	102
Figura 46. Plantas adultas de <i>D. ambrosioides</i> após 30 dias de cultivo hidropônico.....	102
Figura 47. Evolução do crescimento de <i>D. ambrosioides</i> em estudo-piloto durante 30 dias de cultivo em areia + solução foliar.	102
Figura 48. Cromatogramas comparativos obtidos por folhas frescas de <i>D. ambrosioides</i> a partir de diferentes substratos para cultivo hidropônico, obtidos por CG-EM.....	104
Figura 49. <i>D. ambrosioides</i> – cultivo hidropônico.....	105
Figura 50. Cromatogramas do óleo essencial <i>D. ambrosioides</i> -cultivo hidropônico e solo, obtidos por CG-EM.....	107
Figura 51. Espectro de massas do composto em Tr 6,01 min., α -terpineno.....	111
Figura 52. Espectro de massas do composto em Tr 6,22 min., <i>p</i> -cimeno.	111
Figura 53. Espectro de massas do composto em Tr 15,57 min., acetato de <i>t</i> -crisantenila.....	112
Figura 54. Principais compostos identificados no óleo essencial de <i>D. ambrosioides</i> – cultivo hidropônico.....	112
Figura 55. Cromatograma do hidrolato de <i>D. ambrosioides</i> - cultivo hidropônico, obtido por CG-EM.....	113
Figura 56. Principais compostos identificados no hidrolato de <i>D. ambrosioides</i> – cultivo hidropônico.....	114
Figura 57. Cromatogramas de diferentes partes vegetais de <i>D. ambrosioides</i> , obtido por CG-EM.....	115
Figura 58. Espectros de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS) do óleo essencial de <i>D. ambrosioides</i> - A) cultivo hidropônico; B) cultivo em solo.	119
Figura 59. Espectros de RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3 , TMS) do óleo essencial de <i>D. ambrosioides</i> - A) cultivo hidropônico e B) cultivo em solo.	120
Figura 60. Formação do ascaridol e seus produtos de degradação.....	121
Figura 61. Gráficos de distribuição de tamanho da nanoemulsão de A) <i>C. nitida</i> ; B) <i>D. ambrosioides</i> - cultivo hidropônico; C) <i>M. pulegium</i>	130
Figura 62. Gráfico de distribuição do potencial zeta da nanoemulsão de A) <i>C. nitida</i> ; B) <i>D. ambrosioides</i> - cultivo hidropônico; C) <i>M. pulegium</i>	132

Figura 63. Cromatogramas comparativos entre o óleo essencial de <i>C. nitida</i> e nanoemulsão, obtido por CG-EM.....	133
Figura 64. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no óleo essencial de <i>C. nitida</i> utilizado no preparo da nanoemulsão.....	134
Figura 65. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados na nanoemulsão com óleo essencial de <i>C. nitida</i>	135
Figura 66. Cromatogramas comparativos entre o óleo essencial de <i>D. ambrosioides</i> - hidropônico e nanoemulsão, obtidos por CG-EM.....	135
Figura 67. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no óleo essencial de <i>D. ambrosioides</i> - hidropônico utilizado no preparo da nanoemulsão.....	136
Figura 68. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados na nanoemulsão com óleo essencial de <i>D. ambrosioides</i> - hidropônico.....	136
Figura 69. Cromatogramas comparativos entre o óleo essencial de <i>M. pulegium</i> e nanoemulsão, obtidos por CG-EM.	137
Figura 70. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no óleo essencial de <i>M. pulegium</i> utilizado no preparo da nanoemulsão.	138
Figura 71. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados na nanoemulsão com óleo essencial de <i>M. pulegium</i>	138
Figura 72. <i>L. pseudobrassicae</i> mortos após 24 h de tratamento com a nanoemulsão de óleo essencial de <i>D. ambrosioides</i> – cultivo hidropônico.	140

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Comparação entre a composição química do óleo essencial de <i>D. ambrosioides</i> obtidos de diferentes regiões.	37
Quadro 2. Interpretação da porcentagem de repelência	61
Quadro 3. Interpretação da porcentagem de mortalidade.....	62
Quadro 4. Composição química da solução foliar Dripsol®.....	67
Quadro 5. Avaliação do potencial <i>zeta</i>	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições analíticas (CG-EM) utilizadas para a caracterização dos óleos essenciais e hidrolatos.....	55
Tabela 2. Soluções tratamento empregadas no ensaio de toxicidade de contato versus <i>B. brassicae</i>	72
Tabela 3. Compostos identificados no óleo essencial de <i>D. ambrosioides</i> - cultivo em solo.....	80
Tabela 4. Compostos identificados no óleo essencial de <i>M. pulegium</i>	85
Tabela 5. Principais compostos identificados no óleo essencial de <i>C. nitida</i>	91
Tabela 6. Compostos identificados no hidrolato de <i>M. pulegium</i>	94
Tabela 7. Compostos identificados no hidrolato de <i>C. nitida</i>	97
Tabela 8. Tamanho médio da planta e folhas de <i>D. ambrosioides</i> em diferentes cultivos.....	103
Tabela 9. Principais compostos identificados no óleo essencial de <i>D. ambrosioides</i>	110
Tabela 10. Composição do hidrolato de <i>D. ambrosioides</i> -cultivo hidropônico.....	113
Tabela 11. Principais compostos identificados em <i>D. ambrosioides</i> - solo, sendo partes vegetais frescas.....	116
Tabela 12. Resultado do ensaio de repelência pelo método de escolha.	122
Tabela 13. Resultado do ensaio de mortalidade sobre superfície tratada com massa de grãos.....	123
Tabela 14. Resultado do ensaio de perda de massa de grãos tratados após 30 dias.....	124
Tabela 15. Resultado de mortalidade após 24 h.	125
Tabela 16. Resultado do ensaio de repelência pelo método de escolha contra <i>S. zeamais</i>	126
Tabela 17. Resultado do ensaio de mortalidade sobre superfície tratada com massa de grãos.....	127
Tabela 18. Resultado do ensaio de perda de massa de grãos tratados após 30 dias.....	127
Tabela 19. Resultado de mortalidade após 24 h.	128

Tabela 20. Valores de pH dos óleos essenciais.	129
Tabela 21. Resultados da análise de tamanho de diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações contendo 1% de óleo essencial.....	130
Tabela 22. Composição do óleo essencial de <i>C. nitida</i> utilizado no preparo da nanoemulsão.....	134
Tabela 23. Composição da nanoemulsão com óleo essencial de <i>C. nitida</i>	135
Tabela 24. Composição do óleo essencial de <i>D. ambrosioides</i> - hidropônico utilizado no preparo da nanoemulsão.	136
Tabela 25. Composição da nanoemulsão com óleo essencial de <i>D. ambrosioides</i>	136
Tabela 26. Composição do óleo essencial de <i>M. pulegium</i> utilizado no preparo da nanoemulsão.....	137
Tabela 27. Composição da nanoemulsão com óleo essencial de <i>M. pulegium</i>	138
Tabela 28. Comparativo entre a atividade inseticida dos óleos essenciais <i>versus</i> nanoemulsões após 24 h.....	140

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPI *Base Peak Ion Chromatogram*

CG-EM Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de Massas

CLUE-EM Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas

Cn *Cola nitida*

CnOE Óleo Essencial de *C. nitida*

Da *Dysphania ambrosioides*

DaOE Óleo Essencial de *D. ambrosioides*

EM Espectrometria de Massas

ER Extrato Resinoso Concentrado

eV *Electron volts*

FE Fase Estacionária

FM Fase Móvel

HSQC *Heteronuclear Single Quantum Coherence* – referente à correlação por ligação simples entre carbono e hidrogênio

IE Ionização Eletrônica

IR Índice de Resposta para Atividade Inseticida

IR Índice de Retenção

LD₅₀ Concentração letal em 50% da população

Mp *Mentha pulegium*

MpOE Óleo Essencial de *M. pulegium*

m/z Razão Massa/Carga

NIST *National Institute of Standards and Technology*

nm Nanômetro

P.E. Ponto de Ebulição (em °C)

PR Porcentagem de repelência

Qsp Quantidade suficiente para

RD₅₀ Concentração de repelência em 50% da população

RD₉₅ Concentração de repelência em 95% da população

Rf Fator de retenção

RMN Ressonância Magnética Nuclear

RMN ¹³C Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN ¹H Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RPM Rotações por minuto

SIR *Selected Ion Recording*

TIC *Total Ion Chromatogram*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVO GERAL	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	29
3.1	BIOINSETICIDAS.....	29
3.2	ASPECTOS GERAIS SOBRE ÓLEOS ESSENCIAIS	32
3.3	<i>Dysphania ambrosioides</i> L. Mosyakin & Clemants (AMARATHACEAE)	34
3.4	<i>Mentha pulegium</i> L. (LAMIACEAE)	37
3.5	<i>Cola nitida</i> (Vent.) Schott & Endl. (MALVACEAE)	40
3.6	PLANTAS MEDICINAIS E HIDROPONIA	42
3.7	NANOEMULSÕES.....	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1	MATERIAL VEGETAL	49
4.1.1	<i>Dysphania ambrosioides</i>	49
4.1.2	<i>Mentha pulegium</i>	50
4.1.3	<i>Cola nitida</i>	52
4.2	OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	53
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E HIDROLATOS	54
4.4	ATIVIDADE BIOLÓGICA EM ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA	57
4.4.1	Criação de <i>Sitophilus zeamais</i>	57
4.4.2	Criação de <i>Brevicoryne brassicae</i>	58
4.4.3	Coleta de <i>Lipaphis pseudobrassicae</i>	58
4.4.4	Atividade repelente.....	59
4.4.4.1	Método de livre chance de escolha em papel-filtro tratado versus <i>S. zeamais</i>	59

4.4.5	Atividade inseticida	61
4.4.5.1	<i>Método de superfície tratada com papel-filtro versus S. zeamais.....</i>	61
4.4.5.2	<i>Ensaio de mortalidade sobre superfície tratada com grãos versus S. zeamais</i>	62
4.4.6	Avaliação de perda de massa de grãos.....	63
4.4.7	Método de toxicidade de contato versus <i>B. brassicae</i>	63
4.4.8	Método de toxicidade de contato versus <i>L. pseudobrassicae</i>.....	65
4.4.9	Análise estatística.....	65
4.5	CULTIVO HIDROPÔNICO DE <i>D. ambrosioides</i>	65
4.6	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO VOLÁTIL	68
4.7	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>D. ambrosioides</i> - CULTIVO HIDROPÔNICO	69
4.8	DESENVOLVIMENTO DAS NANOEMULSÕES	69
4.8.1	Diluyente dos óleos essenciais	69
4.8.2	Obtenção das nanoemulsões	70
4.8.3	Caracterização das nanoemulsões.....	70
4.8.3.1	<i>Determinação do valor de pH</i>	70
4.8.3.2	<i>Estabilidade.....</i>	70
4.8.3.3	<i>Distribuição de tamanho de partícula e potencial zeta.....</i>	71
4.8.3.4	<i>Análise qualitativa dos compostos voláteis na nanoemulsão.....</i>	71
4.9	COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DAS NANOEMULSÕES E ÓLEOS ESSENCIAIS.....	72
4.9.1.1	<i>Método de toxicidade de contato versus <i>B. brassicae</i>.....</i>	72
4.9.1.2	<i>Método de toxicidade de contato versus <i>L. pseudobrassicae</i>.....</i>	72
4.9.2	Análise estatística.....	73
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
5.1	OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	74

5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	76
5.2.1	Cultivo hidropônico de <i>D. ambrosioides</i>	99
5.3	ANÁLISE ESPECROSCÓPICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>D. ambrosioides</i>	117
5.4	ATIVIDADE BIOLÓGICA	121
5.4.1	Atividade repelente	122
5.4.1.1	<i>Ensaio de repelência pelo método de escolha em papel-filtro tratado</i>	122
5.4.2	Atividade inseticida	123
5.4.2.1	<i>Ensaio de mortalidade sobre superfície tratada com massa de grãos</i>	123
5.4.3	Avaliação de perda de massa de grãos tratados	124
5.4.4	Atividade inseticida contra <i>B. brassicae</i>	125
5.5	COMPARATIVO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA: SOLO <i>VERSUS</i> HIDROPÔNICO.....	126
5.5.1	Atividade repelente contra <i>S. zeamais</i>	126
5.5.2	Atividade inseticida contra <i>S. zeamais</i>	126
5.5.2.1	<i>Ensaio de mortalidade sobre superfície tratada com massa de grãos</i>	126
5.5.3	Avaliação de perda de massa de grãos tratados	127
5.5.4	Atividade inseticida contra <i>B. brassicae</i>	128
5.6	NANOEMULSÕES.....	128
5.6.1	Solubilidade e pH dos óleos essenciais	129
5.6.2	Caracterização	129
5.6.2.1	<i>Teor de óleo essencial da nanoemulsão</i>	133
5.6.3	Comparação da atividade inseticida entre os óleos essenciais e nanoemulsões	139
5.6.3.1	<i>Ensaio de mortalidade por toxicidade de contato</i>	139
6	CONCLUSÕES	141
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	142
	REFERÊNCIAS	143

ANEXO A – Fluxograma da pesquisa	158
ANEXO A - Artigo publicado.....	159

1 INTRODUÇÃO

O Reino Plantae permanece até os dias atuais como um dos principais reservatórios de novos compostos para o desenvolvimento de medicamentos, seja na forma de extrato vegetal, como composto isolado ou como modelo estrutural para o desenvolvimento de novas moléculas (ATANASOV et al., 2021). Além das plantas medicinais contribuírem para o desenvolvimento de novos componentes ativos ou mesmo como fitoterápicos na indústria farmacêutica, nos últimos anos têm revelado seu potencial de uso na agricultura, principalmente na obtenção de novos bioinseticidas (ACHEUK et al., 2022; PAVELA; BENELLI, 2016). O uso de inseticidas contra pragas na agricultura e no estoque de alimentos à base de óleos essenciais têm crescido consideravelmente, com expansão principalmente na Europa e América Central e confirmado sucesso pelo número de publicações, sendo 25% de formulações bioinseticidas com óleos essenciais (ISMAN, 2020a). O uso de bioinseticidas em substituição aos inseticidas sintéticos usualmente empregados tem sido recomendado pelo Manejo Integrado de Controle de Pragas, priorizando a segurança ambiental e a otimização no controle de pragas na agricultura (DEGU et al., 2020; ISMAN, 2020b; RIBEIRO; ALVES, 2021).

Dentre as diversas classes de metabólitos secundários produzidas pelas plantas medicinais destacam-se como componentes de potencial inseticida os alcaloides, os compostos fenólicos e os terpenos (principalmente monoterpenos e sesquiterpenos), particularmente os que predominam na composição química dos óleos essenciais (CHAABAN et al., 2019; DAYAN; CANTRELL; DUKE, 2009; REIS et al., 2016). Os óleos essenciais (OE) atuam como fonte de sinalização química para o controle e regulação do ambiente e podem promover interação planta-planta (inibição na germinação ou crescimento de outras plantas) ou interação planta-animal (atrativo de polinização, proteção contra fungos, repelente e pesticida ou *antifeedant* (provocando inapetência em insetos herbívoros) (RAVEAU; FONTAINE; LOUNÈS-HADJ SAHRAOUI, 2020; ZOUBIRI; BAALIOUAMER, 2014).

A composição de um óleo essencial pode variar de acordo com o órgão vegetativo de uso, estágio do ciclo vegetativo, origem geográfica, bem como ser afetada por fatores bióticos como alteração climática, solo, nutrientes, estresse hídrico e ataque de predadores. Esta variabilidade na composição promove diferenças no odor e na atividade biológica e desta

forma revela um ponto crítico na aplicação e a necessidade de se estabelecer condições ideais para a obtenção de um produto padronizado (LI et al., 2020; PREEDY, 2016).

O interesse no cultivo de plantas medicinais por hidroponia tem crescido, principalmente para a obtenção em escala industrial, uma vez que este sistema permite mensurar o tempo de crescimento da planta e rendimento de material vegetal, calcular os gastos de água, energia e oferta de nutrientes, além de controlar os nutrientes para o direcionamento na produção de componentes de interesse. Enfim, viabiliza a padronização do material vegetal, contribuindo para a constância em sua composição química (AHMADI, 2021; BUYEYE et al., 2022).

Além do controle na produção dos óleos essenciais, garantir a estabilidade dos produtos obtidos torna-se essencial para a manutenção das características química e biológica. A técnica de microencapsulamento utilizando matrizes poliméricas naturais, como quitosana, gelatina e inulina com tamanho de partícula em torno de 3 – 4,5 μm , vem sendo empregada com o intuito de minimizar a degradação e facilitar o emprego dos óleos essenciais diante da característica lipofílica e volátil dos constituintes químicos (ABREU et al., 2012; BEIRÃO-DA-COSTA et al., 2013).

As nanoemulsões são formulações que visam melhorar a solubilidade de substâncias pouco solúveis em água, assim como a sua biodisponibilidade. Elas também podem ser utilizadas como recurso tecnológico utilizando os óleos essenciais obtidos por material vegetal hidropônico no intuito de obter bioinseticidas para o controle de pragas e vetores (OLIVEIRA et al., 2017).

Inseticidas sintéticos, também chamados de agrotóxicos, são utilizados para o controle de pragas, ervas-daninhas, insetos vetores de doenças e patógenos de plantas. No Brasil, os inseticidas mais utilizados são os organofosforados, carbamatos, organoclorados, piretróides, triazinas, triazóis e nicotinóides (PIGNATI et al., 2017). Os consumidores estão cada vez mais conscientes dos riscos da presença dessas substâncias nos alimentos com efeitos tóxicos, desejando consumir alimentos seguros. Sendo assim, existe uma maior demanda na obtenção de novos produtos para o controle de insetos, como a partir de plantas, desde que sejam previamente avaliadas e apresentem composição química segura para o consumo humano (DAMALAS; ELEFTHEROHORINOS, 2011; ISMAN, 2020c; PAVONI et al., 2019). Os agrotóxicos apresentam risco de intoxicação aos agricultores que trabalham no campo e em casas de vegetação, além de contribuir para o aumento da poluição ambiental e

apresentar efeitos tóxicos em organismos não-alvo como pássaros, peixes e algas (DAMALAS; ELEFTHEROHORINOS, 2011; SALEM et al., 2018).

Entre as plantas com potencial repelente e inseticida encontra-se a espécie *Cola nitida*, que apresenta relatos etnofarmacológicos sobre uso da queima da resina como repelente de insetos em rituais africanos. Em uma análise preliminar da resina de *C. nitida* por *headspace*-CG-EM foi possível identificar os compostos majoritários α -felandreno e *p*-cimeno, sendo que uma publicação anterior mostrou que estes monoterpenos apresentaram potencial em atividade repelente e inseticida (CHAABAN et al., 2019). Além desta, selecionou-se as espécies *Dysphania ambrosioides*, a qual tem sido amplamente investigada contra pragas de estocagem (ISMAN, 2020b) e *Mentha pulegium*, popularmente conhecida por combater pulgas e carrapatos.

Neste âmbito, considerando todas as evidências apresentadas e com a necessidade de obter novos produtos bioinseticidas e repelentes no intuito de contribuir para a segurança alimentar, o presente estudo teve como objetivo obter e caracterizar os óleos essenciais de *D. ambrosioides*, *M. pulegium* e *C. nitida* e utilizá-los na produção de nanoemulsões para aplicação como repelente e inseticida.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar o óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* obtidos pelo cultivo de hidroponia e compará-lo à espécie coletada de cultivo em solo, assim como obter e caracterizar os óleos essenciais de *Mentha pulegium* e *Cola nitida*, avaliando o potencial repelente e inseticida, assim como desenvolver nanoemulsões com os óleos essenciais de *D. ambrosioides* – cultivo hidropônico, *M. pulegium* e *C. nitida*, avaliando o seu potencial inseticida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter e caracterizar por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) o óleo essencial de *D. ambrosioides* cultivada em solo e pelo cultivo hidropônico;

Obter e caracterizar por CG-EM o óleo essencial de *M. pulegium*;

Obter e caracterizar por CG-EM o óleo essencial de *C. nitida*;

Avaliar a influência do estado vegetativo (floração e durante a produção de sementes) sobre a composição do óleo essencial de *D. ambrosioides* hidropônico por *headspace*-CG-EM;

Investigar a atividade repelente e inseticida dos óleos essenciais obtidos das espécies em estudo contra *Sitophilus zeamais* utilizando o método por livre chance de escolha e *Brevicoryne brassicae* utilizando o método por toxicidade de contato;

Comparar a atividade repelente e inseticida contra *S. zeamais* e *B. brassicae* do óleo essencial de *D. ambrosioides* obtido pelo solo em relação ao hidropônico;

Desenvolver nanoemulsões contendo o óleo essencial de *D. ambrosioides*- cultivo hidropônico, *M. pulegium* e *C. nitida* com ação inseticida.

Avaliar a permanência no ambiente e a estabilidade térmica das nanoemulsões por CG-EM.

Avaliar o potencial inseticida das nanoemulsões e compará-las aos óleos essenciais através do método de toxicidade de contato frente aos afídeos *Brevicoryne brassicae* e *Lipaphis pseudobrassicae*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 BIOINSETICIDAS

Dentre as classes de metabólitos secundários que atuam como bioinseticidas encontram-se os alcaloides, compostos fenólicos, policetídeos, limonóides, piretrinas, ácidos graxos e óleos essenciais (ACHEUK et al., 2022). Como alternativa para a agricultura orgânica, o extrato de *neem* (extrato das sementes prensadas a frio de *Azadirachta indica*, Meliaceae, padronizado em azadiractina) é o tratamento mais utilizado, o qual atua sobre a regulação no crescimento do inseto. Além disso, as piretrinas também são empregadas, extraídas da espécie *Tanacetum cinerariifolium* (Asteraceae). Além destes, produtos à base de óleos essenciais tem sido desenvolvidos, como o Prev-Am® (óleo essencial de laranja a 5,0% padronizado em D-limoneno), usado contra térmitas que destroem troncos/madeira e formigas; Ecotec® (mistura dos óleos essenciais de alecrim a 10,0% e hortelã 2,0%); Captiva® (mistura de óleos essenciais da oleoresina de *Capsicum* e alho) e Requiem® (terpenos sintéticos α -terpineno, *o*-cimeno e limoneno, simulando o efeito do óleo essencial de *Dysphania ambrosioides*, Amaranthaceae, a 16,75%) (ISMAN, 2020c).

A entomologia agrícola é a área da agronomia que pesquisa os tratamentos efetivos para o controle de pragas no campo e no armazenamento de alimentos, evitando o consumo excessivo de produtos químicos, visando evitar o desenvolvimento de resistência pelos insetos, efeitos residuais tóxicos para organismos não-alvo como em humanos e animais, além de reduzir o acúmulo de substâncias não-biodegradáveis no solo e na água (ABROL; SHANKAR, 2014). Uma espécie de inseto é considerada praga se causar danos econômicos à agricultura, sendo que as pragas podem ser controladas pelo: 1) sistema convencional (utilizando substâncias químicas diretamente sobre o campo ou alimento) ou 2) manejo integrado de pragas (utilizando um método de controle de forma racional, visando não afetar o ambiente).

Dentre as pragas que causam maior impacto econômico no estoque de alimentos encontram-se os insetos pertencentes às ordens Coleoptera, como o gorgulho-do-milho (*Sitophilus zeamais*), gorgulho do arroz (*S. oryzae*) e gorgulho-de-celeiro (*S. granarius*); e Lepidoptera (mariposas e borboletas, como da família Pyralidae), onde encontram-se importantes pragas que consomem farinhas e cereais, as mariposas *Ephestia kuehniella* e

Plodia interpunctella sendo que neste último caso, o principal alvo de tratamento é contra as larvas (SALLAM, 2013). Além desses existem os insetos que afetam a produção de alimentos no campo, como os pulgões, lagartas, gafanhotos, tripes e ácaros.

Sitophilus zeamais Motschulsky 1885 (COLEOPTERA, CURCULIONIDAE), conhecido popularmente por “caruncho do milho” ou “gorgulho do milho” (Figura 1) encontra-se entre as principais pragas de armazenamento no Brasil e no mundo, por isso é considerada uma praga primária, sendo importante tomar medidas de controle. Apresenta diferenciação sexual (macho e fêmea), ciclo de vida aproximado de 122 dias na fase adulta, e a reprodução acontece no período de 22 dias de oviposição, 5 dias de incubação dos ovos e 67 dias para a emergência das larvas (ADEBAYO OJO; AMOS OMOLOYE, 2012). Este inseto alimenta-se da polpa do grão do milho e de outros grãos como sorgo e arroz, e além da perda da massa de grãos, ocorre contaminação por fungos e aumento de ácidos graxos livres, reduzindo a qualidade do grão estocado (RITA DEVI et al., 2017).

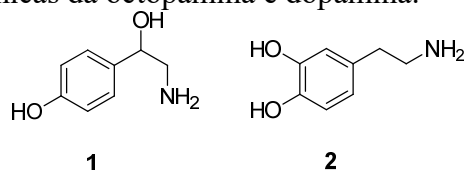
Figura 1. Inseto adulto de *Sitophilus zeamais*



Fonte: (BOTTON; LORINI, 2005)

Entre os tratamentos convencionais de controle utilizados encontra-se a bifentrina e deltametrina (piretróides), fosfeto de alumínio e de magnésio (sais inorgânicos precursores de fosfina), fosfina e pirimifós-metílico (organofosforado) (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2022), no entanto o aumento do uso destes produtos pode causar a contaminação dos grãos, aumentando o risco para a saúde humana, além de aumentar o risco de formação de populações resistentes. O alvo de tratamento contra esses insetos baseia-se na habilidade de inibir proteínas específicas, como acetilcolinesterase e receptores octopaminérgicos, sendo a octopamina (1) a versão da dopamina (2) (Figura 2) para invertebrados (OCAMPO; BRAZA; NELLAS, 2020).

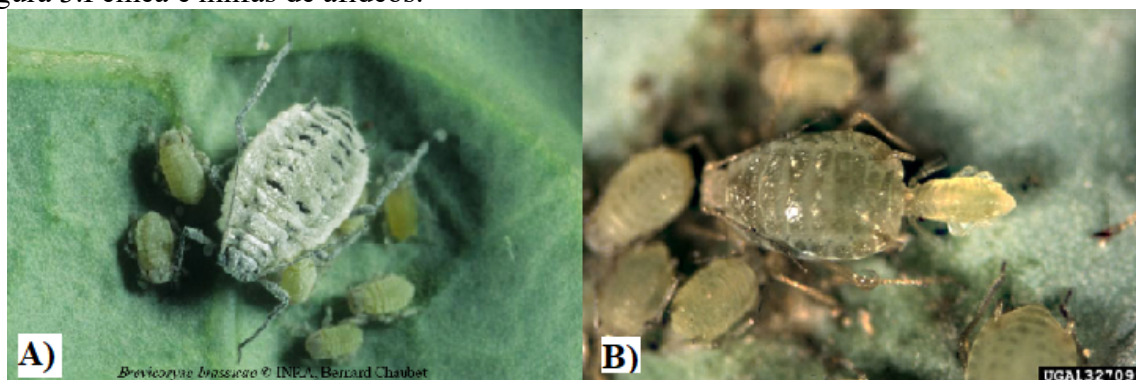
Figura 2. Estruturas químicas da octopamina e dopamina.



Como alternativa de tratamento tem-se utilizado produtos com a espécie *Azadirachta indica* (ou *neem*, a 10% da planta seca, triturada e diluída em água ou extrato padronizado em azadiractina 0,12%, usado nas concentrações de 0,25% a 1% para a proteção de grãos armazenados (PROCÓPIO et al., 2003; SITOPHILUS et al., 2006), sendo que estes produtos destacam-se na maior segurança para quem aplica o produto e para os consumidores dos alimentos.

Os afídeos *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus) (Hemiptera: Aphididae) (Figura 3-A) e *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) (Hemiptera: Aphididae) (Figura 3-B) encontram-se como duas importantes pragas a serem controladas no cultivo de brássicas, como couve, brócolis, repolho e mostarda (RESENDE et al., 2006). *B. brassicae* apresenta reprodução partenogênica e ciclo de vida total de 14 dias, assim como o afídeo *L. pseudobrassicae*. A couve-manteiga é um dos vegetais mais consumidos no Brasil, e estes afídeos representam um grande problema na agricultura (SILVA et al., 2017), os quais ficam alojados na face abaxial das folhas e se alimentam da seiva localizada nos tecidos vasculares, principalmente no caule. Além disso, estes insetos injetam toxinas, que afetam o desenvolvimento da planta.

Figura 3. Fêmea e ninfas de afídeos.



A) Inseto adulto e ninfas de *Brevicoryne brassicae*. Fonte: https://www6.inrae.fr/encyclopedie-pucerons_eng/Species/Aphids/Brevicoryne/B.-brassicae.

B) Inseto adulto e ninfas de *Lipaphis pseudobrassicae*. Fonte: <https://bladminerders.nl/parasites/animalia/arthropoda/insecta/hemiptera/sternorrhyncha/aphidoidea/aphididae/aphidinae/macrosiphini/lipaphis/lipaphis-pseudobrassicae/>

Os inseticidas convencionais são usualmente utilizados contra pragas da agricultura, os quais encontram-se os piretróides, carbamatos, organofosforados e neonicotinóides (KUMAR; CHAPMAN, 1984), como metil carbamato de oxima (metomil), tiacloprido (neonicotinóide), acefato e malationa (organofosforados), piridina azometina (pimetrozina), deltametrina (piretróide), acetamiprido e imidacloprido (neonicotinóides) + etofenproxi (éter difenílico), flupiradifurona (butenolida), acetamiprido + bifentrina (piretróide), além de opções mais seguras como azadirachtina e óleo vegetal, fonte de ésteres de ácidos graxos (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2022), porém já podem ser encontradas populações resistentes a estes produtos. Além disso, esses tratamentos apresentam periculosidade para a saúde humana e organismos não-alvo pela sua toxicidade. Sendo assim, é necessário pensar em encontrar alternativas sustentáveis para o meio ambiente para substituir pelos tratamentos convencionais. Sobre o alvo de tratamento, é interessante obter produtos que atuem sobre os insetos jovens, como ninfas (na primeira fase da vida do inseto), pois nesta fase ainda não ocorreu formação da ecdise do inseto (exoesqueleto), facilitando a permeação do tratamento. Geralmente o inseto é morto pela ação do tratamento de controle sobre o bloqueio de neurotransmissores específicos, hormônios de crescimento ou enzimas digestivas (SAMPSON et al., 2005). Como alternativa para a agricultura orgânica, o extrato de *neem* é utilizado, porém é necessária a descoberta de tratamentos mais assertivos e acessíveis economicamente.

3.2 ASPECTOS GERAIS SOBRE ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais (OE's), também chamados de óleos essenciais ou óleos etéreos, estão incluídos entre as substâncias produzidas pelo metabolismo secundário de plantas superiores. Apresentam grande interesse medicinal uma vez que desempenham papel fisiológico importante, revelando o respectivo potencial biológico. Os OE's atuam como fonte de sinalização química para o controle e regulação do ambiente e podem promover interação planta-planta (inibição na germinação ou crescimento de outras plantas) ou interação planta-animal (atrativo de polinização, proteção contra fungos, repelente/pesticida, *antifeedant*= provocar inapetência em insetos herbívoros) (RAVEAU; FONTAINE; LOUNÈS-HADJ SAHRAOUI, 2020; ZOUBIRI; BAALIOUAMER, 2014).

Fazem parte da composição química dos OE's os terpenos (unidades de isopreno, 2-metil-1,3-butadieno), como os monoterpenos (10 carbonos) que correspondem em sua grande

maioria a 80% da composição dos OE's e sesquiterpenos (15 carbonos), além destas duas classes químicas observa-se a presença de isoprenóides, derivados oxigenados de terpenos, como álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, fenóis, éteres e ésteres (ALI et al., 2015; ASBAHANI et al., 2015). Com relação ao quantitativo dos fito constituintes nos óleos essenciais pode-se classificá-los como: constituintes majoritários, quando presentes de 20 a 95% em relação ao total de fito constituintes, secundários, quando variam de 1 a 20% e traços, quando correspondem a < 1% do total detectado e apresentam ponto de ebulição entre 150 até acima de 300° C (SIMÕES et al., 2017), e por isso são analisados pela técnica de cromatografia gasosa.

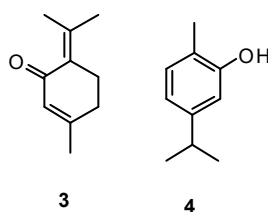
Os OE's são produzidos através de duas vias diferentes: a via do ácido mevalônico, que origina os monoterpenóides (compostos por 10 carbonos) e a rota do metileritriol-4-fosfato, que irá originar os sesquiterpenóides (compostos por 15 carbonos), e geralmente são abundantes em angiospermas dicotiledôneas (SIMÕES et al., 2017).

A composição química de um óleo essencial pode variar de acordo com o órgão da planta (flor, folha, fruto, caule cascas e raízes), idade (jovem e adulta) e estágio do ciclo vegetativo, bem como aos fatores bióticos como alteração climática, solo, estresse hídrico, predadores, como forma de adaptação ao ambiente. A variabilidade na composição de um óleo essencial pode promover diferenças no odor e na atividade biológica e diante disto faz-se necessário a investigação da forma que se considerem as variáveis e se estabeleça uma forma padronizada de coleta (PREEDY, 2016).

Além do óleo volátil obtido, majoritariamente empregando o método de hidrodestilação com aparelho de cleveger, o hidrolato, ou água floral/herbal, é a fração aquosa originada pela partição com o OE no processo de hidrodestilação, geralmente também são observados na composição compostos voláteis hidrofílicos de baixo peso molecular e que podem ser investigados sobre o potencial biológico. Os hidrolatos são produzidos em grande volume, apresentam baixo custo de obtenção e são considerados subprodutos do processo de extração de OE's (RAO, 2012; TRAKA et al., 2018). Alguns hidrolatos são utilizados como água aromática na indústria cosmética, como por exemplo, a água de rosas. Na agricultura em um estudo revelou o potencial dos hidrolatos de *Ocimum basilicum* L. e de *Ruta chalepensis*, contendo majoritariamente monoterpenos oxigenados, em diminuir a taxa de fecundidade e efeito inseticida em afídeos (TRAKA et al., 2018). Com relação às espécies eleitas para o presente estudo foi identificado somente o estudo conduzido por Zekri et al. (2016) realizado

com o hidrolato obtido a partir das folhas de *M. pulegium* contra o afídeo *Toxoptera aurantii*, uma praga que ataca espécies de citrus. Nesta investigação foi evidenciada a presença majoritária dos componentes oxigenados, como óxido de piperitenona (**3**) e carvacrol (**4**) (Figura 4) (ZEKRI et al., 2016).

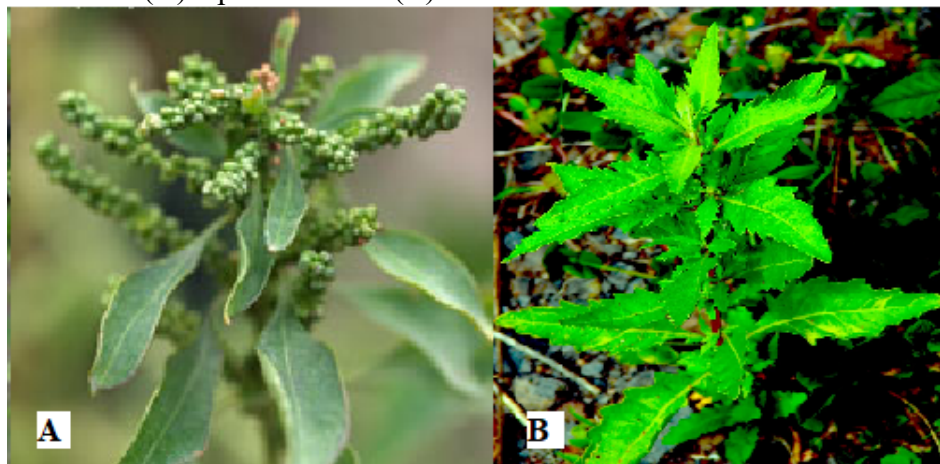
Figura 4. Estrutura química dos principais compostos encontrados no hidrolato de *M. pulegium*: óxido de piperitenona e carvacrol.



3.3 *Dysphania ambrosioides* L. MOSYAKIN & CLEMANTS (AMARANTHACEAE)

Dysphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clemants (Sinonímia: *Chenopodium ambrosioides* L.), Amaranthaceae (Figura 5), é originária do México e é popularmente conhecida como “erva-de-santa-maria”, “mentruz”, “mastruz”, “mastruço”, “ambrósia”, “anserina”, “matruz”, “mentruz”, “chá-do-méxico”, “quenopódio”, “erva-do-formigueiro”, “paico” e “epazote” (SÁ et al., 2016; TRIVELLATOGRASSI et al., 2013). Após estudos filogenéticos, algumas espécies do gênero *Chenopodium* foram transferidas para *Dysphania*, incluindo a espécie do presente estudo (FUENTES-BAZAN; UOTILA; BORSCH, 2012). Esta planta pertence à classe Equisetopsida, subclasse Magnolidae, família Amaranthaceae Juss. e gênero *Dysphania* (TROPICOS, 2020). A espécie tem crescimento anual e é abundante em regiões subtropicais e tropicais como Brasil, México e África, e também em países localizados em zonas temperadas (SÁ et al., 2016). A planta adulta apresenta tamanho de 1 metro aproximadamente (CAVALLI et al., 2004), seus galhos são ramificados e o caule principal geralmente curvado pelo peso das sementes, conforme visualizado na Figura 5.

Figura 5. Flor e fruto (A) e planta inteira (B) de *D. ambrosioides*.

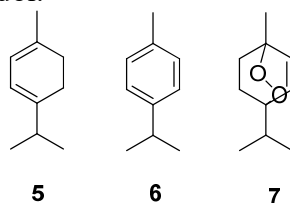


Fonte: A) (“Top Tropicals”, 2020); B) (“ethnopharm.com”, 2020).

A espécie *D. ambrosioides* pertence à Lista Nacional de Plantas Medicinais do Sistema Único de Saúde (RENISUS) (MARMITT et al., 2015), a qual possui relevância na medicina popular brasileira. A infusão das partes aéreas tem sido usada com indicação para atividade diurética, anti-helmíntica, na cicatrização de feridas, problemas respiratórios, processos inflamatórios e dor, bronquite, tuberculose e doenças reumáticas (TRIVELLATOGRASSI et al., 2013), antifúngico (PRASAD et al., 2010), coincidindo com os usos tradicionais do gênero *Chenopodium* na medicina Ayurveda (YADAV et al., 2007). O extrato aquoso das folhas demonstrou atividade de cicatrização de feridas em ratos através da estimulação de proliferação de fibroblastos e miofibroblastos (SÉRVIO et al., 2011).

Os compostos voláteis desta espécie localizam-se nos tricomas glandulares, na face abaxial e adaxial foliar (SÁ et al., 2016) e nas sementes, e diferem de acordo com a localização de plantio, sendo α -terpineno (5, massa teórica 136,1252), *p*-cimeno (6, massa teórica 134,1096) e ascaridol (7, massa teórica 168,1150) os terpenos mais relatados como majoritários (Figura 6). O ascaridol é um terpeno endoperóxido, encontrado nas partes aéreas e nas sementes, com grande potencial biológico, com destaque para o efeito sedativo e analgésico (CAVALLI et al., 2004; CHU; FENG HU; LIU, 2011; TRIVELLATOGRASSI et al., 2013), e já tem sido empregado como ativo repelente e inseticida (ISMAN, 2020c).

Figura 6. Principais estruturas químicas encontradas no óleo essencial de *D. ambrosioides*: α -terpineno, *p*-cimeno e ascaridol.



O óleo essencial de *D. ambrosioides* apresenta atividades giardicida (NEIVA et al., 2011), repelente de mariposas (SINGH; PANDEY, 2018), antiparasitário contra *Taenia saginata*, *Ascaris lumbricoides*, *Leishmania sp.* (MONZOTE et al., 2011), inseticida contra *Blattella germanica* (ZHU et al., 2012), pulgas, carrapatos, piolhos, percevejos, traças, lagartas, além de larvicida contra *Lucilia ingênu*a (HARRAZ et al., 2015); apresenta mortalidade contra *Sitophilus granarius* L. acima de 80% em 24 h (discos com 0,2 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$) (TAPONDJOU et al., 2002), e em outro estudo o óleo essencial da espécie coletada na China demonstrou atividade inseticida ($\text{LC}_{50} = 3,08 \text{ mg/L}$) através da fumigação contra *S. zeamais* (CHU; FENG HU; LIU, 2011).

Com relação à citotoxicidade do óleo essencial, Monzote et al. (2009) revelou citotoxicidade intraperitoneal do OE em ratos BALB/c de CI_{50} de $58,2 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$, enquanto que ascaridol apresentou citotoxicidade 10 vezes maior ($\text{CI}_{50} = 5,5 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$) (MONZOTE et al., 2009).

Os compostos majoritários do óleo essencial de *D. ambrosioides* podem variar conforme a localidade de coleta: α -terpineno (Nigéria, Ruanda, Colômbia, Lavras-MG-Brasil, Camarões e Índia), *m*-cimeno (Índia, 43,9%), *p*-cimeno (Camarões, 50,0%), α -felandreno (40,0% no verão), α -pineno (32,7% no verão) e ascaridol (mistura de *cis* e *trans*-ascaridol: Alegre-ES-Brasil, 92,0%; Cáceres-MT-Brasil, 49,8%). Mesmo sendo localizada no mesmo país, esta espécie pode apresentar um perfil químico variável, como está ilustrado no Quadro 1.

Quadro 1. Comparação entre a composição química do óleo essencial de *D. ambrosioides* obtidos de diferentes regiões.

Localidade da coleta	Material vegetal	(%)	Composição (%)				Referência
<i>Brasil:</i>			<i>Cis</i> -ascaridol	<i>Trans</i> -ascaridol	α -terpineno	<i>p</i> -cimeno	
Alegre, ES	Partes aéreas/folhas frescas	0,3	87,00	5,04	1,24	4,83	(MONTEIRO et al., 2017)
Lavras, MG	Partes aéreas/folhas frescas	n.i.	Ausente	12,49	40,73	21,81	(SANTIAGO et al., 2016)
Cáceres, MT	Folhas secas	1,15	49,77		Ausente	42,32	(DEGENHARDT et al., 2016)
Outras regiões:							
<i>Córdoba/Tucumã-Argentina</i>	Planta inteira	n.i.	99,4		Ausente	0,2	(GILLE et al., 2010)
<i>Irã</i>	Partes aéreas secas	1,1	43,40	6,38	15,90	5,60	(OMIDBAIGI; SEFIDKON; NASRABADI, 2005)

Todos os exemplos de óleos essenciais apresentados foram obtidos por hidrodestilação por aparelho de Clevenger. % = Rendimento de óleo essencial; n.i.= não informado.

Um estudo de 2016 demonstrou que a espécie *D. ambrosioides* coletada em Recife-PE (Brasil) continha 42.14% de α -terpineno, 31.57% de α -terpineil-acetato e 0.87% de ascaridol (responsável pela atividade anti-helmíntica); sendo que a concentração deste último é influenciável pela qualidade do solo e local de coleta (SÁ et al., 2016). Em um estudo de 2016 foi investigado o impacto do manganês sobre o crescimento de *D. ambrosioides* em cultivo hidropônico, sendo o único trabalho encontrado com *D. ambrosioides* envolvendo a hidroponia, onde foi visto que na concentração acima de 10000 $\mu\text{mol/L}$ de manganês ocorreu dano intracelular, ocorrendo rompimento da membrana bilamelar dos cloroplastos, além de redução no número de mitocôndrias nas células radiculares (XUE et al., 2016).

Sendo assim, o óleo volátil de *D. ambrosioides* tem sido amplamente investigado, porém informações sobre a sua larga obtenção para uso industrial continuam desconhecidas.

3.4 *Mentha pulegium* L.(LAMIACEAE)

Mentha pulegium Linnaeus pertence ao gênero *Mentha*, sendo uma das espécies mais importantes pertencentes à família Lamiaceae. Conhecido popularmente como “poejo”, “hortelãzinho”, “menta-selvagem”, “*pennyroyal*”, esta espécie é nativa da Europa, porém pode ser encontrada na África, Ásia (ABDELLI et al., 2016b) e foi domesticada na América

do Sul. A espécie atinge a altura de 40 cm, em média, e os caules são ligeiramente arqueados (Figura 7) (KUMAR et al., 2011).

Figura 7. Flores (A) e partes aéreas (B) de *M. pulegium*.

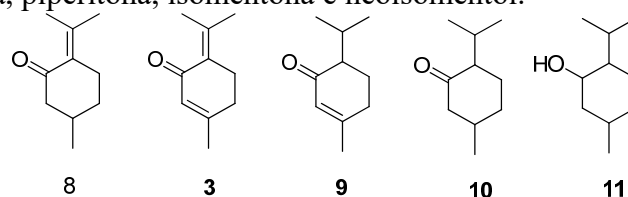


Fonte: A) (“Horto didático de plantas medicinais - UFSC”, 2020) B) (“henriettes-herb.com”, 2020).

A infusão das partes aéreas é utilizada como expectorante, digestivo e antiespasmódico, contra gases intestinais (BENLARBI et al., 2014), além de atuar como cicatrizante e antisséptico tópico (OLIVEIRA et al., 2011).

O óleo essencial da espécie apresenta três quimiotipos, com diferentes compostos majoritários, tipo 1) pulegona (8); tipo 2) piperitenona (3) ou piperitona (9) e tipo 3) isomentona (10) e neoisomentol (11) (OLIVEIRA et al., 2011), ilustradas na Figura 8. Estudos tem apontado variabilidade em sua composição química referente ao local de coleta, como observado por Abdelli et al., 2016 que evidenciou maior teor de pulegona (70,66%) e neo-mentol (11,21%) na espécie coletada no norte da África; em outro estudo conduzido com a espécie coletada em Marrocos revelou como compostos majoritários a pulegona (33,65%) e acetato de α -terpinenila (24,29%) (ABDELLI et al., 2016b; CHERRAT et al., 2014). O óleo essencial obtido a partir de material vegetal procedente do Irã apresentou uma maior presença de piperitona (38,0%) e piperitenona (33,0%) e apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positiva, como *Staphylococcus aureus* (MAHBOUBI; HAGHI, 2008).

Figura 8. Principais estruturas encontradas no óleo essencial de *M. pulegium*: pulegona, piperitenona, piperitona, isomentona e neoisomentol.



O hidrolato desta espécie também já foi alvo de investigação. Petrakis et al. (2015) reportaram que a composição consistia em 97,9% de piperitenona, sendo que este hidrolato foi avaliado quanto à atividade inseticida contra o afídeo *Myzus persicae*, o qual apresentou mortalidade de 10-15% após 24 h, quando aplicado sem diluição em ensaio de mortalidade sobre superfície tratada (PETRAKIS et al., 2015).

Quanto a publicações sobre o potencial repelente e inseticida do óleo essencial desta espécie, os resultados são promissores. A queima da planta inteira como incenso apresenta atividade repelente contra traças de roupas (CHERAGHI NIROUMAND et al., 2016). Um estudo feito com o óleo essencial da planta coletada na Algeria, norte da África, demonstrou alta eficiência inseticida ($LD_{50} 9,11 \pm 2,53 \mu\text{L/mL}$) contra *Sitophilus granarius*, uma praga de estocagem de trigo, em que o tratamento padrão consiste no uso de *malathion*, um inibidor de acetilcolinesterase (ABDELLI et al., 2016). O óleo essencial de *M. pulegium* coletado na Tunísia foi testado contra *Tribolium castaneum*, conhecido como ‘besouro do trigo vermelho’, o qual representa um problema importante em estoque de farinhas, e contra *Lasioderma serricone*, conhecido como ‘besouro do fumo’. Neste estudo, o óleo essencial demonstrou atividade inseticida por fumigação ($LC_{50} 11,57 \mu\text{L/L}$ de ar) e de repelência ($RD_{50} 0,015 \mu\text{L/cm}^2$ e $RD_{95} 0,370 \mu\text{L/cm}^2$) contra *T. castaneum* e mortalidade por fumigação ($LC_{50} 8,46 \mu\text{L/L}$ de ar) e de repelência ($RD_{50} 0,01 \mu\text{L/cm}^2$ e $RD_{95} 0,526 \mu\text{L/cm}^2$) contra *L. serricone* (SALEM et al., 2018). O óleo essencial de *M. pulegium* também demonstrou atividade acaricida contra *Tetranychus urticae* na concentração de $LC_{50} 2,57 \mu\text{L/L}$ para ovos e $LC_{50} 2,25 \mu\text{L/L}$ para adultos desta espécie (MOZAFFARI et al., 2013). Em um estudo utilizando o óleo essencial de *M. pulegium* contendo 81% de pulegona, mostrou potencial inseticida contra *L. pseudobrassicae* com LC_{50} de 3,49 mg/mL (após 10 min.), LC_{50} de 3,1 mg/mL (após 30 min.) e LC_{50} de 1,8 mg/mL (após 60 min.) (SAMPSON et al., 2005).

3.5 *Cola nitida* (VENT.) SCHOTT & ENDL. (MALVACEAE)

Cola nitida (Vent.) Schott & Endl. (Malvaceae) é uma árvore nativa da África, originária de agroflorestas localizadas em Serra Leoa, Costa do Marfim, Nigéria, Libéria, Camarões e Gana. Desde 1912 tem sido cultivada extensivamente pelo oeste da Nigéria e foi trazida para Jamaica e Brasil pelos imigrantes africanos em 1930, onde a encontra-se como árvore exótica domesticada, conforme Figura 9 (ORWA, 2009).

Figura 9. Localização geográfica da espécie domesticada *C. nitida*.



Fonte: adaptado de (ORWA, 2009).

A espécie *C. nitida* é popularmente conhecida na África como “*gbanja*” ou “*goro*” (ASOGWA et al., 2012) e no Brasil como “noz-de-cola” ou “cola”. Seu nome binomial *Cola nitida* (Vent.) Schott & Endl. pode ser identificado pelos sinônimos *Cola nitida* A. Chev. e *Sterculia nitida* Ventenat (basinômio) (TROPICOS, 2020). Pertence à ordem Malvales Juss., Família Malvaceae, a qual foi transferida da família Sterculiaceae para a atual, juntamente com outra espécie, *Cola acuminata* (DAH-NOUVLESSOUNON et al., 2016). A árvore apresenta crescimento perene e alcança o tamanho de 20 metros em média (Figura 10) e adequa-se facilmente ao solo de pH variável (PFAF, 2020).

Figura 10. Noz de cola (A), inflorescências (B), árvore (C) e folhas (D) de *C. nitida*.



Fonte: A) e B) (“Plants of world on line”, 2020); C) (“Tropicos,b”, 2016) D) Iwu, 2014.

O uso popular da espécie *C. nitida* é muito difundido na África. A noz-de-cola é mascarada como função tônica, estimulante e para promover a saciedade (LOWOR; ACULEY; ASSUAH, 2010; ODEBODE, 1996; STARIN, 2013); pode ser oferecida como gesto de paz e amizade, e tem importância em cerimônias e atividades religiosas (FAJINMI; OLAREWAJU, 2017; SALAHDEEN et al., 2015). Relatos apontaram que em tribos africanas, a resina é utilizada na forma de incenso, para “atrair bons espíritos” e como repelente de insetos em cerimônias religiosas. Além disso, há a evidência que o fluxo de produção de resina na planta é estimulado pelo ataque de insetos, com a função de repeli-los (CIESLA, 2009).

A noz, semente, folhas e cascas de *C. nitida* foram extensamente investigadas quanto à composição fitoquímica e atividades biológicas. Em um estudo conduzido por Adeosun et al. (2017), o extrato etanólico das folhas promoveram atividade diurética sem causar depleção de eletrólitos em estudo *in vivo* utilizando ratos (ADEOSUN et al., 2017). A noz promove o efeito de saciedade e redução de fadiga além de aumentar a atividade mental e diminuir o sono, sendo que estes efeitos devem-se principalmente à presença de cafeína e teobromina, identificados por CG-EM (ESIMONE et al., 2007). Além disso, a noz apresenta teor em polifenóis, incluindo ácido clorogênico, ácido quínico, e maior proporção em ácido tânico, catequina e epicatequina (ODEBODE, 1996). Porém a pesquisa sobre a resina de *C. nitida* não é muito enfatizada, de acordo com estudo anterior (FRANKENBERGER, 2017), a fração

não-volátil da resina é composta por triterpenos pentacíclicos do tipo oleanano e ursano, com 13,0% de α -amirina e 7,0% de óleo essencial, sendo que em uma análise de predição em *headspace* - CG-EM apresentou composição monoterpênica, sendo α -felandreno e *p*-cimeno os compostos voláteis majoritários (FRANKENBERGER et al., 2018). As investigações farmacológicas para o uso da resina de *C. nitida* continuam escassas, sendo um material vegetal com potencial para investigação química e atividade biológica.

3.6 PLANTAS MEDICINAIS E HIDROPONIA

Antes de abordar sobre o cultivo hidropônico é necessário apresentar uma introdução sobre o cultivo convencional de plantas medicinais, sendo o cultivo em solo o mais abrangente e utilizado, por ser acessível a baixo custo (HEIMLER; ROMANI; IERI, 2017; STRZEMSKI et al., 2020). No entanto este modelo de cultura mostra vários obstáculos para o fornecimento de um material vegetal padronizado em um marcador químico. Os fatores ecológicos como variação na irrigação, sazonalidade e oferta de nutrientes adequados no solo impactam diretamente na qualidade do material vegetal (YUAN et al., 2020). Como alternativa encontra-se a hidroponia, onde é possível suplementar os nutrientes adequados, evitar o ataque de pragas presentes no solo e otimizar a irrigação com água de forma eficiente e racional (PRADHAN; DEO, 2019; STRZEMSKI et al., 2020).

O cultivo hidropônico já está bem consolidado como ferramenta para a produção de hortaliças e verduras, sendo crescente o emprego principalmente em países com escassez de água e solo, ou que sofreram com mudanças climáticas, desastres naturais e urbanização (AIRES, 2018; SHARMA et al., 2018). A hidroponia tem se apresentado como uma alternativa viável para a otimização na produção de plantas medicinais e a obtenção de metabólitos secundários, geralmente apresentando menor tempo de crescimento da planta até a fase de colheita em um sistema controlado, melhorando assim a produtividade de material vegetal. Além disso, essa técnica não necessita de grandes espaços de cultivo e solo, representando assim uma alternativa possível de ser aplicada em escala industrial (MAIRAPETYAN et al., 2018). Por não necessitar de solo, os canteiros podem ser compostos por perlita, areia e outros substratos reutilizáveis, e a nutrição das raízes é feita com solução nutriente composta por minerais. Além deste modelo, é crescente a utilização do canteiro vertical, no intuito de produzir em larga escala em menor espaço, aumentando a

produtividade. No entanto, este modelo de cultivo hidropônico apresenta custo elevado, sendo utilizado para espécies com maior valor agregado. Em canteiros com pouca incidência de luz pode ser empregadas lâmpadas de LED (*light emitting diode*) como recurso para estender o período de fotofase com o objetivo de aumentar a produtividade de material vegetal (BUYEYE et al., 2022).

O cultivo hidropônico de plantas medicinais pode ser realizado por diferentes métodos de irrigação, com destaque para os tipos de gotejamento, fluxo contínuo e por imersão das raízes em solução foliar (PRADHAN; DEO, 2019). Além disso, a estrutura do canteiro pode apresentar variações, como em forma de calha, recomendado para espécies rasteiras; canteiro vertical, na forma de bolsas de feltro instaladas na parede; e como canteiro em forma de calhetão, recomendado para espécies arbustivas.

Dentre as espécies já cultivadas e avaliadas em hidroponia encontram-se *Acmella oleracea*, a qual produziu alto teor de polifenóis totais, assim como no solo, porém com estruturas químicas diferentes (NASCIMENTO et al., 2020b). O mesmo evento foi demonstrado por Strzemski et al. (2020) através da espécie *Carlina acaulis*, uma espécie amplamente utilizada na etnofarmacologia da Europa, a qual produziu os mesmos teores de ácido clorogênico e ácido 3,5-dicafeoilquínico (STRZEMSKI et al., 2020). Em outro estudo utilizando *Mentha piperita* ocorreu produção superior de material vegetal através do cultivo hidropônico utilizando canos de polietileno com 30-40 cm de diâmetro e substratos como resíduo vulcânico e cascalho, sendo que o material vegetal hidropônico apresentou o mesmo teor de óleo essencial comparado com outras culturas de solo (MAIRAPETYAN et al., 2018). A partir dos exemplos ilustrados e das referências consultadas, é possível afirmar que o foco na produção de marcadores químicos foi principalmente para polifenóis, óleos essenciais, flavonóides heterosídeos, entre outros (DAYANI; SABZALIAN, 2017).

Sobre a *D. ambrosioides*, um único estudo avaliou a influência da oferta de diferentes nutrientes na micropropagação da espécie *in vitro*, mostrando um maior crescimento nos segmentos nodais e apicais na presença de meio de cultura básico (DE CARVALHO et al., 2018). No entanto, não foram encontradas pesquisas comparando qualitativamente os metabólitos secundários produzidos pela espécie em diferentes cultivos.

3.7 NANOEMULSÕES

Emulsão é uma formulação composta por dois líquidos imiscíveis, em que uma fase se encontra dispersa dentro de outra fase na presença surfactantes (moléculas anfífilas conhecidas também como tensoativos, que promovem a junção de moléculas imiscíveis). A emulsão pode ser composta por uma fase aquosa e outra fase oleosa ou partículas sólidas, sendo o processo de formação da emulsão chamado de emulsificação. Este processo pode ser realizado através de diferentes métodos, incluindo agitação simples, formação com o auxílio de rotores, injeção líquida através de membrana porosa, homogeneização sob alta pressão ou com aparelhos de ultrassom (AKBARI; NOUR, 2018). Dentre os processos que envolvem agitação, encontra-se o processo de emulsificação espontânea, o qual depende principalmente de variáveis como tensão interfacial, viscosidade, região de transição de fase, estrutura e concentração de surfactante (BOUCHEMAL et al., 2004).

A diferença entre uma microemulsão e uma nanoemulsão é a proporção envolvida entre o surfactante e óleo, sendo que a composição pode ser a mesma para os dois tipos de formulações. Dependendo da concentração de óleo na formulação, é necessária a adição de um co-surfactante, para reduzir a tensão interfacial e aumentar a estabilidade termodinâmica das microemulsões (PAVONI et al., 2020)

Dentre as principais diferenças das microemulsões e nanoemulsões, além do tamanho da partícula formada, encontram-se os problemas de estabilidade. Nanoemulsões são cineticamente mais estáveis que as microemulsões (BOUCHEMAL et al., 2004), ocorrendo em menor proporção os fenômenos de instabilidade como *creaming*, floculação, coalescência e sedimentação (SHARMA et al., 2020). Além disso, necessita-se de menor concentração de tensoativos para uma nanoemulsão, sendo um fator importante a ser considerado para o desenvolvimento de produtos inseticidas. Microemulsões necessitam de cerca de 20% ou mais de tensoativos, ao passo que para a formação de nanoemulsão é necessário em torno de 3 a 10% (BOUCHEMAL et al., 2004).

A biotecnologia está envolvida no desenvolvimento de novos produtos que serão utilizados na indústria de alimentos, na otimização de processos na agricultura, no diagnóstico e tratamento médicos, na engenharia biomolecular, e dentre esses avanços encontra-se a nanotecnologia (FAKRUDDIN; HOSSAIN; AFROZ, 2012).

As nanoemulsões são sistemas com tamanho de partícula entre 20 a 200 nm, capazes de melhorar o sistema de entrega de fármacos lipossolúveis, assim como substâncias apolares como óleos essenciais e insumos, como vitaminas e compostos isolados de plantas com características hidrofóbicas (SOLANS et al., 2005). As nanoemulsões partem do conceito das emulsões, sendo uma das formas farmacêuticas que utiliza sistemas tensoativos capazes de dispersar dois líquidos imiscíveis (GASCO; GALLARATE; PATTARINO, 1991).

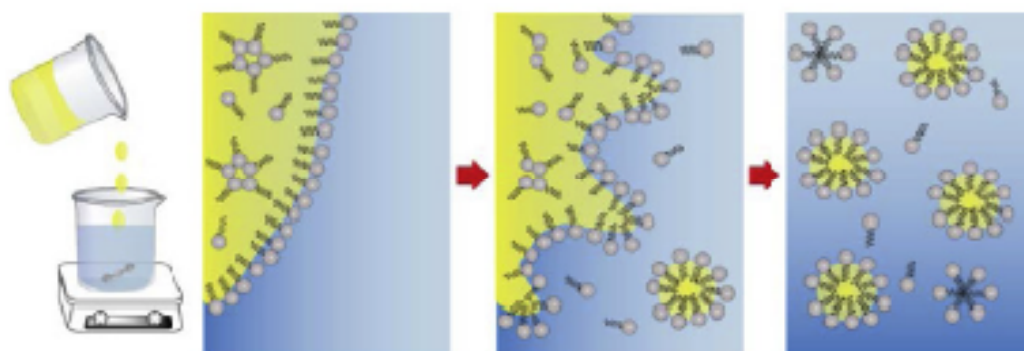
O crescente interesse em desenvolver novas nanoemulsões ocorre devido ao grande número de possibilidades de aplicações, como nos tratamentos médicos cutâneos, na farmacologia e na agricultura (NASTITI et al., 2017; NENAAH; IBRAHIM; AL-ASSIUTY, 2015). As nanoemulsões têm sido desenvolvidas para melhorar a permeação cutânea de medicamentos e ativos lipossolúveis, que não conseguem atravessar a barreira trans epidérmica com facilidade. Além disso, com a melhora da solubilidade em veículos hidrossolúveis, ocorre um aumento nas opções em veículos para a sua incorporação, como géis aquosos e loções. Outro fator importante é que as nanoemulsões podem reduzir a possibilidade de irritação cutânea de determinadas substâncias, utilizando em alguns casos a lecitina de soja ou lecitina de ovo como agente emulsificante, contribuindo para o desenvolvimento de veículos inertes (NASTITI et al., 2017). Sobre o aspecto em aplicação na agricultura, as nanoemulsões encontram-se como um recurso para melhorar a hidrossolubilidade da substância empregada, facilitando a aplicação pelos agricultores (FENG et al., 2018; MANJUNATHA; NAIK; USHARANI, 2019)

As nanoemulsões apresentam-se transparentes ou translúcidas a olho nu, monofásicas, opticamente isotrópicas, lipofílicas (logP 1-3) (NASTITI et al., 2017), com alta estabilidade cinética e geralmente necessitam de baixa energia para serem formuladas (FERNANDES et al., 2014; JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; LI et al., 2017; SOLANS et al., 2005).

Para a obtenção das nanoemulsões pode-se utilizar diferentes técnicas, sendo divididas em preparações envolvendo: 1) alta energia de emulsificação (incluindo neste grupo o método de alta energia de agitação, emulsificação ultrassônica, homogeneização de alta pressão, microfluidização, emulsificação de membrana); 2) baixa energia de emulsificação (onde incluem-se as técnicas de temperatura de inversão de fase, técnica de inversão de ponto de emulsão e técnica de emulsificação espontânea) (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; PRASAD; MOHANTA; SUDHAKAR, 2019). O método de emulsificação espontânea ocorre

quando a fase oleosa é vertida sobre a fase aquosa sob agitação tornando um sistema coloidal cineticamente estável, ocorrendo dispersão de dois líquidos imiscíveis. Em uma nanoemulsão, gotículas esféricas formam a fase dispersa, sendo líquido em uma fase contínua no entorno. Este efeito deve-se à formação de micelas promovidas pelo sistema de tensoativos escolhido (Figura 11) (ASWATHANARAYAN; VITTAL, 2019; PIORKOWSKI; MCCLEMENTS, 2014). As formulações geralmente são compostas por uma combinação de tensoativos (ou surfactantes), sendo, no mínimo, um tensoativo com maior afinidade pela fase aquosa e o outro com maior afinidade pela fase oleosa. Entre os exemplos de surfactantes comumente utilizados encontram-se os surfactantes aniônicos como lauril sulfato de sódio e não-iônicos como *tween* 80, polisorbato 20, Brij 58 e Triton X-100 (LI et al., 2017).

Figura 11. Método de emulsificação espontânea.



Fonte: (PIORKOWSKI; MCCLEMENTS, 2014).

A caracterização das nanoemulsões pode ser realizada através de espectroscopia por espalhamento de luz dinâmico (mais conhecido pela sigla em inglês DLS, *dynamic light scattering*) sendo possível avaliar o tamanho do diâmetro interno da partícula (de 3 nm a 5 μm), carga e polidispersibilidade através do efeito de espalhamento de Rayleigh (fenômeno em que o tamanho da nanopartícula corresponde a 1/10 do comprimento de onda da luz incidente) (ASWATHANARAYAN; VITTAL, 2019). DLS registra a intensidade das flutuações resultantes da localização espacial devido ao movimento browniano das pequenas partículas sobre o momento em que ocorre o espalhamento da luz (BHATTACHARJEE, 2016; LI et al., 2017; PRASAD; MOHANTA; SUDHAKAR, 2019).

Além disso, avaliar a integridade da aparência da formulação é importante, em uma avaliação macroscópica deseja-se ausência de separação de fase, *creaming* ou sedimentação a temperatura ambiente (FERNANDES et al., 2014; SOLANS et al., 2005). O *creaming*

consiste em um efeito de separação gravitacional de fase, quando ocorre a presença de duas densidades relativas diferentes (ASWATHANARAYAN; VITTAL, 2019).

Baseando-se na crescente procura por novos ativos para o mercado cosmético, medicina, saneantes e para o controle de pragas e doenças visando produção de alimentos, vários insumos, como polifenóis, óleos fixos, óleos essenciais, vitaminas e outros extratos vegetais têm sido utilizados no desenvolvimento de novos produtos conciliando as técnicas de nano formulações, visando melhorar a estabilidade química, solubilidade em água e eficácia (BARRADAS; DE HOLANDA E SILVA, 2020; YANG et al., 2020). Para os óleos fixos, por exemplo, os quais são utilizados na indústria cosmética como recurso hidratante, antioxidante e agente reparador cutâneo, são encapsulados em carreadores lipídicos nanoestruturados para evitar a oxidação devido à presença de ácidos graxos poli-insaturados (YANG et al., 2020). Isto é desejável não só para óleos fixos, mas para outros ativos como vitaminas, extratos vegetais, corantes naturais e ativos utilizados como preservantes de alimentos (ASWATHANARAYAN; VITTAL, 2019).

Voltando ao foco dos ativos naturais nanoemulsionados com atividade repelente e inseticida, algumas publicações já mostraram como essas formulações são promissoras; em um trabalho utilizando uma fração apolar de *Manilkara subsericea* (5%) resultou em uma nanoformulação com tamanho médio de diâmetro de 155 nm induzindo a mortalidade em *Dysdercus peruvianus*, uma praga no cultivo de algodão (FERNANDES et al., 2014). Os óleos essenciais de *Ageratum conyzoides*, *Achillea fragrantissima* e *Tagetes minuta* foram incorporados a nanoemulsões pela técnica de homogeneização sob alta pressão, alcançando um tamanho médio de 49 a 136 nm, apresentando assim um aumento da atividade inseticida por fumigação e por contato pelo método de ensaio em superfície tratada (papel-filtro) contra *Callosobruchus maculatus*, uma praga de infestação de sementes de feijão (NENAAH; IBRAHIM; AL-ASSIUTY, 2015).

As nanoemulsões são preparadas utilizando diferentes sistemas de tensoativos, os quais podem ter composição biodegradável ou não. Nanoemulsões com tensoativos biodegradáveis são consideradas ecologicamente sustentáveis e tem crescido o interesse em investigá-las para uso em cosméticos (YANG et al., 2020), saneantes e no controle de pragas e vetores (OLIVEIRA et al., 2017).

Apesar de observar estudos na área de inseticidas com o uso de OE's, observam-se lacunas no que se refere à obtenção padronizada deles, além da obtenção de material vegetal

de forma sustentável, evitando o desgaste de solo e realizando o consumo consciente de água e fertilizantes. Existe disponível no mercado uma formulação baseada na composição química do óleo volátil de *D. ambrosioides*, padronizada em seus 2 compostos majoritários (α -terpineno e *p*-cimeno) juntamente com limoneno, sendo este último adicionado para ampliar o espectro de atividade (BAYER, 2015).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

4.1.1 *Dysphania ambrosioides*

As partes aéreas de *D. ambrosioides* foram coletadas durante o verão, pela manhã, no Horto Didático de Plantas Medicinais do Hospital Universitário HU/CCS (HORTO-HU/CCS), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, Brasil, 27°35'50.3"S 48°31'01.3"O). A identificação botânica foi realizada pelos botânicos Dr. Pedro Fiaschi e Dr^a. Juliana de Paula-Souza com um exemplar selecionado para a confecção de exsicata (Figura 12), a qual foi depositada no herbário FLOR sob o número 68439. O material vegetal foi submetido à estabilização por secagem sobre bancada, localizada no laboratório de Farmacognosia – UFSC, em temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) por 15 dias e as sementes separadas para germinação (Figura 13), com a finalidade de obter mudas futuras para transplante em cultivo hidropônico. As partes aéreas de *D. ambrosioides* - cultivo em solo foram submetidas à secagem sobre bancada para a obtenção de material vegetal seco, no intuito de prevenir a degradação provocada por fungos. Isto é importante para o processo de extração do óleo essencial, visando contornar possíveis problemas de contaminação em seu armazenamento, podendo ocasionar alterações na composição química e nos resultados biológicos posteriores. Em seguida, as partes aéreas secas foram submetidas à extração do óleo essencial conforme será descrito o item 4.2.

Figura 12. Exsicata de *D. ambrosioides*.



Fonte: O autor.

Figura 13. Material vegetal de *D. ambrosioides* coletado do solo.



Fonte: O autor. A) Planta inteira; B) Separação das Sementes e C) Sementes.

As sementes de *D. ambrosioides* foram coletadas em fevereiro de 2018 pela manhã, no HORTO-HU/CCS, as quais permaneceram sob bancada por 7 dias a temperatura ambiente e então levadas para a semeadura no cultivo hidropônico, conforme será descrito no item 4.5.

4.1.2 *Mentha pulegium*

As partes aéreas de *M. pulegium* foram coletadas no Laboratório de Hidroponia - UFSC (27°27'34.58.0"S 48°30'20.1"O), sendo um exemplar selecionado para a confecção de exsiccata, identificada pela botânica Silvia Venturi e depositada no Herbário FLOR (UFSC) sob número 68464. A espécie foi cultivada em um canteiro vertical (Figura 14 e Figura 15), onde recebia rega duas vezes ao dia com solução foliar Dripsol®. Após a coleta, as partes aéreas (Figura 16) foram secas sobre bancada em temperatura ambiente por 30 dias, e em seguida foi realizada a extração do óleo essencial.

Figura 14. Canteiro vertical com mudas de *M. pulegium* utilizadas no estudo.



Fonte: O autor.

Figura 15. Visão geral do canteiro vertical com mudas de *M. pulegium* utilizadas no estudo.



Fonte: O autor. A) plantio inicial das mudas. B) coleta do material vegetal, após 60 dias.

Figura 16. Partes aéreas de *M. pulegium* no momento da coleta.



Fonte: O autor.

As partes aéreas de *M. pulegium* foram submetidas à secagem sobre bancada para a obtenção de material vegetal seco, no intuito de prevenir a degradação provocada por fungos.

4.1.3 *Cola nitida*

A resina bruta proveniente do tronco da árvore de *C. nitida* foi coletada na região oeste da República de Camarões – África Central, em Bangangté, capital de Ndé (5°09'00" N 10°31'00" L) em março de 2014, acondicionada em saco plástico preto a temperatura ambiente e fornecida pelo professor Dr. Louis Pergaud Sandjo em agosto de 2014. O material vegetal foi identificado como originado da espécie *Cola nitida* por comparação de exsicata depositada no Herbário Nacional de Yaoundé – Camarões-África sob número 14590SRF. No momento da chegada ao Brasil, a resina bruta foi submetida à maceração com CHCl₃/MeOH (1:1, v/v) por dez dias, filtrada e concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida, no intuito de obter um extrato com melhor estabilidade e ser investigado em um maior prazo de tempo,

obtendo assim o extrato resinoso concentrado (Figura 17), conforme descrito na dissertação de mestrado da autora (FRANKENBERGER, 2017).

Figura 17. Extrato resinoso concentrado da resina de *C. nitida*



Fonte: O autor.

4.2 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Para a obtenção do óleo essencial de *D. ambrosioides*- cultivo em solo (DaSOE), 39,36g de material vegetal seco rasurado foi inserido em balão volumétrico de 1 L juntamente com 600 mL (m/v) de água destilada e submetido à hidrodestilação em aparelho de clevenger por 3,5 h. Em seguida aguardou-se 10 minutos e o óleo essencial foi coletado, adicionado sulfato de sódio (1,0g) para a remoção de eventual fração aquosa (hidrolato) e devidamente armazenado sob refrigeração ($4^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$). O rendimento extrativo do óleo essencial foi expresso em volume (mL) e porcentagem (%) em relação ao material vegetal seco. O experimento foi conduzido em capela de exaustão e com luz apagada durante as extrações. O hidrolato foi armazenado sob refrigeração.

O óleo essencial de *M. pulegium* (MpOE) foi obtido através da hidrodestilação em aparelho de clevenger com um balão volumétrico de 1 L contendo 46,88g de material vegetal seco e rasurado e 650 mL de água destilada (m/v). A extração durou 2 h; em seguida aguardou-se 10 minutos e então o óleo essencial foi coletado, adicionado sulfato de sódio (1,0g) para retirada de qualquer resíduo de fração aquosa e armazenado sob refrigeração. O

rendimento extrativo do óleo essencial foi expresso em volume (mL) e porcentagem (%) em relação ao material vegetal seco. Uma alíquota do hidrolato foi separada para avaliação de atividade biológica e o restante foi filtrado e submetido à secagem em rotaevaporador sob pressão reduzida e armazenado sob congelador.

Para a extração do óleo essencial de *C. nitida* (CnOE) foram utilizados 71,0g de extrato resinoso concentrado obtido pela maceração da resina bruta em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1, v/v) por dez dias seguido por filtração com papel filtro e algodão e retirada do solvente extrator em rotaevaporador sob pressão reduzida originando o extrato resinoso concentrado. O extrato resinoso concentrado foi pesado em balão volumétrico com 200 mL (m/v) de água destilada. Em seguida foi levado à hidrodestilação em aparelho de clewenger por 3,0 h. Após este período aguardou-se 10 minutos e em seguida o óleo essencial foi coletado, adicionado sulfato de sódio (1,0 g) para retirada de resíduo de fração aquosa e armazenado sob refrigeração. O rendimento extrativo do óleo essencial foi expresso em volume (mL) e porcentagem (%) em relação ao material vegetal seco (g). O hidrolato foi armazenado sob refrigeração. Uma alíquota para a caracterização por CG-EM foi retirada e secada em rotaevaporador sob pressão reduzida. O resíduo resultante na filtração foi armazenado para uma futura pesquisa.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E HIDROLATOS

Os óleos essenciais e os respectivos hidrolatos foram analisados através da técnica de CG-EM, utilizando um cromatógrafo a gás Perkin-Elmer Clarus 680 com coluna capilar de sílica apolar Elite 5mS (coluna com 5% de difenil-polisiloxano e 95% de dimetil-polisiloxano e dimensões de 30 m x 0.25 mm, espessura de 0.25 μm) acoplado a um espectrômetro de massas Perkin-Elmer Clarus SQ8, sob as condições analíticas descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições analíticas (CG-EM) utilizadas para a caracterização dos óleos essenciais e hidrolatos.

	CnOE	DaSOE	MpOE	Hidrolato (Cn, DaS e Mp)
Diluição da amostra	1% com éter dietílico P.A. (v/v)			
Volume de injeção	0,5 µl			
Gás de arraste	Hélio (He ₂ , tipo 5.0, com 99.999% de pureza) 1mL/min			
Rampa de temperatura	35° C (4 min) até 90° C a 20° C/min, até 130° C a 5° C/min, 130° C (1 min) até 250° C a 15° C/min	80° C (4 min.) até 110° C a 2° C/min., 110° C por 1 min., em seguida até 130° C a 5° C/min., 130° C (1 min.), finalizando em 250° C a 15° C/min	35° C (4 min.) até 110° C a 2° C/min., 110° C por 1 min., em seguida até 130° C a 5° C/min., 130° C (1 min.), finalizando em 250° C a 15° C/min	80° C (4 min.) até 110° C a 2° C/min., 110° C por 1 min., em seguida até 130° C a 5° C/min., 130° C (1 min.), finalizando em 250° C a 15° C/min
Temp. do injetor	250° C			
Modo de injeção	<i>split</i> (10 mL/min)	<i>split</i> (50 mL/min)		<i>split</i> (5 mL/min)
<i>Solvent-delay</i>	4 minutos			
Temp. da fonte	180° C			
Temp. da linha de transferência	220° C			
Ionização IE	70 eV			
Faixa de <i>scan</i>	30 a 600 Da			

A identificação dos compostos presentes no óleo volátil e hidrolato de *D. ambrosioides* foi realizada com o auxílio da biblioteca NIST-MS (2011), comparando com a similaridade no padrão de fragmentação das estruturas de referência. Os métodos analíticos foram desenvolvidos a partir de um método padrão proposto por (ADAMS, 2007). A proporção de cada composto foi determinada calculando o valor da área sob a curva, considerando os picos identificados na ordem de magnitude de e^{10} (o que significa que a sensibilidade de detecção com fator de resposta 10 – relação entre o incremento de área sob a curva de cada pico e incremento de massa do analito) e e^9 . Com isso os picos referentes ao ruído foram desconsiderados. Foram realizadas análises com o objetivo de comparar com os tempos de retenção da série homóloga de alcanos (C9, 11, 13, 15, 17, 19) e de padrões analíticos (α -pineno, $\geq 97\%$ de pureza, fabricante Sigma-Aldrich, China; β -pineno, $\geq 97\%$ de pureza, fabricante Sigma-Aldrich, China) e comparação com literatura de referência (ADAMS, 2007). Através das informações obtidas pelo tempo de retenção de cada alcano (da série homóloga de n-alcanos) utilizando o método cromatográfico utilizado para a análise de

caracterização dos óleos essenciais, é possível calcular o índice de retenção de cada composto identificado, seguindo a Equação 1 abaixo.

Equação 1. Fórmula para calcular o índice de retenção (IR) para análise em temperatura programada

$$IR = 100 \left[\frac{(tR - tRz)}{(tR(z+1) - tRz)} \right]$$

Sendo tR= tempo de retenção do composto desconhecido; tRz = tempo de retenção no n-alcano anterior; tR (z + 1) = tempo de retenção do n-alcano posterior.

A avaliação da presença de ascaridol no óleo volátil de *D. ambrosioides*- cultivo em solo foi realizada utilizando o modo SIR (*selecting ion recording*), selecionando os íons diagnósticos conforme literatura de referência: *m/z* 43; 55; 69; 79; 93; 107; 121 e 136 Da (CHU et al., 2008).

A proporção de cada composto do óleo volátil e hidrolato de *M. pulegium* foram determinadas calculando o valor da área sob a curva, considerando os picos identificados na ordem de magnitude de e^{10} . Os dados foram processados pelo *software* Turbo Mass 6.1.0 e a identificação dos compostos foi realizada com o auxílio da biblioteca NIST-MS (2010, versão 2.0), comparando com a similaridade no padrão de fragmentação das estruturas de referência, e através da comparação com os tempos de retenção da série homóloga de alcanos (C9, 11, 13, 15, 17, 19) e de padrões analíticos (α -pineno, $\geq 97\%$ de pureza, fabricante Sigma-Aldrich, China; β -pineno, $\geq 97\%$ de pureza, fabricante Sigma-Aldrich, China) e comparação com literatura de referência (ADAMS, 2007).

O cromatograma do óleo volátil de *C. nitida*, assim como o hidrolato, foi analisado em modo TIC e os picos foram integrados para a obtenção da área sob a curva de cada pico. Os dados foram processados pelo *software* Turbo Mass 6.1.0 e a identificação dos compostos foi realizada com o auxílio da biblioteca NIST-MS (2010, versão 2.0), comparando com a similaridade no padrão de fragmentação das estruturas de referência, e através da comparação com os tempos de retenção da série homóloga de alcanos (C8 – C20) e de padrões analíticos (α -pineno, $\geq 97\%$ de pureza, fabricante Sigma-Aldrich, China; β -pineno, $\geq 97\%$ de pureza, fabricante Sigma-Aldrich, China) e comparação com artigos e literatura de referência (ADAMS, 2007).

4.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA EM ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA

Os bioensaios entomológicos foram realizados no Laboratório de Entomologia Agrícola – Centro de Ciências Agrárias – UFSC, sob coordenação do Prof. Dr. Alex Sandro Poltronieri. O ensaio foi realizado com a espécie *Sitophilus zeamais*, uma praga de armazenamento que reduz a massa de grãos de milho, além de contaminá-los com fungos causando déficit de qualidade e produtividade.

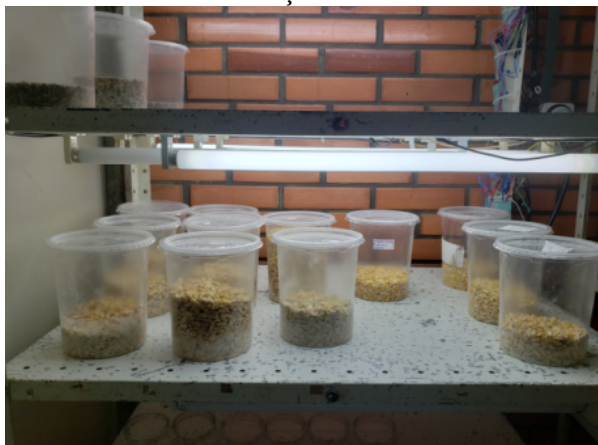
Outras espécies avaliadas foram o pulgão de couve *Brevycorine brassicae* e *Lipaphis pseudobrassicae*, pertencente à mesma família Aphididae.

Sendo assim, é importante investigar novas opções de bioinseticidas para estas espécies, as quais representam um grande problema na estocagem de alimentos e na produção de hortaliças na agricultura orgânica.

4.4.1 Criação de *Sitophilus zeamais*

Insetos adultos não-sexados de *S. zeamais* (Motschulsky, 1855) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) com 15 dias de idade foram coletados de uma criação artificial (gaiola plástica com grãos de milho) mantida em condições controladas em uma sala de criação ($25 \pm 2^\circ$ C, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 h) (Figura 18). Os insetos foram identificados pelo professor Dr Alex Sandro Poltronieri – Laboratório de Entomologia Agrícola da Universidade Federal de Santa Catarina (Labento – UFSC).

Figura 18. Criação de *S. zeamais* - sala de criação



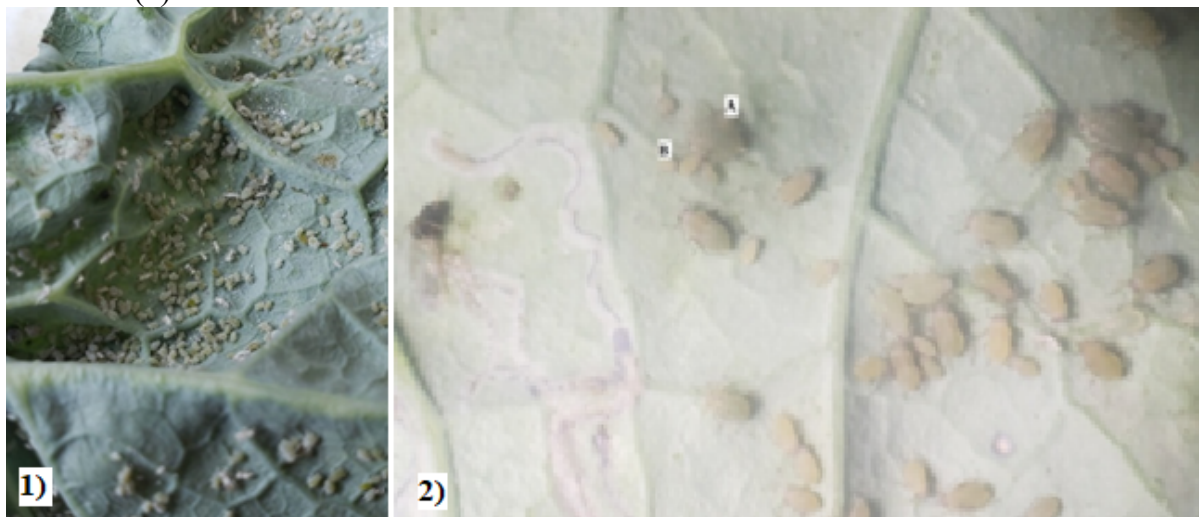
Fonte: O autor.

4.4.2 Criação de *Brevicoryne brassicae*

Os insetos foram identificados pelo professor Dr. Alex Sandro Poltronieri – Laboratório de Entomologia Agrícola da Universidade Federal de Santa Catarina (Labento – UFSC).

Insetos adultos de *B. brassicae* foram obtidos a partir de folhas de couve-manteiga infestadas coletadas da horta experimental do Centro de Ciências Agrárias – UFSC, e de folhas de brócolis infestadas coletadas da horta experimental da EPAGRI – CIRAM (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**, ilustração 1). A seleção dos insetos foi realizada através de identificação microscópica, excluindo os insetos parasitados, alados ou de outras espécies. Foram inoculados seis insetos fêmeas adultas/placa e deixados em repouso por 24 h na sala de criação. Após este período, os insetos adultos foram retirados, permanecendo 10 ninfas de 1º instar (insetos no primeiro estágio de vida, onde não ocorreu a maturidade sexual, porém apresenta a mesma morfologia que o inseto adulto) por placa (Figura 19, ilustração 2).

Figura 19. Folha de couve infestada por afídeos (1); Foto ampliada de *B. brassicae* adultos e ninfas (2).



Fonte: O autor. A) inseto adulto; B) ninfa de 1º instar.

4.4.3 Coleta de *Lipaphis pseudobrassicae*

Os insetos adultos de *L. pseudobrassicae* foram coletados de folhas de couve do canteiro experimental do LabHidro – CCA – UFSC (Figura 20) e identificados pelo professor

Dr. Alex Sandro Poltronieri – Laboratório de Entomologia Agrícola da Universidade Federal de Santa Catarina (Labento – UFSC) com confirmação dada pela entomologista Maria Aparecida Cassilha Zawadneak.

Figura 20. Insetos adultos de *L. pseudobrassicae*, A. em folha infestada; B. Foto ampliada do inseto adulto e ninfas.



Fonte: O autor.

4.4.4 Atividade repelente

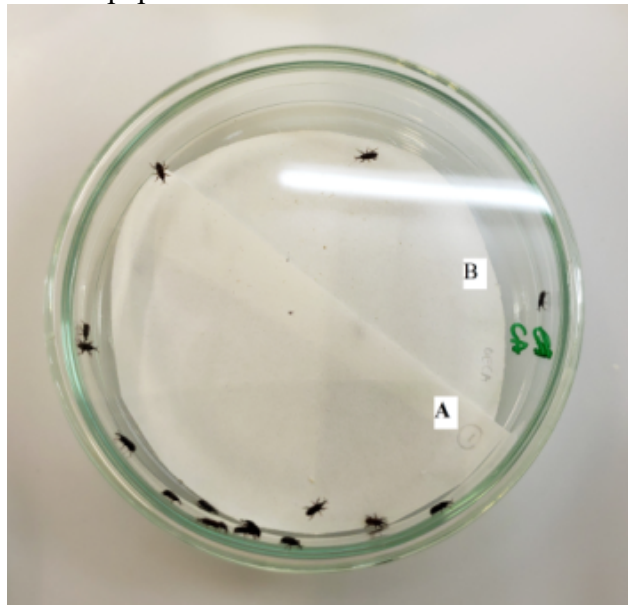
4.4.4.1 Método de livre chance de escolha em papel-filtro tratado versus *S. zeamais*

Para a avaliação da atividade repelente, escolheu-se o ensaio pelo método de escolha em papel-filtro (NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2009). Sobre discos de papel filtro com 9,0 cm de diâmetro (marca Advantec, No. 2. 90,0 mm, Toyoroshi Kaisha Ltda., Japan) foram aplicados 1,0 mL de tratamento para cada disco, permanecendo em secagem por 24 h em capela a temperatura ambiente; em seguida os discos foram divididos e uma metade de papel tratado com controle positivo, controle negativo ou com solução de óleo essencial foi inserida em placa de petri de 9 cm de diâmetro, e a outra metade sendo com controle negativo.

Cada placa correspondeu a uma repetição, totalizando seis repetições para cada tratamento. O experimento foi conduzido em um modelo completamente randomizado entre o tratamento: óleo essencial a 1% (OE de *C. nitida*, *D. ambrosioides*- cultivo em solo ou *M. pulegium*) diluído em veículo (dimetilsulfóxido a 1% e água destilada qsp); controle positivo Citromax® a 1% (extrato de *Azadirachta indica* Juss.; também conhecido por extrato de *neem*, padronizado em azadiractina 0,12%) diluído em veículo; e controle negativo, sendo somente o veículo.

Em cada placa foram inseridos 20 insetos de *S. zeamais* e a contagem dos insetos em cada lado realizada após 1h, 3h e 24h (Figura 21).

Figura 21. Repetição contendo papel-filtro e insetos inoculados.



Fonte: O autor. A) controle negativo; B) tratamento.

O resultado foi calculado baseado na porcentagem de repelência (PR), Equação 2 e interpretado conforme os dados do Quadro 2.

Equação 2. Cálculo da Porcentagem de Repelência

$$PR = [(Nc - Nt) \times (Nc + Nt)^{-1}] \times 100$$

Onde: Nc = número de insetos na área com controle negativo (ou não-tratada); Nt = número de insetos na área com controle positivo, tratamento ou controle negativo.

Quadro 2. Interpretação da porcentagem de repelência

Taxa de repelência (%)	Interpretação
>0,01 a <0,1	Sem repelência
0,1 a 20	Repelência muito baixa
20,1 a 40	Baixa repelência
40,1 a 60	Repelência moderada
60,1 a 80	Repelente
80,1 a 100	Muito repelente

Fonte: (LANGSI et al., 2018)

4.4.5 Atividade inseticida

4.4.5.1 Método de superfície tratada com papel-filtro versus *S. zeamais*

Para este ensaio foram utilizados disco de papel-filtro com 9,0 cm de diâmetro em placas de petri do mesmo tamanho. Em cada disco foi aplicado 1 mL de solução de tratamento sendo realizados 10 repetições para cada tratamento. O experimento foi conduzido em um *design* completamente randomizado entre o tratamento: óleo essencial a 1% (DaSOE, MpOE e CnOE) diluído em veículo (acetona qsp); controle positivo (Citromax® a 1% diluído em veículo); e controle negativo, sendo somente o veículo qsp. Após a aplicação do tratamento, as placas permaneceram abertas a temperatura ambiente e sob capela por 20 minutos (para evaporação do solvente) e em seguida foram inoculados 20 insetos de *S. zeamais* em cada placa (correspondendo a 1 ensaio) (método adaptado de (DANGA et al., 2015). Os insetos vivos e mortos foram contados a cada 24 h até 120 h, com o auxílio de um pincel de cerdas macias. Os dados foram calculados utilizando a equação de cálculo da porcentagem de mortalidade (Equação 3) e os resultados avaliados com programa estatístico e interpretados conforme Quadro 3.

Equação 1. Cálculo da mortalidade pela Fórmula de Abbott

$$IR = [(T-C) \times T^{-1}] \times 100$$

Onde: T= número de insetos vivos no controle negativo, C= número de insetos vivos no tratamento ou controle positivo.

Quadro 3. Interpretação da porcentagem de mortalidade.

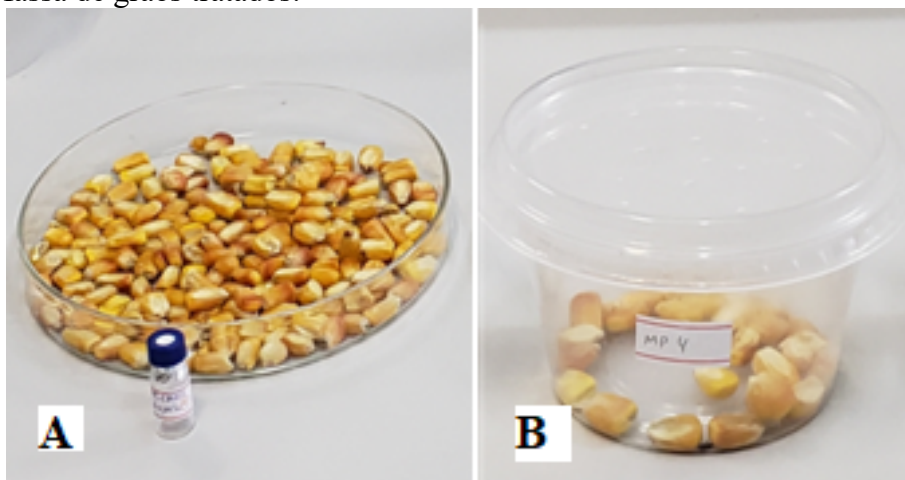
Mortalidade (%)	Interpretação
0 a 20	Seletivo
21 a 40	Baixa toxicidade
41 a 60	Média toxicidade
61 a 100	Alta toxicidade

Fonte: (“normas inseticidas embrapa”, [s.d.]

4.4.5.2 Ensaio de mortalidade sobre superfície tratada com grãos versus *S. zeamais*

Grãos de milho foram armazenados em freezer por 48 h, mantidos a temperatura ambiente por 72 h, pesados (66,0 g de milho, suficientes para 6 repetições) e a seguir borrifados com 6,6 mL de tratamento com óleo essencial a 1% (DaSOE, MpOE e CnOE) diluído em veículo (acetona qsp); controle positivo Citromax® a 1% diluído em veículo; e controle negativo, sendo somente o veículo. A massa de grãos de milho tratado foi mantida em capela a temperatura ambiente por 20 minutos (Figura 22-A); após os grãos tratados foram pesados ($10,0 \pm 0,1$ g de milho para cada gaiola) (Figura 22-B) e em seguida 20 insetos de *S. zeamais* foram inoculados em cada gaiola (repetição). Foram realizadas seis repetições para cada ensaio. Os dados foram calculados utilizando a equação de índice de resposta (Equação 3) e os resultados avaliados com programa estatístico.

Figura 22. Massa de grãos tratados.



Fonte: O autor. A) Aplicação do tratamento sobre a massa total de grãos utilizados para as repetições e secagem; B) milho pós-tratamento pesado para cada repetição.

4.4.6 Avaliação de perda de massa de grãos

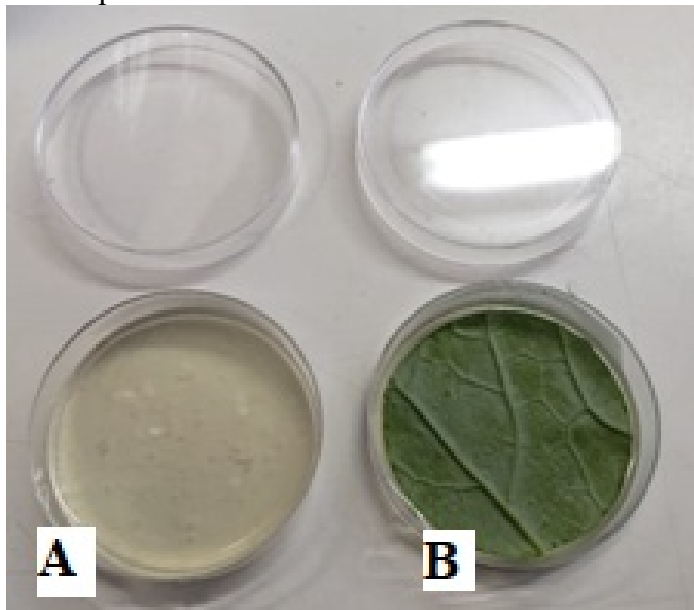
Após a contagem de 120 h do ensaio de mortalidade sobre superfície tratada com grãos frente a *S. zeamais* (item 4.4.5.2), as repetições foram pesadas e armazenadas na sala de criação por 30 dias, sendo pesadas novamente ao final deste período e comparadas com a massa inicial. A avaliação de perda de massa de grãos consistiu na diferença entre a massa inicial e da massa final, sendo os resultados calculados em média e avaliado no programa estatístico. Além disso, os dados foram tabelados na forma de porcentagem de perda de massa de grãos \pm desvio padrão.

4.4.7 Método de toxicidade de contato versus *B. brassicae*

As amostras de óleos essenciais de *C. nitida* e de *M. pulegium* foram avaliadas quanto ao potencial inseticida frente a insetos de *B. brassicae* L. (HEMIPTERA: APHIDIDAE) com 24 h de idade (ninfas de 1º instar). Nesta etapa de experimentos, não havia quantidade suficiente de óleo essencial de *D. ambrosioides*- cultivo em solo, portanto esta opção de tratamento não foi considerada.

Para o preparo do meio de cultura utilizou-se 200 mL de água destilada aquecida, em um béquer, por 2 min. em forno de micro-ondas, em seguida foi adicionado 4 g de meio Agar simples a 2% (m/v; fabricante Biolag, lote PCA 80329), composto por triptona (5g/L), extrato de levedura (2,5 g/L), D-glicose anidra ACS (1g/L) e agar bacteriológico (15g/L); agitado e aquecido por mais 15 segundos. Em seguida a solução foi resfriada até 45° C e então inserida em placas de petri descartáveis com 6,0 cm de diâmetro (Figura 23-A). Quando o meio estava quase gelificado foi inserido o disco de folha de couve (6,0 cm de diâmetro) (Figura 23-B). Para os ensaios utilizou-se *Brassica oleraceae* L. var. acephala, Brassicaceae (couve-manteiga orgânica comprada no Mercado São Jorge – Florianópolis, SC), sendo as folhas lavadas em água corrente e deixadas em contato com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por 1 minuto. Em seguida as folhas foram enxaguadas, secas em papel toalha e cortadas com o auxílio de molde metálico circular com 6,0 cm de diâmetro, mantidas sob temperatura ambiente 25° C \pm 2° C e umidade relativa de 70% \pm 10% até a sua utilização.

Figura 23. Placas utilizadas para o ensaio de mortalidade em discos de couve.



Fonte: O autor. A) placa com meio de cultura agar simples; B) placa com meio de cultura agar simples e couve-manteiga.

Para cada placa de petri foram inoculados seis insetos adultos fêmeas deixados em repouso por 24 h na sala de criação. Após este período, os insetos adultos foram retirados, permanecendo 10 ninfas de 1º instar por placa.

Em cada placa foram aplicados três borrifos (0,25 mL) de solução com tratamento (OE de *C. nitida* ou OE de *M. pulegium*) a 1,0% em veículo (DMSO a 1% e água qsp); controle positivo (Citromax® a 1%) em veículo ou controle negativo (somente veículo). No intuito de investigar o potencial de subproduto da hidrodestilação, os hidrolatos de *C. nitida* e *M. pulegium* também foram utilizados como tratamento, porém sem diluição em veículo; neste caso foram borrifadas três vezes sobre a placa (0,75 mL no total). Foram realizadas seis repetições para cada tratamento.

Após a aplicação do tratamento, as placas foram acondicionadas na sala de criação por 24 h e então os insetos mortos e vivos foram contados, com o auxílio de um pincel de cerdas macias e os resultados calculados utilizando a equação de cálculo da porcentagem de mortalidade (Equação 3). Foram realizadas cinco repetições para cada ensaio.

4.4.8 Método de toxicidade de contato versus *L. pseudobrassicae*

Os óleos essenciais das espécies eleitas para o presente estudo foram avaliados quanto ao potencial inseticida frente a insetos adultos de *Lipaphis pseudobrassicae* L. (HEMIPTERA: APHIDIDAE).

A metodologia de preparação das placas foi semelhante ao item 4.4.7, sendo que para este ensaio foram coletados insetos adultos de couves hidropônicas infestadas (LabHidro-UFSC). Cada folha infestada foi agitada sobre uma superfície limpa e os insetos que caíram espontaneamente foram transferidos para as placas do bioensaio, com o auxílio de um pincel de cerdas macias. Após a transferência, foi verificado se todos os insetos estavam vivos (n= 10 insetos/placa, representando 1 repetição).

Em cada placa foram aplicados cinco borrifos (0,42 mL) de solução com tratamento (MpOE e CnOE) a 1,0% em veículo (DMSO a 1% e água qsp); controle positivo (Citromax® a 1%) em veículo ou controle negativo (somente veículo). Foram realizadas seis repetições para cada tratamento.

Após a aplicação do tratamento, as placas foram acondicionadas na sala de criação por 24 h e então os insetos mortos e vivos foram contados, com o auxílio de um pincel de cerdas macias e os resultados calculados utilizando a equação de cálculo da porcentagem de mortalidade (Equação 3).

4.4.9 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) e teste *post hoc* de Tukey, sendo os dados processados com *software* GraphPad Prism 8.0.1 (Inc. San Diego, CA). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados indicativos de significância. Os resultados foram apresentados como a média \pm desvio padrão da média para cada grupo de experimentos.

4.5 CULTIVO HIDROPÔNICO DE *D. ambrosioides*

Após observar o potencial da espécie *D. ambrosioides*- cultivo em solo contra insetos, decidiu-se avaliar a possibilidade de obtenção desta planta para uso em larga escala

industrial. Para isso foi conduzido um estudo comparativo de obtenção entre a espécie coletada no solo e cultivada em hidroponia. O estudo de cultivo foi realizado no Laboratório de Hidroponia - UFSC (27°27'34"58.0"S 48°30'20.1"O).

Para a germinação das sementes coletadas da espécie-cultivo em solo, espuma fenólica seca (marca *Green up*, 2,5 x 2,5 x 3,0 cm/célula) foi imersa por 12 h em uma solução de carbonato de cálcio em água (15g: 20 L, m/v) para equilibrar em pH 10,0; em seguida a espuma foi lavada 2 vezes com água corrente. Após escorrer o excesso de água, a espuma foi acondicionada em uma bandeja plástica, e então as sementes (média de 50 sementes/célula) foram colocadas com o auxílio de uma espátula; em seguida borrifou-se com água o suficiente para manter toda a espuma úmida e levou-se à estufa (20° C, lâmpada incandescente com 80% de energia) por 10 dias (Figura 24).

Figura 24. Germinação de sementes de *D. ambrosioides* em espuma fenólica.



Fonte: O autor.

Em seguida as células com as sementes germinadas ficaram sob bancada sendo irrigadas, alternando água e solução nutritiva para folhosas Dripsol® (complexo de minerais) (FURLANI, 1999), com condutividade elétrica de 1,5 dS/m, temperatura ambiente e pH $5,5 \pm 0,5$ por 10 dias, onde ao final deste tempo cada muda alcançou o tamanho aproximado de 8,00 cm.

A solução foliar (Dripsol®) consistia em uma solução usualmente empregada no cultivo de hortaliças a qual continha uma mistura de minerais elementares conforme descrito no Quadro 4, com condutividade elétrica de 1,5 dS/m.

Quadro 4. Composição química da solução foliar Dripsol®.

Nutriente	mg/L	Nutriente	mg/L
Nitrogênio-nitrato	178,80	Boro	0,30
Nitrogênio-amonio	7,50	Cobre	0,15
Fósforo	39,30	Fluor	1,50
Potássio	249,00	Manganês	0,50
Cálcio	138,80	Molibdênio	0,04
Magnésio	40,00	Zinco	0,85
Enxofre	60,00		

Fonte: material suplementar de(NASCIMENTO et al., 2020a).

Para decidir sobre o melhor método de cultivo hidropônico, foram utilizadas embalagens plásticas medindo 11,0 cm de altura x 16,0 cm de comprimento x 10,0 cm de largura, nas quais foram inseridas três combinações diferentes de substratos: 1. Areia e solução foliar (SF, Dripsol®); 2. Fibra de coco + fibra de arroz em vaso + SF 3. SF com raízes suspensas. Os experimentos foram realizados em triplicata. Ao final de 30 dias, as folhas dos três cultivos foram coletadas, medidas e inseridas frescas em *vials* e analisadas em *headspace*- CG-EM, conforme citado no item 4.6 As mudas foram plantadas no mesmo dia e as medições realizadas 30 dias após o replante. O tamanho das plantas e as folhas foram avaliados com o auxílio de régua e trena, e os valores calculados em média \pm desvio padrão.

Em um segundo experimento, a partir da decisão sobre o melhor cultivo do experimento anterior, foi realizado a germinação de sementes coletadas da *D. ambrosioides*-cultivo em solo submetido ao mesmo procedimento ao experimento anterior e após 10 dias as mudas foram replantadas em um canteiro suspenso de calhetão composto por camadas de areia, perlita expandida e pedras, onde foram dispostas 9 células com espaçamento de 16,0 cm x 12,0 cm entre cada célula. O canteiro foi irrigado por um sistema automatizado duas vezes ao dia, com duração de 5 minutos cada rega, utilizando água e solução nutritiva para folhosas por 30 dias. Com o objetivo de comparar a composição da fração volátil de cada órgão vegetal, foram coletadas amostras das raízes e das folhas jovens e após 30 dias, as folhas, raízes e caule foram coletados e acondicionados em *vials* para *headspace* com capacidade para 20 mL e analisados em *headspace*-CG-EM. As partes aéreas foram coletadas pela manhã, durante o verão; o material vegetal foi submetido à secagem sobre bancada por 15 dias e em seguida levado à extração do óleo essencial.

4.6 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO VOLÁTIL

Para a caracterização dos compostos voláteis e consequente comparação dos mesmos, folhas frescas de *D. ambrosioides* foram coletadas de cada método de cultivo hidropônico (3 g de cada método, em triplicata) e mantidas em *vials* para *headspace* com septo de PTFE (politetrafluoroetileno) a 3° C até o dia de análise. As amostras congeladas permaneceram por 4 h a temperatura ambiente e avaliadas utilizando amostrador tipo *headspace* 40/110 *Trap sampler* Perkin-Elmer sob as condições: temp. forno 100° C por 10', 20 psi de pressão por 2', temp. da agulha de 120° C. O aquecimento da amostra gerou uma pressão de vapor, o qual foi injetado diretamente para a coluna capilar do CG, seguindo o método analítico a seguir.

Para a obtenção do óleo essencial de *D. ambrosioides* do cultivo hidropônico (DaHiOE), 46,08 g de material vegetal seco rasurado (partes aéreas) foi inserido em balão volumétrico de 1 L juntamente com 600 mL (m/v) de água destilada e submetido à hidrodestilação em aparelho de clewenger por 3,5 h. Em seguida aguardou-se 10 minutos e o óleo essencial foi removido, adicionado sulfato de sódio (1,0 g) para retirada de qualquer resíduo aquoso e devidamente armazenado sob refrigeração (4° C ± 2° C). O hidrolato foi coletado e armazenado sob refrigeração. O experimento foi conduzido em capela de exaustão e ao abrigo da luz durante as extrações.

Como técnica complementar de identificação e comparação dos principais compostos dos óleos essenciais de *D. ambrosioides*- cultivo em solo (caracterizado conforme item 4.3) e *D. ambrosioides*- cultivo hidropônico foram realizados os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono 13 (RMN-¹H e ¹³C). Utilizou-se o espectrômetro de ressonância magnética nuclear do fabricante Bruker, modelo Fourier 300 MHz e os dados foram processados utilizando o *software* Topspin 3.1. As amostras foram preparadas a 20 µL/550 µL com solvente clorofórmio deuterado (pureza de 99,8%) com tetrametilsilano (TMS, 0,05%) como padrão interno.

Com o objetivo de comparar a composição química da água de cocção (solo *versus* hidropônico), a mesma foi filtrada e concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida e mantida em congelador até o momento da análise, originando o extrato bruto aquoso de *D. ambrosioides* – hidropônico (DaHiE, 0,628 g) e o extrato bruto aquoso de *D. ambrosioides*–

solo (DaSE, 0,560 g). Os extratos foram avaliados quanto ao teor de umidade em balança de infravermelho Ohaus MB-45, a 130° C por 10 minutos, sendo 1° C/1 min, modo AFREE.

Os extratos foram investigados perante atividade repelente e inseticida contra *S. zeamais* (DaHiE e DaSE, de acordo com os métodos descritos em 4.4.4.1 e 4.4.5.1) pela aluna de Agronomia Thais da Silva Labes, e os resultados foram publicados juntamente com a comparação da fração volátil de ambos os cultivos, hidropônico e solo, assim como a atividade biológica contra *S. zeamais* (FRANKENBERGER et al., 2022a).

4.7 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *D. ambrosioides*- CULTIVO HIDROPÔNICO

O óleo essencial de *D. ambrosioides*- cultivo hidropônico foi testado contra a espécie *S. zeamais*, seguindo o mesmo procedimento descrito em 4.4.4.1, 4.4.5.2 e 4.4.6. Foi realizado também o bioensaio contra osafídeos *B. brassicae* *L. pseudobrassicae* (conforme itens 4.4.7 e 4.4.8). Os resultados foram analisados conforme item 4.4.9.

4.8 DESENVOLVIMENTO DAS NANOEMULSÕES

As nanoemulsões foram desenvolvidas no Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia – Centro de Ciências da Saúde – UFSC, sob coordenação do Prof. Dr. Thiago Caon e com o auxílio da pós-doutoranda Débora Fretes Argenta.

4.8.1 Diluente dos óleos essenciais

Para avaliar a estabilidade dos óleos essenciais nos solventes envolvidos no desenvolvimento da formulação em nanoemulsão, os óleos essenciais de *D. ambrosioides*- cultivo hidropônico, *M. pulegium* e *C. nitida* foram diluídos em etanol e acetona e avaliados no dia 1 e no dia 30, utilizando diluições de 10 e 50 µL/mL em etanol, acetona e em uma mistura de etanol/acetona (1:1 v/v) e agitados em banho de ultrassom por 30 min. sob temperatura ambiente (25° C), conforme parâmetros definidos pela Farmacopeia Brasileira (2019) (FARMACOPÉIA, 2019). O óleo essencial de *D. ambrosioides*- cultivo em solo não

foi incluído na etapa de desenvolvimento de nanoemulsão, pois em um planejamento prévio foi visto que não havia quantidade suficiente de óleo essencia para os testes.

4.8.2Obtenção das nanoemulsões

Em um béquer A foram pesados o óleo essencial (8,0%, 0,04g), span® 80 (oleato de sorbitan, 1,0%, 0,05g) e como solvente orgânico, uma solução de acetona/etanol (1:1, v/v, 15 mL). Em um béquer B foram pesados tween® 80 (monoleato de sorbitan etoxilado 20 EO, 1,0%, 0,05g) e água deionizada (30 mL). Aos dois béqueres foram inseridos agitadores magnéticos e levados à agitação (agitador Multistirrer VELP Scientifica) por 5 min. Ao final deste período, verteu-se o béquer A em B, com o auxílio de uma seringa plástica; em seguida a solução permaneceu sob agitação por 30 min. Terminado este tempo, a solução foi levada ao rotaevaporador sob pressão reduzida (Marca Buchi) para a retirada dos solventes, até restar 5,0 mL de solução final. O pH da solução foi verificado em triplicata e armazenada até o dia seguinte, onde foram avaliados *PDI*, potencial *zeta*, tamanho de partícula e características macroscópicas.

4.8.3Caracterização das nanoemulsões

4.8.3.1Determinação do valor de pH

Para a determinação do pH, os óleos essenciais foram analisados sem diluição no dia₀ da formulação das nanoemulsões utilizando um pH-metro digital marca MS Tecnoyon (modelo mPA210).

4.8.3.2Estabilidade

As nanoemulsões desenvolvidas com óleos essenciais foram avaliadas quanto à estabilidade física mantidas sobre refrigeração ($4 \pm 2^\circ \text{C}$) por 30 dias, sendo realizados a avaliação de cor e uniformidade, determinação do pH (com o mesmo equipamento do item 4.8.3.1), potencial *zeta*, tamanho de partícula e índice de poli dispersão. As avaliações foram realizadas no tempo zero (d_0) e após 30 dias (d_{30}).

4.8.3.3 Distribuição de tamanho de partícula e potencial zeta

O tamanho médio da partícula, o índice de poli dispersão e o potencial zeta foram determinados por *Dinamic Light Scattering*, utilizando o equipamento Malvern ZetaSizer® e os dados obtidos foram analisados no software ZetaSizer versão 7.10.

Para a avaliação do potencial *zeta* as amostras de nanoemulsões foram diluídas em solução NaCl 1 nM. Cada formulação foi preparada a 1:10, v/v para 1,5 mL de solução, utilizando uma cubeta de acrílico com duas entradas e selecionando os experimentos para a temperatura de 25° C e tempo de equilíbrio de 120 segundos. As análises foram realizadas em triplicata.

O índice de polidispersão (PDI) e tamanho da partícula foram avaliados com a mesma alíquota amostral e foram realizadas em triplicata. A formulação foi preparada a 1:10, v/v para qsp 1,5 mL de solução, utilizando água miliQ como solvente. Os experimentos foram realizados a 25° C com uma cubeta de acrílico (COD. DTS 1070), ângulo de detecção de 173° e tempo de equilíbrio de 30 segundos.

4.8.3.4 Análise qualitativa dos compostos voláteis na nanoemulsão

Para a análise qualitativa dos compostos do óleo essencial presentes nananoemulsão, as formulações e os seus respectivos óleos essenciais foram avaliados utilizando a técnica de dessorção térmica por *headspace*-CG-EM sem solvente, com 10 µL em cada vial de 20 mL, sendo utilizado o amostrador *headspace* Perkin-Elmer 40/110 *trap* com as seguintes condições de análise: Temp. da agulha 65° C, temp. de transferência 65° C, temp. de forno 60° C, pressão de 20 psi, tempo de pressão 1 min., tempo de injeção 30 seg., tempo de transferência 0,2 min., tempo de forno 20 min., pressão de injeção 30 psi. Quanto ao método cromatográfico, foi utilizado coma condição seguinte: gás de arraste Hélio (1 mL/min); rampa de temperatura: 130° C até 250° C (15° C/min); temp. injetor 250° C, modo de injeção *split* (50 mL/min); e as condições do espectrômetro de massas seguindo: *solvent delay* de 1 min, temp. da fonte de 180° C, temp. da linha de transferência de 220° C; energia de ionização de 70 eV e faixa de *scan* de 30 a 600 Da. Os equipamentos foram os mesmos utilizados para a análise dos óleos essenciais por *HS*-CG-EM (item 4.3).

4.9 COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DAS NANOEMULSÕES E ÓLEOS ESSENCIAIS

4.9.1.1 Método de toxicidade de contato versus *B. brassicae*

As amostras de nanoemulsões (NE) e de óleos essenciais (OE) (Tabela 2) foram avaliadas quanto ao potencial inseticida frente a insetos de *B. brassicae* com 24 h de idade (ninfas de 1º instar) criados da mesma forma descrita no item 4.4.2.

Em cada placa foram aplicados três borrifos (0,25 mL) de solução com tratamento (conforme mostrado na Tabela 2) a 1,0% em veículo (DMSO a 1% e água qsp); controle positivo (Citromax® a 1%) em veículo ou controle negativo (somente veículo).

Tabela 2. Soluções tratamento empregadas no ensaio de toxicidade de contato versus *B. brassicae*

<u>Amostra</u>	<u>Descrição</u>
1	OE de <i>D. ambrosioides</i> - HI
2	OE de <i>M. pulegium</i>
3	OE de <i>C. nitida</i>
4	NE de <i>D. ambrosioides</i> -HI
5	NE de <i>M. pulegium</i>
6	NE de <i>C. nitida</i>

OE = óleo essencial; HI= cultivo hidropônico; NE= nanoemulsão

Após a aplicação dos tratamentos, as placas foram acondicionadas na sala de criação por 24 h e então os insetos mortos e vivos foram contados, com o auxílio de um pincel de cerdas macias e os resultados calculados utilizando a equação para o cálculo da porcentagem de mortalidade (Equação 4). Foram realizadas cinco repetições para cada ensaio.

4.9.1.2 Método de toxicidade de contato versus *L. pseudobrassicae*

As amostras de nanoemulsões (NE) e de óleos essenciais (OE) (Tabela 2) foram avaliadas quanto ao potencial inseticida frente a insetos adultos de *L. pseudobrassicae* conforme descrito no item 4.4.8. Em cada placa foram aplicados cinco borrifos (0,42 mL) de solução com tratamento (conforme mostrado na Tabela 2) a 1,0% em veículo (DMSO a 1% e

água qsp); controle positivo (Citromax® a 1%) em veículo ou controle negativo (somente veículo), sendo realizadas seis repetições para cada tratamento.

4.9.2 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) e teste *pos hoc* de Tukey, conforme descrito no item 4.4.9.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Abaixo estão apresentados os rendimentos obtidos para os óleos essenciais extraídos das três espécies eleitas para o presente estudo visando sua caracterização e avaliação do potencial inseticida.

As partes aéreas secas de *D. ambrosioides*- cultivo em solo foram submetidas a hidrodestilação para a obtenção do óleo essencial (DaSOE) apresentando um rendimento de $1,07 \pm 0,01\%$, sendo este resultado similar ao descrito para a espécie coletada na África (1,0%, conforme Farmacopeia Africana, 2014), material vegetal coletado em Cáceres-MT, Brasil com rendimento de 1,15% (DEGENHARDT et al., 2016) e espécie coletada no México com rendimento de 1,2% (SAGRERO-NIEVES; BARTLEY, 1995). Entretanto, um estudo conduzido por Pavela e Benelli, 2016 revelou rendimento de 0,08% para espécie coletada em Camarões-África (PAVELA; BENELLI, 2016). Ressaltar o motivo da não obtenção do óleo essencial da planta por hidroponia.

Quanto à forma de preparo das partes aéreas secas para a hidrodestilação, em uma análise prévia utilizando o material vegetal triturado em moinho de facas, foi visto que o rendimento de óleo essencial foi de 0,43%, menor que o rendimento utilizando as partes aéreas rasuradas. Este evento pode ser explicado pela preservação da ruptura dos tricomas glandulares pelo método de rasurar o material vegetal no momento da hidrodestilação.

A hidrodestilação conduzida com as partes aéreas secas de *M. pulegium* apresentou um rendimento de $2,24 \pm 0,21\%$ para o óleo essencial. Este rendimento foi semelhante ao encontrado em outro estudo utilizando *M. pulegium* coletado no Norte do Marrocos (partes aéreas secas a temperatura ambiente por duas semanas, em hidrodestilação por 2 h com rendimento de 1,8%) (CHERRAT et al., 2014). Em um estudo conduzido com material vegetal cultivado em casa de vegetação (com vaso e terra) demonstrou que a produção de pulegona, assim como os tricomas, foi estimulada em resposta ao estresse provocado pela menor oferta hídrica e intensidade da luz (BENLARBI et al., 2014); em outro estudo, a espécie *M. pulegium* procedente do Egito foi avaliada em cultivo hidropônico sob irrigação por gotejamento, originando um rendimento de 0,19% de óleo essencial contendo 88,05% de pulegona e 5,75% de isomentona (AZIZ; CRAKER, 2009). É importante ressaltar que o

rendimento obtido de óleo essencial originado em canteiro hidropônico vertical no presente estudo foi superior ao observado em literaturas com a mesma espécie obtida pelo cultivo convencional (solo) e pelos relatos de cultivo hidropônico. Este evento pode ser explicado pelo local em que a espécie foi cultivada, devido a variações na incidência de luz e salinidade. A espécie *M. pulegium* cultivada em locais com aumento de salinidade na água como no Egito, por exemplo, promove um rendimento menor de óleo essencial, fazendo com que países como esse adquiram o óleo essencial por importação (AZIZ; CRAKER, 2009). O óleo essencial extraído da espécie coletada em Cabo Verde originou um rendimento de 0,3%, enquanto que a espécie coletada em Portugal apresentou 0,6% de rendimento de óleo essencial (ROCHA et al., 2015). Cabe destacar que influências externas, como solo, clima, altitude, nutrientes, ataque de insetos herbívoros, podem acarretar em alteração da produção do óleo essencial, na qualidade, no que refere-se aos fitoconstituintes presentes no OE como na quantidade de obtenção, seu rendimento em relação à quantidade de planta utilizada (PRINS; VIEIRA; FREITAS, 2010). Desta forma, um cultivo controlado pode auxiliar na constância do OE e viabilizar seu uso industrial.

Considerando a disponibilidade de material vegetal, a espécie *M. pulegium* foi selecionada para a avaliação dos seus componentes voláteis, visto que o material vegetal foi originado de um cultivo não-convencional. A eleição desta espécie no presente estudo também está apoiada pela observação por análise prévia por *HS-CG-EM*, realizada pelo nosso grupo de pesquisa, da presença de elevada concentração do fitoconstituente pulegona em seu óleo essencial, composto que tem apresentado em estudos anteriores seu potencial sobre o controle de insetos. Outro fator importante para sua escolha, é que existem publicações robustas sobre o emprego da pulegona e do óleo essencial de *M. pulegium* contra insetos, sendo útil como comparativo de atividade perante os outros óleos essenciais investigados neste estudo.

A resina coletada do tronco da árvore de *C. nitida* foi escolhida para investigação, devido a existirem relatos etnobotânicos sobre o emprego de resinas como incenso em cerimônias religiosas em tribos africanas, com o objetivo de atrair bons espíritos, proteção espiritual e como repelente de insetos. Neste âmbito, encontram-se também as resinas das espécies *Commiphora myrrha* (mirra) e *Boswellia thurifera* (olíbano), as quais desempenham funções similares de uso popular (IZZO; LODI; VÁZQUEZ DE ÁGREDOS PASCUAL, 2021). Além disso, a resina de *C. nitida* não apresenta publicações referentes à composição da

fração volátil, tampouco qualquer resultado em atividade biológica desta fração. A partir do extrato resinoso concentrado de *C. nitida* foi possível obter o rendimento de $5,89 \pm 1,63\%$ de óleo essencial, sendo que não existem informações prévias referente ao rendimento deste material vegetal para realizar comparação de informações.

Os óleos essenciais são encontrados nos tricomas glandulares (tecidos secretores localizados na superfície de órgãos vegetais, principalmente nas flores e folhas) e outras estruturas secretórias (SHARIFI-RAD et al., 2017). Um estudo publicado em 2016 mostrou imagens histológicas da espécie *D. ambrosioides*, onde os tricomas glandulares encontram-se nas faces abaxial e adaxial da folha, além de estarem nos galhos e pecíolos (SÁ et al., 2016). Na espécie *M. pulegium*, o óleo essencial também é encontrado nos tricomas glandulares, nas faces abaxial e adaxial das folhas (BENLARBI et al., 2014). Os óleos essenciais podem ser extraídos também de oleoresinas, como no caso da *C. nitida*, especialmente em espécies de *Pinus* e coníferas (AWADH ALI et al., 2008; CIESLA, 2009). A produção da oleoresina é estimulada quando o tronco da árvore sofre injúria provocada pelo ataque de insetos, os quais são repelidos (CIESLA, 2009).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A análise dos fitoconstituintes presentes nos óleos essenciais de *D. ambrosioides*-cultivo em solo, *M. pulegium* e *C. nitida* foi realizada por CG-EM com comparação com a biblioteca NIST e literatura especializada.

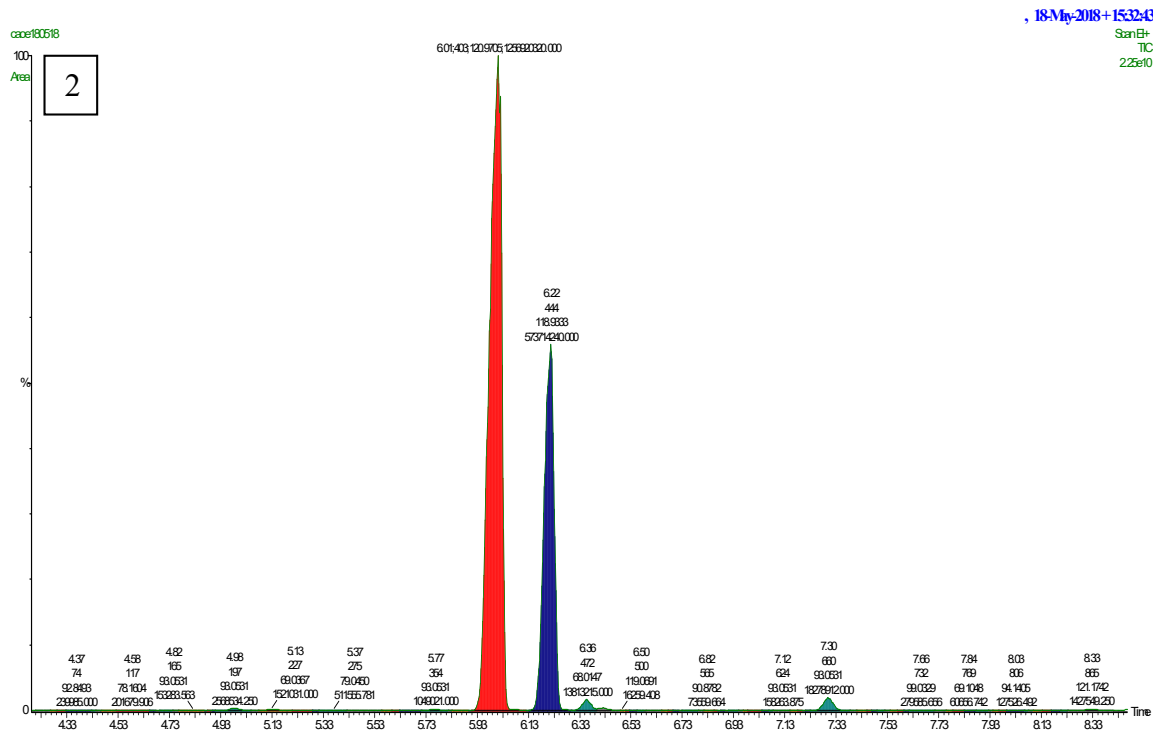
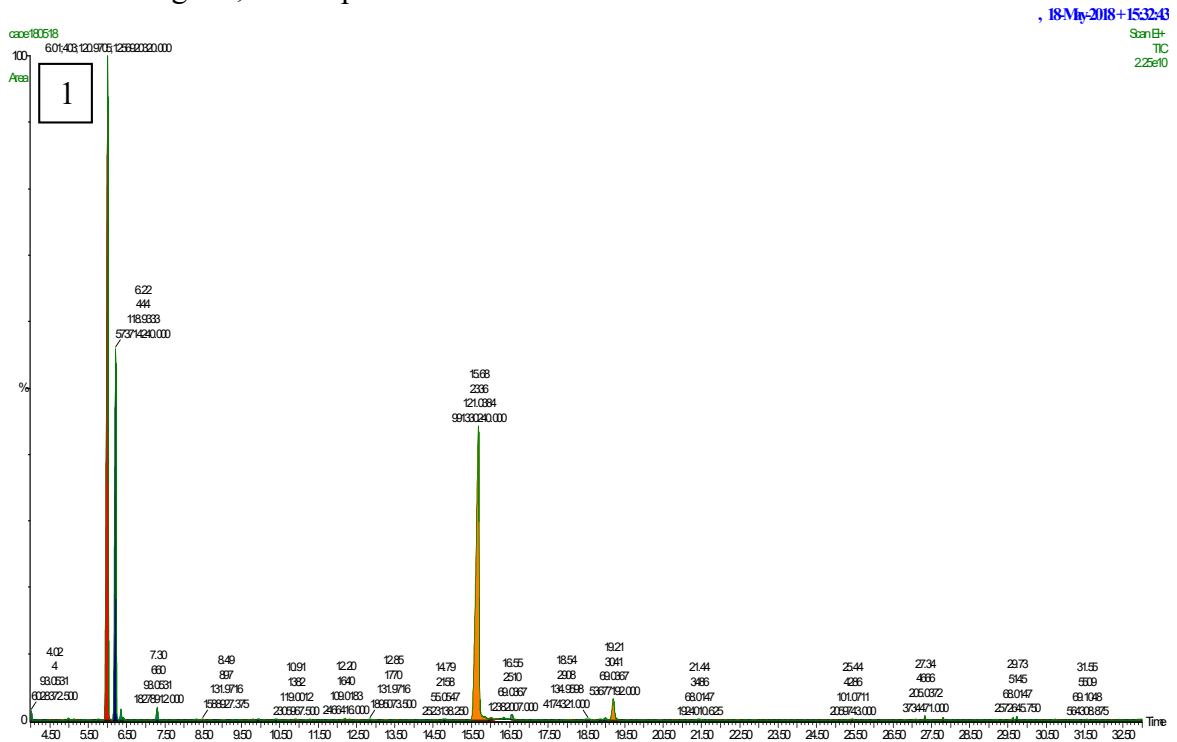
Os óleos essenciais, assim como os hidrolatos, podem ser analisados para a identificação dos seus compostos voláteis através da técnica em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). A técnica hifenada com espectrometria de massas (EM) é relativamente recente e demonstra-se como uma técnica mais robusta para a identificação de compostos desconhecidos, sendo antes usada a técnica hifenada com ionização por chama (mais conhecido pelo nome em inglês- *FID*, *flame ionization detector*). A principal diferença entre EM e FID é que, no primeiro caso, os compostos são identificados através do respectivo espectro de massas, o qual pode ser comparado a uma biblioteca espectral onde os fragmentos são comparados aos espectros previamente identificados, sendo que o espectro representa como uma impressão digital de cada composto. Já na técnica por FID, a amostra é preparada com uma série homóloga de n-alcenos, e os compostos são

identificados comparando o tempo de retenção dos mesmos ao tempo de retenção do alceno anterior e posterior ao tempo de retenção, e a posição identificada (expressa como índice de Kovatz, KI, quando aplicado com análise isotérmica, indicada para compostos isolados ou como índice de retenção, utilizando o método cromatográfico eleito para análise de óleos essenciais ou amostras complexas) é comparada com referências conhecidas. O compêndio mais conhecido é do autor Robert Adams (ADAMS, 2007), sendo utilizada a série homóloga de n-alcenos como uma ferramenta adicional para auxiliar na identificação de um composto desconhecido, podendo ser empregada em análises também por EM. No entanto, neste estudo não ocorreu coincidência entre os índices de retenção, conforme esperado, como pode ser visualizado nas tabelas de identificação dos respectivos óleos essenciais e hidrolatos; sendo assim, priorizou-se a identificação dos compostos baseando-se no perfil de fragmentação das massas pelo espectro obtido de cada composto, comparando os dados à biblioteca NIST e pela literatura (ADAMS, 2007).

Para as análises por CG-EM ou CG-FID a amostra pode ser injetada através da injeção manual ou automática. Em ambos os casos é necessária a adição de um solvente, geralmente orgânico, lipossolúvel.

Como pode ser observado na Figura 25, o óleo essencial de *D. ambrosioides*- cultivo em solo (DaSOE) revelou a presença de seis componentes voláteis, sendo evidenciado como majoritários os terpenos α -terpineno (**5**, Tr= 6,01 min, Figura 26, 43,4%), *p*-cimeno (**6**, Tr= 6,22 min, Figura 27, 19,81%) e terpinoleno (**13**, Tr= 15,68 min, Figura 28, 34,3%) (Tabela 3). A composição encontrada no DaSOE foi similar à composição química do óleo essencial da variedade *ambrosioides* encontrada em países como China e Brasil (CHU; FENG HU; LIU, 2011). A espécie *D. ambrosioides* var. *antihelminthicum* é rica em ascaridol, diferente da espécie *D. ambrosioides* var. *ambrosioides* (AIT SIDI BRAHIM et al., 2015; KASALI et al., 2006) presente em países como Marrocos e também no Brasil. Na amostra analisada foi encontrada apenas 1,85% de ascaridol (**7**, Figura 29). As estruturas químicas dos principais compostos identificados no óleo essencial de *D. ambrosioides*- cultivo em solo estão ilustradas na Figura 30 – α -terpineno (**5**), *p*-cimeno (**6**), γ -terpineno (**12**), terpinoleno (**13**), ascaridol (**7**) e enoato de 2-metilbutil-2-octila (**14**).

Figura 25. Cromatograma do óleo essencial de *D. ambrosioides*-cultivo em solo, obtido por CG-EM. 1. geral; 2-4. expandido



Continuação. Figura 25. Cromatograma do óleo essencial de *D. ambrosioides*-cultivo em solo, obtido por CG-EM.1. geral; 2-4. expandido

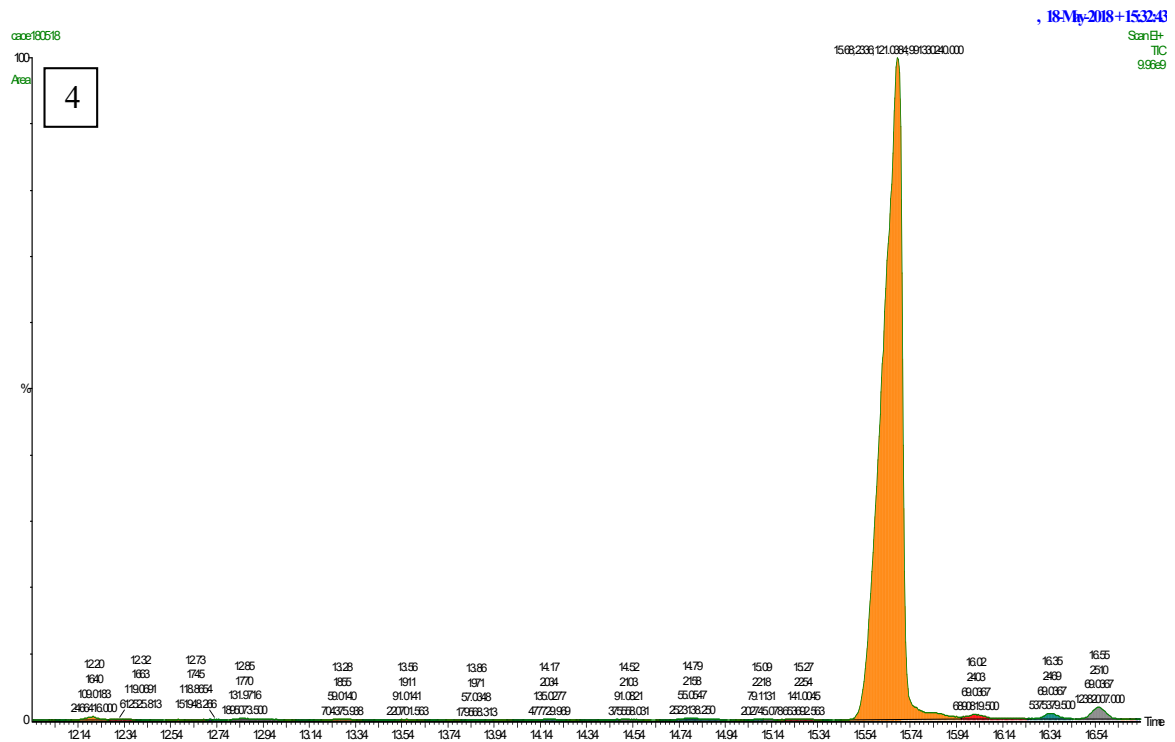
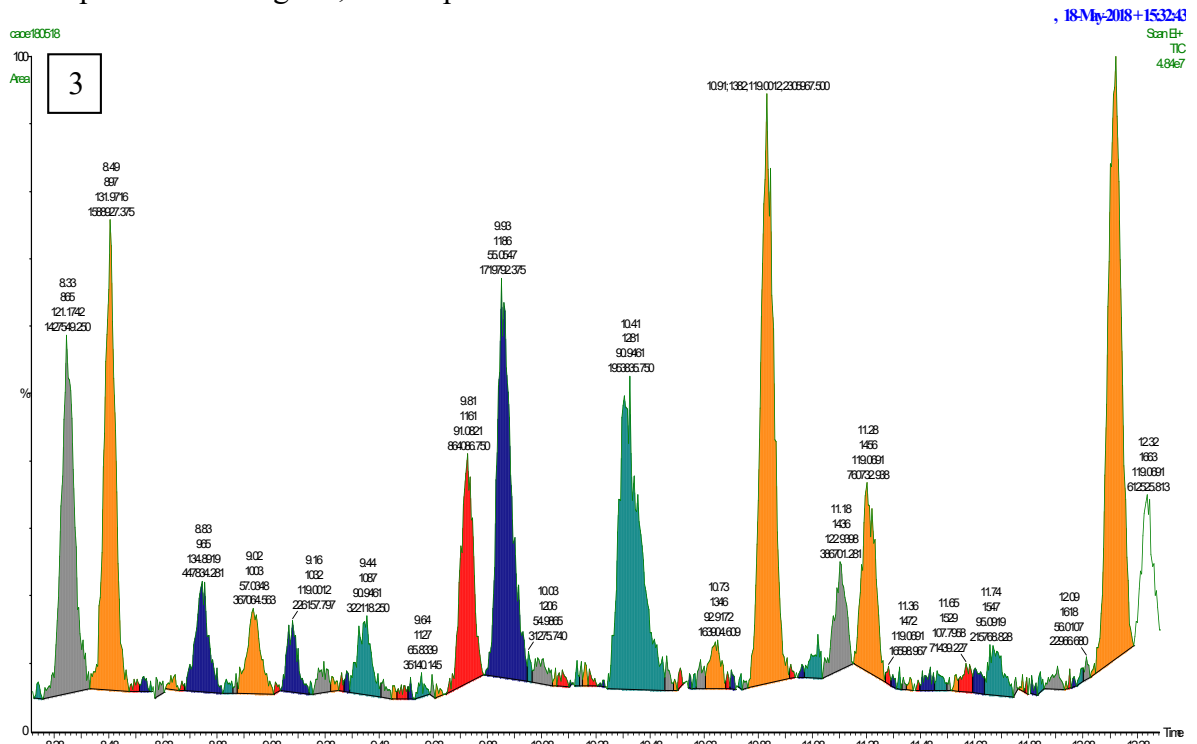
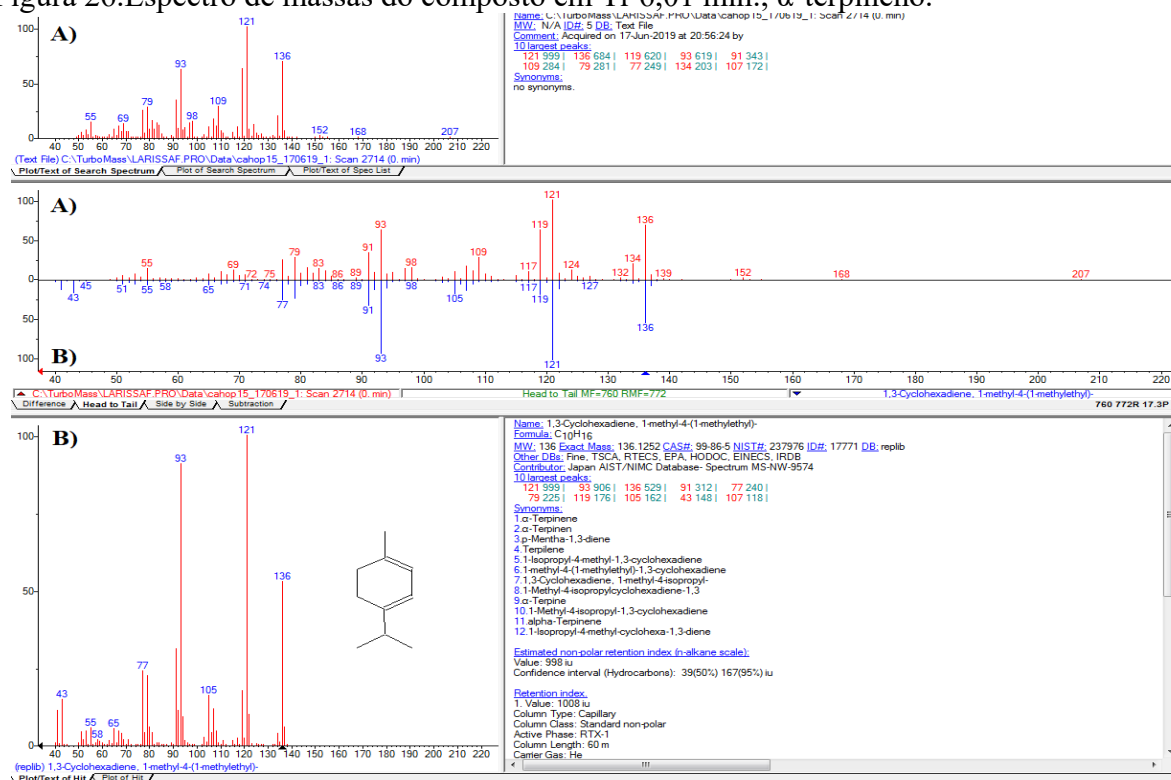


Tabela 3. Compostos identificados no óleo essencial de *D. ambrosioides*- cultivo em solo.

IR- TM	IR	Tr (min)	Composto identificado	<i>m/z</i> Experimental	DaSOE%
403	1125	6,01	α -terpineno	135,9867	43,40
444	1135	6,22	<i>p</i> -cimeno	134,0090	19,81
660	1186	7,30	γ -terpineno	136,0389	0,63
2336	1709	15,68	Terpinoleno	136,0465	34,32
3041	1999	19,21	Ascaridol	168,0369	1,85
4760	1954	27,81	Enoato de 2-metilbutil-2- octila	212,2235	0,09
% compostos identificados					100,00
% monoterpenos - hidrocarbonetos					98,16
% monoterpenos oxigenados					1,90
% sesquiterpenos - hidrocarbonetos					-
% sesquiterpenos oxigenados					-

IR- TM = índice de retenção para coluna elite 5-ms calculado pelo *software* TurboMass®; IR: Índice de retenção calculado pela fórmula de índice de retenção, utilizando a série homóloga de *n*-alcanos; Tr = Tempo de retenção (min); *m/z* = relação massa/carga do fragmento abundante; porcentagem em área relativa de DaSOE = óleo essencial de *D. ambrosioides* solo.

Figura 26. Espectro de massas do composto em Tr 6,01 min., α -terpineno.

A) Espectro de massas do composto identificado α -terpineno; **B)** Espectro de massas e identificação da biblioteca NIST.

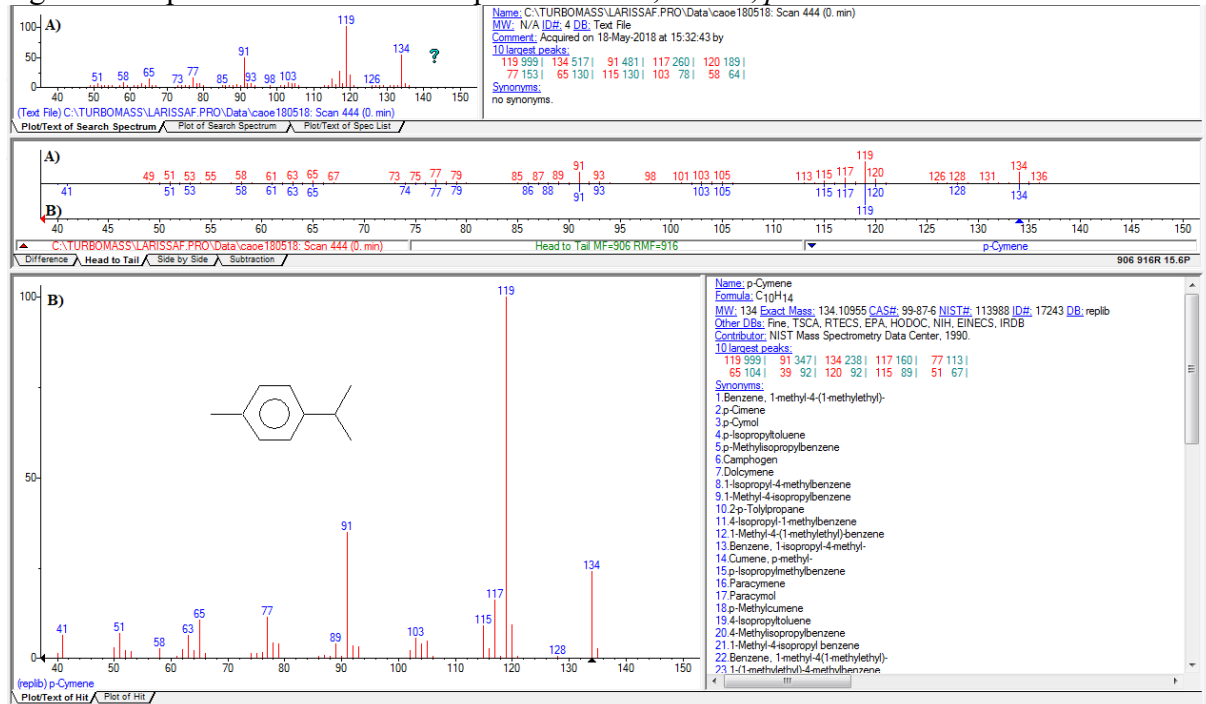
Figura 27. Espectro de massa do composto em Tr 6,22 min, *p*-cimeno.

Figura 28. Espectro de massa do composto em Tr 15,68 min, terpinoleno.

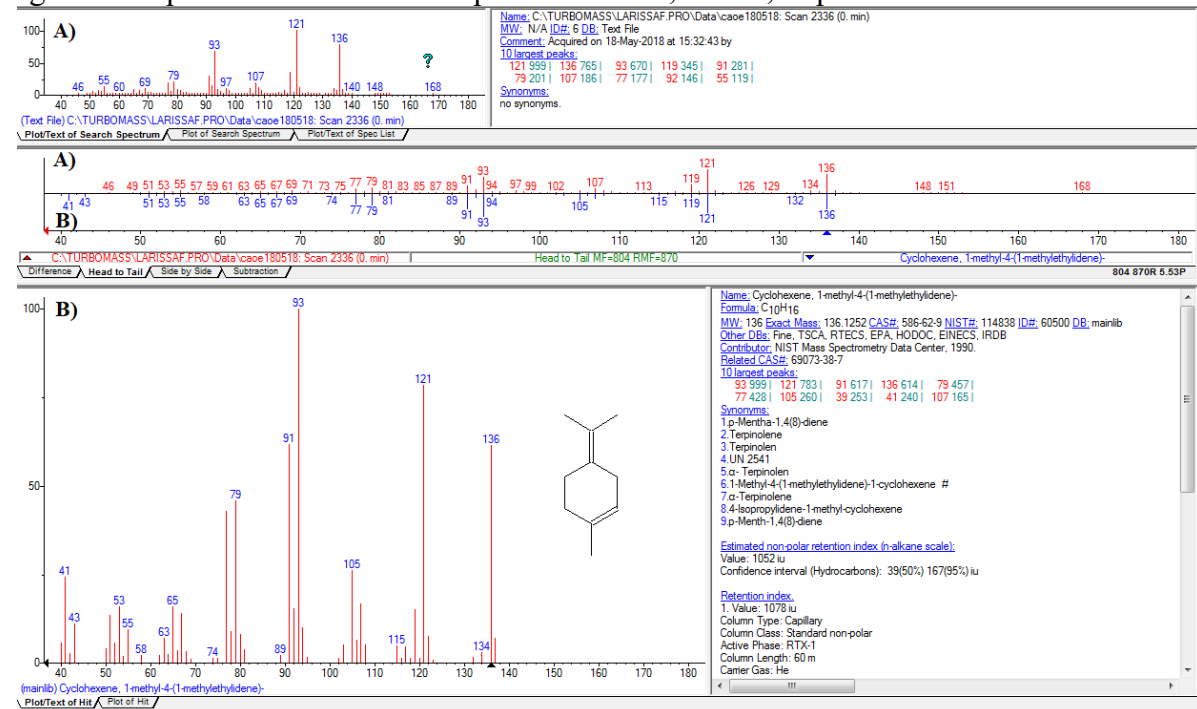
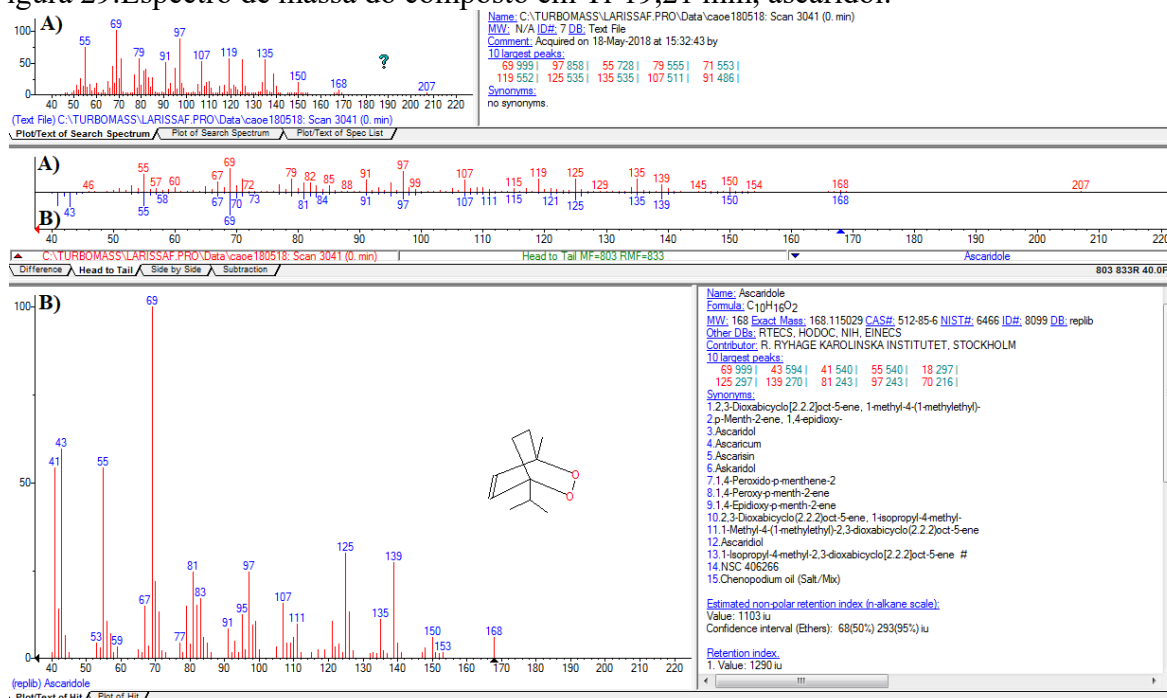
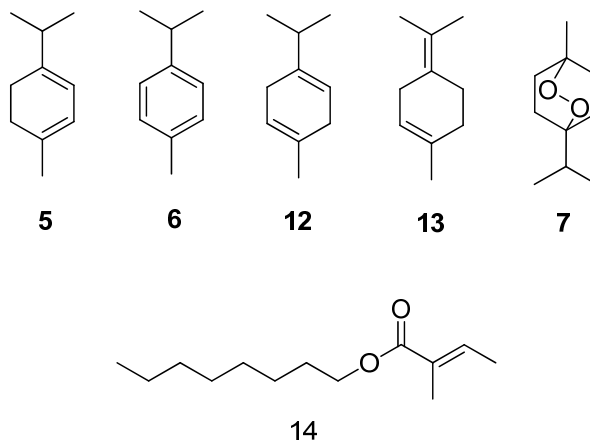


Figura 29. Espectro de massa do composto em Tr 19,21 min, ascaridol.



A) Espectro de massas do composto identificado ascaridol; B) Espectro de massas e identificação da biblioteca NIST.

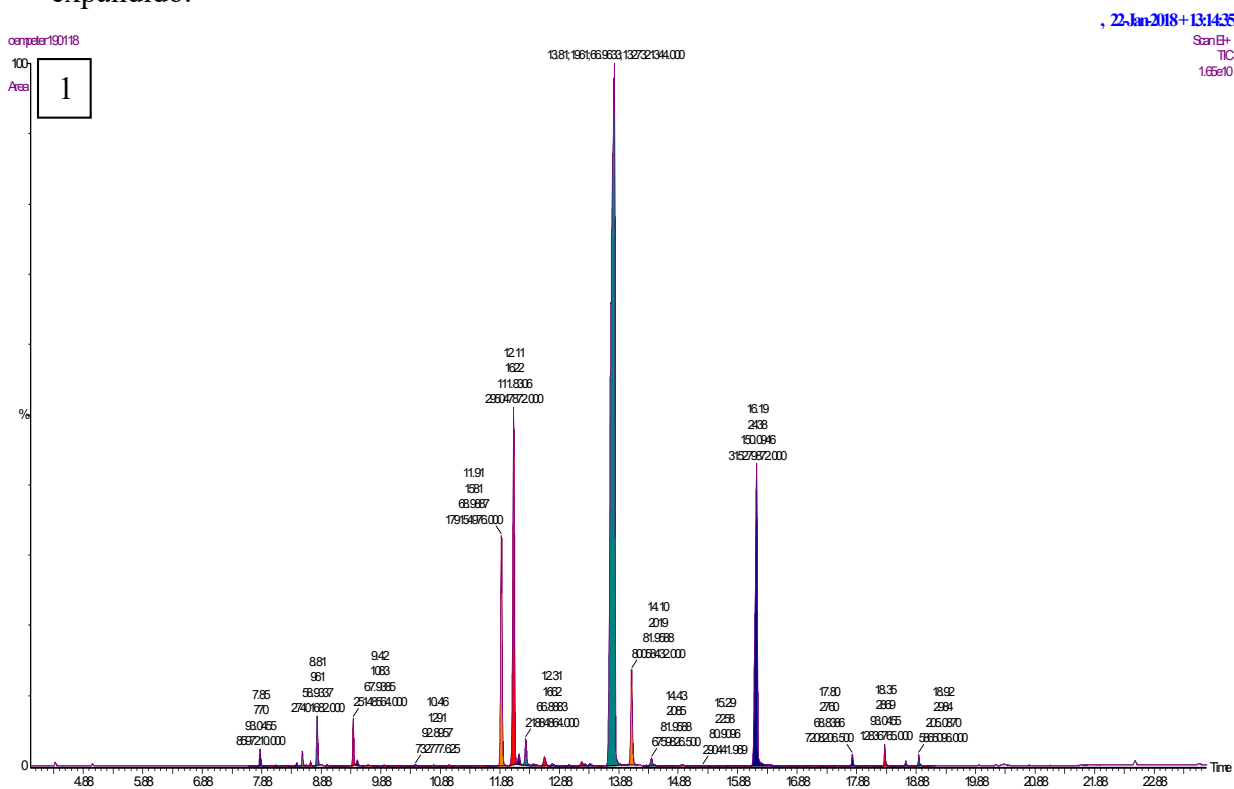
Figura 30. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no óleo essencial de *D. ambrosioides*- cultivo em solo.



α -terpineno, *p*-cimeno, γ -terpineno, terpinoleno, ascaridol e enoato de 2-metilbutil-2-octila, respectivamente.

O óleo essencial obtido a partir das partes aéreas de *M. pulegium* revelou a presença de 26 compostos dos quais 20 substâncias foram identificadas através da comparação com dados fornecidos pela biblioteca NIST em comparação com o respectivo espectro de massa coletado (Figura 31). A partir do cálculo da área sob a curva dos picos identificados evidenciou-se a presença de isomentona (Tr= 12,11 min, Figura 32, 12,56%), pulegona (Tr= 13,81 min, Figura 33, 56,5%) e verbenona (Tr= 16,19 min, Figura 34, 13,42%) como os terpenos majoritários (Tabela 4).

Figura 31. Cromatograma do óleo essencial de *M. pulegium* obtido por CG-EM.1. geral. 2-3. expandido.



Continuação. Figura 31. Cromatograma do óleo essencial de *M. pulegium* obtido por CG-EM.1. geral. 2-3. expandido.

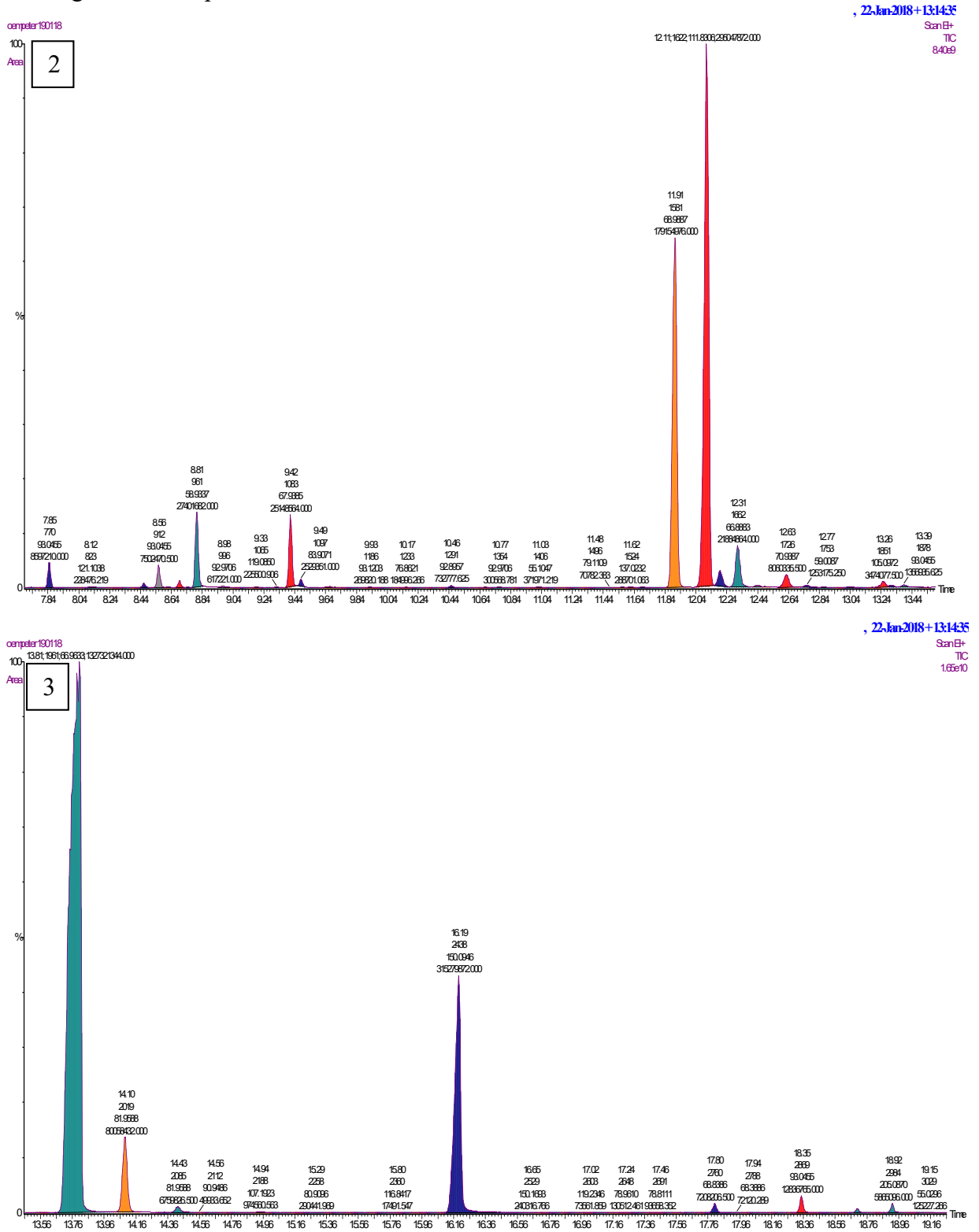
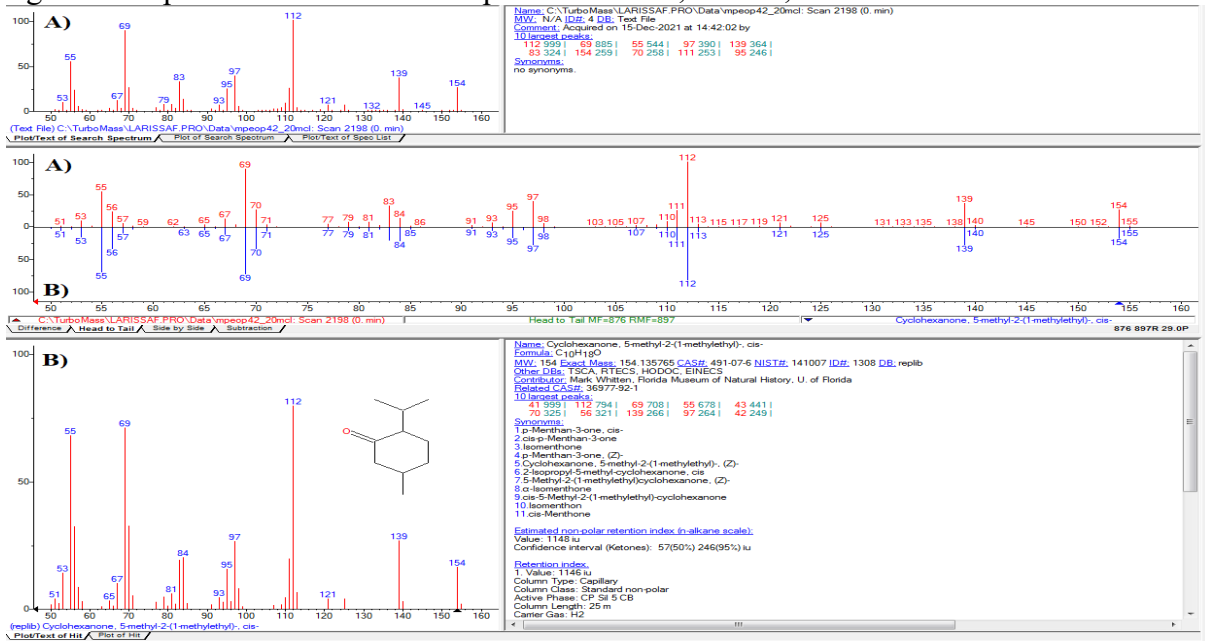


Tabela 4. Compostos identificados no óleo essencial de *M. pulegium*.

IR-TM	IR	Tr (min)	Composto identificado	<i>m/z</i> Experimental	MpOE%
770	1219	7,85	α -pineno	136,0901	0,37
893	1265	8,47	β -pineno	136,1022	0,06
912	1271	8,56	β -pineno - isômero	136,1011	0,32
939	1282	8,70	β -mirceno	136,0127	0,10
961	1290	8,81	3-Octanol	129,1119	1,17
1083	1320	9,42	L-limoneno	136,1220	1,07
1097	1323	9,49	Eucaliptol	154,1486	0,11
1581	1440	11,91	Isomentona	154,1889	7,62
1622	1452	12,11	Isomentona	154,1897	12,56
1640	1458	12,20	Isomentol	156,2689	0,34
1662	1465	12,31	Isopulegona	152,1529	0,93
1726	1485	12,63	Levomentol	156,2919	0,34
1753	1494	12,77	n.i.	154,1121	0,05
1851	1528	13,26	n.i.	148,1123	0,15
1961	1567	13,81	Pulegona	152,1185	56,49
2019	1588	14,10	Piperitona	152,1722	3,41
2085	1612	14,43	(-)-carvona	150,1305	0,29
2188	1651	14,94	n.i.	179,2236	0,04
2258	1678	15,29	(-)-cis-carano	138,2618	0,01
2438	1751	16,19	Verbenona	150,1147	13,42
2760	1888	17,80	Isocariofileno	204,1644	0,31
2869	1938	18,35	Humuleno	204,1312	0,55
2940	1971	18,70	β -copaeno	204,0889	0,11
3185	1995	19,93	n.i.	207,0114	0,02
3243	1994	20,22	n.i.	207,0387	0,02
3269	1993	20,35	n.i.	207,0097	0,09
			% compostos identificados		99,63
			% monoterpenos - hidrocarbonetos		1,93
			% monoterpenos oxigenados		82,09
			% sesquiterpenos - hidrocarbonetos		0,97
			% sesquiterpenos oxigenados		-

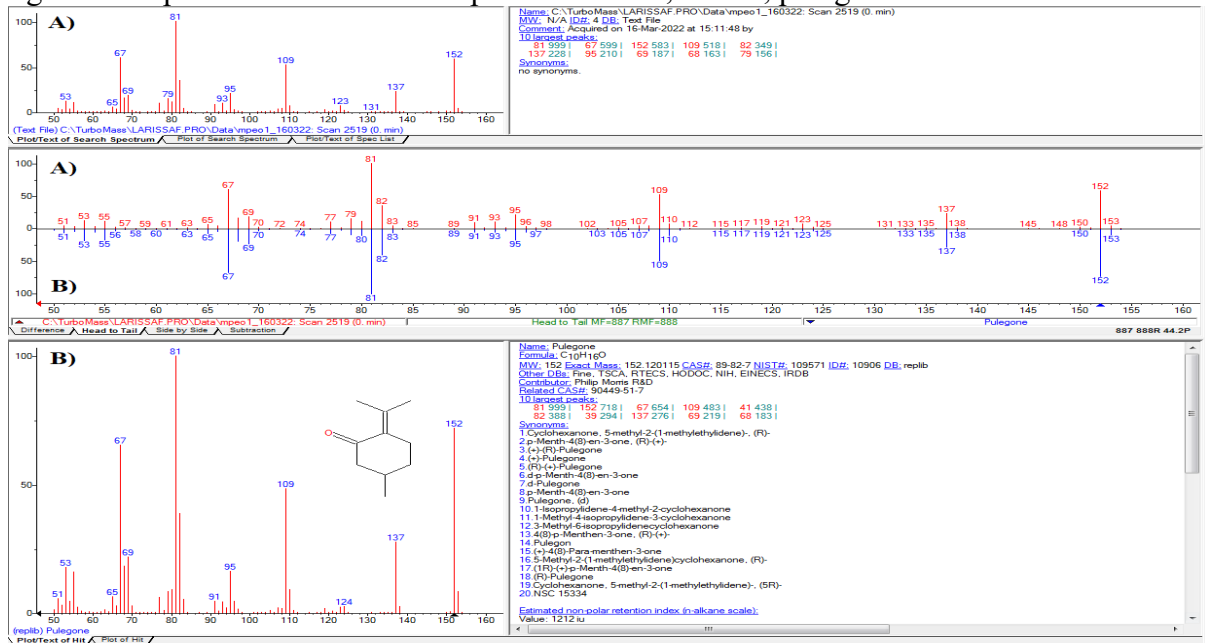
IR- TM = índice de retenção para coluna elite 5-ms calculado pelo *software* TurboMass®; IR: Índice de retenção calculado pela fórmula de índice de retenção pelo método descrito por Adams, 2007, utilizando a série homóloga de n-alcenos; Tr = Tempo de retenção (min); *m/z* = relação massa/carga do fragmento abundante; porcentagem em área relativa de MpOE = óleo essencial de *M. pulegium*; N.i. não identificado.

Figura 32. Espectro de massas do composto em Tr 12,11 min., isomentona.



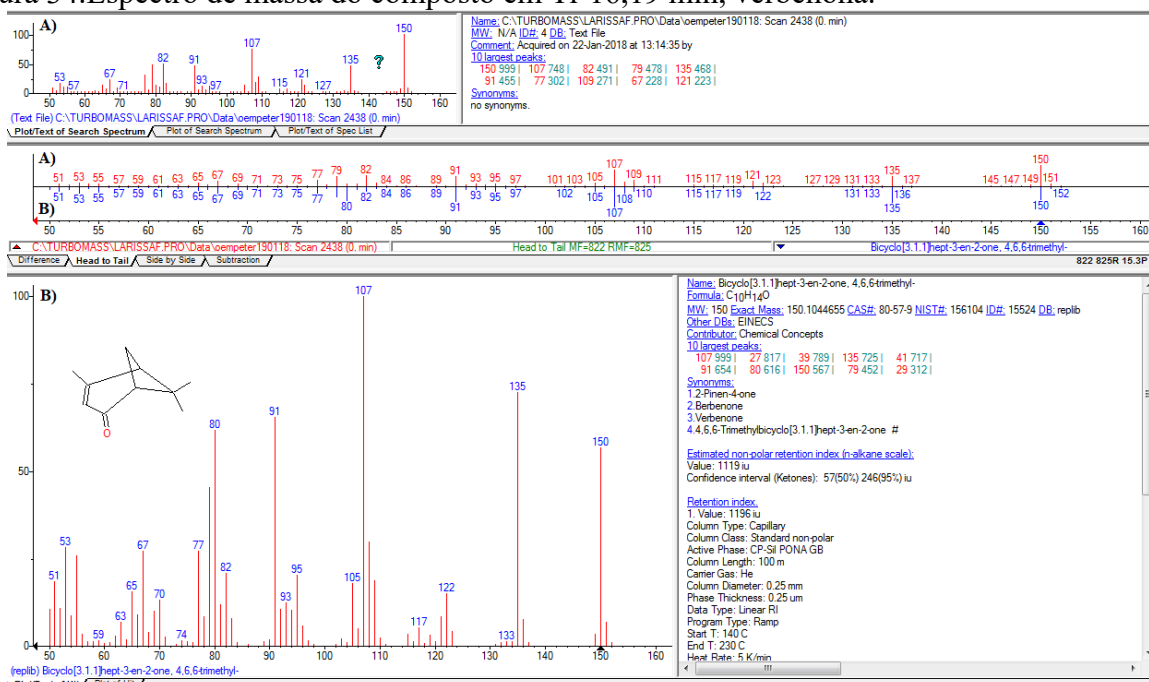
A) Espectro de massas do composto identificado isomentona; **B)** Espectro de massas e identificação da biblioteca NIST.

Figura 33. Espectro de massa do composto em Tr 13,81 min, pulegona.



A) Espectro de massas do composto identificado pulegona; **B)** Espectro de massas e identificação da biblioteca NIST.

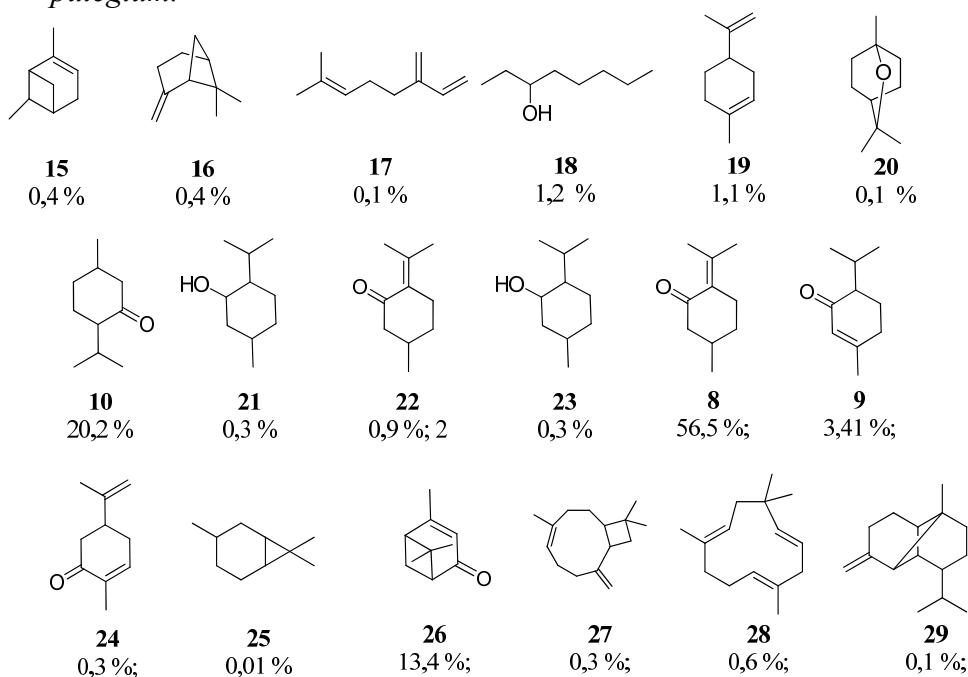
Figura 34. Espectro de massa do composto em Tr 16,19 min, verbenona.



A) Espectro de massas do composto identificado verbenona; **B)** Espectro de massas e identificação da biblioteca NIST.

A identificação dos compostos em maior teor foi realizada a partir da comparação dos dados obtidos com a biblioteca NIST e com o perfil de fragmentação de cada composto com a literatura de referência (ADAMS, 2007), sendo identificados isomentona (**10**, Tr= 11,91 min, com *match* de 935 e *match* reverso de 950), um isômero de isomentona (**10**, Tr= 12,11 min, com *match* de 930 e *match* reverso de 945, Figura 32), pulegona (**8**, Tr=13,81 min, com *match* de 907 e *match* reverso de 908, Figura 33) e a piperitenona (**3**, Tr= 14,10 min, com *match* de 784 e *match* reverso de 813). Além destes compostos, foram identificadas as substâncias α -pineno (**15**), β -pineno (**16**), β -mirceno (**17**), 3-octanol (**18**), L-limoneno (**19**), eucaliptol (**20**), isomentol (**21**), isopulegona (**22**), levomentol (**23**), (-)-carvona (**24**), *cis*-carano (**25**), verbenona (**26**), isocariofileno (**27**), humuleno (**28**) e β -copaeno (**29**), conforme ilustrado na Figura 35.

Figura 35. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no óleo essencial de *M. pulegium*.



α -pineno, β -pineno, β -mirceno, 3-octanol, L-limoneno, eucaliptol, isomentona, isomentol, isopulegona, levomentol, pulegona, piperitenona, (-)-carvona, *cis*-carano, verbenona, isocariofileno, humuleno e β -copaeno, respectivamente.

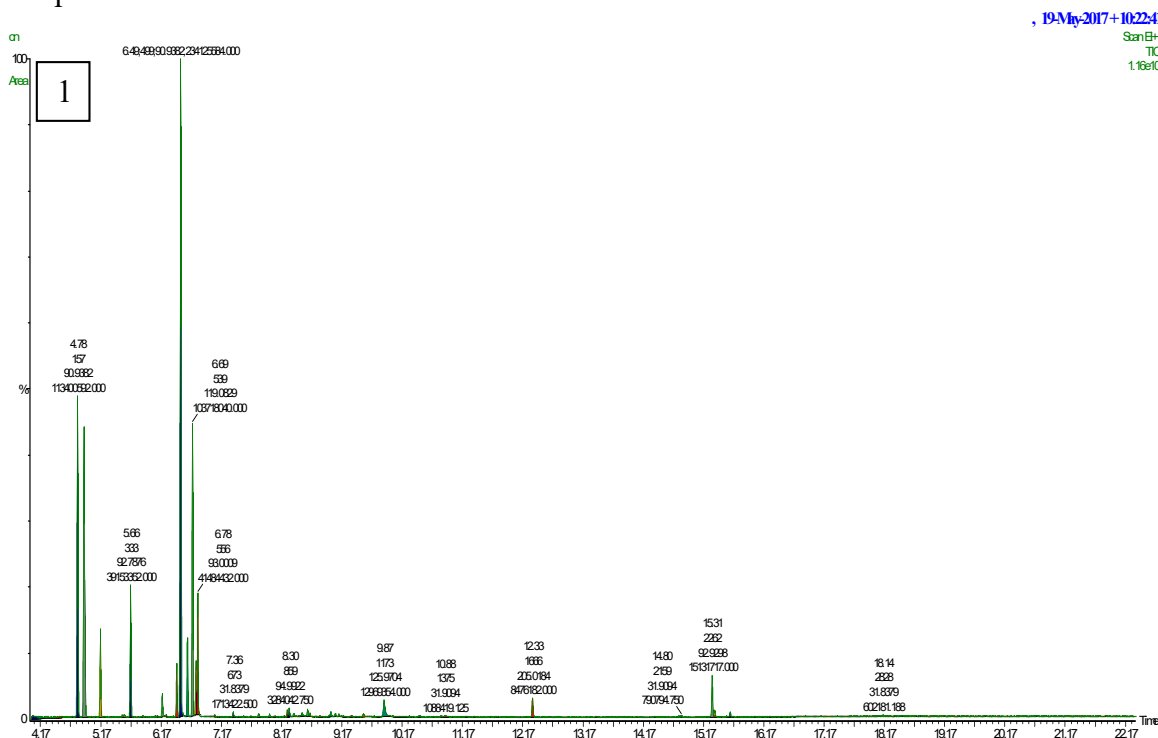
Em um estudo conduzido em Portugal, comparou-se a composição do óleo essencial de *M. pulegium* coletada em duas diferentes regiões, apresentando diferenças relevantes na composição das substâncias majoritárias: 30,4% de mentol, 15,3% de mentona e 14,7% de acetato de mentila para a espécie coletada em Cabo Verde e 61,4% de pulegona e 20,1% de mentona para a planta coletada em Portugal (ROCHA et al., 2015).

A análise cromatográfica do óleo essencial de *C. nitida* (Figura 36) apresentou como terpenos majoritários α -felandreno (**33**, 45,8%) e *p*-cimeno (**6**, 20,3%) (Tabela 5). A identificação foi realizada confrontando os dados obtidos pela biblioteca NIST e comparando o perfil de fragmentação com dados da literatura (ADAMS, 2007), resultando em 10 compostos identificados. A identificação de α -felandreno (**33**, Tr= 6,49 min, Figura 37) apresentou *match* de 889 e *match* reverso de 893, enquanto *p*-cimeno (**6**, Tr= 6,69 min, Figura 38) apresentou *match* de 902 e *match* reverso de 910. As estruturas dos principais compostos

identificados no óleo essencial de *C. nitida* encontram-se na Figura 39, apresentando os compostos minoritários ciclofencheno (**30**), β -terpineno (**31**), *p*-ment-3-eno (**32**), (+)-4-careno (**34**), D-silvestreno (**35**), β -felandreno (**36**), 2-hidroxicineol (**37**) e α -tujeno (**38**).

Realizando um levantamento em bases de dados científicos com relação aos óleos essenciais extraídos de espécies de *Cola* pode-se constatar ausência de dados que pudessem contribuir para a correlação aos resultados apresentados no presente estudo para a Cola nítida. Considerando que esta espécie vegetal pertence à família Malvaceae, em um trabalho publicado em 2009 foi investigado a composição química volátil de espécies coletadas na Amazônia, incluindo *Gossypium hirsutum* L., no qual as flores apresentaram 21,4% de α -pineno e 11,1% de β -cariofileno (MAIA; ANDRADE, 2009). Na espécie *Malva sylvestris*, as folhas e flores contêm eugenol (46,7% e 10,3%, respectivamente) (CECOTTI et al., 2016). Comparando estes dados com a composição encontrada no óleo volátil de *C. nitida* no presente estudo, foi possível observar que não houve similaridades na composição química, sendo um assunto em potencial para investigações futuras.

Figura 36. Cromatograma do óleo essencial de *C. nitida* obtido por CG-EM.1. geral; 2. expandido.



Continuação. Figura 36. Cromatograma do óleo essencial de *C. nitida* obtido por CG-EM.1. geral; 2. expandido.

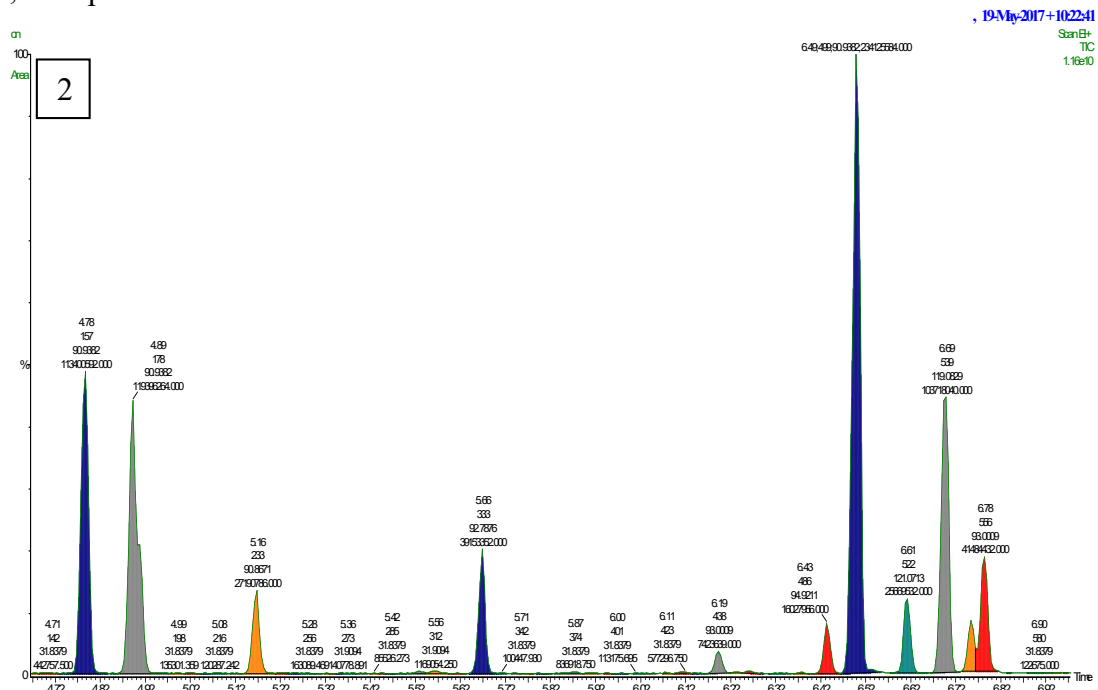
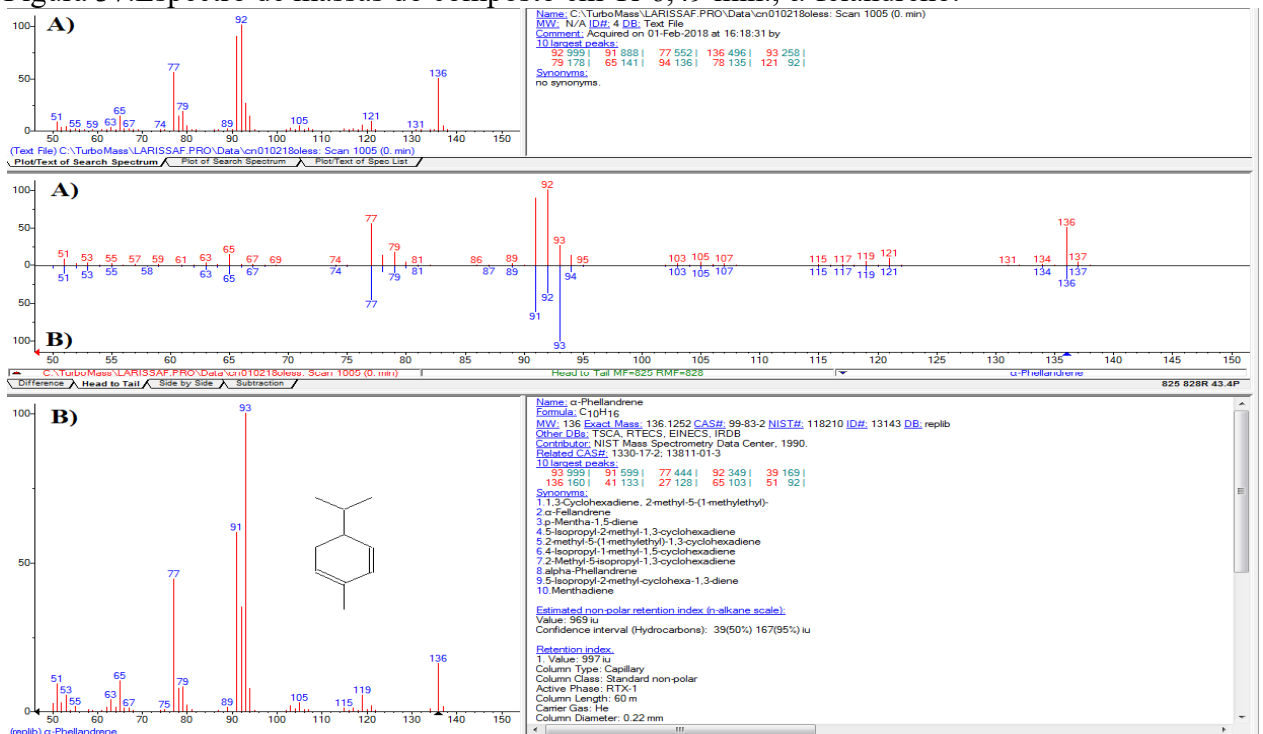
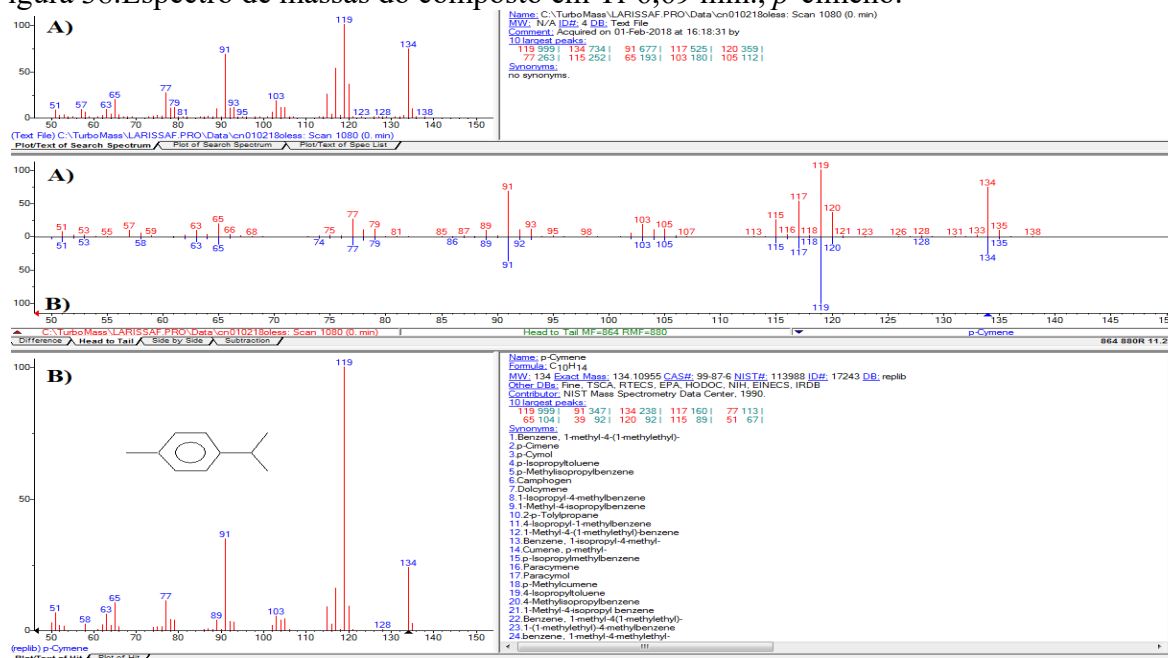


Figura 37. Espectro de massas do composto em Tr 6,49 min., α -felandreno.



A) Espectro de massas do composto identificado α -felandreno; B) Espectro de massas e identificação da biblioteca NIST.

Figura 38. Espectro de massas do composto em Tr 6,69 min., *p*-cimeno.

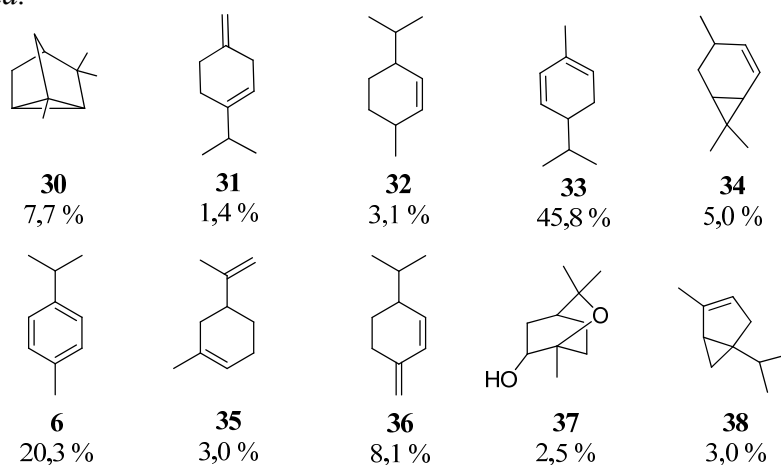
A) Espectro de massas do composto identificado *p*-cimeno; B) Espectro de massas e identificação da biblioteca NIST.

Tabela 5. Principais compostos identificados no óleo essencial de *C. nitida*.

IR-TM	IR	Tr (min)	Composto identificado	<i>m/z</i> Experimental	CnOE%
333	1109	5,66	Ciclofencheno	135,9902	7,67
438	1134	6,19	β -terpineno	136,0510	1,45
486	1145	6,43	<i>p</i> -ment-3-eno	137,9998	3,14
499	1148	6,49	α -felandreno	136,0053	45,84
522	1154	6,61	(+) -4-careno	135,9549	5,02
539	1158	6,69	<i>p</i> -cimeno	134,0083	20,31
550	1160	6,75	D-silvestreno	135,9714	2,95
556	1162	6,78	β -felandreno	136,0081	8,12
1173	1339	9,87	2-Hidroxicineol	170,1528	2,54
2262	1681	15,31	α -tujeno	136,0392	2,96
			% compostos identificados		100,00
			% monoterpénos - hidrocarbonetos		97,46
			% monoterpénos oxigenados		2,54
			% sesquiterpénos - hidrocarbonetos		-
			% sesquiterpénos oxigenados		-

IR- TM = índice de retenção para coluna elite 5-ms calculado pelo *software* TurboMass®; IR: Índice de retenção calculado pela fórmula de índice de retenção pelo método descrito por Adams, 2007, utilizando a série homóloga de *n*-alcanos; Tr = Tempo de retenção (min); *m/z* = relação massa/carga do fragmento abundante; porcentagem em área relativa referente ao óleo essencial de *C. nitida*. N.i. não identificado.

Figura 39. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no óleo essencial de *C. nitida*.



Ciclofencheno, β -terpineno, *p*-ment-3-eno, α -felandreno, (+)-4-careno, *p*-cimeno, D-silvestreno, β -felandreno, 2-hidroxicineol e α -tujeno, respectivamente.

No intuito de identificar a composição química do subproduto resultante do processo de hidrodestilação de cada espécie vegetal investigada, o hidrolato, advindo da extração do óleo essencial, foi submetido à concentração sob pressão reduzida para a obtenção do resíduo aquoso o qual foi avaliado por CG-EM. O hidrolato da hidrodestilação com *D. ambrosioides* – cultivado em solo não forneceu um cromatograma conclusivo e adequado para a identificação dos compostos, desta forma não foi apresentado no presente trabalho.

A análise do hidrolato de *M. pulegium* revelou a presença de 9 compostos, os quais todos foram identificados (Figura 40) (Tabela 6), com a presença majoritária da pulegona (**8**, Tr = 13,60, 58,59%) e verbenona (**26**, Tr= 16,01, 27,72%), e dos compostos minoritários *p*-mentona (**39**), D-isomentona (**10**), isomentol (**21**), isopulegona (**22**), óxido de L-pulegona (**40**) e piperitona (**9**) (Figura 41). Em uma comparação com a composição do óleo essencial, foi observado que há a presença de mais monoterpênos oxigenados identificados no hidrolato do que no óleo essencial (100% e 82,1%, respectivamente), porém com teores semelhantes de pulegona. A composição majoritária do hidrolato mostrou-se diferente quando comparado à literatura; Petrakis et al. (2014) encontrou 97,9% de piperitona no hidrolato extraído por hidrodestilação (PETRAKIS et al., 2015), enquanto que neste estudo foram encontrados 58,6% de pulegona e 27,7% de verbenona.

Figura 40. Cromatograma do hidrolato de *M. pulegium* obtido por CG-EM.1. geral. 2. Expandido.

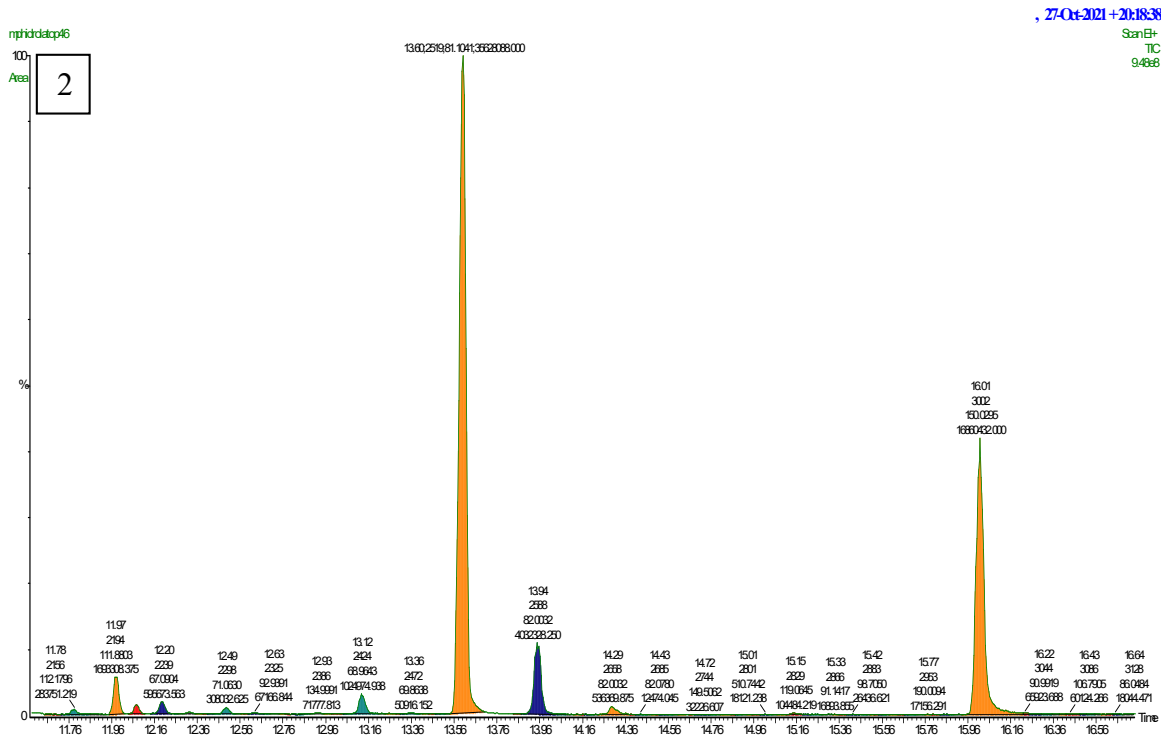
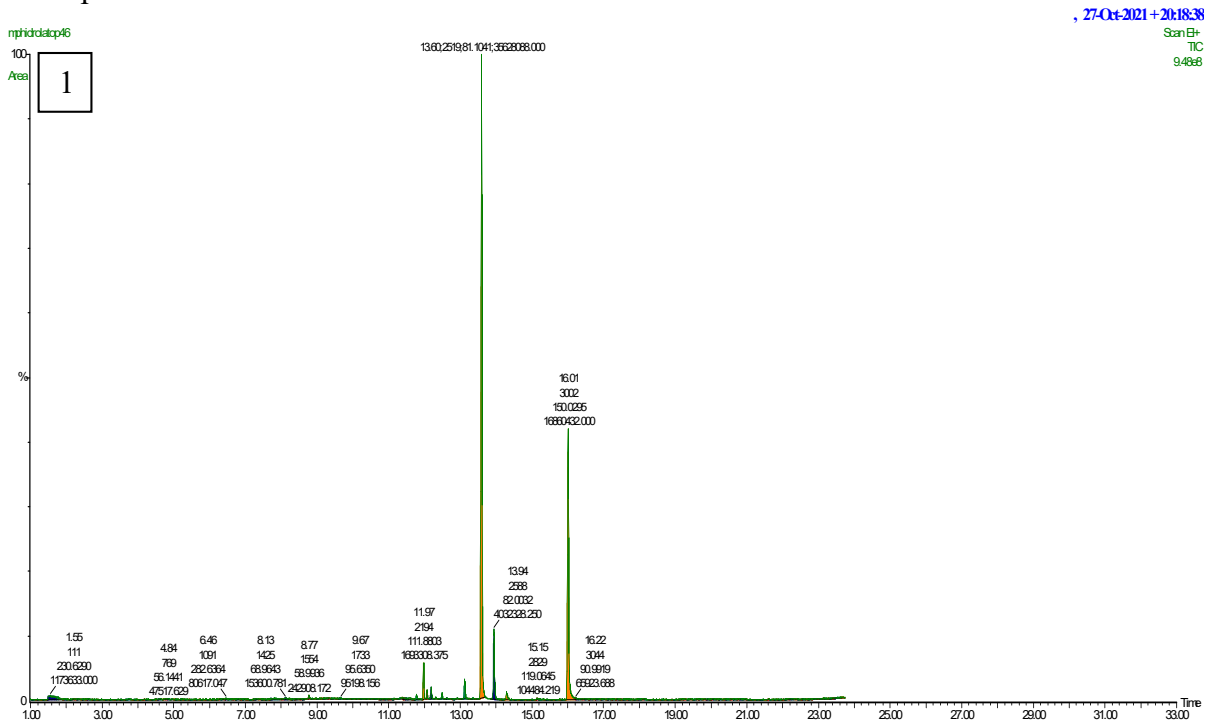
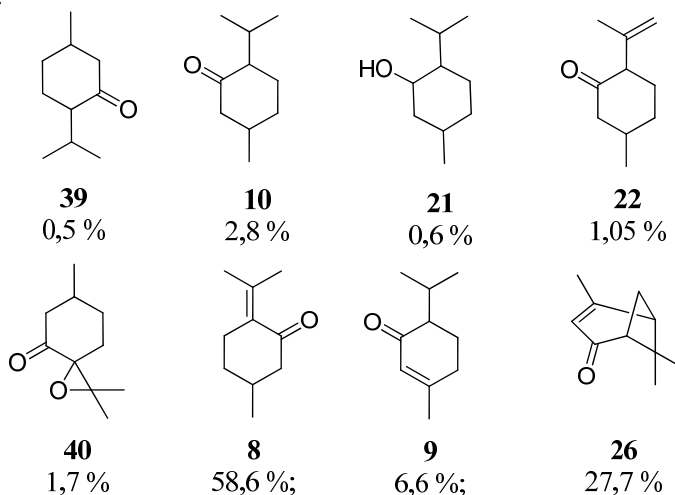


Tabela 6. Compostos identificados no hidrolato de *M. pulegium*.

IR-TM	IR	Tr (min)	Composto identificado	<i>m/z</i> experimental	(%)
2156	1431	11,78	<i>p</i> -mentona	154,1981	0,47
2194	1443	11,97	D-isomentona	154,1689	2,78
2214	1450	12,07	Isomentol	156,4245	0,64
2239	1458	12,20	Isopulegona	152,1945	0,98
2298	1477	12,49	Isomentol	156,9190	0,51
2424	1518	13,12	Óxido de <i>trans</i> -pulegona	168,2665	1,68
2519	1552	13,60	Pulegona	152,1818	58,59
2588	1576	13,94	Piperitona	152,2217	6,63
3002	1736	16,01	Verbenona	150,1424	27,72
% compostos identificados					100,00
% monoterpenos - hidrocarbonetos					-
% monoterpenos oxigenados					100,00
% sesquiterpenos - hidrocarbonetos					-
% sesquiterpenos oxigenados					-

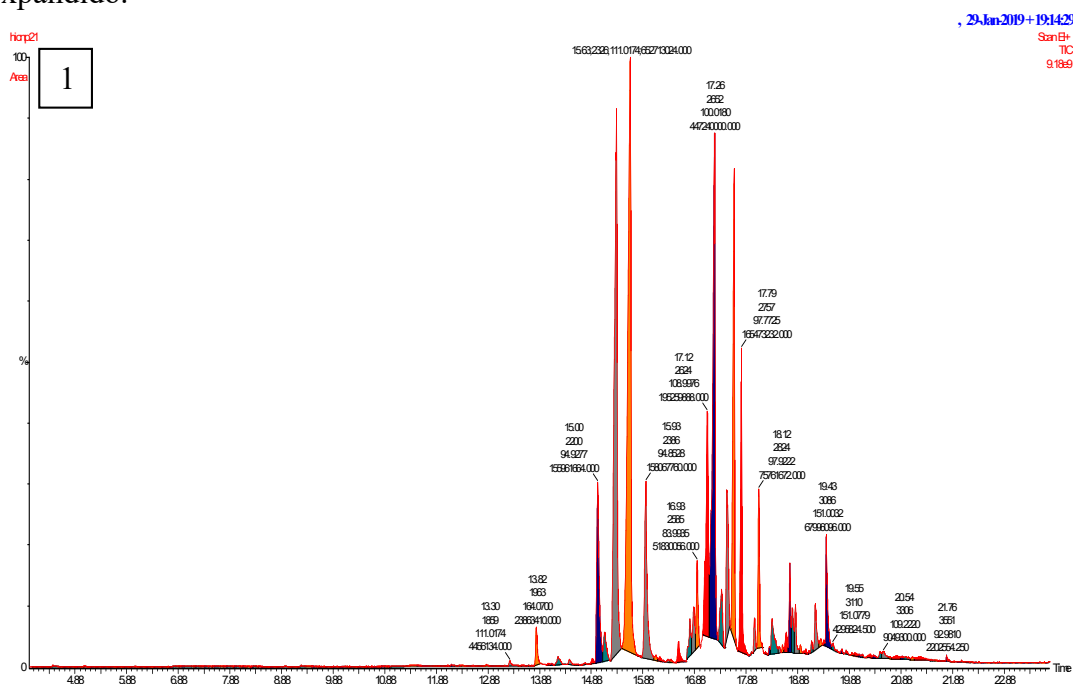
IR- TM = índice de retenção para coluna elite 5-ms calculado pelo *software* TurboMass®; IR: Índice de retenção calculado pela fórmula de índice de retenção pelo método descrito por Adams, 2007, utilizando a série homóloga de *n*-alcanos; Tr = Tempo de retenção (min); *m/z* = relação massa/carga do fragmento abundante; % = porcentagem em área relativa.

Figura 41. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no hidrolato de *M. pulegium*.

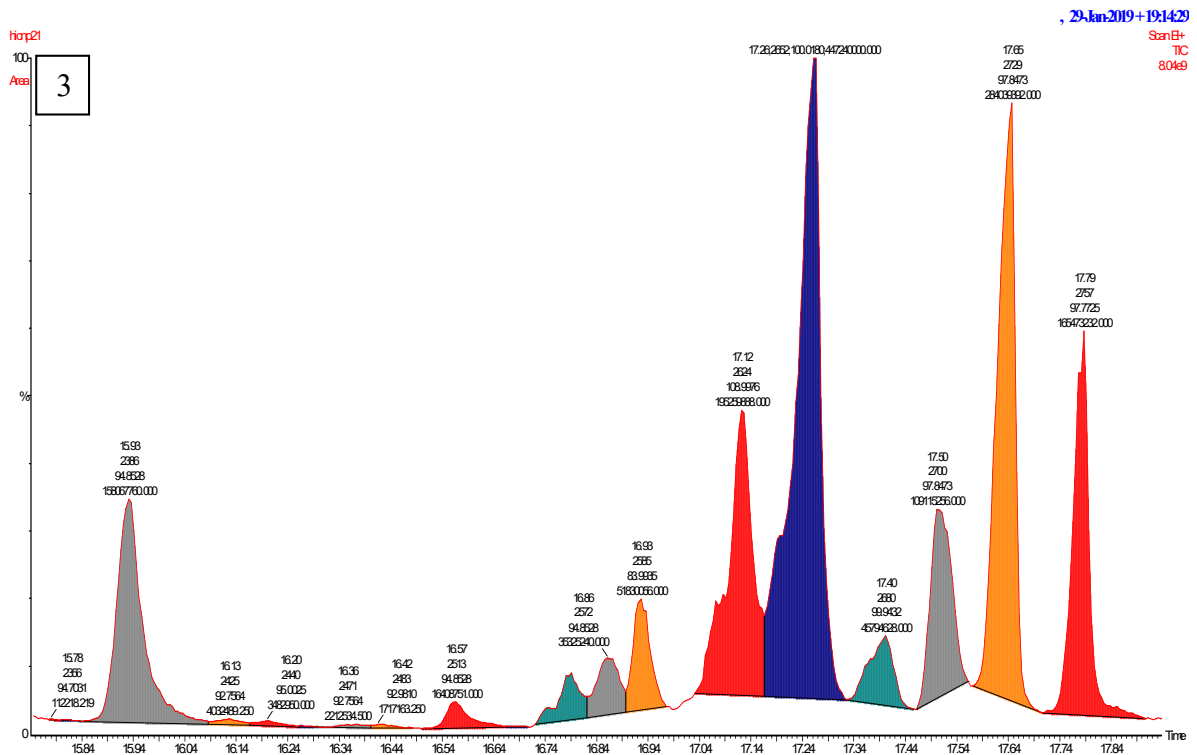
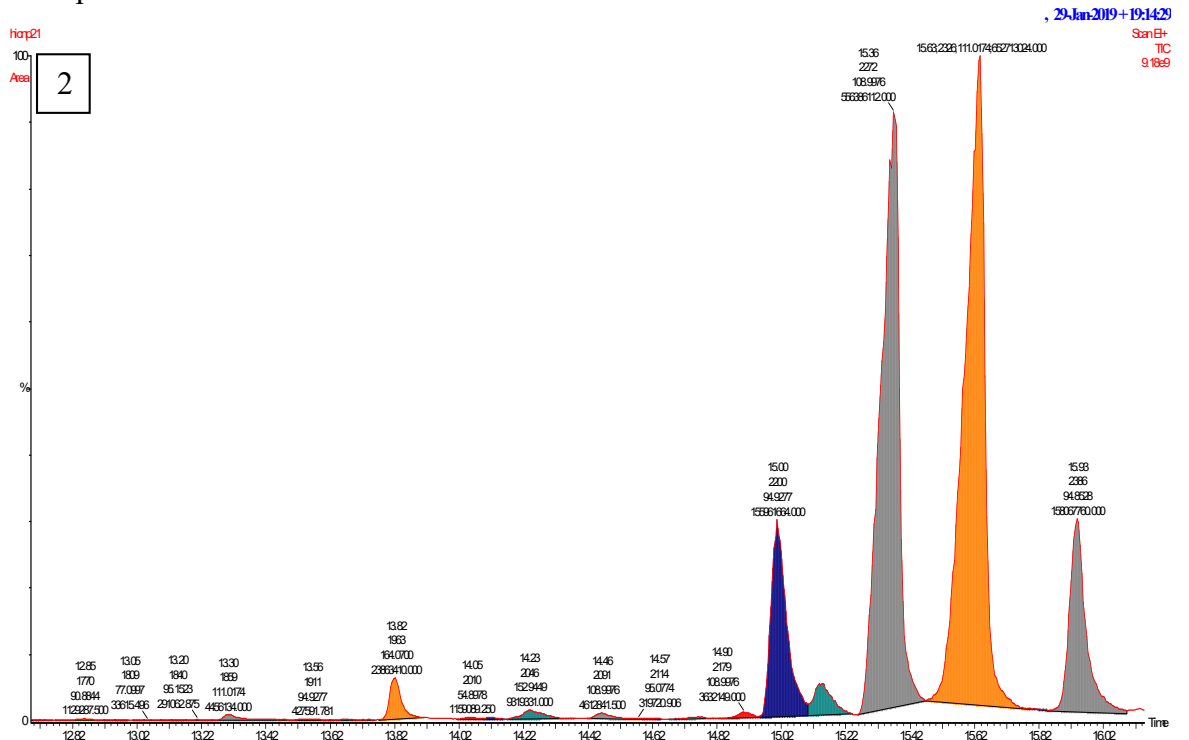
p-mentona, D-isomentona, isomentol, isopulegona, óxido de L-pulegona, pulegona, piperitona e verbenona, respectivamente.

O hidrolato obtido da hidrodestilação da espécie vegetal *C. nitida*, apresentou o rendimento de 0,11% após a secagem por rotaevaporador sob pressão reduzida. Através da análise da amostra por CG-EM foi possível obter o cromatograma (Figura 42), sendo 2-hidroxicineol (**37**, 21,4%) o composto majoritário e trans-2-carene-4-ol (**43**, 18,2%) e 2,3-bornanediol (**48**, 14,6%) como os compostos secundários, além das substâncias minoritárias: timoquinona (**41**), endo-borneol (**42**), 2,3-pinanediol (**44**), *p*-mentano-1,2,3-triol (**45**), *cis*-piperitol (**46**), *cis*-carveol (**47**), 2,3-bornanediol (**48**), 3-metil-4,7-dioxo-oct-2-enal (**49**), 2-(3-oxobutil)-ciclohexanona (**50**), *trans*-2-ciclohexen-1-ona (**51**), 6-(3-hidroxi-but-1-enil)-1,5,5-trimetil-7-oxabicyclo [4.1.0] heptan-2-ol (**52**) e 6-metil-5-(1-metiletil)-5-hepten-3-in-2-ol (**53**) (Tabela 7). A presença de substâncias hidroxiladas são as responsáveis pela solubilidade destes compostos na fração aquosa. Foram identificados 16 compostos, os quais estão ilustrados na Figura 43, sendo possível observar diferenças com relação aos fitoconstituintes majoritários presentes no OE em relação ao hidrolato, com a presença majoritária de compostos mais polares no hidrolato. Não foram encontrados relatos de outras espécies da família Malvaceae ou do gênero *Cola* relacionando estes compostos voláteis ao potencial contra insetos.

Figura 42. Cromatograma do hidrolato de *C. nitida*, obtido por CG-EM. 1. geral. 2-4. Expandido.



Continuação. Figura 42. Cromatograma do hidrolato de *C. nitida*, obtido por CG-EM.1. geral. 2-4. Expandido.



Continuação. Figura 42. Cromatograma do hidrolato de *C. nitida*, obtido por CG-EM.1. geral. 2-4. Expandido.

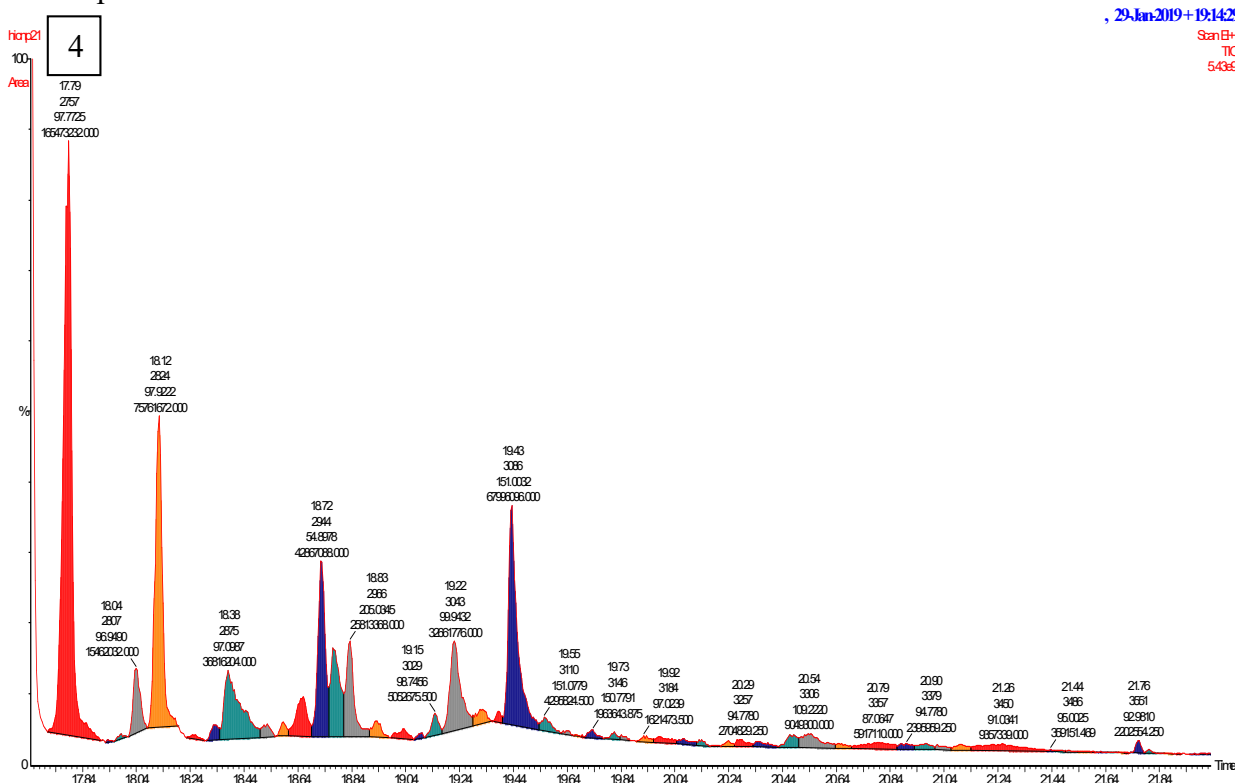


Tabela 7. Compostos identificados no hidrolato de *C. nitida*.

IR-TM	IR	Tr (min)	Composto identificado	<i>m/z</i> experimental	CnH(%)
1963	1568	13,82	Timoquinona	164,0700	0,78
2200	1656	15,00	Endo-borneol	154,3312	5,11
2272	1684	15,36	<i>Trans</i> -2-Caren-4-ol	151,9831	18,22
2326	1705	15,63	2-Hidroxicineol	170,0404	21,37
2386	1730	15,93	2,3-Pinandediol	170,1055	5,18
2513	1782	16,57	<i>p</i> -mentano-1,2,3-triol	189,4301	0,53
2557	1801	16,79	<i>Cis</i> -piperitol	153,1173	0,91
2585	1813	16,93	<i>Cis</i> -carveol	152,0115	1,70
2624	1829	17,12	<i>Cis</i> -carveol	152,0511	6,40
2652	1841	17,26	2,3-Bornandediol	170,0495	14,64
2700	1862	17,50	3-metil-4,7-dioxo-oct-2-enal	168,0785	3,57
2729	1875	17,65	2-(-3-oxobutil) - ciclohexanona	168,0585	9,30

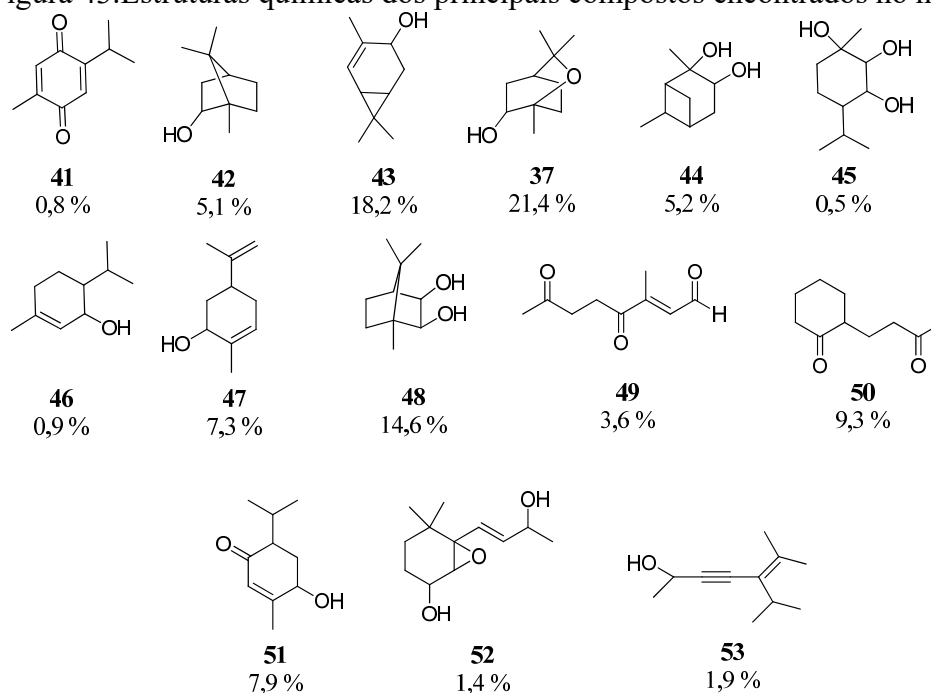
IR- TM = índice de retenção para coluna elite 5-ms calculado pelo *software* TurboMass®; IR: Índice de retenção calculado pela fórmula de índice de retenção pelo método descrito por Adams, 2007, utilizando a série homóloga de *n*-alcanos; Tr = Tempo de retenção (min); *m/z* = relação massa/carga do fragmento abundante; porcentagem em área relativa de CnH = hidrolato de *C. nitida*.; n.i. = não identificado.

Continuação. Tabela 7. Compostos identificados no hidrolato de *C. nitida*.

IR-TM	IR	Tr (min)	Composto identificado	<i>m/z</i> experimental	CnH(%)
2757	1888	17,79	4-hidroxi-3-metil-6-(1-metiletil), trans-2-ciclohexen-1-ona	168,0837	5,42
2824	1917	18,12	4-hidroxi-3-metil-6-(1-metiletil), trans-2-ciclohexen-1-ona (isômero)	168,0576	2,48
2944	1972	18,72	6-(-3-hidroxi-but-1-enil)-1,5,5- trimetil-7-oxabicyclo [4.1.0] heptan- 2-ol	212,6062	1,40
3043	1999	19,22	n.i.	206,9448	1,07
3086	1998	19,43	6-metil-5-(1-metiletil)-5-hepten-3- in-2-ol	166,0856	1,91
			% compostos identificados		98,93
			% monoterpenos - hidrocarbonetos		-
			% monoterpenos oxigenados		95,62
			% sesquiterpenos - hidrocarbonetos		-
			% sesquiterpenos oxigenados		-

IR- TM = índice de retenção para coluna elite 5-ms calculado pelo *software* TurboMass®; IR: Índice de retenção calculado pela fórmula de índice de retenção pelo método descrito por Adams, 2007, utilizando a série homóloga de n-alcanos; Tr = Tempo de retenção (min); *m/z* = relação massa/carga do fragmento abundante; porcentagem em área relativa de CnH = hidrolato de *C. nitida*.; n.i. = não identificado.

Figura 43. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no hidrolato de *C. nitida*.



Timoquinona, endo-borneol, *trans*-2-carenoil, 2-hidroxicineol, 2,3-pinanediol, *p*-mentano-1,2,3-triol, *cis*-piperitol, *cis*-carveol, 2,3-bornanediol, 3-metil-4,7-dioxo-oct-2-enal, 2-(3-oxobutil)-ciclohexanona, 4-hidroxi-3-metil-6-(1-metiletil), *trans*-2-ciclohexen-1-ona, 6-(3-hidroxi-but-1-enil)-1,5,5-trimetil-7-oxabicyclo [4.1.0]heptan-2-ol, 6-metil-5-(1-metiletil)-5-hepten-3-in-2-ol, respectivamente.

5.2.1 Cultivo hidropônico de *D. ambrosioides*

Com o intuito de padronizar o material vegetal de *D. ambrosioides* a ser utilizado no desenvolvimento futuro de um produto comercial realizou-se o cultivo em hidroponia visando avaliar a influência do manejo do material vegetal na composição química, cultivo em solo versus cultivo hidropônico. Esta espécie vegetal foi eleita para investigação pelo potencial já demonstrado, uma vez que já existe um produto comercial desenvolvido pelo laboratório Bayer® com o nome de Requiem EC25®; porém este produto é composto somente pelos terpenos majoritários (α -terpineno e *p*-cimeno) presentes na espécie *D. ambrosioides* var. *ambrosioides*, associados ao D- e L-limoneno (os quais aumentam o espectro de atividade) obtidos por síntese química, veiculados em emulsão e indicados pelo fabricante para aplicação

como pesticida contra insetos, ácaros, nematódeos e fitopatógenos (WACHENDORFF-NEUMANN; DAHMEN; HELL-WEGE, 2014).

O estudo de obtenção do óleo essencial pelo cultivo hidropônico representa uma proposta de alternativa sustentável, comparada à obtenção por síntese. Outro aspecto que foi considerado foi sobre a obtenção de maior concentração de ascaridol, visto que este monoterpeno apresenta um vasto histórico em potencial inseticida (ALMADIY, 2020; BENELLI et al., 2020; BOSSOU et al., 2013; CHU; FENG HU; LIU, 2011; HARRAZ et al., 2015).

O emprego do cultivo hidropônico tem aumentado para a obtenção de plantas medicinais, no intuito de otimizar as condições de cultivo para obter maior rendimento de material vegetal padronizado em um sistema controlado. A hidroponia pode ser considerada uma cultura sustentável, devido ao uso racional de água e nutrientes, os quais são constantemente reciclados, além de não necessitar de uso de pesticidas, na maioria dos casos. Este sistema de plantio pode ser reproduzido em escala industrial, visto que não necessita de extensa área de plantação comparado ao plantio convencional. Na biotecnologia, a hidroponia tem servido como fonte de produção de metabólitos secundários e macromoléculas, como proteínas (MOON et al., 2020). No entanto, fatores ambientais como temperatura, qualidade do solo, altitude, umidade do ar, ou a outros fatores como estágio de crescimento da planta e uso de fertilizantes pode interferir na variabilidade da composição dos metabólitos produzidos, em particular os óleos essenciais, os quais podem alterar características como odor e atividade biológica.

Em setembro de 2019, durante o período de investigação sobre o melhor método de cultivo hidropônico, houve a oportunidade de participar de uma escola de verão em Los Baños – Filipinas, na instituição SEARCA (*Southeast Asian Regional Center for Graduate Study and Research in Agriculture*) promovida pelo Centro de Segurança Alimentar da Universidade de Hohenheim – Alemanha, direcionada a alunos de doutorado residentes na Ásia, África e América do Sul. Esta oportunidade mostrou como o tema hidroponia está alcançando relevância em países desenvolvidos, visando à padronização e otimização do cultivo, e estão sendo implantados em países com escassez de recursos hídricos e econômicos, como Filipinas. Os métodos mais utilizados coincidiram com os métodos empregados nos experimentos realizados para esta pesquisa.

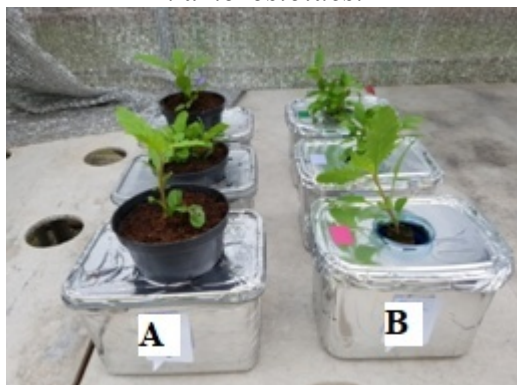
O método-piloto utilizando as raízes suspensas com solução foliar (Dripsol®) em livre demanda foi realizado para avaliar se esta espécie cresceria de forma otimizada em um sistema de *floating* (ou leito flutuante), sendo que este método é utilizado atualmente para o cultivo de hortaliças, como alface, rúcula e agrião por ser um método de fácil manejo (Figura 44). O método-piloto utilizando substrato de fibra de coco e fibra de arroz (Figura 45-A; Figura 46) foi testado porque este método é utilizado para o cultivo de morango, tomate e outros frutos, os quais normalmente são suscetíveis ao ataque de patógenos e por isso evita-se o cultivo hidropônico destes em local aberto, sendo recomendado o uso de vasos em casas de vegetação. O método-piloto em vaso de areia com solução foliar (Figura 45-B e Figura 47) foi realizado para avaliar se a planta se adaptaria ao sistema de plantio em canteiro em forma de calhetão, composto por uma larga camada de areia na superfície. O tamanho foliar e altura de cada planta obtida foram medidos e comparados conforme os resultados mostrados na Tabela 8)

Figura 44. Exemplo de canteiro hidropônico com hortaliças pelo método de leito fluidizado.



Fonte: O autor.

Figura 45. Estudo-piloto de cultivo de *D. ambrosioides*.



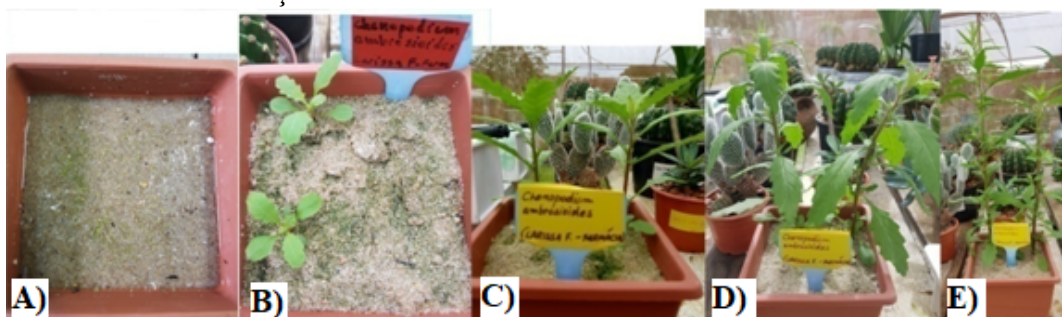
Fonte: O autor. A) modelo de vaso com substrato (fibra de coco e arroz); B) modelo utilizando somente solução foliar (com as raízes suspensas).

Figura 46. Plantas adultas de *D. ambrosioides* após 30 dias de cultivo hidropônico.



Fonte: O autor. A) Modelo de vaso com substrato (fibra de coco e arroz) e solução foliar; Modelo de cultivo com raízes suspensas em solução foliar.

Figura 47. Evolução do crescimento de *D. ambrosioides* em estudo-piloto durante 30 dias de cultivo em areia + solução foliar.



Fonte: O autor. A) tempo zero; B) após 10 dias; C) após 20 dias; D) após 25 dias; E) após 30 dias.

Tabela 8. Tamanho médio da planta e folhas de *D. ambrosioides* em diferentes cultivos

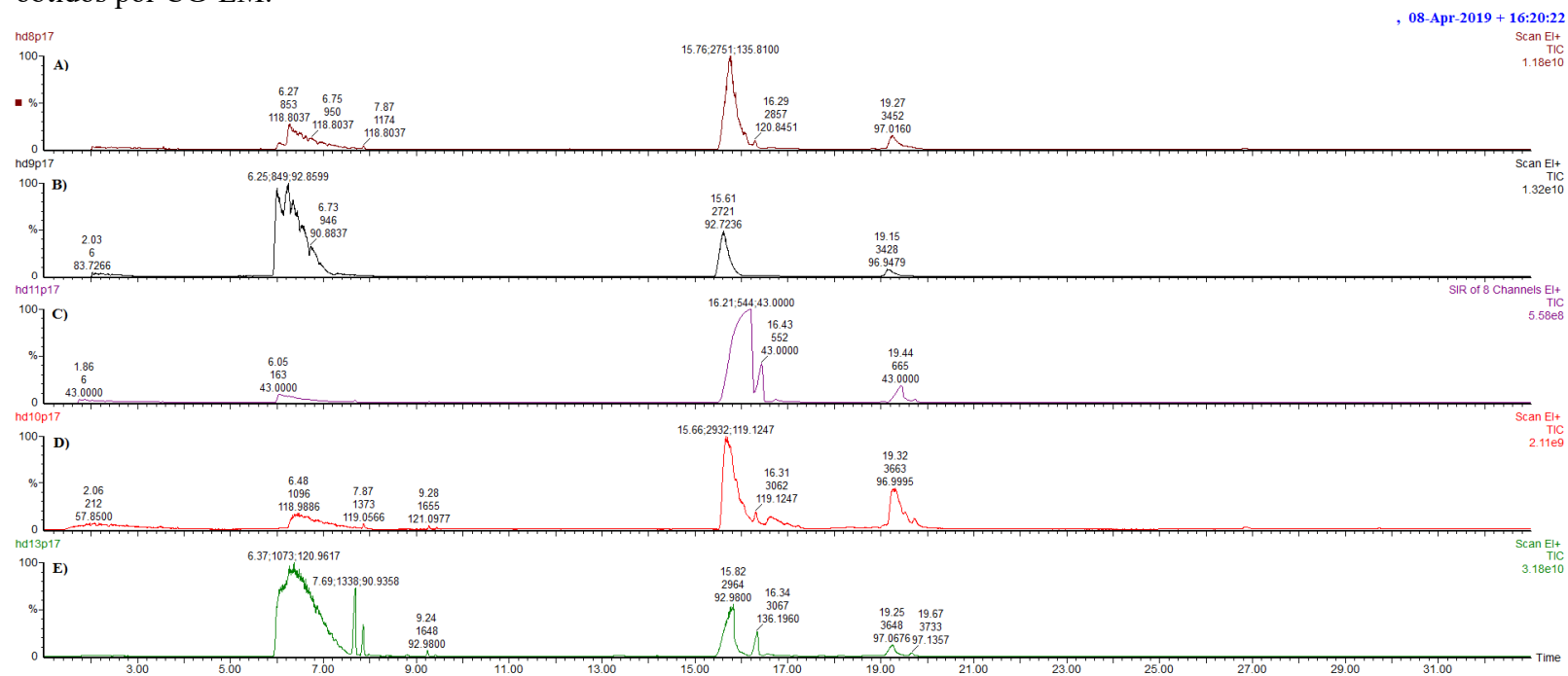
Tipo de cultivo	Altura (cm)	Tamanho foliar (cm)
Areia + SF em vaso	32,67 ± 0,58	4,50 ± 1,00
SF em vaso com substrato*	43,67 ± 0,58	3,83 ± 0,58
SF com raízes suspensas	27,66 ± 0,58	3,67 ± 0,28

SF: solução foliar Dripsol®. *fibra de coco e fibra de arroz. Os resultados foram expressos na forma de média dos tamanhos encontrados em cm ± desvio padrão.

Após a avaliação dos três cultivos-piloto, observou-se que o cultivo utilizando vaso com substrato de fibras de arroz e coco com solução foliar (SF) originou plantas com maior tamanho em altura (43,67 ± 0,58 cm) e no cultivo em areia com SF foi possível obter plantas com maior tamanho foliar (4,50 ± 1,00 cm), sendo este o cultivo eleito como método para prosseguir no intuito de obter maior volume material vegetal hidropônico. Através da avaliação dos cromatogramas obtidos por *headspace*-CG-EM foi possível concluir que todas as formas de cultivo-piloto (Figura 48) apresentaram a mesma composição volátil, em relação às substâncias majoritárias. O método analítico utilizando amostrador tipo *Headspace* dinâmico conectado diretamente à coluna do cromatógrafo gasoso tem sido empregado para a análise de amostras voláteis, incluindo material vegetal fresco ou seco, óleos essenciais e nanoemulsões, porém ainda se apresenta como uma técnica recente, visto que em trabalhos anteriores há maior prevalência de experimentos com *Headspace*-SPME-CG-EM (SPME, do inglês, *solid phase microextraction*) (DIAS et al., 2012; LUCCA et al., 2015). Esta técnica não necessita de uso de solventes orgânicos, contribuindo para a redução nos rejeitos ambientais, contudo, é um método que demanda grande consumo de gás de arraste, aumentando o seu custo.

Os picos dos compostos majoritários apareceram saturados nos cromatogramas, pois o principal objetivo neste momento era observar o pico de ascaridol (7), o qual apareceu utilizando o método SIR com $T_r = 19,24$ min (Figura 48-C), porém em ordem de magnitude e^8 (na forma de composto minoritário). A identificação do ascaridol foi realizada com o auxílio da biblioteca NIST, onde o espectro de massas foi comparado a referências, acusando um *match* de 811 e um *match* reverso de 832. O valor de *match* é calculado a partir da razão de quanto de similaridade existe entre o analito e a referência, enquanto o *match* reverso é a razão entre referência e analito. Quanto mais próximo de 1000 significa que há 100% de similaridade.

Figura 48. Cromatogramas comparativos obtidos por folhas frescas de *D. ambrosioides* a partir de diferentes substratos para cultivo hidropônico, obtidos por CG-EM.



A análise C foi realizada em modo SIR, com o aparecimento do pico referente ao ascaridol em 19,24 min. A) Vaso com substrato e solução foliar (SF); B) SF; C) areia + SF; D) cultivo em calhetão, com SF; E) partes aéreas de cultivo em calhetão.

O primeiro plantio foi realizado no verão sendo possível realizar a primeira coleta após 30 dias e nos seis meses subsequentes (Figura 49). O motivo deste resultado pode estar relacionado à maior oferta de nutrientes e irrigação adequada durante todo o crescimento da planta, porém após seis meses a planta estava desgastada e infestada por herbívoros. Este efeito já era esperado neste modelo de cultivo, o qual não demandou o uso de pesticidas. Sendo assim, após este período as plantas antigas foram retiradas e um novo plantio foi realizado no inverno, o qual originou novas plantas após 30 dias. Este evento em hidroponia também foi mostrado por Maggini et al. (2012), onde as espécies *Echinaceae augustifolia* e *Ocimum basilium* mostraram crescimento acelerado (MAGGINI et al., 2012). Em outro estudo de cultivo hidropônico de *Carlina acaulis*, foi possível concluir que o cultivo hidropônico promoveu crescimento mais rápido da planta. O rendimento de material vegetal foi menor comparado ao proveniente do solo, porém é possível obter um rendimento satisfatório após sucessivos ciclos de cultivo em menor tempo (STRZEMSKI et al., 2020). Este evento mostra-se como um indicativo de que o cultivo hidropônico pode ser considerado um candidato para a obtenção de material vegetal em escala industrial.

Figura 49.D. *ambrosioides* – cultivo hidropônico.



Fonte: O autor.

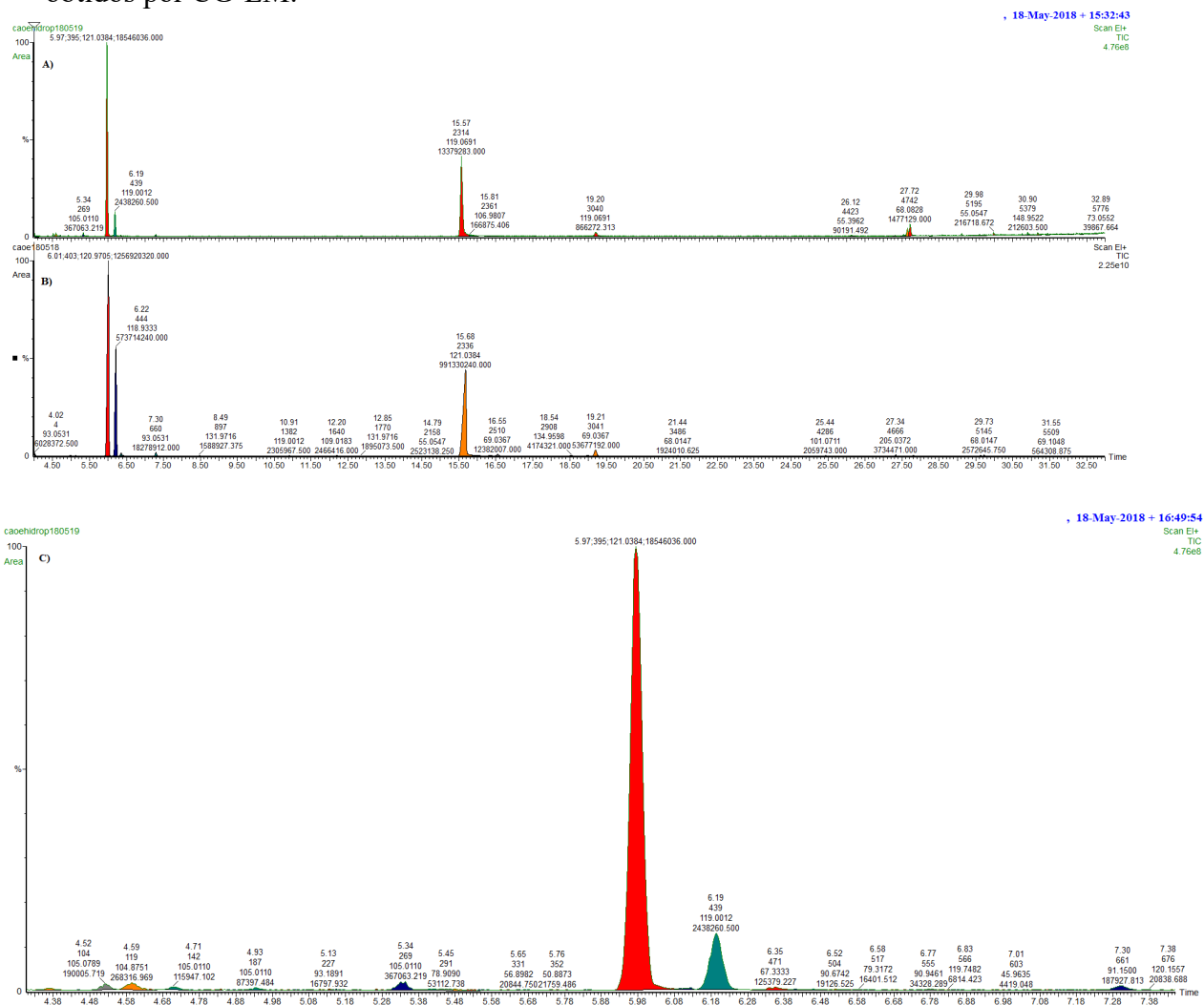
O rendimento do óleo essencial obtido das partes aéreas de *D. ambrosioides*- cultivo hidropônico (DaHiOE) foi de $0,54 \pm 0,03\%$, menor que o rendimento apresentado anteriormente para *D. ambrosioides*- cultivo em solo ($1,07 \pm 0,01\%$). Esta diferença pode ser explicada devido às partes aéreas (cultivo em solo) terem sido coletadas de plantas no estágio adulto, e já havia produzido flores e sementes anteriormente. Além disso, a planta cultivada em solo esteve susceptível às variações de amplitude térmica e recebimento irregular de irrigação pela chuva. A planta hidropônica foi coletada após 30 dias desde o replante das mudas para o canteiro hidropônico, estágio onde foi observada uma maior densidade de produção de folhas e início de formação de flores e sementes. Não foi realizada a avaliação de massa foliar da planta inteira, mas verificou-se que foram necessários apenas $1,92 \text{ m}^2$ de canteiro hidropônico para cada planta. Sobre o melhor método de preparo do material vegetal para extração do óleo essencial por hidrodestilação, em uma análise prévia utilizando o material vegetal seco triturado em moinho de facas, verificou-se que o rendimento de óleo essencial foi de $0,11\%$, menor que o rendimento utilizando as partes aéreas secas rasuradas. Em ambos os cultivos (solo e hidropônico) as plantas foram coletadas no verão, na mesma cidade, em áreas sem cobertura e recebiam a mesma intensidade de luz, temperatura e quantidade de chuvas, sendo que ambos os materiais vegetais foram coletados durante a fase de floração e produção de sementes, ou seja, na mesma fase de crescimento vegetativo. Sendo assim, as diferenças entre os cultivos foram baseadas na irrigação complementar, onde as plantas em solo recebiam rega com água corrente uma vez por semana e no cultivo hidropônico as plantas recebiam solução foliar três vezes ao dia por 5 minutos. Outro fator que pode ter impactado no rendimento de óleo essencial é a idade da planta (efeito ontogenético); plantas com mais idade apresentam maior número de tricomas glandulares, os quais são produzidos como mecanismo de defesa contra agressões externas, incluindo insetos e patógenos ou como forma adaptativa em um ambiente com outras espécies de plantas.

A obtenção de óleos essenciais de plantas hidropônicas ainda é um tema recente e implica em vários obstáculos para a sua consolidação como recurso na indústria. Um sistema de refrigeração e irrigação eficiente demanda um maior gasto de energia elétrica (PANDEY; JAIN; SINGH, 2009). Além disso, é necessária mão-de-obra qualificada para o manejo deste cultivo, tomando precauções na limpeza das calhas e vasos, evitando a contaminação por fungos e limo. Sendo assim, torna-se necessário intensificar as pesquisas investigando diferentes variáveis envolvendo o cultivo hidropônico, como diferentes volumes e horários de

irrigação, diferentes proporções na composição da solução nutriente foliar, comparar a composição da espécie situada em canteiro a céu aberto com canteiro em casa de vegetação, no intuito de otimizar a produção de um marcador fitoquímico específico em um menor tempo possível.

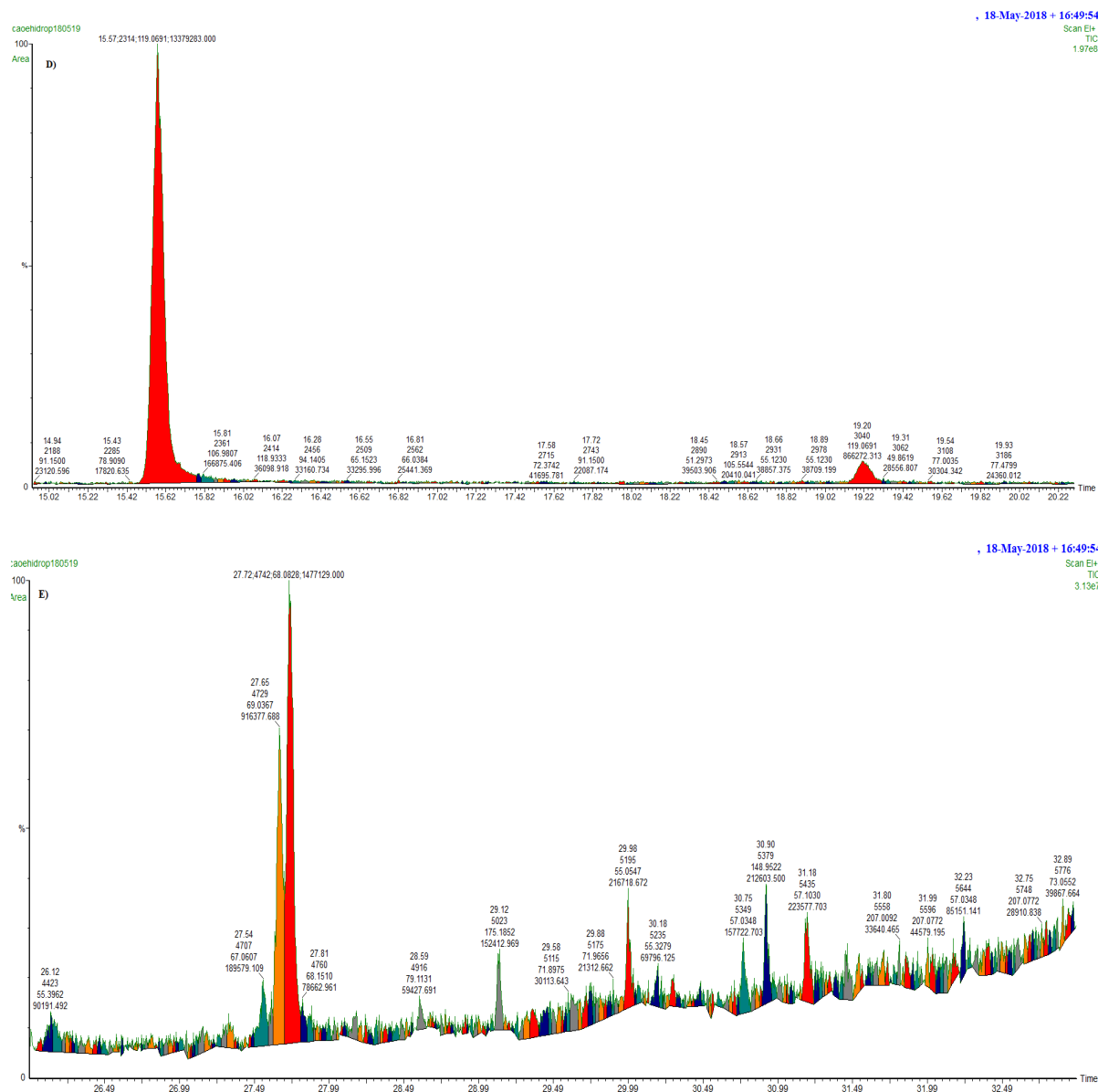
Abaixo estão apresentados os cromatogramas do óleo essencial obtido a partir da espécie cultivada em solo e do óleo essencial obtido a partir da planta em cultivo hidropônico (Figura 50).

Figura 50. Cromatogramas do óleo essencial *D. ambrosioides*-cultivo hidropônico e solo, obtidos por CG-EM.



A) Cultivo hidropônico. B) Cultivo em solo C) cromatograma expandido – cultivo hidropônico (Tr 4,52 a 7,38 min); D) cromatograma expandido – cultivo hidropônico (Tr 14,94 a 19,93 min); E) cromatograma expandido – cultivo hidropônico (Tr 26,12 a 32,89 min).

Continuação. Figura 50. Cromatogramas do óleo essencial *D. ambrosioides*-cultivo hidropônico e solo, obtidos por CG-EM.



A) Cultivo hidropônico. B) Cultivo em solo C) cromatograma expandido – cultivo hidropônico (Tr 4,52 a 7,38 min); D) cromatograma expandido – cultivo hidropônico (Tr 14,94 a 19,93 min); E) cromatograma expandido – cultivo hidropônico (Tr 26,12 a 32,89 min).

Através da comparação dos respectivos cromatogramas foi possível evidenciar diferenças na sua composição química (Figura 50), onde o cultivo em solo (DaSOE) revelou como compostos majoritários α -terpineno (**5**, Tr= 6,01 min, 43,4%) e terpinoleno (**13**, Tr= 15,68 min, 34,3%) enquanto que o cultivo hidropônico (DaHiOE) proporcionou a formação

como compostos majoritários além do α -terpineno, já observado no solo (**5**, Tr= 6,01 min, 49,05%, Figura 51), o acetato de *trans*-crisantenila (**54**, Tr= 15,57 min, 35,4%, Figura 53) (Tabela 9). A identificação dos compostos foi a partir dos dados obtidos comparados aos dados da biblioteca NIST; o diterpeno acetato de *trans*-crisantenila apresentou um *match* de 747 e *match* reverso de 764. Além dos compostos citados, foram encontradas as substâncias p-cimeno (**6**), γ -terpineno (**12**), acetato de 2,6,6-trimetil-biciclo [3.1.1] hept-2-en-ol (**55**), geranil tigolato (**56**) e D-limoneno (**57**), como compostos secundários no óleo essencial de *D. ambrosioides* – cultivo hidropônico.

As análises por CG-EM foram realizadas sequencialmente sob as mesmas condições analíticas. A composição encontrada no DaSOE foi similar com a composição química do óleo essencial da variedade *ambrosioides* (CHU; FENG HU; LIU, 2011) encontrada em países como China e Brasil. A espécie *D. ambrosioides* var. *antihelminthicum* é rica em ascaridol, diferente da espécie *D. ambrosioides* var. *ambrosioides* (AIT SIDI BRAHIM et al., 2015; KASALI et al., 2006) presente em países como Marrocos e também no Brasil.

Os compostos α -terpineno e acetato de *trans*-crisantenila também estão presentes no óleo essencial da espécie *Artemisia absinthium*, porém em porcentagens menores (0.2% e 0.1%, respectivamente), sendo que o último citado encontra-se presente também no óleo essencial da espécie *Chrysanthemum coronarium* (7.6%) (LLORENS-MOLINA et al., 2017; MFARREJ; RARA, 2019) e na espécie *Tanacetum parthenium* (22,1%) (POLATOĞLU et al., 2010). Sobre o óleo volátil de *D. ambrosioides*- cultivo hidropônico, é importante ressaltar sobre a vantagem da ausência do monoterpeno ascaridol, podendo ser considerado mais seguro para a utilização para consumo humano (DEGENHARDT et al., 2016). Este resultado também pode ser considerado para uma reflexão sobre a dificuldade em padronizar o material vegetal e obter o rendimento esperado da fração de interesse. No caso da espécie *D. ambrosioides*, parece que somente a irrigação e a composição da solução foliar não foram suficientes para estimular a produção de ascaridol ou promover a formação de uma composição química similar ao óleo essencial da espécie obtida pelo cultivo em solo. No entanto, novas investigações poderiam ser realizadas, utilizando diferentes composições de solução foliar, além de diferentes sistemas de iluminação e irrigação, para avaliar o impacto sobre a produção de metabólitos secundários, especialmente os óleos essenciais. Sendo assim, este modelo de cultivo poderia ser empregado em culturas de alto valor agregado ou que apresentam alta variabilidade química.

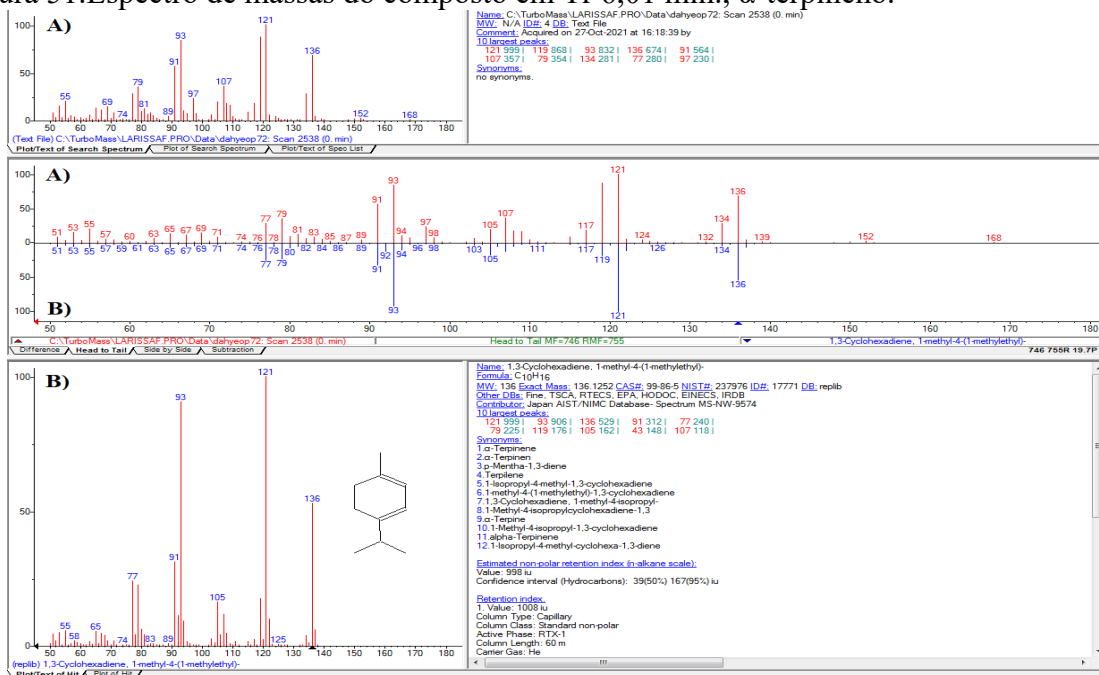
Como um dado complementar, uma publicação mostrou que a composição química dos óleos essenciais das espécies *Croton tetradenius* e *C. pulegioides* apresentam similaridades com a composição do óleo essencial de *D. ambrosioides*-hidropônico, contendo α -terpineno, *p*-cimeno e acetato de *trans*-crisantenila em maiores presenças. No entanto, o foco de investigação foi para atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, demonstrando grande potencial de atividade (ROCHA et al., 2021); esta seria uma abordagem interessante para investigar outras atividades com o óleo essencial de *D. ambrosioides*-hidropônico.

Tabela 9. Principais compostos identificados no óleo essencial de *D. ambrosioides*.

IR-TM	IR	Tr (min)	Composto identificado	<i>m/z</i> Experimental	DaHiOE%	DaSOE%
403	1125	6,01	α -terpineno	135,9946	49,05	43,40
444	1135	6,22	<i>p</i> -cimeno	134,0090	6,45	19,81
660	1186	7,30	γ -terpineno	136,0465	0,50	0,63
2314	1652	15,57	Acetato de <i>t</i> -crisantenila	193,7552	35,38	-
2336	1709	15,68	Terpinoleno	136,0459	-	34,32
3040	1999	19,20	Acetato de 2,6,6-trimetil-biciclo [3.1.1] hept-2-en-ol	194,3422	2,29	-
3041	1955	19,21	Ascaridol	168,0433	-	1,85
4729	1954	27,65	Geranil tiglato	236,2312	2,42	-
4742	1955	27,72	(-) Limoneno	135,9567	3,91	-
4760	1955	27,81	Enoato de 2-metilbutil-2-octila	212,1938	-	0,09
			% compostos identificados		100,00	100,00
			% monoterpenos - hidrocarbonetos		59,91	98,15
			% monoterpenos oxigenados		-	1,85
			% sesquiterpenos - hidrocarbonetos		-	-
			% sesquiterpenos oxigenados		2,42	-

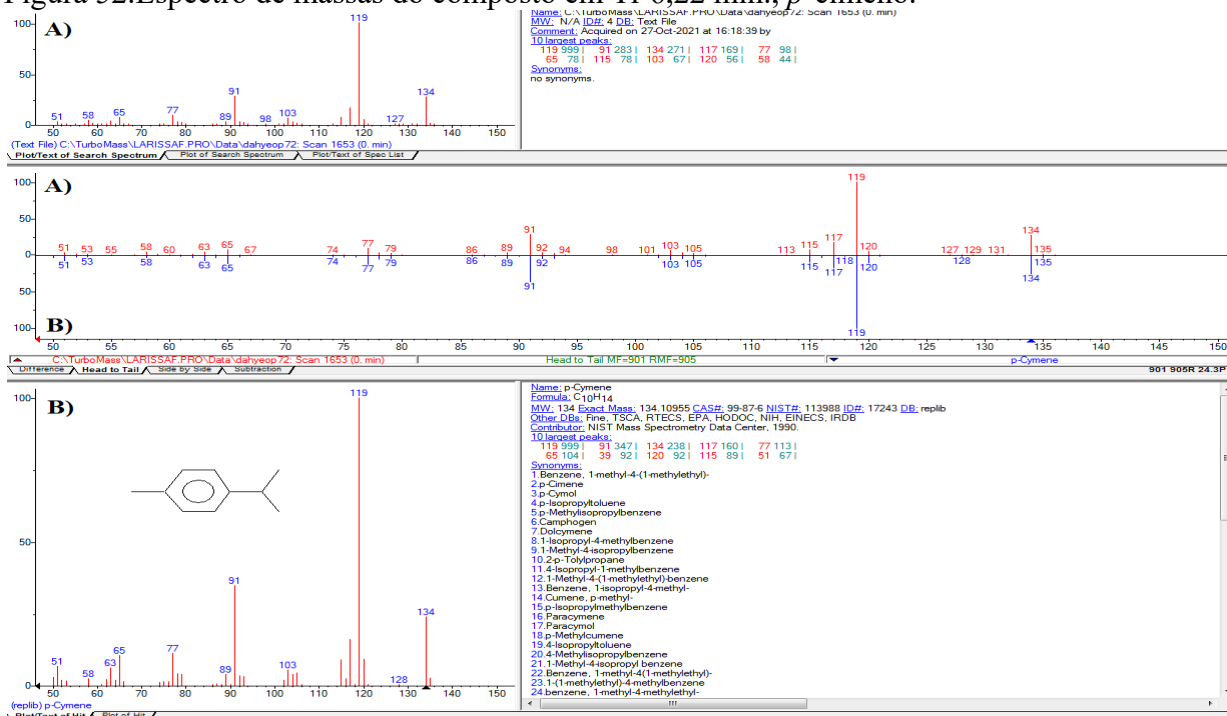
IR- TM = índice de retenção para coluna elite 5-ms calculado pelo *software* TurboMass®; IR: Índice de retenção calculado pela fórmula de índice de retenção pelo método descrito por Adams, 2007, utilizando a série homóloga de *n*-alcanos; Tr = Tempo de retenção (min); *m/z* = relação massa/carga do fragmento abundante; porcentagem em área relativa de DaHiOE = óleo essencial de *D. ambrosioides* hidropônico; DaSOE = óleo essencial de *D. ambrosioides* solo.

Figura 51. Espectro de massas do composto em Tr 6,01 min., α -terpineno.



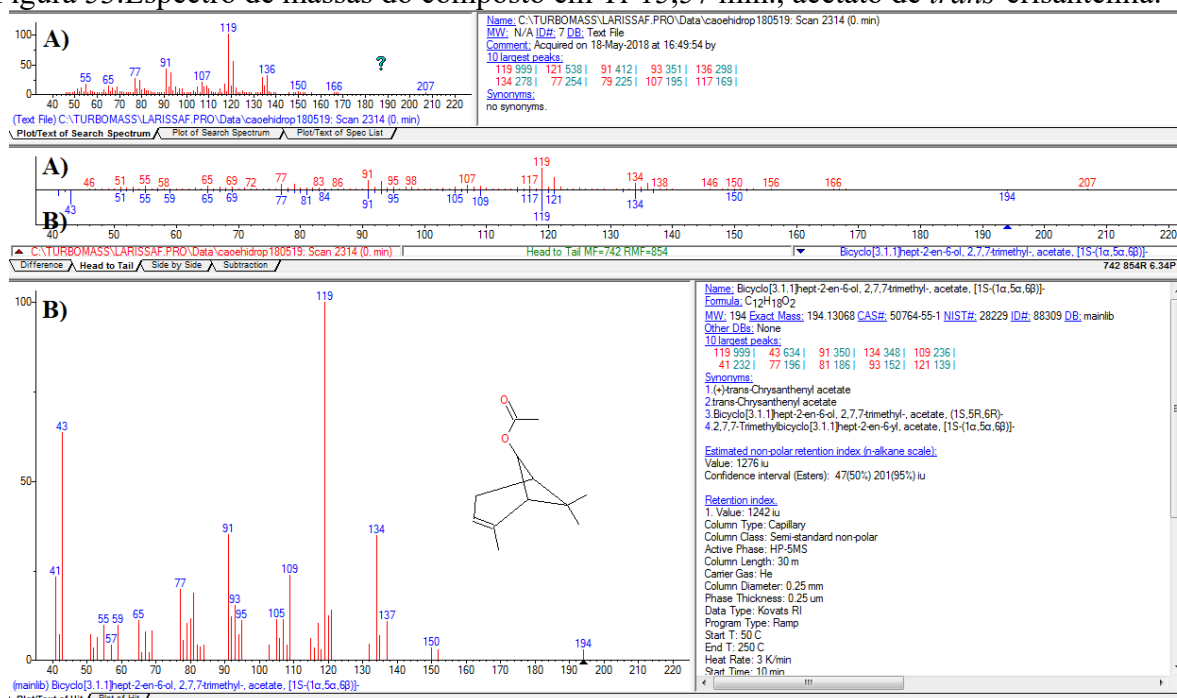
A) Espectro de massas do composto identificado α -terpineno; B) Espectro de massas e identificação da biblioteca NIST.

Figura 52. Espectro de massas do composto em Tr 6,22 min., *p*-cimeno.



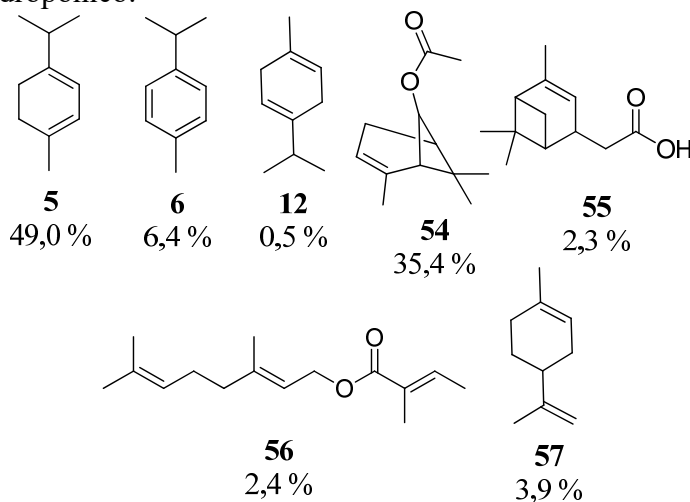
A) Espectro de massas do composto identificado *p*-cimeno; B) Espectro de massas e identificação da biblioteca NIST.

Figura 53. Espectro de massas do composto em Tr 15,57 min., acetato de *trans*-crisantenila.



A) Espectro de massas do composto identificado terpinoleno ou acetato de *t*-crisantenila;
B) Espectro de massas e identificação da biblioteca NIST referente ao composto acetato de *t*-crisantenila.

Figura 54. Principais compostos identificados no óleo essencial de *D. ambrosioides* – cultivohidropônico.



α -terpineno, *p*-cimeno, γ -terpineno, acetato de *trans*-crisantenila, acetato de 2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] hept-2-en-ol, geranyl tiglato e D-limoneno, respectivamente.

Através da análise do cromatograma do hidrolato de *D. ambrosioides* – cultivo hidropônico (Figura 55) mostrou a presença do composto majoritáriocis-*p*-menta-2,8-dien-1-ol (**61**, Tr 13,64 min),e além deste monoterpene oxigenado foram identificados *trans*-2-caren-4-ol (**58**), *p*-cimen-8-ol (**59**), 5-isoprenil-2-metil-7-oxabicyclo[4.1.0] heptan-2-ol (**60**) e acetato de 2,6,6-trimetil- bicyclo [3.1.1] hept-2-en-4-ol (**62**), sendo os dados obtidos apresentados na Tabela 10 e as estruturas químicas ilustradas na Figura 56.

Figura 55.Cromatograma do hidrolato de *D. ambrosioides* - cultivo hidropônico, obtido por CG-EM.

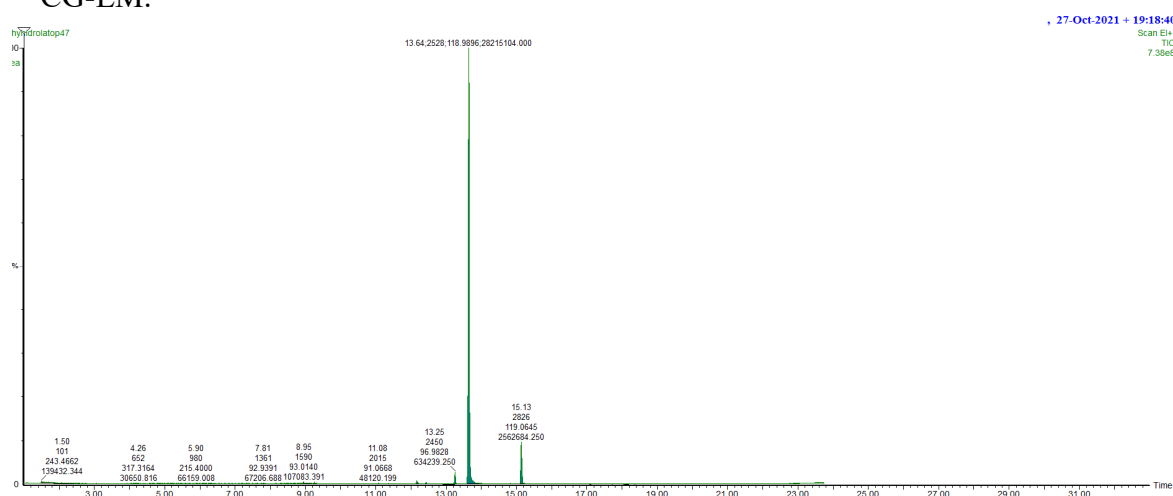
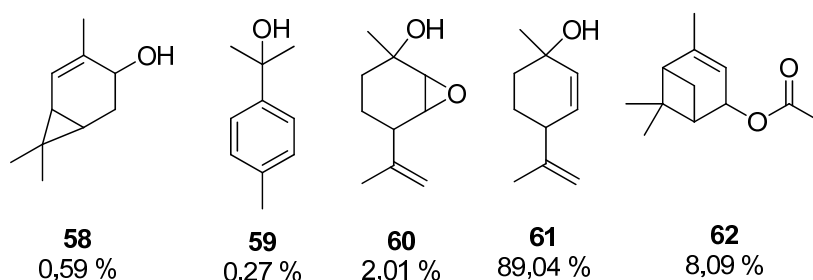


Tabela 10.Composição do hidrolato de *D. ambrosioides*-cultivo hidropônico.

IR-TM	IR	Tr (min)	Composto identificado	<i>m/z</i> Experimental	% área
2333	1456	12,17	Trans-2-Caren-4-ol	150,5583	0,59
2287	1473	12,44	<i>p</i> -cimen-8-ol	150,2096	0,27
2450	1528	13,25	5-isoprenil-2-metil-7-oxabicyclo [4.1.0] heptan-2-ol	168,3101	2,01
2528	1555	13,64	Cis- <i>p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	152,1170	89,04
2826	1666	15,13	Acetato de 2,6,6-trimetil-bicyclo [3.1.1] hept-2-en-4-ol	195,2047	8,09
			% compostos identificados		100,0
			% monoterpenos - hidrocarbonetos		-
			% monoterpenos oxigenados		91,91
			% sesquiterpenos - hidrocarbonetos		-
			% sesquiterpenos oxigenados		-

n.i. = não identificado.

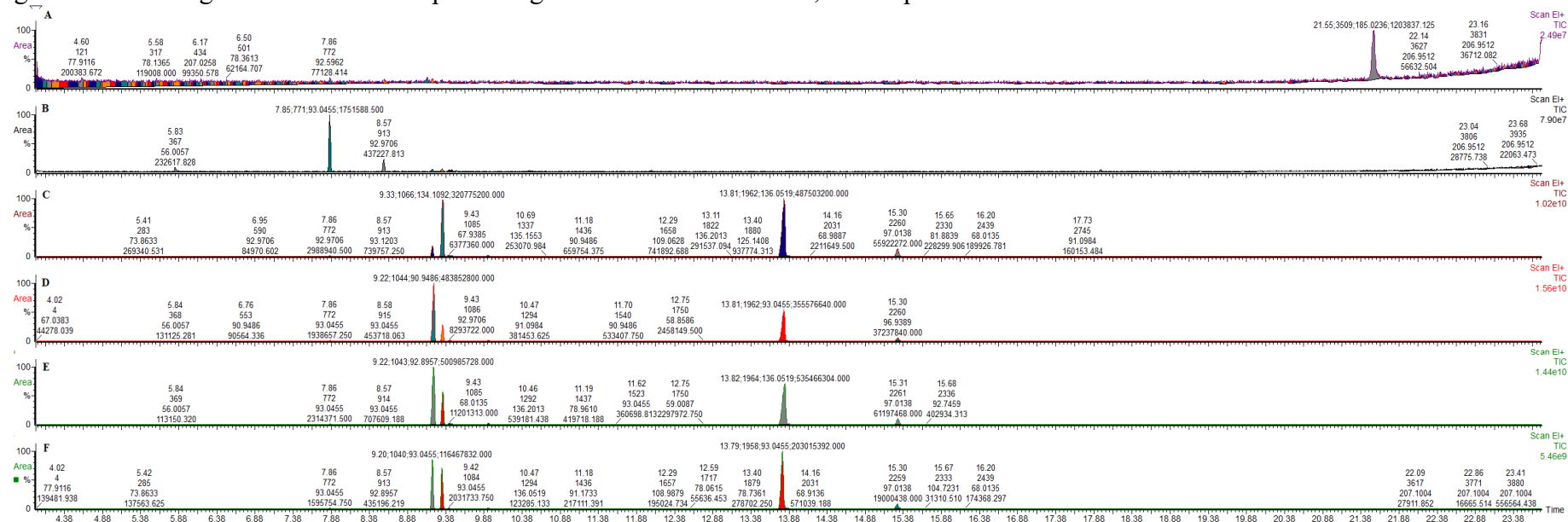
Figura 56. Principais compostos identificados no hidrolato de *D. ambrosioides* – cultivo hidropônico.



trans-2-carene-4-ol, *p*-cimene-8-ol, 5-isoprenil-2-metil-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-ol, cis-*p*-mentha-2,8-dien-1-ol e acetato de 2,6,6-trimetil- bicyclo [3.1.1] hept-2-en-4-ol, respectivamente.

Com o objetivo de avaliar o motivo da diferença na composição e em qual ponto do crescimento da planta cessou a produção de ascaridol, as partes aéreas do cultivo em solo e as mudas obtidas em espuma fenólica a partir das sementes coletadas da *D. ambrosioides*- cultivo em solo, foram analisadas por *headspace*-CG-EM e os cromatogramas obtidos foram comparados às análises das folhas, raízes e caule da planta adulta coletados do solo (Figura 57), e a partir do cálculo da área sob a curva foi possível observar que o teor de ascaridol de *D. ambrosioides*- cultivo em solo (6,09%) reduziu após a germinação em espuma fenólica (3,77%) para o cultivo hidropônico (Tabela 11). Nas literaturas avaliadas foi possível verificar que ocorreu produção dos mesmos compostos encontrados ao método convencional (solo), porém em proporções diferentes, sendo relatado pelos autores que este evento pode variar de acordo com cada espécie (MAIRAPETYAN et al., 2018).

Figura 57. Cromatogramas de diferentes partes vegetais de *D. ambrosioides*, obtido por CG-EM.



A) Raiz de mudas após germinação na espuma fenólica - hidropônico; B) raiz de planta adulta – cultivado em solo; C) folhas de planta adulta – cultivo em solo; D) folhas de mudas – cultivo hidropônico; E) caule e folhas de planta adulta – cultivo em solo; F) caule de planta adulta – cultivo hidropônico.

A partir dos cromatogramas apresentados na Figura 57 foi possível observar que na análise da raiz jovem germinada em espuma fenólica apareceu com maior intensidade o contaminante acetil tributil citrato, um composto encontrado comumente em tubos plásticos e caixas plásticas compostos por PVC, sendo que material também compõe parte do sistema de irrigação hidropônico. Além deste contaminante, foram encontrados os monoterpenos α -pineno e terpinoleno, sendo este último o principal composto encontrado na folha da planta adulta. Já na raiz adulta, houve a presença de 66,4% de α -pineno e 16,6% de β -pineno. Estes monoterpenos são comuns de serem encontrados em raízes, os quais inibem o crescimento precoce das raízes pelo aumento da peroxidação lipídica (SINGH et al., 2006). Avaliando a composição química das folhas, pode-se observar que a folha adulta do cultivo em solo apresentou 53,07% de α -terpineno, o monoterpeno precursor da formação do ascaridol. Esta informação mostra que a região em que a planta estava cultivada (Horto-HU/CCS) poderia não ter recebido incidência de luz suficiente para a conversão em ascaridol. A composição do caule e da folha adulta (ambos provenientes do cultivo em solo) foi analisada com o propósito de avaliar se seria viável fazer a extração das partes vegetais separadas ou todas juntas; como a composição foi semelhante, foi decidido fazer a hidrodestilação das partes aéreas – caule e folhas (Tabela 11).

Tabela 11. Principais compostos identificados em *D. ambrosioides* - solo, sendo partes vegetais frescas.

IR	Tr	Composto identificado	<i>m/z</i>	% A	% B	% C	% D	% E	% F
367	5,83	Hexanal	99,7679	-	8,82	-	-	-	-
772	7,86	α -pineno	136,1379	5,77	66,4	0,32	0,20	0,17	0,45
913	8,57	β -pineno	136,2003	-	16,5	-	-	-	-
1041	9,21	Terpinoleno	136,1181	4,20	3,82	5,01	48,9	37,4	33,1
1067	9,33	<i>p</i> -cimeno	134,0891	-	4,36	34,9	10,5	17,1	2,76

IR: Índice de retenção para coluna elite 5-ms; Tr: Tempo de retenção (minutos); *m/z*: relação massa/carga do fragmento abundante (experimental); %: porcentagem em área relativa. N.i. não identificado. A) raiz de mudas; B) raiz de planta adulta; C) folhas de planta adulta; D) folhas de mudas; E) caule e folhas de planta adulta; F) caule de planta adulta.

Continuação. Tabela 11. Principais compostos identificados em *D. ambrosioides* - solo, sendo partes vegetais frescas.

IR	Tr	Composto identificado	<i>m/z</i>	% A	% B	% C	%D	% E	% F
1186	9,93	γ -terpineno	136,0903	-	-	0,58	0,58	0,68	0,45
1958	13,79	α -terpineno	136,1172	-	-	53,07	35,98	40,01	57,78
2260	15,30	Ascaridol	168,1192	-	-	6,09	3,77	4,57	5,41
3509	21,55	Acetil tributil citrato	402,2207	90,03	-	-	-	-	-

IR: Índice de retenção para coluna elite 5-ms; Tr: Tempo de retenção (minutos); *m/z*: relação massa/carga do fragmento abundante (experimental); %: porcentagem em área relativa. N.i. não identificado. A) raiz de mudas; B) raiz de planta adulta; C) folhas de planta adulta; D) folhas de mudas; E) caule e folhas de planta adulta; F) caule de planta adulta.

5.3 ANÁLISE ESPECROSCÓPICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *D. ambrosioides*

O método analítico espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) pode ser utilizado como uma ferramenta complementar para a identificação de compostos em óleos essenciais, através de regiões distintas é possível obter informações importantes, como a presença de grupamentos funcionais pelos tipos de deslocamento químico de carbono e hidrogênio (MAHANTA et al., 2020).

Como pode ser observado na Figura 58 em ambos os espectros demonstram a presença de sinais entre 0,6-2,5 ppm referente a natureza terpênica, dos hidrogênios alifáticos, assim como a região de 4,0-6,0 ppm referente aos hidrogênios ligados aos carbonos oxigenados e hidrogênios olefínicos dos componentes presentes o óleo essencial. O óleo essencial de *D. ambrosioides*- cultivo hidropônico revelou deslocamento químico referente ao acetato de *t*-crisantenila em 5,57 ppm relativo ao H-3 (NAPOLI et al., 2020), e com maior presença dos deslocamentos referentes aos dois compostos majoritários, α -felandreno e *p*-cimeno. No espectro de ^1H da *D. ambrosioides*- cultivo em solo foi possível observar o deslocamento de 6,46 ppm referente ao H-3 do ascaridol, semelhante ao encontrado em literatura (DEGENHARDT et al., 2016) e deslocamentos no espectro de ^{13}C (Figura 59), região entre 15 e 50 ppm referente aos carbonos alifáticos, entre 120 e 140 ppm referente aos carbonos olefínicos e entre 70 e 80 ppm estão os carbonos oxigenados, concordando com dados da literatura (CAVALLI et al., 2004), e coincidindo com os encontrados para as substâncias α -terpineno e *p*-cimeno no OE do cultivo hidropônico.

Além destes deslocamentos, foram identificados 145,8 ppm e 142,4 ppm em DaHiOE, indicativos de carbono insaturado ou núcleo aromático; 136,4 ppm em DaHiOE e DaSOE, possivelmente para C-1 do *p*-cimeno; 133,0 ppm em DaHiOE e DaSOE, possivelmente para C-1 do α -terpineno.

Foram realizadas análises complementares em 2D – HSQC, no intuito de auxiliar na identificação das correlações existentes, onde identificou-se os deslocamentos químicos: 129,0 ppm (C-2 e C-6) em DaHiOE e DaSOE, que correlacionou com 7,13 ppm (H-2 e H-6), possivelmente do *p*-cimeno (DEGENHARDT et al., 2016); também foram encontradas correlações entre 126,2 ppm (C-3 e C-5) e 7,11 (s, H-3 e H-5), possivelmente do *p*-cimeno.

Figura 58. Espectros de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) do óleo essencial de *D. ambrosioides*- A) cultivo hidropônico; B) cultivo em solo.

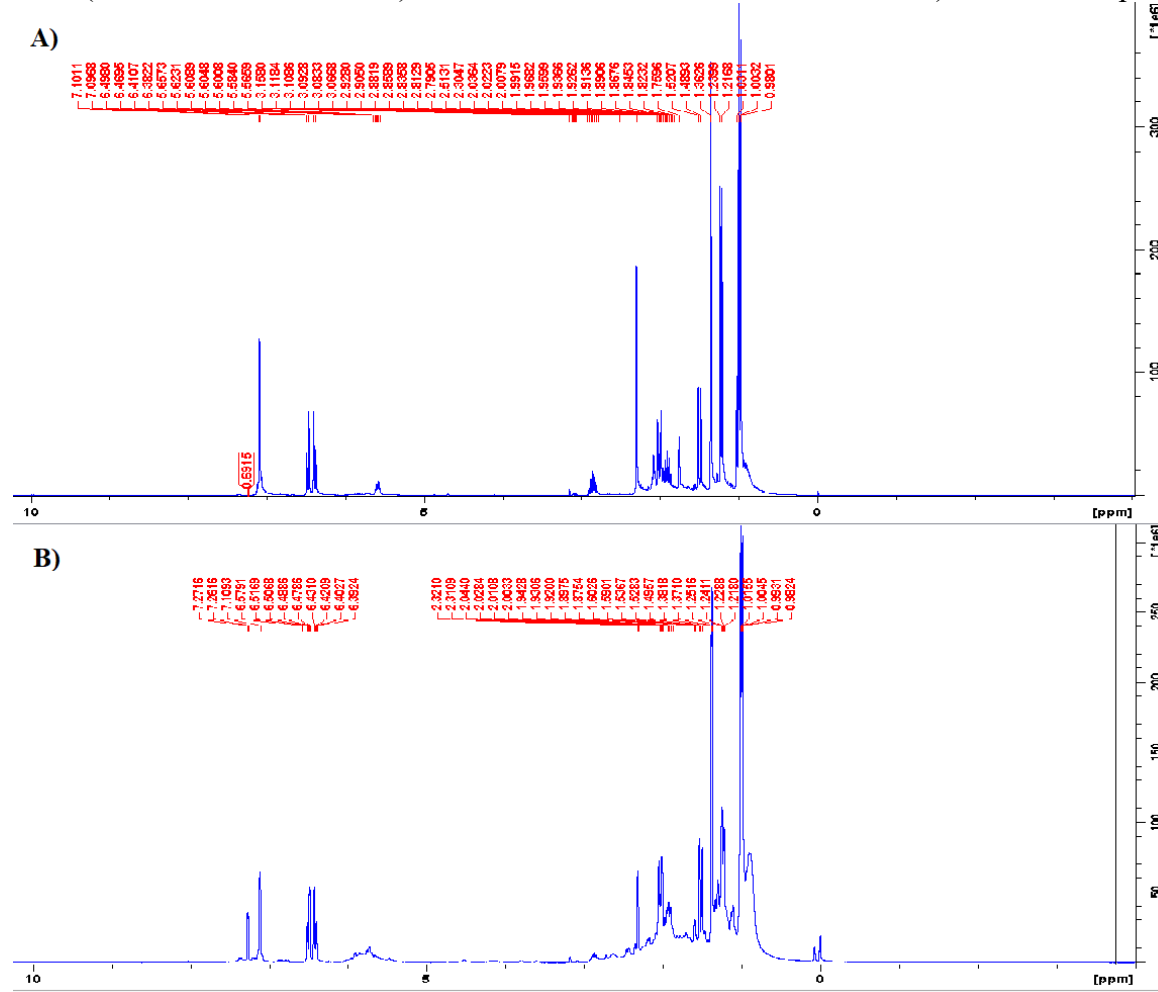
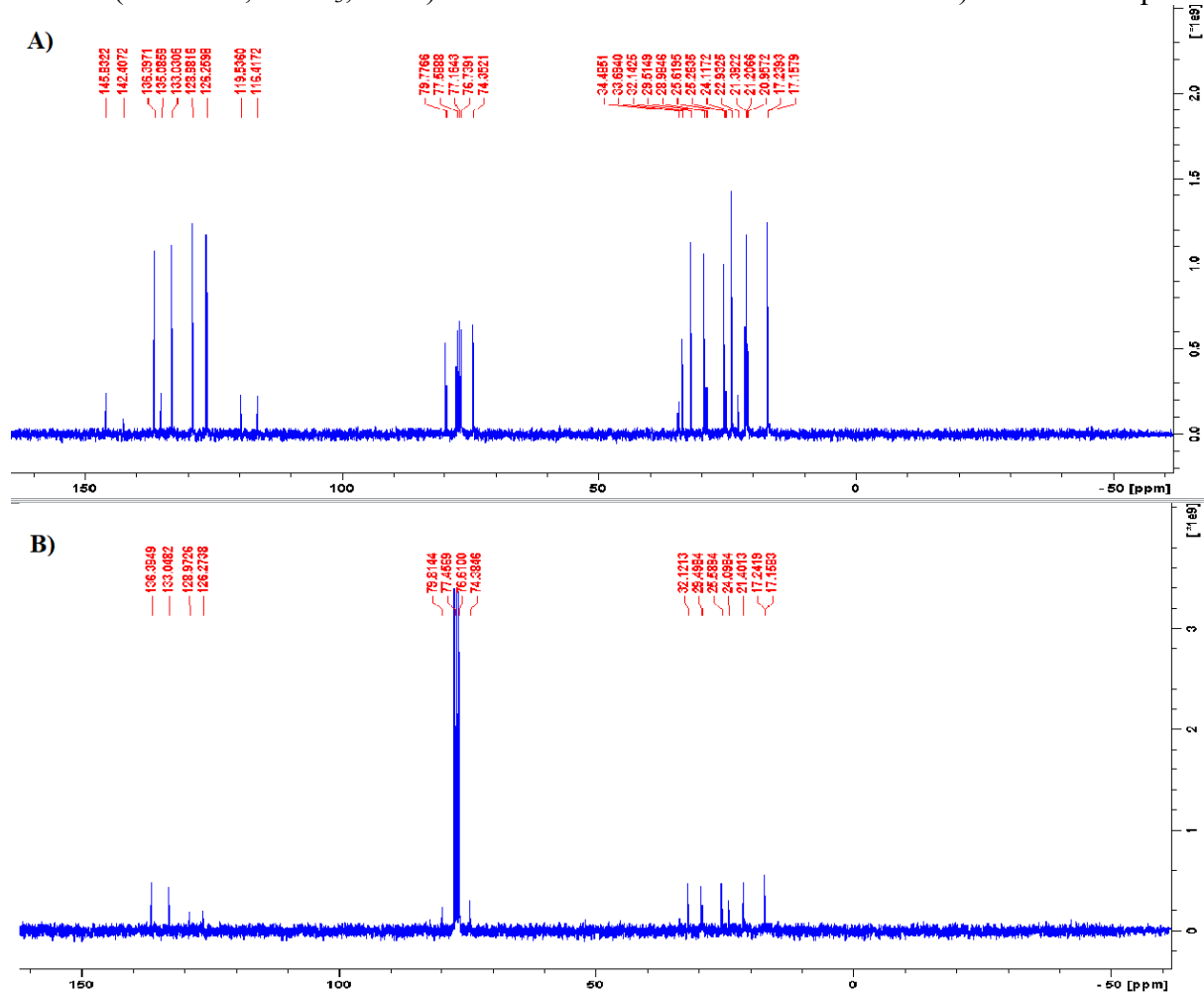
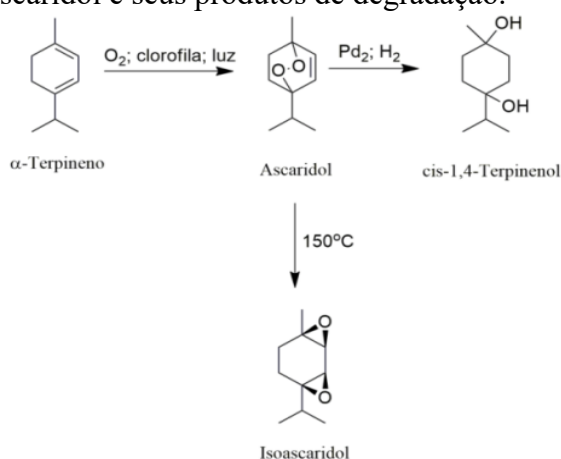


Figura 59. Espectros de RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3 , TMS) do óleo essencial de *D. ambrosioides*- A) cultivo hidropônico e B) cultivo em solo.



Na amostra de óleo essencial de *D. ambrosioides* – cultivo hidropônico não foi possível identificar a presença de ascaridol como esperado, sendo que a formação ocorreria a partir da oxidação do α -terpineno, abundante em ambas as amostras (Figura 60), enquanto que o óleo essencial de *D. ambrosioides* – cultivo em solo apresentou α -terpineno e terpinoleno como os compostos majoritários. Esta variação na composição pode estar relacionada ao fato desta espécie crescer preferencialmente em solo arenoso e seco, diferente do meio no cultivo hidropônico, com suporte de nutrientes e irrigação constante.

Figura 60. Formação do ascaridol e seus produtos de degradação.



Fonte: adaptado de (CAN BAŞER; BUCHBAUER, 2015)

5.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA

A espécie *D. ambrosioides* apresenta um histórico considerável sobre o potencial contra insetos, utilizando a planta inteira triturada (CHOUGOUROU et al., 2016; DENLOYE et al., 2010; LIMA-MENDONÇA et al., 2013; PROCÓPIO et al., 2003) e o óleo essencial (BOSSOU et al., 2013; DENLOYE et al., 2010; FIGUEIREDO; ROCHA; FREITAS, 2019). Existem também publicações avaliando a atividade contra *S. zeamais* (CHU; FENG HU; LIU, 2011; LANGSI et al., 2018). A investigação sobre essa espécie é intensa, principalmente pela diferença na sua composição fitoquímica, o que confere diferentes resultados de atividade biológica. No presente trabalho, visou principalmente obter o óleo essencial para uso em escala industrial e seu potencial inseticida e repelente, um enfoque diferente comparado com as publicações anteriores.

5.4.1 Atividade repelente

5.4.1.1 Ensaio de repelência pelo método de escolha em papel-filtro tratado

Para avaliar o potencial repelente dos óleos essenciais das espécies vegetais eleitas no presente estudo sobre o *S. zeamais* foi utilizado o método de escolha utilizando-se a concentração de 1% de cada óleo essencial no teste de superfície tratada utilizando papel-filtro. Esta concentração foi eleita no intuito de comparar à mesma concentração do controle positivo, Citromax®.

Comparando com os parâmetros interpretados no Quadro 2, os resultados mostraram que após 1 h de tratamento o óleo essencial de *M. pulegium* (MpOE) promoveu baixa repelência, semelhante ao controle positivo e após 24 h, MpOE apresentou moderada atividade, semelhante ao controle positivo ($p < 0,05$) (Tabela 12). Considerando a atividade conforme o componente majoritário de cada amostra, a pulegona (MpOE) contribuiu para o efeito repelente imediato (1 h) e para o efeito tardio, em 24 h. O efeito repelente imediato pode estar relacionado ao modo de ação neurotóxico (KOUL; WALIA; DHALIWAL, 2008). Outro dado importante é que monoterpenos oxigenados já demonstraram atividade inseticida e repelente contra *S. zeamais*, como a pulegona e o ascaridol (ABDELLI et al., 2016; CHU; FENG HU; LIU, 2011). O óleo essencial de *M. pulegium* apresentou atividade repelente semelhante ao controle positivo após 1 h de aplicação. Este efeito também pode ser visualizado após 24 h. Os óleos essenciais de *C. nitida* e *D. ambrosioides* – cultivo em solo apresentaram atividade atrativa ou nenhuma atividade. Estes resultados mostraram que o óleo essencial de *M. pulegium* promoveu melhor desempenho como ação fumigante, onde a ação é pela penetração no corpo do inseto via sistema respiratório.

Tabela 12. Resultado do ensaio de repelência pelo método de escolha.

Tratamento	1 h	24 h
CnOE	-11,41 ± 36,88	9,00 ± 17,92
DaSOE	9,00 ± 17,92	-17,00 ± 11,60
MpOE	25,60 ± 31,91*	44,65 ± 30,11*
Controle positivo	30,71 ± 13,92*	40,97 ± 23,67*

Resultados expressos em porcentagem de repelência ± desvio padrão, calculado conforme equação 2; CnOE= óleo essencial de *C. nitida* (1.0%); DaSOE = óleo essencial de *D. ambrosioides*-solo (1.0%); MpOE = óleo essencial de *M. pulegium* (1.0%); Controle positivo = extrato de *neem* Citromax® (1.0%).

5.4.2 Atividade inseticida

5.4.2.1 Ensaio de mortalidade sobre superfície tratada com massa de grãos

O ensaio de mortalidade sobre grãos tratados foi baseado na metodologia de (ARAÚJO et al., 2019; VÁZQUEZ-COVARRUBIAS et al., 2015), para avaliar a capacidade de cada tratamento em atuar sobre o aparelho digestivo do inseto, após a ingestão de milho tratado (RESTELLO; MENEGATT; MOSSI, 2009). A ação de controle sobre pragas de grãos armazenados revela-se através da toxicidade através das vias respiratórias (fumigação), da cutícula (contato) e da ingestão (grãos tratados) (RESTELLO; MENEGATT; MOSSI, 2009).

Os óleos essenciais de *D. ambrosioides* – solo (DaSOE) e *M. pulegium* (MpOE) mostraram alta toxicidade durante todo o período de experimento ($p < 0.05$), como pode ser demonstrado na Tabela 13 e comparado aos parâmetros interpretados no Quadro 3. Um estudo demonstrou que terpenos como pulegona, terpinoleno e careno apresentam afinidade pelo receptor de tiramina, um alvo desejável porque está presente em insetos e ausente em humanos (OCAMPO; BRAZA; NELLAS, 2020).

Os resultados referentes ao teste com óleo essencial de *C. nitida* foram descartados, pois como pode ser visualizado na Tabela 13, pois ocorreram valores negativos após o cálculo da fórmula de Abbott, sendo incoerente para resultados de mortalidade.

Tabela 13. Resultado do ensaio de mortalidade sobre superfície tratada com massa de grãos.

Tratamento	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
CnOE	x	x	x	x	x
DaSOE	89,9 ± 4,66*	98,00 ± 4,2*	98,00 ± 4,2*	98,00 ± 4,2*	98,00 ± 4,2*
MpOE	98,3 ± 2,65*	100,0 ± 0,0*	100,0 ± 0,0*	100,0 ± 0,0*	100,0 ± 0,0*
Controle negativo	0,17 ± 0,41	1,00 ± 1,00	1,00 ± 1,00	1,00 ± 1,00	1,00 ± 1,00

CnOE = óleo essencial de *C. nitida* (1%) e veículo qsp 0,5 mL; DaEOS = óleo essencial de *D. ambrosioides* solo (1.0%) e veículo qsp 0,5 mL; MpOE = óleo essencial de *M. pulegium* (1%) e veículo qsp 0,5 mL; controle negativo (veículo) = DMSO 1% e água destilada qsp 0,5 mL, v/v. Resultados expressos pela média ± desvio padrão. X= resultado descartado. * = Não houve diferença estatística entre os resultados ($p < 0,05$).

5.4.3 Avaliação de perda de massa de grãos tratados

A avaliação de perda de massa de grãos é importante para determinar o potencial de um tratamento produzir o efeito de inapetência pelo inseto, visto que este controle melhora o rendimento total dos grãos.

A avaliação após 30 dias (Tabela 14) mostrou a melhor prevenção da perda de massa de grãos através dos tratamentos com o óleo essencial de *D. ambrosioides*- cultivo em solo e de *M. pulegium*, sendo que não houve diferença estatística entre os dois tratamentos. O óleo essencial de *C. nitida* não apresentou atividade, semelhante ao controle negativo, o qual era composto somente por acetona qsp 1 mL por repetição. Um estudo prévio utilizando extrato de sementes de *A. indica* (pó da planta a 5%, m/m) mostrou uma perda de massa de grãos de 0,17% após 30 dias; outra espécie, *Chrysanthemum cinerariaefolium* mostrou 0,07% de perda de massa de grãos (pó da planta a 5%, m/m) após 28 dias (SHIBERU, 2017). Estes resultados podem estar relacionados à interferência na taxa de reprodução do inseto, prevenindo o desenvolvimento de ninfas de primeiro instar e consequente aumento na densidade de população. Os resultados observados podem ser explicados por outro mecanismo; o de provocar inapetência em insetos herbívoros, os quais são diretamente afetados por metabólitos secundários produzidos pelas plantas como resposta de defesa. (VALCÁRCEL et al., 2021).

Tabela 14. Resultado do ensaio de perda de massa de grãos tratados após 30 dias.

Tratamento	Massa d ₀	Massa d ₃₀	% de perda de massa de grãos
CnOE	10,30 ± 0,78	10,08 ± 0,74	2,3 ± 0,82%
DaSOE	10,03 ± 0,23	9,92 ± 0,26	1,3 ± 0,52%*
MpOE	10,12 ± 0,52	10,02 ± 0,50	1,0 ± 0,63%*
Controle negativo	10,22 ± 0,39	9,97 ± 0,42	2,7 ± 0,52%

CnOE = óleo essencial de *C. nitida* 1% em acetona qsp 1 mL; DaEOS = óleo essencial de *D. ambrosioides* solo 1.0% em acetona qsp 1 mL; MpOE = óleo essencial de *M. pulegium* 1% em acetona qsp 1 mL; Controle negativo = acetona qsp 1 mL. Resultados expressos pela média ± desvio padrão. Foram realizadas 6 repetições para cada tratamento. * = Não houve diferença estatística entre os resultados ($p < 0,05$).

5.4.4 Atividade inseticida contra *B. brassicae*

O afídeo *B. brassicae* é considerado uma praga na agricultura, e junto com outras pragas, provocam perdas na colheita que variam entre 10 e 50%, sendo alvo constante de aplicação de produtos químicos inseticidas. Porém o seu uso prolongado acarreta em contaminação do solo, estimula a resistência do inseto, além de promover toxicidade para o consumo (PAVELA, 2006). Sendo assim, torna-se necessária a busca por novos tratamentos mais seguros e eficientes contra o *B. brassicae* no campo.

Os óleos essenciais de *C. nitida* e *M. pulegium* foram avaliados contra ninfas de 1º instar de *B. brassicae*. O óleo essencial de *D. ambrosioides* solo não foi avaliado, pois não havia volume suficiente para os bioensaios. Os tratamentos não demonstraram atividade similar ou superior ao controle positivo ($p < 0,05$), porém o seu uso poderia ser considerado, pois o óleo essencial de *C. nitida* provocou cerca de 50% de mortalidade e o óleo essencial de *M. pulegium* provocou cerca de 70% de mortalidade (Tabela 15). Estes resultados mostram que o óleo essencial composto majoritariamente por monoterpenos oxigenados apresenta maior potencial inseticida que o óleo essencial composto por monoterpenos hidrocarbonetos. O método utilizado avaliou o potencial inseticida aplicando o tratamento diretamente sobre o inseto, provocando morte por contato. Como o controle negativo foi semelhante ao controle ambiental, não foi aplicada a fórmula de Abbott sobre os resultados, sendo os mesmos expressos como porcentagem dos insetos mortos, sem considerar o controle negativo.

Tabela 15. Resultado de mortalidade após 24 h.

Tratamento	% após 24 h
CnOE	50,00 ± 18,71
MpOE	70,00 ± 17,32
Controle positivo	100,00 ± 0,00
Controle negativo	4,00 ± 5,48
Controle ambiental	0,00 ± 0,00

CnOE = óleo essencial de *C. nitida* (1%) em DMSO 1% e água qsp 0,75 mL; MpOE = óleo essencial de *M. pulegium* (1%) em DMSO 1% e água qsp 0,75 mL; Controle positivo = Citromax® 1.0% DMSO 1% e água qsp 0,75 mL; Controle negativo = DMSO 1% e água qsp 0,75 mL; controle ambiental = nenhum tratamento. Resultados expressos pela média ± desvio padrão. Foram realizadas 5 repetições para cada tratamento.

5.5 COMPARATIVO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA: SOLO *VERSUS* HIDROPÔNICO

5.5.1 Atividade repelente contra *S. zeamais*

Comparando a atividade repelente das amostras provenientes dos óleos essenciais dos dois cultivos foi possível observar que o óleo essencial de *D. ambrosioides*- hidropônico apresentou melhor desempenho em repelência. Este efeito deve-se possivelmente à presença do acetato de *t*-crisantenila, uma vez que o fito constituinte foi detectado somente na amostra cultivada por hidroponia. Em um primeiro momento, seria viável concluir que os dois compostos majoritários (α -felandreno e *p*-cimeno) seriam os responsáveis pela atividade repelente, porém estavam presentes em ambas as amostras. Outra hipótese seria que o acetato de *t*-crisantenila atuou sinergicamente ao α -felandreno e *p*-cimeno, promovendo melhor resposta em atividade repelente contra *S. zeamais*. O resultado negativo observado para DaSOE após 24 h significam que o tratamento apresentou mais atividade atrativa do que repelente, como visualizado no óleo essencial de *D. ambrosioides*-solo após 24 h (Tabela 16).

Tabela 16. Resultado do ensaio de repelência pelo método de escolha contra *S. zeamais*.

Tratamento	1 h	24 h
DaHiOE	3,10 ± 40,65	39,07 ± 41,45*
DaSOE	9,00 ± 17,92	-17,00 ± 11,60
Controle positivo	30,71 ± 13,92	40,97 ± 23,67*

Resultados expressos em porcentagem de repelência ± desvio padrão. DaHiOE = óleo essencial de *D. ambrosioides* – cultivo hidropônico; DaSOE = óleo essencial de *D. ambrosioides* – cultivo solo; Controle positivo = Citromax®. * = não houve diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$).

5.5.2 Atividade inseticida contra *S. zeamais*

5.5.2.1 Ensaio de mortalidade sobre superfície tratada com massa de grãos

Os óleos de *D. ambrosioides* – cultivo em solo (DaSOE) e *D. ambrosioides* – cultivo hidropônico (DaHiOE) mostraram alta atividade durante todo o período de experimento ($p < 0,05$), como pode ser demonstrado na Tabela 17. Não houve diferença estatística entre os óleos provenientes dos dois cultivos após 48 h. Portanto, pode-se afirmar que ambos os óleos essenciais de *D. ambrosioides* podem ser uma alternativa de controle de *S. zeamais* em grãos

armazenados. Estes dados completam a conclusão mostrada em um estudo anterior, onde foi avaliado o potencial inseticida por fumigação do óleo essencial de *D. ambrosioides* contendo 29,7% de ascaridol (CHU; FENG HU; LIU, 2011).

Tabela 17. Resultado do ensaio de mortalidade sobre superfície tratada com massa de grãos.

Tratamento	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
DaHiOE	54,3 ± 22,4	88,7 ± 21,10*	88,7 ± 21,10*	88,7 ± 21,10*	88,7 ± 21,10*
DaSOE	89,9 ± 4,66	98,00 ± 4,2*	98,00 ± 4,2*	98,00 ± 4,2*	98,00 ± 4,2*
Controle negativo	0,17 ± 0,41	1,00 ± 1,00	1,00 ± 1,00	1,00 ± 1,00	1,00 ± 1,00

DaHi= óleo essencial de *D. ambrosioides* – hidropônico(1,0%); DaS = óleo essencial de *D. ambrosioides* solo (1.0%); Pos = controle positivo (Citromax® 1.0%). Resultados expressos pela média ± desvio padrão. * = não ocorreu diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$).

5.5.3 Avaliação de perda de massa de grãos tratados

A avaliação de perda de massa de grãos é útil para calcular o quanto se pode prevenir o consumo de massa de grãos pelo inseto de forma quantitativa. Através do resultado, é possível mensurar o quanto de dano econômico pode ser prevenido pela perda de massa de grãos (CANEPPELE et al., 2003; G ANTUNES et al., 2011).

A avaliação após 30 dias (Tabela 18) demonstrou uma prevenção de perda de massa de grãos pelos tratamentos com o óleo essencial de *D. ambrosioides*- cultivo em solo e hidropônico, superiores ao mostrado pelo controle positivo.

Tabela 18. Resultado do ensaio de perda de massa de grãos tratados após 30 dias.

Tratamento	Massa d_0	Massa d_{30}	% de perda de massa de grãos
DaHiOE	10,33 ± 0,55	10,23 ± 0,55	1,0 ± 0,00%*
DaSOE	10,03 ± 0,23	9,92 ± 0,26	1,3 ± 0,52%*
Controle negativo	10,22 ± 0,39	9,97 ± 0,42	2,7 ± 0,52%

DaHIOE = óleo essencial de *D. ambrosioides* - hidropônico 1.0% em acetona qsp 1 mL por repetição; DaSOE = óleo essencial de *D. ambrosioides* solo 1.0% em acetona qsp 1 mL por repetição; MpOE = óleo essencial de *M. pulegium* 1% em acetona qsp 1 mL por repetição; controle negativo = acetona qsp 1 mL por repetição. Resultados expressos pela média ± desvio padrão. Foram realizadas 6 repetições para cada tratamento. * = não ocorreu diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$).

A inapetência do milho tratado pelo inseto pode ter sido provocada pela composição dos óleos essenciais, principalmente pela presença da substância *p*-cimeno, comum nos dois

tratamentos, e que já demonstrou atividade de inapetência contra insetos, como contra o besouro da batata, *Leptinotarsa decemlineata* (DE ELGUEA-CULEBRAS et al., 2017).

5.5.4 Atividade inseticida contra *B. brassicae*

O óleo essencial de *D. ambrosioides*- hidropônico foi avaliado contra ninfas de 1º instar de *B. brassicae*. O tratamento demonstrou atividade similar ao controle positivo ($p < 0,05$), mostrando potencial como inseticida contra *B. brassicae* (Tabela 19).

Comparando à interpretação sobre a porcentagem de mortalidade (Quadro 3), o óleo essencial de *D. ambrosioides*- cultivo hidropônico apresentou alta toxicidade contra os insetos, demonstrando potencial inseticida dos compostos voláteis para utilização em canteiros, especialmente em estufas ou sistemas fechados (MOTAZEDIAN et al., 2014). Essa ação inseticida pode ser atribuída ao efeito sinérgico do acetato de *trans*-crisantenila, um terpenoide, associado aos monoterpenos majoritários, α -terpineno e *p*-cimeno. Esta evidência pode ser confirmada por outro estudo, o qual mostrou forte atividade inseticida promovida pelos terpenos hidrocarbonetos (E)-cariofileno mirceneno e α -pineno, obtidos a partir do óleo das inflorescências de *Cannabis sativa*, testado contra *M. persicae*, um afídeo comum em brássicas (BENELLI et al., 2018).

Tabela 19. Resultado de mortalidade após 24 h.

Tratamento	% após 24 h
DaHiOE	86,00 \pm 13,42*
Controle positivo	100,00 \pm 0,00*
Controle negativo	4,00 \pm 5,48
Controle ambiental	0,00 \pm 0,00

DaHinOE = óleo essencial de *D. ambrosioides*- hidropônico 1% em DMSO a 1% e água qsp0,75 mL; controle positivo = Citromax® 1.0% em DMSO a 1% e água qsp0,75 mL; controle negativo = DMSO a 1% e água qsp0,75 mL; controle ambiental = nenhum tratamento. Resultados expressos pela média \pm desvio padrão.* = não ocorreu diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$). Foram realizadas 5 repetições para cada tratamento.

5.6 NANOEMULSÕES

Com o intuito de melhorar a solubilidade dos óleos essenciais estudados em água, melhorar a eficácia nos ensaios inseticidas e aumentar a estabilidade do produto foram desenvolvidas nanoemulsões dos óleos essenciais. Esta proposta também foi baseada em

publicações prévias mostrando o potencial da nanotecnologia no desenvolvimento de produtos inseticidas com maior atividade se comparado com o produto na sua forma bruta, como um extrato ou óleo volátil (HEYDARI et al., 2020; LOPES MARTINS et al., 2021; MASSOUD et al., 2018).

5.6.1 Solubilidade e pH dos óleos essenciais

Todos os óleos essenciais foram solúveis em etanol e em acetona, no primeiro dia (dia ₁) e ao final de 30 dias (dia ₃₀) nas concentrações avaliadas 10 µL/mL e 50 µL/mL. O pH dos óleos essenciais utilizados no desenvolvimento das nanoemulsões foram avaliados no dia 0, sendo a formulação com o óleo essencial de *M. pulegium* a mais ácida (Tabela 20).

Tabela 20. Valores de pH dos óleos essenciais.

Óleo essencial	pH	Temperatura (° C)
<i>C. nitida</i>	5,79	24,0
<i>D. ambrosioides</i> - cultivo hidropônico	6,77	24,0
<i>M. pulegium</i>	2,74	24,0

5.6.2 Caracterização

Para a obtenção das nanoemulsões foi eleita a técnica de emulsificação espontânea óleo em água (o/a), devido ao procedimento ser mais rápido e simples, pensando na sua posterior produção industrial, além de contribuir para a obtenção de produtos com melhor solubilidade em água, facilitando a aplicação pelo agricultor. Além disso, esta técnica demanda uma menor concentração de tensoativos comparado ao desenvolvimento de microemulsão, não necessitando de aquecimento. Este é um fator importante a ser considerado, para que mantenha a integridade da composição do óleo essencial (ASWATHANARAYAN; VITTAL, 2019).

Observando o tamanho do diâmetro médio de partícula das formulações (Tabela 21) é possível concluir que as formulações chegaram à escala nanométrica, abaixo de 200 nm (Figura 61).

Figura 61. Gráficos de distribuição de tamanho da nanoemulsão de A) *C. nitida*; B) *D. ambrosioides*- cultivo hidropônico; C) *M. pulegium*

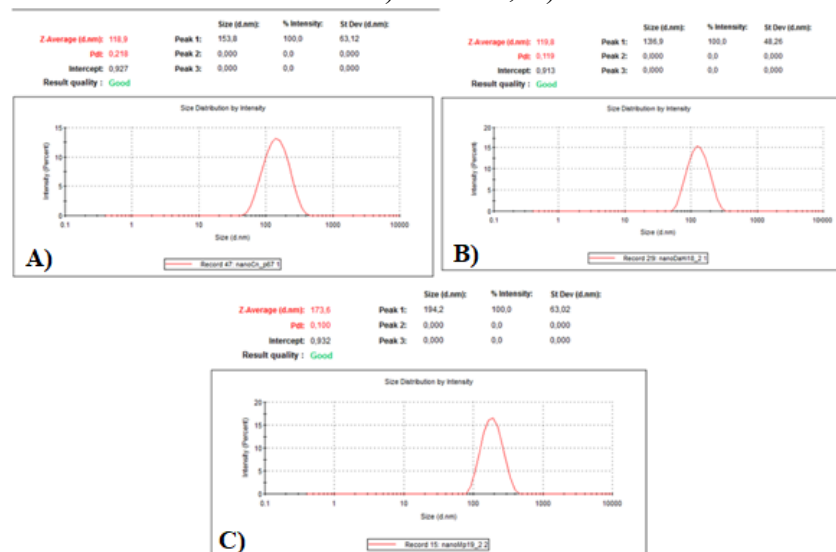


Tabela 21. Resultados da análise de tamanho de diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações contendo 1% de óleo essencial.

Nanoemulsão	pH		Diâmetro (nm)		Índice de polidispersão		Potencial zeta (mV)	
	D ₀	D ₃₀	D ₀	D ₃₀	D ₀	D ₃₀	D ₀	D ₃₀
<i>C. nitida</i>	7,25	6,35	158,51 ± 4,75	157,12 ± 4,17	0,094 ± 0,01	0,132 ± 0,00	-16,54 ± 6,01	-12,49 ± 6,01
<i>D. ambrosioides</i> - hidropônico	7,86	6,88	154,59 ± 15,52	148,39 ± 0,59	0,090 ± 0,04	0,109 ± 0,02	-26,15 ± 4,90	-24,99 ± 9,50
<i>M. pulegium</i>	5,11	4,13	203,45 ± 14,33	193,93	0,090 ± 0,04	0,06	-14,60 ± 0,70	-7,1

Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=3, exceto para a avaliação após 30 dias da nanoemulsão de *M. pulegium*, a qual foi analisada em uma única formulação). D₀ = representa o tempo zero; D₃₀ = representa a avaliação após 30 dias.

Para a análise do potencial *zeta* foi utilizada uma solução de NaCl 0,1 mM para auxiliar na diferença de condutividade elétrica. Os resultados das médias obtidas foram comparados em módulo, utilizando como referência os dados do Quadro 5 (BHATTACHARJEE, 2016; GROSS et al., 2016) e mostraram que as formulações apresentaram estabilidade, conforme os dados da tabela anterior. As formulações apresentaram valores de potencial zeta negativos, sendo formulações de pH básico. Sendo assim, a nanoemulsão de óleo essencial de *M. pulegium* apresentaram potencial *zeta* < 10, mesmo após 30 dias de estoque em geladeira.

Ocorreram diferenças de pH após 30 dias, devido à quebra gradual da nanoemulsão, mostrando pH's após 30 dias mais próximos dos valores de pH de cada óleo essencial bruto. Esses dados mostram que será necessário reavaliar a composição e concentração dos tensoativos utilizados, para melhorar a estabilidade das formulações.

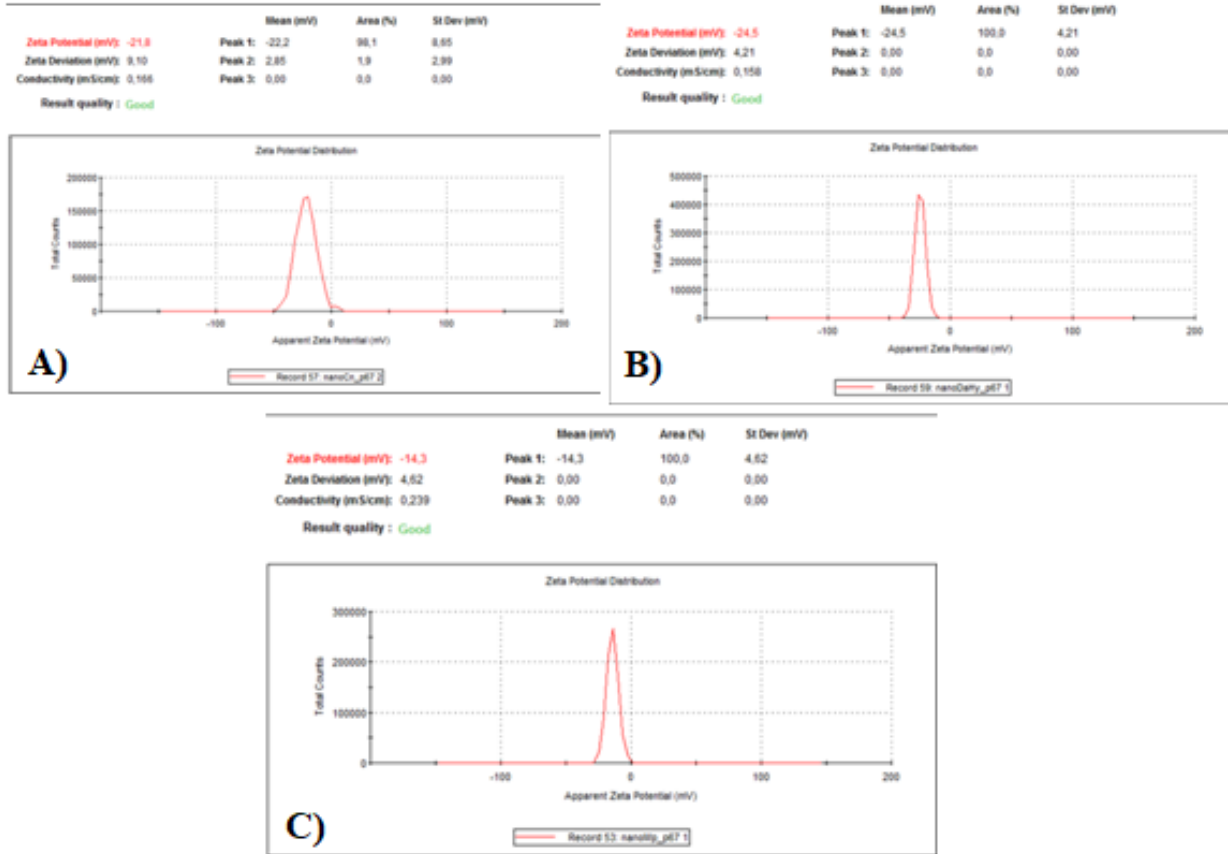
Quadro 5. Avaliação do potencial *zeta*.

Valor de potencial zeta (mV)	Avaliação
± 0 - 10	Muito instável
± 10 - 20	Relativamente estável
± 20 - 30	Moderadamente estável
± 30	Muito estável

Fonte: (BHATTACHARJEE, 2016)

Os resultados de PDI também foram comparados com literatura, onde o desejável seria $PDI \leq 0,1$ (levemente monodisperso), senão $PDI 0,1$ a $0,4$ = moderadamente disperso ou $PDI > 0,4$ (muito polidisperso) (BHATTACHARJEE, 2016). De acordo com essas informações, é possível comparar com os dados obtidos e afirmar que todas as formulações permaneceram monodispersas mesmo após 30 dias. Isto quer dizer que não ocorreu variação na morfologia da partícula (Figura 62).

Figura 62. Gráfico de distribuição do potencial zeta da nanoemulsão de A) *C. nitida*; B) *D. ambrosioides*- cultivo hidropônico; C) *M. pulegium*

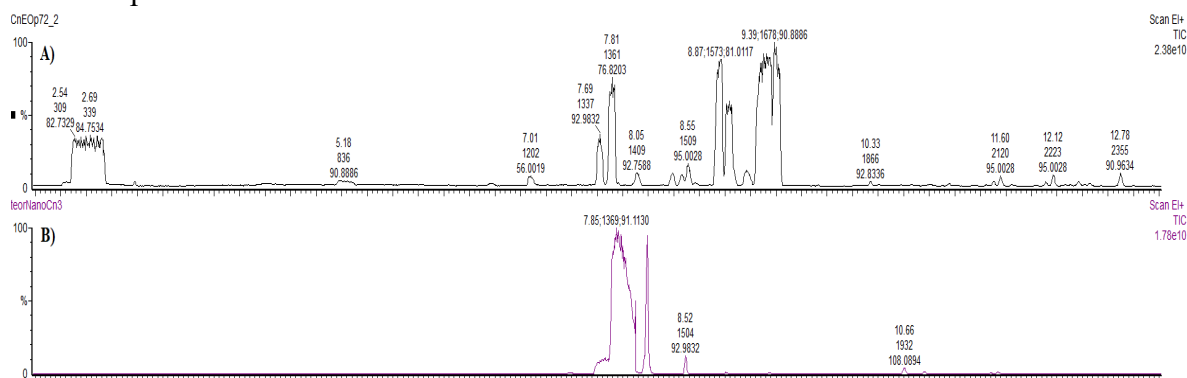


5.6.2.1 Teor de óleo essencial da nanoemulsão

Considerando que as amostras de óleo essencial de *D. ambrosioides*- cultivo hidropônico, *M. pulegium* e *C. nitida* utilizadas para o preparo das nanoemulsões haviam sido obtidas no segundo ano do doutorado, e as nanoemulsões preparadas há menos de um mês antes do *lockdown* da pandemia, optou-se por previamente avaliá-las por HS-CG-EM, no intuito de detectar possíveis alterações que pudessem ter ocorrido em sua composição química. As análises por HS-CG-EM (Figura 63) mostraram a presença de compostos voláteis na nanoemulsão, com diferenças se comparado à composição do óleo essencial inicial. Isto pode ser devido à resposta perante o contato com os solventes envolvidos no desenvolvimento da nanoemulsão ou instabilidade da composição após longo período de tempo (maior que 30 dias). Outra hipótese seria que os compostos oxigenados poderiam ter sido carregados juntamente com a fase aquosa no momento da secagem em rotaevaporador, restando na nanoemulsão os monoterpenos mais lipofílicos. Sobre o teor dos compostos voláteis na nanoemulsão, não foi possível avaliar devido às restrições de acesso ao laboratório por conta da pandemia. As análises foram realizadas tardiamente, não mostrando a real composição da formulação.

Através da análise dos cromatogramas do óleo essencial de *C. nitida* e da sua respectiva nanoemulsão foi possível observar a presença do composto Z-2,7-dimetiloct-3-em-5-ino (**60**) na nanoemulsão, provável produto de conversão dos compostos α -felandreno (**33**) e *p*-cimeno (**5**), presentes no óleo essencial inicial (Tabela 22).

Figura 63. Cromatogramas comparativos entre o óleo essencial de *C. nitida* e nanoemulsão, obtido por CG-EM.

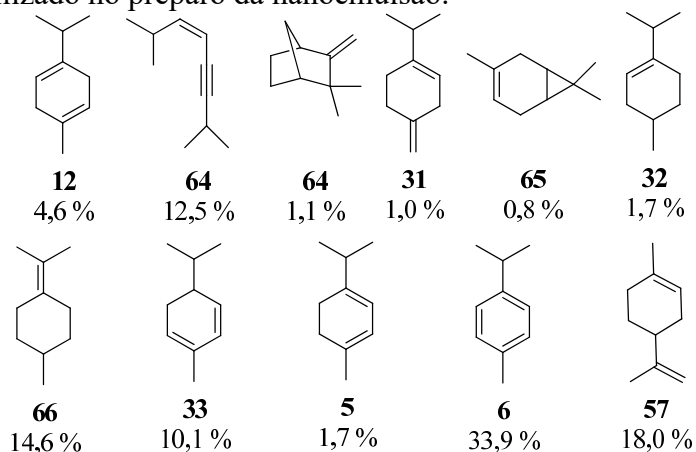


A) óleo essencial de *C. nitida*; B) nanoemulsão com óleo essencial de *C. nitida*.

Tabela 22. Composição do óleo essencial de *C. nitida* utilizado no preparo da nanoemulsão

IR	Tr (min)	Composto identificado	<i>m/z</i> Experimental	% área
1337	7,69	γ -terpineno	135,9725	4,59
1361	7,81	Z-2,7-Dimetiloct-3-en-5-ino	135,9434	12,46
1409	8,05	Canfeno	135,8902	1,12
1479	8,40	β -terpineno	135,9383	0,96
1497	8,49	3-Careno	135,8828	0,84
1509	8,55	<i>p</i> -ment-3-eno	137,9484	1,69
1573	8,87	<i>p</i> -ment-4-(8)-eno	137,9549	14,60
1590	8,95	α -felandreno	135,9491	10,15
1623	9,12	α -terpineno	135,9145	1,71
1656	9,28	<i>p</i> -cimeno	133,9412	33,92
1678	9,39	D-limoneno	135,9346	17,96

IR: Índice de retenção para coluna elite 5-ms; Tr: Tempo de retenção (minutos); *m/z*: relação massa/carga do fragmento abundante; porcentagem em área relativa.

Figura 64. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no óleo essencial de *C. nitida* utilizado no preparo da nanoemulsão.

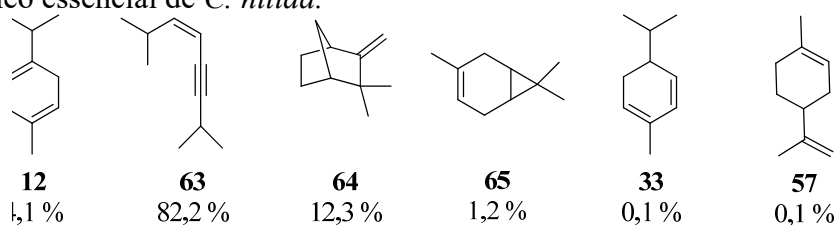
γ -terpineno, (Z)-2,7-dimetiloct-3-em-5-ino, canfeno, β -terpineno, 3-careno, *p*-ment-3-eno, *p*-ment-4-(8)-eno, α -felandreno, α -terpineno, *p*-cimeno e D-limoneno, respectivamente.

Através da comparação dos cromatogramas e dos dados compilados obtidos pelas análises do óleo essencial de *C. nitida* e sua respectiva nanoemulsão foi possível verificar que houve diferenças na composição volátil, tendo uma maior presença do composto Z-2,7-dimetiloct-3-em-5-ino na nanoemulsão (82,2%, conforme ilustrado na Figura 65), parecendo que houve a ruptura do ciclohexadieno devido à degradação da nanoemulsão (Tabela 22 e Tabela 23). Este evento ocorreu provavelmente pelo maior tempo de armazenamento (maior que 30 dias), visto que nos ensaios de caracterização da nanoemulsão, as mesmas apresentaram estabilidade após 30 dias.

Tabela 23. Composição da nanoemulsão com óleo essencial de *C. nitida*.

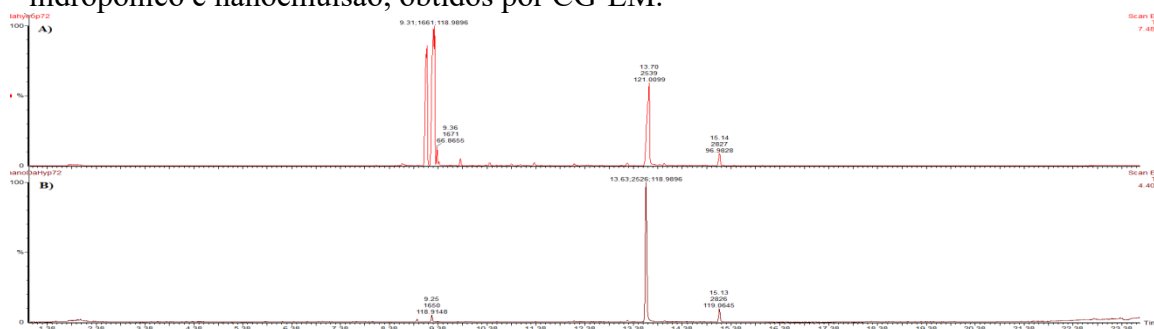
IR	Tr (min)	Composto identificado	m/z experimental	% área
1347	7,74	γ -terpineno	135,9530	4,07
1369	7,85	Z-2,7-Dimetiloct-3-en-5-ino	135,9721	82,21
1430	8,15	canfeno	135,9271	12,28
1504	8,52	3-Careno	135,9282	1,21
1583	8,92	α -felandreno	135,9532	0,12
1669	9,35	D-limoneno	135,9778	0,08
1687	9,44	1,3,8- <i>p</i> -mentatrieno	133,8917	0,02

IR: Índice de retenção para coluna elite 5-ms; Tr: Tempo de retenção (minutos); m/z: relação massa/carga do fragmento abundante; porcentagem em área relativa.

Figura 65. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados na nanoemulsão com óleo essencial de *C. nitida*.

γ -terpineno, (Z)-2,7-dimetiloct-3-em-5-ino, canfeno, 3-careno, α -felandreno e D-limoneno, respectivamente.

Através da análise comparativa do óleo essencial de *D. ambrosioides* e a sua respectiva nanoemulsão foi possível observar que houve uma conversão do β -terpinoleno em α -terpinoleno, provavelmente devido à degradação causada durante o longo prazo de armazenamento ou por não ter sido incorporado completamente na nanoemulsão (GADHAVE, 2014; MONTES DE OCA-ÁVALOS; CANDAL; HERRERA, 2017).

Figura 66. Cromatogramas comparativos entre o óleo essencial de *D. ambrosioides* - hidropônico e nanoemulsão, obtidos por CG-EM.

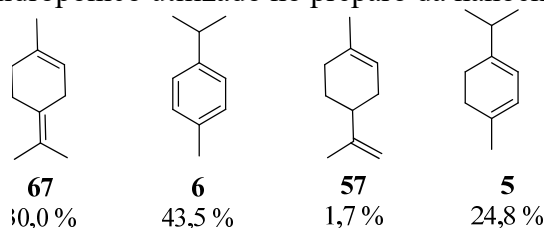
A) óleo essencial de *D. ambrosioides* - hidropônico; B) nanoemulsão com óleo essencial de *D. ambrosioides* - hidropônico.

Tabela 24. Composição do óleo essencial de *D. ambrosioides*- hidropônico utilizado no preparo da nanoemulsão.

IR	Tr (min)	Composto identificado	<i>m/z</i> Experimental	% área
1630	9,15	β -terpinoleno	135,9843	30,01
1661	9,31	<i>p</i> -cimeno	133,9569	43,46
1671	9,36	D-limoneno	136,0142	1,72
2539	13,70	α -terpineno	136,0050	24,81

IR: Índice de retenção para coluna elite 5-ms; Tr: Tempo de retenção (minutos); *m/z*: relação massa/carga do fragmento abundante; porcentagem em área relativa.

Figura 67. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no óleo essencial de *D. ambrosioides*- hidropônico utilizado no preparo da nanoemulsão.



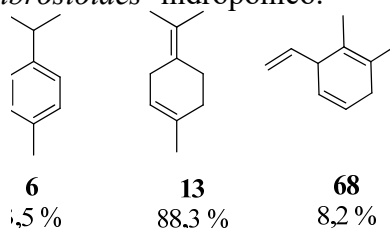
β -terpinoleno, *p*-cimeno, D-limoneno e α -terpineno, respectivamente.

Tabela 25. Composição da nanoemulsão com óleo essencial de *D. ambrosioides*

IR	Tr (min)	Composto identificado	<i>m/z</i> experimental	% área
1650	9,25	<i>p</i> -cimeno	134,0191	3,51
2526	13,63	α -terpinoleno	134,0415	88,27
2826	15,13	1,2-dimetil-3-vinil-1,4-ciclohexadieno	134,1431	8,22

IR: Índice de retenção para coluna elite 5-ms; Tr: Tempo de retenção (minutos); *m/z*: relação massa/carga do fragmento abundante; porcentagem em área relativa.

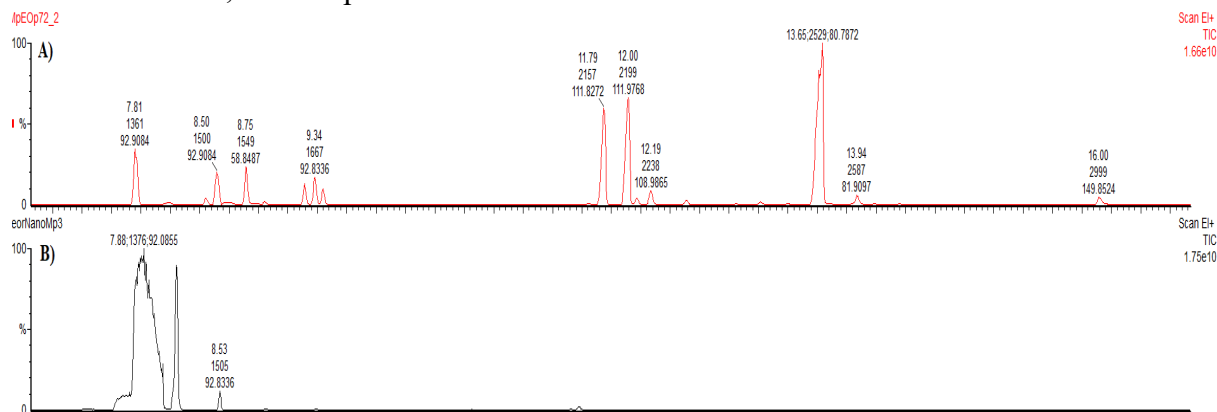
Figura 68. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados na nanoemulsão com óleo essencial de *D. ambrosioides*- hidropônico.



p-cimeno, α -terpinoleno e 1,2-dimetil-3-vinil-1,4-ciclohexadieno, respectivamente.

Através da avaliação dos cromatogramas obtidos pela análise do óleo essencial de *M. pulegium* e de sua nanoemulsão é possível concluir que houve a degradação dos compostos de maior tempo de retenção, restando apenas os compostos mais voláteis 3-careno, canfeno (obtido pela conversão do β -felandreno) e β -mirceno. Este evento pode ter ocorrido devido ao maior tempo de armazenamento antes da análise.

Figura 69. Cromatogramas comparativos entre o óleo essencial de *M. pulegium* e nanoemulsão, obtidos por CG-EM.



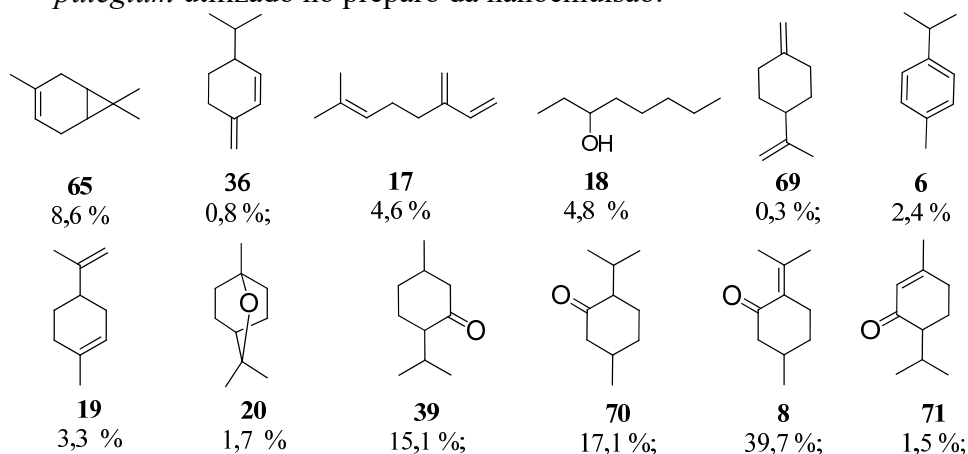
A) óleo essencial de *M. pulegium*; B) nanoemulsão com óleo essencial de *M. pulegium*.

Tabela 26. Composição do óleo essencial de *M. pulegium* utilizado no preparo da nanoemulsão.

IR	Tr (min)	Composto identificado	<i>m/z</i> Experimental	% área
1361	7,81	3-Careno	135,9389	8,64
1482	8,41	β -felandreno	135,9538	0,77
1500	8,50	β -mirceno	135,9851	4,61
1549	8,75	3-octanol	129,0232	4,78
1581	8,91	1 (7), 8- <i>p</i> - mentadieno	135,9390	0,28
1649	9,25	<i>p</i> -cimeno	133,9461	2,41
1667	9,34	L-limoneno	135,9611	3,34
1681	9,41	Eucaliptol	154,0487	1,73
2157	11,79	<i>p</i> -mentona	153,9753	15,10
2199	12,00	L-mentona	154,0022	17,14
2529	13,65	Pulegona	151,9621	39,69
2587	13,94	Isopiperitenona	151,9865	1,49

IR: Índice de retenção para coluna elite 5-ms; Tr: Tempo de retenção (minutos); *m/z*: relação massa/carga do fragmento abundante; porcentagem em área relativa.

Figura 70. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no óleo essencial de *M. pulegium* utilizado no preparo da nanoemulsão.



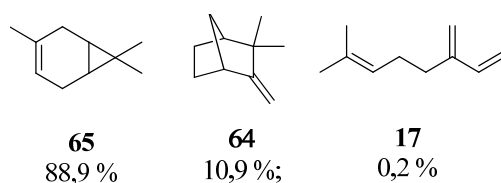
3-careno, β -felandreno, β -mirceno, 3-octanol, 1-(7), 8-*p*-mentadieno, *p*-cimeno, L-limoneno, eucaliptol, *p*-mentona, L-mentona, pulegona e isopiperitenona, respectivamente.

Tabela 27. Composição da nanoemulsão com óleo essencial de *M. pulegium*

IR	Tr (min)	Composto identificado	<i>m/z</i> Experimental	% área
1376	7,88	3-Careno	135,9747	88,95
1431	8,16	Canfeno	135,9527	10,89
1505	8,53	β -mirceno	135,9800	0,16

IR: Índice de retenção para coluna elite 5-ms; Tr: Tempo de retenção (minutos); *m/z*: relação massa/carga do fragmento abundante; porcentagem em área relativa.

Figura 71. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados na nanoemulsão com óleo essencial de *M. pulegium*.



3-careno, canfeno e β -mirceno, respectivamente.

A próxima etapa de avaliação da nanoemulsão deve ser a análise quantitativa dos compostos voláteis (teor), através da realização de curva de calibração utilizando padrões internos. As avaliações de degradação térmica e de estabilidade em diferentes pH e tempo de resistência à oxidação dependeriam da análise quantitativa. Por isso, não foi possível obter estes resultados nesta tese.

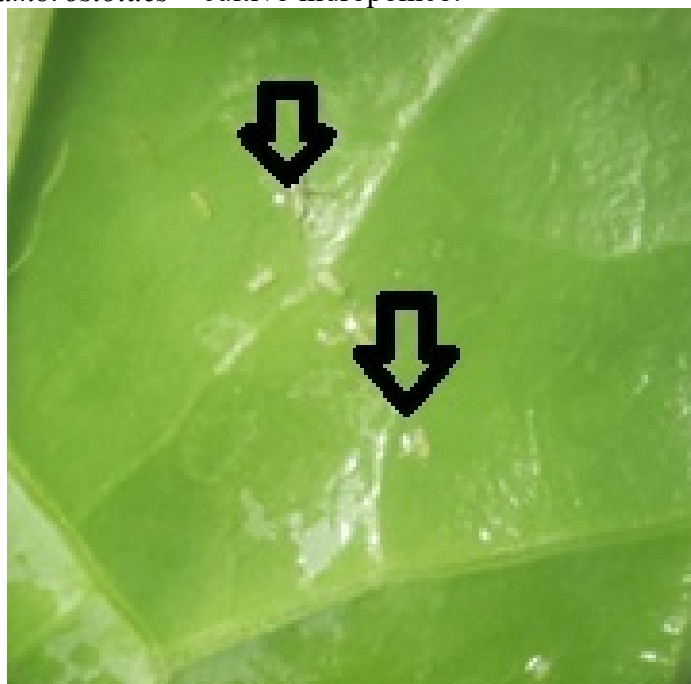
5.6.3 Comparação da atividade inseticida entre os óleos essenciais e nanoemulsões

Os bioensaios foram realizados na semana seguinte da formulação das nanoemulsões, portanto, os resultados serão interpretados considerando que a nanoemulsão apresentou a mesma composição química do seu respectivo óleo essencial.

5.6.3.1 Ensaio de mortalidade por toxicidade de contato.

O ensaio de toxicidade de contato foi realizado frente ao afídeo *B. brassicae*, conhecido popularmente como “pulgão-de-couve”, sendo uma das principais pragas que infestam verduras como couve-manteiga, brócolis e couve-flor. Esta praga é nativa da Europa, porém encontra-se presente globalmente. Este afídeo alimenta-se da seiva foliar, causando amarelecimento e perda das folhas, além de ser um vetor de doenças como vírus do mosaico (AHMED et al., 2020). Assim como o *B. brassicae*, outra espécie que apresenta o mesmo comportamento alimentar é o *L. pseudobrassicae*, o qual convive juntamente com o *B. brassicae* em folhas de brássicas. O interesse por descobrir novos tratamentos de controle deve-se principalmente ao aumento da taxa de reprodução destes insetos, provocadas pelo aumento do aquecimento global (VALCÁRCEL et al., 2021). O ensaio realizado contra *B. brassicae* apresentou atividade inseticida semelhante ao controle positivo com os tratamentos MpNE (96,0%), DaHiOE (86,0%) e CnNE (84,0%), conforme mostrado na Tabela 28. Além das amostras anteriores, foram avaliados dois hidrolatos, os subprodutos da hidrodestilação de *M. pulegium* e de *D. ambrosioides*- hidropônico, aplicados a 100% sobre a placa com os insetos *B. brassicae* (1 mL/ repetição), os quais também exibiram alta toxicidade após 24 h ($92,22 \pm 10,83\%$ e $90,28 \pm 9,93\%$, respectivamente). Os resultados dos bioensaios contra *L. pseudobrassicae* mostraram que os tratamentos DaHiOE (80,0%), DaHiNE (70,0%) e MpOE (80,0%) apresentaram atividade semelhante ao controle positivo ($p < 0,05$). O efeito do MpOE já era esperado, conforme literatura prévia, onde o óleo rico em pulegona (81,0%) mostrou efeito inseticida após 60 min, com LC_{50} 1,8 mg/mL (SAMPSON et al., 2005). Outro aspecto a ser observado é que a nanoemulsão com óleo essencial de *M. pulegium* não promoveu a mesma atividade, pois pela análise qualitativa observou-se que houve maior presença de *trans*-careno, e ausência de pulegona. De acordo com os dados exibidos, os tratamentos que exibiram melhor desempenho, de um modo geral, podem ser candidatos para o emprego sobre os afídeos *B. brassicae* e *L. pseudobrassicae* em canteiros de hortaliças, sobre folhas de couve e outras brássicas.

Figura 72. *L. pseudobrassicae* mortos após 24 h de tratamento com a nanoemulsão de óleo essencial de *D. ambrosioides* – cultivo hidropônico.



Fonte: O autor.

Tabela 28. Comparativo entre a atividade inseticida dos óleos essenciais *versus* nanoemulsões após 24 h.

Tratamento	Atividade contra <i>B. brassicae</i>		Atividade contra <i>L. pseudobrassicae</i>	
	Óleo essencial	Nanoemulsão	Óleo essencial	Nanoemulsão
<i>C. nitida</i>	50,0 ± 18,71	84,0 ± 16,73*	20,0 ± 21,21	30,0 ± 4,47
<i>D. ambrosioides</i> - hidropônico	86,0 ± 13,41*	20,0 ± 29,15	80,0 ± 7,07*	70,0 ± 7,07*
<i>M. pulegium</i>	70,0 ± 17,32	96,0 ± 5,48*	80,0 ± 10,0*	16,0 ± 5,48
Controle positivo (Citromax®)	100,0 ± 0,0*		92,0 ± 8,37*	
Controle negativo	4,0 ± 5,48		2,0 ± 4,47	
Controle ambiental	0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0	

Os resultados estão expressos pela média ± desvio padrão (n= 5 repetições, com 10 insetos/repetição). Os resultados foram analisados com ANOVA 1 via. CnOE = óleo essencial de *C. nitida*; CnNE = nanoemulsão com óleo essencial de *C. nitida*; DaHiOE = óleo essencial de *D. ambrosioides*- hidropônico; DaHiNE = nanoemulsão com óleo essencial de *D. ambrosioides* - hidropônico; MpOE = óleo essencial de *M. pulegium*; MpNE = nanoemulsão com óleo essencial de *M. pulegium*; * = significativamente diferente que o controle negativo (p < 0,05) e atividade similar ao controle positivo (extrato de Neem Citromax®).

Observando as diferenças de atividade inseticida entre os tratamentos – óleo volátil e a nanoemulsão de *C. nitida* e *M. pulegium* – foi possível concluir que o efeito superior da nanoemulsão pode ser explicado pela redução no tamanho da partícula, acelerando a penetração através da cutícula do inseto (KASAI et al., 2014).

6 CONCLUSÕES

Através dos materiais vegetais obtidos foi possível extrair e caracterizar os óleos essenciais de *D. ambrosioides*, *C. nitida* e *M. pulegium*. Quanto à espécie *D. ambrosioides*, foi realizado um estudo de cultivo hidropônico, no intuito de avaliar o tempo de crescimento da planta, assim como o seu desenvolvimento e a produção de metabólitos secundários, com foco nas substâncias presentes no óleo volátil. A espécie mostrou desenvolvimento satisfatório, assim como a produção de compostos voláteis, mostrando que o cultivo hidropônico pode ser um candidato de método alternativo ao cultivo convencional de *D. ambrosioides*. Além disso, é possível concluir que *D. ambrosioides* apresentou uma composição química diferente da fração volátil, comparado com estudos avaliando a mesma espécie, porém cultivada em diferentes localidades do Brasil e de outros países.

Além disso, os óleos essenciais das espécies vegetais investigadas mostraram potencial repelente e inseticida contra *S. zeamais*, principalmente o óleo essencial de *D. ambrosioides* e *M. pulegium*. Os óleos essenciais de *D. ambrosioides* – cultivo hidropônico mostrou potencial atividade inseticida contra *B. brassicae* e este mesmo óleo essencial, assim como o óleo essencial de *M. pulegium* apresentou atividade satisfatória contra *L. pseudobrassicae*, os quais convivem e se alimentam do mesmo substrato vegetal, em folhas de brássicas como couve e brócolis. Sendo assim, o óleo essencial que mostrou desempenho satisfatório para ambos os afídeos poderia ser um candidato para o uso na agricultura orgânica.

Como etapa final desta pesquisa, era esperado obter, caracterizar e avaliar a atividade inseticida das nanoemulsões contra os afídeos *B. brassicae* e *L. pseudobrassicae*, obtidas a partir dos óleos essenciais de *D. ambrosioides*- cultivo hidropônico, *C. nitida* e *M. pulegium*, porém não foi possível realizar todas as etapas de forma linear, comprometendo os resultados obtidos. No entanto, foi possível concluir que as espécies estudadas podem oferecer materiais vegetais para a obtenção de óleos essenciais, assim como serem empregados em pesquisa futuras na busca por novos produtos inseticidas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

✓ Os resultados obtidos sobre *D. ambrosioides*, como a comparação dos cultivos em relação à composição química do óleo essencial e do extrato bruto obtido pela água de cocção, assim como a atividade inseticida e repelente contra *S. zeamais* foram publicados em 2022, na Revista Brasileira de Farmacognosia (FRANKENBERGER et al., 2022b);

✓ Os óleos essenciais de *D. ambrosioides* – cultivo solo e hidropônico e o óleo essencial de *M. pulegium* mostraram grande potencial na prevenção da perda de massa de grãos estocados, sendo necessário um novo estudo de aplicação prática em silos e consequente avaliação econômica;

✓ Foi possível iniciar o desenvolvimento preliminar de nanoemulsões utilizando tensoativos biodegradáveis, e que mostraram potencial em atividade inseticida contra *B. brassicae* e *L. pseudobrassicae*, principalmente a nanoemulsão contendo o óleo essencial de *D. ambrosioides*- hidropônico, eficaz contra ambas as espécies de afídeos. Estes resultados, assim como a composição química dos óleos essenciais de *C. nitida* e *M. pulegium* foram reunidos em manuscrito e submetidos à publicação;

✓ No entanto, para obter mais informações sobre a estabilidade destas nanoemulsões, seria necessário realizar ensaios sobre a sua permanência no ambiente, estabilidade térmica e frente a diferentes condições de luz e pH, visando a obtenção de um produto estável, eficaz e acessível aos agricultores.

REFERÊNCIAS

- ABDELLI, M.; MOGHRANI, H.; ABOUN, A.; MAACHI, R. Algerian *Mentha pulegium* L. leaves essential oil: Chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 197–205, 2016.
- ABREU, F. O. M. S.; OLIVEIRA, E. F.; PAULA, H. C. B.; DE PAULA, R. C. M. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1277–1282, 2012.
- ABROL, D. P.; SHANKAR, U. Pesticides, food safety and integrated pest management. **Integrated Pest Management: Pesticide Problems**, Vol.3. Springer Netherlands, p. 167–199, 2014.
- ACHEUK, F.; BASIOUNI, S.; SHEHATA, A. A.; DICK, K.; HAJRI, H.; LASRAM, S. et al. Status and prospects of botanical biopesticides in Europe and Mediterranean countries. **Biomolecules**, v. 12, n. 2, p. 1–30, 2022.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4th ed. Allured Pub. Corp, 2007.
- OJO, J. A.; OMOLOYE, A. A. Rearing the maize weevil, *Sitophilus zeamais*, on an artificial maize-cassava diet. **Journal of Insect Science**, v. 12, 2011.
- ADEOSUN, O. I.; OLANIYI, K. S.; AMUSA, O. A.; ZIMOH, G. Z.; ONIYIDE, A. A. Methanolic extract of *Cola nitida* elicits dose-dependent diuretic, natriuretic and kaliuretic activities without causing electrolyte impairment, hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 9, n. 6, p. 231–239, 2017.
- AHMADI, F.; SAMADI, A.; SEPEHR, E.; RAHIMI, A.; SHABALA, S. Improving essential oil compositions of purple cone ower (*Echinacea purpurea* L.) medicinal plant using novel growing media and nutrition pattern in hydroponics. **Research Square**, p. 1–22, 2021.
- AHMED, M.; PEIWEN, Q.; GU, Z.; LIU, Y.; SIKANDAR, A.; HUSSAIN, D. et al. Insecticidal activity and biochemical composition of *Citrullus colocynthis*, *Cannabis indica* and *Artemisia argyi* extracts against cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae* L.). **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.
- AIRES, A. Hydroponic Production Systems: Impact on Nutritional Status and Bioactive Compounds of Fresh Vegetables. **Vegetables - Importance of Quality Vegetables to Human Health**, cap. 4, 2018.
- BRAHIM, M. A. S.; FADHI, M.; HASSANI, L.; BOULAY, B.; MARLOUK, M.; BEKKOUCHE, K. et al. *Chenopodium ambrosioides* var. *ambrosioides* used in Moroccan traditional medicine can enhance the antimicrobial activity of conventional antibiotics. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 37–43, 2015.
- AKBARI, S.; NOUR, A. H. Emulsion types, stability mechanisms and rheology: A review. **International Journal of Innovative Research and Scientific Studies**, v. 1, n. 1, p. 11–17, 2018.

ALI, B.; AL-WABEL, N. A.; SHAMS, S.; AHAMAD, A.; KHAN, S. A.; ANWAR, F. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 8, p. 601–611, 2015.

ALMADIY, A. A. Chemical profile, mosquitocidal, and biochemical effects of essential oil and major components of *Dysphania ambrosioides* against *Culex quinquefasciatus* Say. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 33, p. 41568–41576, 2020.

ASOGWA, E. U.; ADEDEJI, A. R.; OYEDOKUN, A. V.; OTUONYE, A. H.; MOKWUNYE, F. C.; AGBONGIARHUOYI, A. E. Strategies for Improving Production and Storage of Kolanuts in Nigeria. v. 12, n. 1, p. 37–43, 2012.

ASWATHANARAYAN, J. B.; VITTAL, R. R. Nanoemulsions and Their Potential Applications in Food Industry. **Frontiers in Sustainable Food Systems**. v. 3, n. 95, 2019.

ATANASOV, A. G.; ZOTCHEV, S. B.; DIRSCH, V. M. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 200–216, 2021.

AWADH ALI, N. A.; WURSTER, M.; LINDEQUIST, U.; WESSJOHAN, L. Essential oil composition from oleogum resin of Soqotraen *Commiphora kua*. **Records of Natural Products**, v. 2, n. 3, p. 70–75, 2008.

AZIZ, E. E.; CRAKER, L. E. Essential oil constituents of peppermint, pennyroyal, and apple mint grown in a desert agrosystem. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, v. 15, n. 4, p. 361–367, 2009.

BARRADAS, T. N.; DE HOLANDA E SILVA, K. G. Nanoemulsions as Optimized Vehicles for Essential Oils. n. May, p. 115–167, 2020.

BAYER, C. S. Safety data sheet section 1: identification of the substance/mixture and of the company/undertaking 1.1. Product identifier Requiem EC. Disponível em: <https://www.fishersci.se/chemicalProductData_uk/wercs?itemCode=11448942&lang=EN>.

BEIRÃO-DA-COSTA, S.; DUARTE, C.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; JANUÁRIO, M. I. N.; VICENTE, A. A. et al. Inulin potential for encapsulation and controlled delivery of *Oregano* essential oil. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 2, p. 199–206, 2013.

BENELLI, G.; PAVELA, R.; PETRELLI, R.; CAPPELLACCI, L.; SANTINI, G.; FIORINI, D. The essential oil from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) by-products as an effective tool for insect pest management in organic crops. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 308–315, 2018.

BENELLI, G.; PAVELA, R.; CIANFAGLIONE, K.; SENDER, J.; DANUTA, U.; MAŚLANKO, W. et al. Ascaridole-rich essential oil from marsh rosemary (*Ledum palustre*) growing in Poland exerts insecticidal activity on mosquitoes, moths and flies without serious effects on non-target organisms and human cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 138, n. 111184, p. 1-10, 2020.

BENLARBI, K. H.; ELMTILI, N.; MACÍAS, F. A.; GALINDO, J. C. G. Influence of in vitro growth conditions in the production of defence compounds in *Mentha pulegium* L. **Phytochemistry Letters**, v. 8, n. 1, p. 233–244, 2014.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.

BOSSOU, A. D.; MANGELINCKX, S.; YEDOMONHAN, H.; BOKO, P. M.; AKOGBETO, M. C.; DE KIMPE, N., et al. Chemical composition and insecticidal activity of plant essential oils from Benin against *Anopheles gambiae* (Giles). **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 1, 2013.

BOTTON, M.; LORINI, I.; LOECK, A. E.; AFONSO, A. P. S. O gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) como praga em frutíferas de clima temperado Circular técnica, Embrapa, 2005.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241–251, 2004.

BUYEYE, Z.; LAGERWALL, G.; SENZANJE, A.; CLULOW, A.; SIBANDA, S. Evaluation of the Resource Use Efficiencies of Small-Scale Vertical Hydroponic Structures against Growing Plants in Soil. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 27, n. 1, p. 60–68, 2022.

CAN BAŞER, K. H.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: Science, technology, and applications**, 975 p., 2010.

CANEPPELE, M. A. B.; CANEPPELE, C.; LÁZZARI, F. A.; LÁZZARI, S. M. N. Correlation between the infestation level of *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera, Curculionidae) and the quality factors of stored corn, *Zea mays* L. (Poaceae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47, n. 4, p. 625–630, 2003.

CAVALLI, J. F.; TOMI, F.; BERNARDINI, A. F.; CASANOVA, J. Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and ¹³C-NMR spectroscopy: Quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. **Phytochemical Analysis**, v. 15, n. 5, p. 275–279, 2004.

CECOTTI, R.; BERGOMI, P.; CARPANA, E.; TAVA, A. Chemical characterization of the volatiles of leaves and flowers from cultivated *Malva sylvestris* var. *mauritanica* and their antimicrobial activity against the aetiological agents of the European and American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). **Natural Product Communications**, v. 11, n. 10, p. 1527–1530, 2016.

CHAABAN, A.; RICHARDI, V. S.; CARRER, A. R.; BRUM, J. S.; CIPRIANO, R. R.; MARTINS, C. E. N. et al. Insecticide activity of *Curcuma longa* (leaves) essential oil and its major compound α -phellandrene against *Lucilia cuprina* larvae (Diptera: Calliphoridae): Histological and ultrastructural biomarkers assessment. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 153, p. 17–27, 2019.

CHERAGHI NIROUMAND, M.; FARZAEI, M. H.; KARIMPOUR-RAZKENARI, E. E.; AMIN, G.; KHANAVI, M.; AKBARZADEH, T. et al. An evidence-based review on medicinal plants used as insecticide and insect repellent in traditional Iranian medicine. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 18, n. 2, 2016.

CHERRAT, L.; ESPINA, L.; BAKKALI, M.; PAGÁN, R.; LAGLAOUI, A. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha* Scheele essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined processes. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 22, p. 221–229, 2014.

CHOUGOUROU, D. C.; AGOSSA, C. H.; ZOCLANCLOUNON, Y. A. B.; NASSARA, M. G.; AGBAKA, A. Efficacy of two plant powders as cowpea grain protectants against *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera, Chrysomelidae: Bruchinae). **Journal of Applied Biosciences**, v. 105, n. 1, p. 10152 - 10156, 2016.

CHU, S. S.; FENG HU, J.; LIU, Z. L. Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Pest Management Science**, v. 67, n. 6, p. 714–718, 2011.

CHU, Y.; LI, W.; HAN, J.; MO, H.; LI, X.; ZHOU, S. Determination and pharmacokinetics of ascaridole in rat plasma by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 3, p. 997–1000, 2008.

CIESLA, W. M. Products of Resin Processing. **Forest and Forest Plants**, v. II, p. 344, 2009.

COITINHO, R. L. B. C.; OLIVEIRA, J. V.; GONDIM JUNIOR, M. G. C.; CÂMARA, C. A. G. Efeito residual de inseticidas naturais no controle de *Sitophilus zeamais* Mots. em milho armazenado. **Revista Caatinga**, v. 19, n. 2, p. 183–191, 2006.

DAH-NOUVLESSOUNON, D. ADOUKONOU-SAGBADJA, H.; NAFAN, D.; ADJANOHOON, A.; NOUMAVO, P. A.; SINA, H. et al. Morpho-agronomic variability of three kola trees accessions [*Cola nitida* (Vent.) Schott et Endl., *Cola acuminata* (P. Beauv.) Schott et Endl., and *Garcinia kola* Heckel] from Southern Benin. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 63, n. 3, p. 561–579, 2016.

DAMALAS, C. A.; ELEFTHEROHORINOS, I. G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 5, p. 1402–1419, 2011.

DANGA, S. P. Y.; NUKENINE, E. N.; FOTSO, G. T.; ADLER, C. Use of NeemPro®, a neem product to control maize weevil *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae) on three maize varieties in Cameroon. **Agriculture and Food Security**, v. 4, n. 1, p. 1–7, 2015.

DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 4022–4034, 2009.

DAYANI, S.; SABZALIAN, M. R. Production of Secondary Metabolites in Medicinal Plants through Hydroponic Complementary Contributor Copy. **Controlled Environment**

Agriculture, p. 34–51, 2017.

DE ARAÚJO, A. M. N.; DE OLIVEIRA, J. V.; FRANÇA, S. M.; NAVARRO, D. A. F.; BARBOSA, D. R. S.; DUTRA, K. A. Toxicity and repellency of essential oils in the management of *Sitophilus zeamais*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 23, n. 5, p. 372–377, 2019.

DE CARVALHO, A. A.; BERTOLUCCI, S. K. V.; SILVA, S. T.; PINTO, J. E. B. P. Growth and volatiles in the micropropagation of Santa Maria herb. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 49, n. 4, p. 624–635, 2018.

DE ELGUEA-CULEBRAS, G. O.; SÁNCHEZ-VIOQUE, R.; BERRUGA, M. I.; HERRAIZ-PEÑALVER, D.; SANTANA-MÉRIDAS, O. Antifeedant effects of common terpenes from mediterranean aromatic plants on *Leptinotarsa decemlineata*. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 17, n. 2, p. 475–485, 2017.

DEGENHARDT, R. T.; FARIAS, I. V.; GRASSI, L. T.; FRANCHI, G. C.; NOWILL, A. E.; BITTENCOURT, C. M. DA S.; WAGNER, T. M. et al. Characterization and evaluation of the cytotoxic potential of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p. 56–61, 2016.

DEGU, S.; BERIHUN, A.; MULUYE, R.; GEMEDA, H.; DEBEBE, E.; AMANO, A. et al. Medicinal plants that used as repellent, insecticide and larvicide in Ethiopia. **Pharmacy & Pharmacology International Journal**, v. 8, n. 5, p. 274–283, 2020.

DENLOYE, A. MAKANJUOLA, W.; TESLIM, O.; ALAFIA, O.; KASALI, A.; ESHILOKUN, A. et al. Toxicity of *Chenopodium ambrosioides* l. (Chenopodiaceae) products from nigeria against three storage insects. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, n. 3, p. 379–384, 2010.

DIAS, D. DE O.; COLOMBO, M.; KELMANN, R. G.; DE SOUZA, T. P.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. F. et al. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. **Analytica Chimica Acta**, v. 721, p. 79–84, 2012.

EL ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; AIT ADDI, E. H.; CASABIANCA, H. et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, 2015.

ESIMONE, C. O.; ADIKWU, M. U.; NWORU, C. S.; OKOYE, F. B. C.; ODIMEGWU, D. C. Adaptogenic potentials of *Camellia sinensis* leaves, *Garcinia kola* and *Kola nitida* seeds. **Scientific Research and Essays**, v. 2, n. 7, p. 232–237, 2007.

FAJINMI, O. O.; OLAREWAJU, O. O. Africa, its people, culture and traditional medicine. v. 3, n. September, p. 157–230, 2017.

FAKRUDDIN, M.; HOSSAIN, Z.; AFROZ, H. Prospects and applications of nanobiotechnology: A medical perspective. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 10, p. 1–8, 2012.

FARMACOPÉIA, A. N. D. V. S. Farmacopeia Brasileira. **Farmacopeia Brasileira, 6ª edição Plantas medicinais**, v. 1, p. 1–873, 2019.

FENG, J.; ZHANG, Q.; LIU, Q.; ZHU, Z.; MCCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. **Application of Nanoemulsions in Formulation of Pesticides**, Elsevier Inc., 2018.

FERNANDES, C. P.; DE ALMEIDA, F. B.; SILVEIRA, A. N.; GONZALEZ, M. S.; MELLO, C. B.; FEDER, D. et al. Development of an insecticidal nanoemulsion with *Manilkara subsericea* (Sapotaceae) extract. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2014.

FIGUEIREDO, R. C.; ROCHA, W. C.; FREITAS, A. D. G. DE. Efeito Inseticida do Óleo Essencial e Extratos Etanólicos das Folhas de Mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.) Sobre o Gorgulho do Milho (*Sitophilus zeamais* Mots). **Ensaio e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 22, n. 2, p. 80, 2019.

FRANKENBERGER, Larissa. **Terpenos de oleoresina de *Cola nitida* (Vent.) Schott & Endl. (Malvaceae): caracterização, semissíntese, avaliação antiprotozoária e anti-inflamatória in vitro**. 2017. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

FRANKENBERGER, L.; D. MORA, T.; DE SIQUEIRA, C. D.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; DE MORAES, M. H.; BIAVATTI, M.W. et al. UPLC-ESI-QTOF-MS2 characterisation of *Cola nitida* resin fractions with inhibitory effects on NO and TNF- α released by LPS-activated J774 macrophage and on *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 6, p. 577–589, 2018.

FRANKENBERGER, L.; ROVER, S.; DA SILVA, T. L.; FAITA, M. R.; BARCELOS-OLIVEIRA, J. L.; POLTRONIERI, A. S.; MEYRE-SILVA, C. et al. Chemical composition of *Dysphania ambrosioides* from hydroponics and soil and its activity against *Sitophilus zeamais*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 32, n. 2, p. 230–237, 2022.

FUENTES-BAZAN, S.; UOTILA, P.; BORSCH, T. A novel phylogeny-based generic classification for *Chenopodium* sensu lato, and a tribal rearrangement of Chenopodioideae (Chenopodiaceae). **Willdenowia**, v. 42, n. 1, p. 5–24, 2012.

FURLANI, P. R. Hydroponic vegetable production in Brazil. **Acta Horticulturae**, v. 481, p. 777–778, 1999.

ANTUNES, L. E. G.; VIEBRANTZ, P. C.; GOTTARDI, R. D.; DIONELLO, R. G. Características físico-químicas de grãos de milho atacados por *Sitophilus zeamais* durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 6, p. 5, 2011.

GADHAVE, A. D. Nanoemulsions: Formation, Stability and Applications. **International Journal for Research in Science & Advanced Technologies**, n. 3, p. 38–43, 2014.

GASCO, M.; GALLARATE, M.; PATTARINO, F. In vitro permeation of azelaic acid from viscosized microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 69, p. 193–196, 1991.

GILLE, L.; MONZOTE, L.; STAMBERG, W.; STANIEK, K. Toxicity of ascaridole from *Chenopodium ambrosioides* in mammalian mitochondria. **BMC Pharmacology**, v. 10, n. S1, 2010.

GROSS, J.; SAYLE, S.; KAROW, A. R.; BAKOWSKY, U.; GARIDEL, P. Nanoparticle tracking analysis of particle size and concentration detection in suspensions of polymer and protein samples: Influence of experimental and data evaluation parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 104, p. 30–41, 2016.

HARRAZ, F. M.; HAMMODA, H.; EL GHAZOULY, M. G.; EL-ASWAD, A. F.; BASSAM, S. M. Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of the essential oils of *Conyza linifolia* and *Chenopodium ambrosioides*. **Natural Product Research**, v. 29, n. 9, p. 879–882, 2015.

HEIMLER, D.; ROMANI, A.; IERI, F. Plant polyphenol content, soil fertilization and agricultural management: a review. **European Food Research and Technology**, v. 243, n. 7, p. 1107–1115, 2017.

HEYDARI, M.; AMIRJANI, A.; BAGHERI, M.; SHARIFIAN, I.; SABAHI, Q. Eco-friendly pesticide based on peppermint oil nanoemulsion: preparation, physicochemical properties, and its aphicidal activity against cotton aphid. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 6, p. 6667–6679, 2020.

ISMAN, M. B. Bioinsecticides based on plant essential oils: A short overview. **Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 75, n. 78, p. 179–182, 2020a.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides in the twenty-first century-fulfilling their promise? **Annual Review of Entomology**, v. 65, p. 233–249, 2020.

IZZO, F. C.; LODI, G. C.; VÁZQUEZ DE ÁGREDOS PASCUAL, M. L. New insights into the composition of historical remedies and pharmaceutical formulations: the identification of natural resins and balsams by gas chromatographic-mass spectrometric investigations. **Archaeological and Anthropological Sciences**, v. 13, n. 1, 2021.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 123–127, 2015.

KASAI, S. KOMAGATA, O.; ITOKAWA, K.; SHONO, T.; NG, L. C.; KOBAYASHI, M. et al. Mechanisms of Pyrethroid Resistance in the Dengue Mosquito Vector, *Aedes aegypti*: Target Site Insensitivity, Penetration, and Metabolism. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, 2014.

KASALI, A. A.; EKUNDAYO, O.; PAUL, C.; KÖNIG, W. A.; ESHILOKUN, A. O.; IGE, B. 1,2:3,4-diepoxy-p-menthane and 1,4-epoxy-p-menth- 2-ene: Rare monoterpenoids from the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. var. *ambrosioides* leaves. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 1, p. 13–15, 2006.

KOUL, O.; WALIA, S.; DHALIWAL, G. Essential oils as green pesticides: Potential and Constraints. **Biopesticides International**, v. 4, n. 1, p. 63–84, 2008.

KUMAR, K.; CHAPMAN, R. B. Toxicity of insecticides to cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* L. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**, v. 12, n. 1, p. 55–58, 1984.

KUMAR, P.; MISHRA, S.; MALIK, A.; SATYA, S. Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 802–817, 2011.

LANGSI, D. J.; TOFEL, H. K.; FOKUNANG, C. N.; SUH, C.; ELOH, K.; CABONI, P. et al. Insecticidal activity of essential oils of *Chenopodium ambrosioides* and *Cupressus sempervirens* and their binary combinations on *Sitophilus zeamais*. **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 24–34, 2018.

LI, J.; CHANG, J. W.; SAENGER, M.; DEERING, A. et al. Thymol nanoemulsions formed via spontaneous emulsification: Physical and antimicrobial properties. **Food Chemistry**, v. 232, p. 191–197, 2017.

LI, Y.; KONG, D.; FU, Y.; SUSSMAN, M. R.; WU, H. et al. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, n. June 2019, p. 80–89, 2020.

LIMA-MENDONÇA, A.; BROGLIO, S.M.F.; ARAÚJO, A.M.N.; DE LOPES, D.O.P.; DIAS-PINI, N.S. Efeito de pós vegetais sobre *Sitophilus zeamais* (Mots., 1855) (Coleoptera: Curculionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 1, p. 91–97, 2013.

LLORENS-MOLINA, J. A.; VACAS, S.; CASTELL, V.; NÉMETH-ZÁMBORINÉ, É. Variability of essential oil composition of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) affected by plant organ. **Journal of Essential Oil Research**, v. 29, n. 1, p. 11–21, 2017.

LOPES MARTINS, R.; RODRIGUES, A. B. L.; RABELO, É. M.; SANTOS, L. L.; BRANDÃO, L. B.; GOMES, C. F. et al. Development of larvicide nanoemulsion from the essential oil of *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng against *Aedes aegypti*, and its toxicity in non-target organism. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 6, 2021.

LOWOR, S.; ACULEY, P.; ASSUAH, M. Analysis of some quality indicators in cured *Cola nitida* (Vent). **Agriculture and Biology Journal of North America**, v. 1, n. 6, p. 1206–1214, 2010.

LUCCA, L. G.; DE MATOS, S. P.; BORILLE, B.T.; DIAS, D. O.; TEIXEIRA, H. F.; VEIGA, V. F. et al. Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 104, p. 144–148, 2015.

MAGGINI, R.; KIFERLE, C.; GUIDI, L.; PARDOSSI, A.; RAFFAELLI, A. Growing medicinal plants in hydroponic culture. **Acta Horticulturae**, 952, p. 697-704, 2012.

MAHANTA, B. P.; SUT, D.; KEMPRAI, P.; PAW, M.; LAL, M.; HALDAR, S. A ¹H-NMR spectroscopic method for the analysis of thermolabile chemical markers from the essential oil of black turmeric (*Curcuma caesia*) rhizome: application in post-harvest analysis. **Phytochemical Analysis**, v. 31, n. 1, p. 28–36, 2020.

MAHBOUBI, M.; HAGHI, G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 2, p. 325–327, 2008.

MAIA, O. G. S.; ANDRADE, L. H. A. Database of the amazon aromatic plants and their essential oils. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 595–622, 2009.

MAIRAPETYAN, S.; ALEXANYAN, J. S.; TADEVOSYAN, A. H.; TOVMASYAN, A. H.; STEPANYAN, B. T.; GALSTYAN, H. M. et al. The productivity of some valuable medicinal plants in conditions of water stream hydroponic. **Journal of Agricultural Science and Food Research**, v. 9, n. 3, p. 1–4, 2018.

MANJUNATHA, R. L.; NAIK, D.; USHARANI, K. V. Nanotechnology application in agriculture : A review. v. 8, n. 3, p. 1073–1083, 2019.

MARMITT, D. J.; GOETTERT, M. I.; REMPEL, C. S.; SILVA, A. C. Plantas medicinais da relação nacional de plantas medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde com potencial antiparasitário. **Scientia Amazonia**, v. 4, n. 3, p. 54–62, 2015.

MASSOUD, M. A.; ADEL, M. M.; ZAGHLOUL, O. A.; MOHAMED, M. I. E.; ABDEL-RHEIM, K. H. Eco-Friendly nanoemulsion formulation of *Mentha piperita* against stored product pest *Sitophilus oryzae*. **Advances in Crop Science and Technology**, v. 06, n. 06, 2018.

MFARREJ, M. F. B.; RARA, F. M. Competitive, sustainable natural pesticides. **Acta Ecologica Sinica**, v. 39, n. 2, p. 145–151, 2019.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. **Agrofit**. Disponível em: <https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 9 jun. 2022.

MONTEIRO, J. N. M. et al. *Chenopodium ambrosioides* L. essential oil and ethanol extract on control of canine *Ancylostoma* spp. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 1947–1953, 2017.

MONTES DE OCA-ÁVALOS, J. M.; CANDAL, R. J.; HERRERA, M. L. Nanoemulsions: stability and physical properties. **Current Opinion in Food Science**, v. 16, p. 1–6, 2017.

MONZOTE, L.; STAMBERG, W.; STANIEK, K.; GILLE, L. Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 240, n. 3, p. 337–347, 2009.

MONZOTE, L.; NANCE, M. R.; GARCÍA, M.; SCULL, R.; SETZER, W. N. Comparative chemical, cytotoxicity and antileishmanial properties of essential oils from *Chenopodium ambrosioides*. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 2, p. 281–286, 2011.

MOON, K. B.; PARK, J. S.; PARK, Y.; SONG, I.; LEE, H.; CHO, H. S. et al. Development of systems for the production of plant-derived biopharmaceuticals. **Plants**, v. 9, n. 1, p. 1–21, 2020.

MOTAZEDIAN, N.; ALEOSFOOR, M.; DAVOODI, A.; BANDANI, A. R. Insecticidal activity of five medicinal plant essential oils against the cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae*. **Journal of Crop Protection**, v. 3, n. 2, p. 137–146, 2014.

MOZAFFARI, F.; ABBASIPOUR, H.; GARJAN, A. S.; SABOORI, A.; MAHMOUDVAND, M. Toxicity and oviposition deterrence and repellency of *Mentha pulegium* (Lamiaceae) essential oils against *Tetranychus urticae* Koch (Tetranychidae). **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 16, n. 5, p. 575–581, 2013.

NAPOLI, M.; MARESCA, V.; VARCAMONTI, M.; BRUNO, M.; BADALAMENTI, N.; BASILE, A. et al. Applied sciences (+)-(E)-Chrysanthenyl acetate: a molecule with interesting biological properties contained in the *Anthemis secundiramea* (Asteraceae) flowers. **Applied Sciences**, v. 10, p. 1–14, 2020.

NASCIMENTO, L. E. S.; ARRIOLA, N. D.A.; DA SILVA, L. A. L.; FAQUETI, L. G.; SANDJO, L. P.; DE ARAÚJO, C. E. S. et al. Phytochemical profile of different anatomical parts of jambu (*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen): A comparison between hydroponic and conventional cultivation using PCA and cluster analysis. **Food Chemistry**, v. 332, p. 1-15, 2020.

NASTITI, C. M. R. R.; PONTO, T.; ABD, E.; GRICE, J. E.; BENSON, H. A.E.; ROBERTS, M. S. et al. Topical nano and microemulsions for skin delivery. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, p. 1–25, 2017.

NEIVA, V.A.; RIBEIRO, M. N. S.; CARTÁGENES, M. S. S.; MORAES-COUTINHO, D. F.; NASCIMENTO, F. R. F.; REIS, A. S. et al. Estudos pré-clínicos de atividade giardicida de *Chenopodium ambrosioides* L. e a padronização dos extratos na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 13, n. 2, p. 155–165, 2011.

NENAAH, G. E.; IBRAHIM, S. I. A.; AL-ASSIUTY, B. A. Chemical composition, insecticidal activity and persistence of three Asteraceae essential oils and their nanoemulsions against *Callosobruchus maculatus* (F.). **Journal of Stored Products Research**, v. 61, p. 9–16, 2015.

NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. E. Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). **Journal of Stored Products Research**, v. 45, n. 3, p. 212–214, 2009.

OCAMPO, A. B.; BRAZA, M. K. E.; NELLAS, R. B. The interaction and mechanism of monoterpenes with tyramine receptor (SoTyrR) of rice weevil (*Sitophilus oryzae*). **SN Applied Sciences**, v. 2, n. 9, p. 1–9, 2020.

ODEBODE, A. C. Phenolic compounds in the kola nut (*Cola nitida* and *Cola acuminata*) (Sterculiaceae) in Africa. **Revista de Biologia Tropical**, v. 44, n. 2, p. 513–515, 1996.

OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; DUARTE, J. L.; CRUZ, R. A.S.; SOUTO, R. N.P.; FERREIRA, R. M.A.; PENICHE, T. et al. *Pterodon emarginatus* oleoresin-based nanoemulsion as a promising tool for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) control. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, 2017.

OLIVEIRA, R. A.; SÁ, I. C.G.; DUARTE, L. P.; OLIVEIRA, F. F. Constituintes voláteis de *Mentha pulegium* L. e *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 165–169, 2011.

OMIDBAIGI, R.; SEFIDKON, F.; NASRABADI, F. B. Essential oil content and compositions of *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 8, n. 2, p. 154–158, 2005.

ORWA, C. *Cola nitida* Schott et Endl. **Agroforestry Database 4.0**. v. 0, p. 1–5, 2009.

PANDEY, R.; JAIN, V.; SINGH, K. P. Hydroponics Agriculture : Its Status, Scope and Limitations. **Division of Plant Physiology, Indian Agricultural Research Institute**, p. 20–29, 2009.

PAVELA, R. Insecticidal activity of essential oils against cabbage aphid *Brevicoryne brassicae*. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 9, n. 2, p. 99–106, 2006.

PAVELA, R.; BENELLI, G. Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 12, 2016.

PAVONI, L.; PAVELA, R.; CESPI, M.; BONACUCINA, G.; MAGGI, F.; ZENI, V. et al. Green micro-and nanoemulsions for managing parasites, vectors and pests. **Nanomaterials**, v. 9, n. 9, 2019.

PAVONI, L.; PERINELLI, D. R.; BONACUCINA, G.; CESPI, M.; PALMIERI, G. F. An overview of micro-and nanoemulsions as vehicles for essential oils: Formulation, preparation and stability. **Nanomaterials**, v. 10, n. 1, 2020.

PETRAKIS, E. A.; KIMBARIS, A. C.; LYKOURESSIS, D. P.; POLISSIOU, M. G.; PERDIKIS, D. C. Hydrosols evaluation in pest control: Insecticidal and settling inhibition potential against *Myzus persicae* (Sulzer). **Journal of Applied Entomology**, v. 139, n. 4, p. 260–267, 2015.

PIGNATI, W. A.; LIMA, F. A. N. S.; DE LARA, S. S.; CORREA, M. L. M.; BARBOSA, J. R.; LEÃO, L. H. C. et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: Uma ferramenta para a vigilância em saúde. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3281–3293, 2017.

PIORKOWSKI, D. T.; MCCLEMENTS, D. J. Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. **Food Hydrocolloids**, v. 42, p. 5–41, 2014.

POLATOĞLU, K.; DEMIRCI, F.; DEMIRCI, B.; GÖREN, N.; BAŞER, K. H. C. Antibacterial activity and the variation of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. essential oils from Turkey. **Journal of Oleo Science**, v. 59, n. 4, p. 177–184, 2010.

PRADHAN, B.; DEO, B. Soilless farming - The next generation green revolution. **Current Science**, v. 116, n. 5, p. 728–732, 2019.

PRASAD, C. S.; SHUKLA, R.; KUMAR, A.; DUBEY, N. K. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of essential oils of *Cymbopogon martini* and *Chenopodium ambrosioides* and their synergism against dermatophytes. **Mycoses**, v. 53, n. 2, p. 123–129, 2010.

PRASAD, D.; MOHANTA, G. P.; SUDHAKAR, M. A Review on Preparation and Evaluation of Nanoemulsions. **International Journal of Pharma Research and Health Sciences**, v. 7, n. 1, p. 2915–22, 2019.

PREEDY, V. R. **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. 1. ed. London: Academic Press, 2016.

PRINS, C. L.; VIEIRA, I. J. C.; FREITAS, S. P. Growth regulators and essential oil production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 2, p. 91–102, 2010.

PROCÓPIO, S. DE O. et al. Bioactivity of powders from some plants on *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 6, p. 1231–1236, 2003.

RAO, B. R. R. Hydrosols and water-soluble essential oils of aromatic plants: Future economic products. **Indian Perfumer**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/270276194>>.

RAVEAU, R.; FONTAINE, J.; LOUNÈS-HADJ SAHRAOUI, A. Essential oils as potential alternative biocontrol products against plant pathogens and weeds: A review. **Foods**, v. 9, n. 365, p. 2-31, 2020.

REIS, S. L.; MANTELLO, A. G.; MACEDO, J. M.; GELFUSO, E. A.; DA SILVA, C. P.; FACHIN, A. L. et al. Typical monoterpenes as insecticides and repellents against stored grain pests. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 1-10, 2016.

RESENDE, A. L. S.; SILVA, E. E.; SILVA, V. B.; RIBEIRO, R. L. D.; GUERRA, J. G. M.; AGUIAR-MENEZES, E. L. First record of *Lipaphis pseudobrassicae* Davis (Hemiptera: Aphididae) and its association with predator insects, parasitoids and ants in kale (Cruciferae) in Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 4, p. 551–555, 2006.

RESTELLO, R. M.; MENEGATT, C.; MOSSI, A. J. Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 2, p. 304–307, 2009.

RIBEIRO, A. L. DE P.; ALVES, Y. M. Manejo integrado de pragas. **Boas práticas agrícolas para a produção de hortaliças**, p. 78–96, 2021.

RITA DEVI, S.; THOMAS, A.; REBIJITH, K. B.; RAMAMURTHY, V. V. Biology, morphology and molecular characterization of *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 73, p. 135–141, 2017.

ROCHA, D.; NOVO, M.; MATOS, O.; FIGUEIREDO, A. C.; DELGADO, M.; CABRAL, M. D. et al. Potencialidade da *Mentha pulegium* no controle de mosquitos. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 2, p. 155–165, 2015.

ROCHA, R. R.; MATOS, M. N. C.; GUERRERO, J. A. P.; CAVALCANTE, R. M. B.; MELO, R. S.; AZEVEDO, Á. M. A. et al. Comparative study of the chemical composition, antibacterial activity and synergic effects of the essential oils of *Croton tetradenius* baill. and

C. pulegioides baill. against *Staphylococcus aureus* isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 156, p. 1-8, 2021.

SÁ, R. D.; SANTANA, A. S.C.O.; SILVA, F. C.L.; SOARES, L. A. L.; RANDAUA, K. P. Anatomical and histochemical analysis of *Dysphania ambrosioides* supported by light and electron microscopy. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 5, p. 533–543, 2016.

SAGRERO-NIEVES, L.; BARTLEY, J. P. Volatile constituents from the leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, n. 2, p. 221–223, 1995.

SALAHDEEN, H. M.; OMOAGHE, A. O.; ISEHUNWA, G. O.; MURTALA, B. A.; ALADA, A. R. A. Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis of ethanolic extracts of kolanut (*Cola nitida*) (vent) and its toxicity studies in rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 3, p. 56–70, 2015.

SALEM, N.; BACHROUCH, O.; SRITI, J.; MSAADA, K.; KHAMMASSI, S.; HAMMAMI, M. 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, p. 1-15, 2018.

SALLAM, M. N. Insect damage: damage on post-harvest. **Food and Agriculture Organization of the United States**, p. 37, 2013.

SAMPSON, B. J.; TABANCA, N.; KIRIMER, N.; DEMIRCI, B.; BASER, K. H. C.; KHAN, I. A. et al. Insecticidal activity of 23 essential oils and their major compounds against adult *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) (Aphididae: Homoptera). **Pest Management Science**, v. 61, n. 11, p. 1122–1128, 2005.

SANTIAGO, J. A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; CASTRO, E. M.; TEIXEIRA, M. L.; PIRES, M. F. Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L.: secretory structures, antibacterial and antioxidant activities. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 38, n. 2, p. 139-147, 2016.

SÉRVIO, E. M. L.; ARAÚJO, K. S.; NASCIMENTO, L. R. S.; COSTA, C. L. S.; MENDES, L. M. S.; MAIA FILHO, A. L. M. et al. Cicatrização de feridas com a utilização do extrato de *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) e cobertura secundária estéril de gaze em ratos. **ConScientiae Saúde**, v. 10, n. 3, p. 441–448, 2011.

SHARIFI-RAD, J.; SUREDA,; TENORE, G. C.; DAGLIA, M.; SHARIFI-RAD, M.; VALUSSI, M. et al. Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. **Molecules**, v. 22, n. 70, p. 1-55, 2017.

SHARMA, N.; ACHARYA, S.; KUMAR, K.; SINGH, N.; CHAURASIA, O.P. Hydroponics as an advanced technique for vegetable production: An overview. **Journal of Soil and Water Conservation**, v. 17, n. 4, p. 364, 2018.

SHARMA, S.; LOACH, N.; GUPTA, S.; MOHAN, L. Phyto-nanoemulsion: An emerging nano-insecticidal formulation. **Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management**, v. 14, p. 1-13, 2020.

SHIBERU, T. Determination of the Appropriate Doses of Promising Botanical Powders against Maize Weevil, *Sitophilus zeamais* Mots (Coleoptera: Curculionidae) on Maize Grain. **Agricultural Research & Technology**, v. 6, n. 5, p. 49–53, 2017.

SILVA, T. S. DE A.; NASCIMENTO, J. E. C.; PORSANI, M. V.; GIACOMIN, L. L.; POLTRONIERI, A. S.; ZAWADNEAK, M. A. C. et al. Potencial inseticida de plantas medicinais encontradas na Amazônia Central contra o pulgão-da-couve *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae). **EntomoBrasilis**, v. 10, n. 2, p. 106–111, 2017.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre, Artmed, p. 167-184, 2017.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KAUR, S.; ARORA, K.; KOHLI, R. K. α -Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. **Annals of Botany**, v. 98, n. 6, p. 1261–1269, 2006.

SINGH, P.; PANDEY, A. K. Prospective of essential oils of the genus mentha as biopesticides: a review. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2018.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 10, n. 3–4, p. 102–110, 2005.

STARIN, D. Kola nut: So much more than just a nut. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 106, n. 12, p. 510–512, 2013.

STRZEMSKI, M.; DRESLER, S.; SOWA, I.; CZUBACKA, A.; AGACKA-MOLDOCH, M.; PLACHNO, B. J. et al. The impact of different cultivation systems on the content of selected secondary metabolites and antioxidant activity of *Carlina acaulis* plant material. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 1–14, 2020.

TAPONDJOU, L. A.; ADLER, C.; BOUDA, H.; FONTEM, D. A. Efficacy of powder and essential oil from *Chenopodium ambrosioides* leaves as post-harvest grain protectants against six-stored product beetles. **Journal of Stored Products Research**, v. 38, n. 4, p. 395–402, 2002.

TRAKA, C. K.; PETRAKIS, E. A.; KIMBARIS, A. C.; POLISSIOU, M. G.; PERDIKIS, D. C. Effects of *Ocimum basilicum* and *Ruta chalepensis* hydrosols on *Aphis gossypii* and *Tetranychus urticae*. **Journal of Applied Entomology**, v. 142, n. 4, p. 413–420, 2018.

TRIVELLATOGRASSI, L.; MALHEIROS, A.; MEYRE-SILVA, C.; BUSS, Z. S.; MONGUILHOTT, E. D.; FRÖDE, T. S. et al. From popular use to pharmacological validation: A study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 127–138, 2013.

VALCÁRCEL, F. et al. Acaricidal and Insect Antifeedant Effects of Essential Oils From Selected Aromatic Plants and Their Main Components. **Frontiers in Agronomy**, v. 3, n.

May, p. 1–12, 2021.

VÁZQUEZ-COVARRUBIAS, D. A.; JIMÉNEZ-PÉREZ, A.; CASTREJÓN-AYALA, F.; FIGUEROA-BRITO, R.; BELMONT, R. M. Effects of five species of Chenopodiaceae on the development and reproductive potential of *Copitarsia decolora* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, v. 98, n. 1, p. 80–85, 2015.

WACHENDORFF-NEUMANN, U.; DAHMEN, P.; HELL-WEGE, E. **WO 2014/020109 A1**, 2014.

XUE, S.; ZHU, F.; WU, C.; LEI, J.; HARTLEY, W.; PAN, W. Effects of manganese on the microstructures of *Chenopodium ambrosioides* L., a manganese tolerant plant. **International Journal of Phytoremediation**, v. 18, n. 7, p. 710–719, 2016.

YADAV, N. et al. Medicinal properties of genus *Chenopodium* linn. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 6, n. 2, p. 131–134, 2007.

YANG, S.; LIU, L.; HAN, J.; TANG, Y. Encapsulating plant ingredients for dermocosmetic application: an updated review of delivery systems and characterization techniques. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 42, p. 16-28, 2020.

YUAN, Y.; VASUDEVA, N.; SINGH, S.; SHARMA, S. K. The effects of ecological factors on the main medicinal components of *Dendrobium officinale* under different cultivation modes. **Forests**, v. 11, n. 1, 2020.

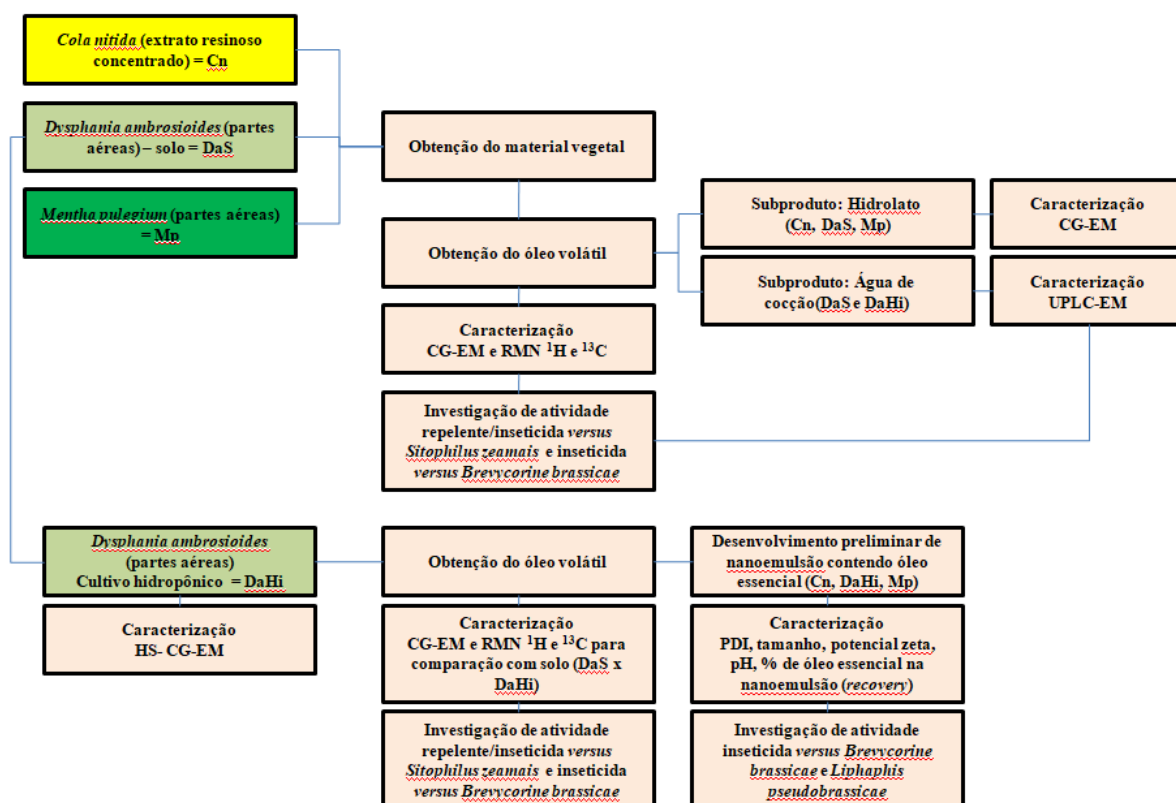
ZEKRI, N.; HANDAQ, N.; EL CAIDI, A.; ZAIR, T.; EL BELGHITI, M. A. et al. Insecticidal effect of *Mentha pulegium* L. and *Mentha suaveolens* Ehrh. hydrosols against a pest of citrus, *Toxoptera aurantii* (Aphididae). **Research on Chemical Intermediates**, v. 42, n. 3, p. 1639–1649, 2016.

ZHU, W. X.; ZHAO, K.; CHU, S. S.; LIU, Z. L. et al. Evaluation of essential oil and its three main active ingredients of Chinese CHENOPODIUM AMBROSIOIDES (Family: Chenopodiaceae) against *Blattella germanica*. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, v. 6, n. 2, p. 90–97, 2012.

ZOUBIRI, S.; BAALIOUAMER, A. Potentiality of plants as source of insecticide principles. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 6, p. 925–938, 2014.

ANEXO A – Fluxograma da pesquisa

Para um melhor entendimento, foi elaborado um fluxograma contendo uma visão geral das etapas realizadas.



ANEXO A – Artigo publicado

Revista Brasileira de Farmacognosia
<https://doi.org/10.1007/s43450-022-00234-0>

ORIGINAL PAPER



Chemical Composition of *Dysphania ambrosioides* from Hydroponics and Soil and Its Activity Against *Sitophilus zeamais*

Larissa Frankenberger¹ · Suélin Rover² · Thaís Labes da Silva³ · Marcia Regina Fanta³ · Jorge Luiz Barcelos-Oliveira² · Alex Sandro Poltronieri³ · Christiane Meyre-Silva¹ · Maique Weber Biavatti¹

Received: 22 November 2021 / Accepted: 17 January 2022
 © The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Farmacognosia 2022

Abstract

The activity and chemical composition of volatile oils and crude extracts from hydrodistillations of aerial parts of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants, Amaranthaceae, grown in hydroponic systems and soil were investigated. The insecticidal and repellent activities of *D. ambrosioides* against *Sitophilus zeamais* were also explored due to its current use in pest control. The volatile oil of *D. ambrosioides* from plants grown in hydroponics and soil was extracted and characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The major volatile compounds from the hydroponic plant material (yield = 0.54%) were *trans*-chrysanthenyl acetate (35.38%) and α -terpinene (49.05%), while those from the plants grown in soil (yield = 1.07%) were isoterpinolene (34.22%) and α -terpinene (43.40%). Both residual waters were used to obtain crude extracts, which were analyzed by ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry and contained rutinoides and some of its derivatives as major constituents. The study revealed repellency of 28% (1 h) and 55.5% (24 h) by volatile oils from hydroponic plants and 30% by the crude extracts after 1 h and for up to 24 h. Regarding the insecticidal activity by the grain mass treated method, both volatile oils presented satisfactory activity up to 120 h, with a response index above 90% after 48 h. The grain mass loss was lower for both oils, reducing ca. 50% of mass loss. Therefore, *D. ambrosioides* volatile oils and crude extracts from hydroponics and soil are both candidates for the development of bioinsecticides against *S. zeamais*.

Keywords Epazote · Volatile oils · Maize weevil · Mexican tea · Pest management · Repellent activity

Introduction

Dysphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clemants, syn. *Chenopodium ambrosioides* (L.) Crantz, Amaranthaceae, popularly known as “crava-de-santa-maria,” “mastuz,” “Mexican tea,” and “epazote,” presents perennial growth. It is native to the Mesoamerican region and is abundant in tropical regions such as Brazil, Mexico, and parts of Africa. Previous experimental studies conducted with extracts of *D. ambrosioides* have demonstrated anti-inflammatory (Pereira et al. 2015) and antimicrobial and antimycobacterial (Jesus et al. 2018) activities.

The *D. ambrosioides* volatile oil (VO) showed antileishmanial (Monzote et al. 2011) and antifungal (Jardim et al. 2008) activities. A formulation based on the major compounds of the *D. ambrosioides* VO has been marketed as a product against insects, mites, nematodes, and phytopathogens (Wachendorff-Neumann et al. 2015). Despite the great potential of this species, it is not still cultivated on an industrial scale. Previous studies carried out with *D. ambrosioides* VO showed that their composition differs according to the location of the crop, with the main differences being found in relation to the α -terpinene (1), *p*-cymene (2), and ascaridole (3) contents (Singh and

✉ Maique Weber Biavatti
 maique.biavatti@ufsc.br

¹ Departamento de Ciência Farmacéuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Reitor João David Ferreira Lima s/n, Campus Universitário Trindade, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

² Departamento de Engenharia Rural, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga 1346, Florianópolis, SC 88034-000, Brazil

³ Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga 1346, Florianópolis, SC 88034-000, Brazil