Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Bioatividade e efeito residual de nanoformulações de nim sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)

Angelina Maria Marcomini

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2009

Angelina Maria Marcomini
Bióloga

Bioatividade e efeito residual de nanoformulações de nim sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)

Orientador:
Prof. Dr. JOSÉ DJAIR VENDRAMIM

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO – ESALQ/USP

Marcomini, Angelina Maria
Bioatividade e efeito residual de nanoformulações de nim sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) / Angelina Maria Marcomini. - - Piracicaba, 2009.
83p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. Inseticidas biológicos – Efeitos 2. Lagartas – Controle 3. Milho 4. Nanotecnologia 5. Plantas produtoras de pesticidas 6. Polímeros I. Título

CDD 632.78
M323b

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A Deus,

Pela vida, força e bênçãos recebidas todos os dias,

AGRADEÇO

Aos meus pais, Luiz Carlos e Vera,
E ao meu irmão, Luiz Henrique,

Porque acreditaram em mim e não mediram esforços para que eu chegasse até aqui,

OFEREÇO E DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Djair Vendramim, pela orientação, atenção, pelos ensinamentos e grande exemplo de ética e profissionalismo.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ/USP, em especial ao Departamento de Entomologia e Acarologia, pela oportunidade concedida para a realização do curso e deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia do Departamento de Entomologia e Acarologia, pelos ensinamentos transmitidos.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Mestrado.

A Moacir Rossi Forim, pelo fornecimento das nanoformulações avaliadas neste trabalho.

A Rafael Major Pitta, pela confecção do *abstract*, e ao Prof. Dr. Fernando Luis Cônsoli, pela revisão.

Aos funcionários Dino, Carlinhos, William, João Batista, Carlos Giusti, Edilene Oliveira, Maria Marta Barella, às bibliotecárias Eliana Maria Garcia e Silvia Maria Zinsly, por todos os serviços prestados, e àqueles que embora não citados contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desse trabalho.

À técnica do Laboratório de Biologia de Insetos, Neide Zério, por ser sempre solícita em tudo que lhe era pedido.

Ao Prof. Dr. Luis Francisco Angeli Alves, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), que me orientou no início desta jornada e incentivou a seguir o caminho da pesquisa.

A Elio Cesar Guzzo, pelo apoio e amizade mesmo antes do meu ingresso no Programa de Mestrado em Entomologia.

Um agradecimento especial ao amigo Paulo Cesar Bogorni, que sempre me auxiliou em tudo, ajudando a crescer tanto pessoal quanto profissionalmente.

A Cherre Sade e Maria Fernanda Peñaflor, pelo fornecimento de insetos quando necessário.

À Marinéia Lara Haddad, Nádia Casarin, Paulo Cesar Bogorni e Rafael Major Pitta, pelo auxílio com as análises estatísticas.

Às amigas Cristiane Müller e Erika Pessoa, pela grande amizade, companheirismo e força em todos os momentos.

À amiga "irmã" Patrícia Almeida Sacramento, que embora distante se fez sempre presente, e a Pedro Rogerio Giongo, pelo carinho, auxílio e incentivo.

A todos os colegas da turma do PPG em Entomologia de 2007, pela amizade e conhecimentos compartilhados.

Aos amigos Cherre Sade, Fátima Bosetti, Fernanda Engels, Gleidyane Lopes, John Saldarriaga, Leandro Delalibera Geremias, Lorena Nunes, Maria Fernanda Peñaflor, Michelle Fonseca, Tiago Costa Lima, que de uma forma ou de outra estiveram presentes e me ajudaram nessa jornada.

Aos colegas do Laboratório de Plantas Inseticidas: Amália Lopes, Ana Paula Korndorfer, Cristina Jensen, Eliane Grisoto, Gerane Bezerra, Leandro Ribeiro, Márcio Silva, Marcos Lima, Maria Auxiliadora Oriani, Mônica Santos, Sheila Carvalho e, em especial, à Fátima Rampelotti e Rafael Major Pitta, pela amizade e auxílio em muitas etapas deste trabalho.

A todos vocês, meus sinceros agradecimentos.

"O prazer no trabalho aperfeiçoa a obra".

(Aristóteles)

SUMÁRIO

RESUMO 11
ABSTRACT 13
LISTA DE ILUSTRAÇÕES 15
LISTA DE TABELAS 17
1 INTRODUÇÃO 19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 21
2.1 *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) na cultura do milho (*Zea mays* L.) 21
2.2 Considerações gerais sobre o nim 23
2.2.1 Efeito do nim sobre *S. frugiperda* 25
2.2.2 Barreiras à expansão e comercialização do nim 28
2.3 A nanotecnologia e o desenvolvimento de novas formulações de nim 29
3 MATERIAL E MÉTODOS 35
3.1 Criação de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) 35
3.2 Bioensaios com aplicação das formulações em dieta artificial 35
3.2.1 Estimativa da CL_{50} de uma formulação comercial de óleo de nim 35
3.2.2 Seleção das nanoformulações mais promissoras em dieta artificial 36
3.3 Bioensaios com aplicação das formulações em plantas de milho em casa de vegetação 38
3.3.1 Cultivo das plantas de milho 38
3.3.2 Estimativa da CL_{50} de uma formulação comercial de óleo de nim em plantas de milho 39
3.3.4 Efeito residual das nanoformulações selecionadas sobre o inseto 42
3.3.5 Efeito das nanoformulações selecionadas sobre o consumo foliar 43
3.4 Análises dos dados 45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 46
4.1 Bioensaios com aplicação das formulações em dieta artificial 46
4.1.1 Estimativa da CL_{50} de uma formulação comercial de óleo de nim 46
4.1.2 Seleção das nanoformulações mais promissoras em dieta artificial 46
4.1.3 Considerações gerais sobre os bioensaios em dieta artificial 51
4.2 Bioensaios com pulverização das formulações em plantas de milho em casa de vegetação 52
4.2.1 Estimativa da CL_{50} de uma formulação comercial de óleo de nim em plantas de milho 52
4.2.2 Seleção de nanoformulações em plantas de milho em casa de vegetação 53
4.2.3 Considerações gerais sobre os bioensaios com folhas de milho 58
4.2.3 Efeito residual das nanoformulações selecionadas sobre *S. frugiperda* 62
4.2.4 Efeito das nanoformulações selecionadas sobre o consumo foliar 68
5 CONCLUSÕES 71
REFERÊNCIAS 73

RESUMO

Bioatividade e efeito residual de nanoformulações de nim sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)

Na tentativa de reduzir a biodegradação dos compostos ativos do nim e melhorar seu efeito residual, extratos de nim foram nanoformulados com diferentes tipos de nanoparticulas e de polímeros. Estas nanoformulações foram testadas sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) e sua eficiência comparada a um produto comercial. Os polímeros poli-ε-caprolactona (PCL), poli-β-hidroxibutirato (PHB) e polimetilmetacrilato(PMMA), foram utilizados nas quantidades 0,25, 0,50 e 0,75g, e em dois tipos de nanopartículas (cápsulas e esferas). Foram utilizados Tween®80 e polivinil álcool (PVA) como agentes tensoativos. As nanoformulações foram produzidas em suspensão aquosa e em pó, sendo diluídas para aplicação. Essas nanoformulações foram aplicadas sobre dieta artificial oferecida a lagartas de segundo instar de *S. frugiperda*, e em plantas de milho das quais as folhas foram cortadas e fornecidas a lagartas de primeiro instar. A eficiência de diferentes nanoformulações foi testada considerando a mortalidade e o peso 10 dias após o tratamento. Quando aplicado em dieta artificial foi observada redução no peso larval. Entretanto, quando aplicadas em folhas de milho, quatro nanoformulações causaram mortalidade entre 40 a 46%. Essas quatro nanoformulações foram avaliadas quanto à preferência alimentar e efeito residual. Foram conduzidos três bioensaios, nos quais as folhas de milho tratadas com as quatro nanoformulações foram oferecidas às lagartas aos 1, 3 e 7 dias após a pulverização (DAP), considerando-se mortalidade e peso das lagartas após 10 dias. Simultaneamente, foram realizados testes de preferência alimentar com dupla escolha (tratamento x controle) com discos foliares de milho aos 1, 3 e 7 DAP. A preferência alimentar foi determinada por meio de um índice de preferência, calculando-se a área foliar consumida pela lagarta após 24h. O efeito residual das nanoformulações foi menor que do produto comercial avaliado. Apenas uma nanoformulaçao e Organic Neem® apresentaram fagodeterrência a *S. frugiperda*, mas somente em 1 DAP. Embora as nanoformulações tenham causado mortalidade e redução de peso larval, sua eficiência foi inferior a do produto comercial.

Palavras-chave: *Azadirachta indica*; Lagarta-do-cartucho, Nanotecnologia, Polímeros, Nanoformulações

ABSTRACT

Bioactivity and residual effect of neem nanoformulations to *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)

Neem extracts were nanoformulated with several types of nanoparticles and polymers in a tentative to reduce the biodegradation of neem active compounds and improve their residual effect. These nanoformulations were tested against *Spodoptera frugiperda* and their efficacy compared to a commercial product. The polymers poly(ε-caprolactone) (PCL), poly(β-hidroxibutirate) (PHB) and poly(methyl methacrylate) (PMMA) were used in the quantities 0.25, 0.50 and 0.75g and two sorts of nanoparticles (capsules and spheres). Tween®80 and poly(vinyl alcohol) (PVA) were utilized as surfactants. The nanoformulations were produced as aqueous suspension and powder and further diluted before application. These nanoformulations were sprayed on artificial diet offered to second instars of *S. frugiperda*, and on corn plants which had their leaves offered to first instars. The efficacy of the different formulations was tested by assessing larval mortality and weight 10 days after treatment. When applied to artificial diets, reduced larval weight was observed, but four of them caused 40 to 46% mortality when applied on corn plants. The four most effective nanoformulations were further tested to evaluate their effects on *S. frugiperda* larval feeding preference and their residual effect. Three bioassays were set up using corn leaves treated with these, wich were offered to larvae at days 1, 3 and 7 after spraying (DAS), having the larval mortality and weight assessed 10 days after larval exposure. Simultaneously, choice tests for larval feeding preference (treatment x control) were carried out using corn leaf discs 1, 3 and 7 DAS. Feeding preference was evaluated by using a preference index calculated after the assessment of the leaf area fed by the larva 24h after exposure. The residual effect of the neem nanoformulations was lower than the commercial product evaluated. Only one nanoformulation and Organic Neem® were feeding deterrents to *S. frugiperda*, but only in the first day after the treatment. Although the nanoformulations caused larval mortality and weight reduction, their efficacy was not any better than that of the commercial product tested.

Key-words: *Azadirachta indica*; Fall armyworm; Nanotechnology; Polymers; Nanoformulations

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática de nanopartículas poliméricas. A) Nanocápsula, com o princípio ativo dissolvido no núcleo oleoso e/ou adsorvido na parede polimérica; B) Nanoesfera, com o princípio ativo retido (adsorvido e/ou disperso) na matriz polimérica. (Adaptado de Schaffazick et al., 2003) 32

Quadro 1 - Nanoformulações em suspensão aplicadas sobre dieta artificial para avaliação de eficiência sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda* 37

Quadro 2 – Nanoformulações em suspensão pulverizadas em folhas de milho para avaliação de eficiência sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda* 40

Quadro 3 – Nanoformulações em pó pulverizadas em folhas de milho para avaliação de eficiência sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda* 41

Figura 2 - Arena utilizada para o teste de deterrência alimentar. A) No início do teste, com uma lagarta de terceiro ínstar recém-liberada no centro da arena; B) Após 24 horas, onde se observa um dos discos foliares quase inteiramente consumido pela lagarta 44

Figura 3 - Eficiência de controle das nanoformulações testadas nos cinco bioensaios em casa de vegetação, sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda*, alimentadas desde o primeiro ínstar com nanoformulações de nim, após 10 dias. (Mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott, 1925) 61

Figura 3 - Eficiência de controle das nanoformulações de nim sobre lagartas de primeiro ínstar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de milho tratadas, 1, 3 e 7 dias após a aplicação (dados corrigidos por Abbott, em cada bioensaio) 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coeficiente angular, valor de CL_{50} e intervalo de confiança do óleo de nim comercial Organic Neem para lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o segundo ínstar com dieta artificial tratada com diferentes concentrações do produto, após 10 dias 46

Tabela 2 - Médias (±EP) de mortalidade e peso de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o segundo ínstar com dieta artificial tratada com nanoformulações de nim, após 10 dias 47

Tabela 3 - Médias (±EP) de mortalidade e peso de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o segundo ínstar com dieta artificial tratada com formulações contendo nanocápsulas de nim com diferentes concentrações de polímero, após 10 dias 48

Tabela 4 - Médias (±EP) de mortalidade e peso de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o segundo ínstar com dieta artificial tratada com formulações contendo nanoesferas de nim com diferentes concentrações de polímero, após 10 dias 49

Tabela 5 - Médias (±EP) de viabilidades larval e pupal de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o segundo ínstar com dieta artificial tratada com nanoformulações de nim 50

Tabela 6 - Médias (±EP) de duração e peso das fases de lagarta (14 dias após a instalação) e de pupa (com 24 horas de idade) de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o segundo ínstar com dieta artificial tratada com formulações de nim 50

Tabela 7 - Coeficiente angular, valor de CL_{50} e intervalo de confiança do óleo de nim comercial Organic Neem para lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com folhas de milho tratadas com diferentes concentrações do produto, após seis dias 53

Tabela 8 - Médias (±EP) de mortalidade e de peso de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com folhas de milho tratadas com nanoformulações de nim, após 10 dias (1º bioensaio) 54

Tabela 9 - Médias (±EP) de mortalidade e de peso de lagartas *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro instar com folhas de milho tratadas com nanoformulações de nim, após 10 dias (2º bioensaio) 55

Tabela 10 - Médias (±EP) de mortalidade e de peso de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com folhas de milho tratadas com nanoformulações de nim, após 10 dias (3º bioensaio) 56

Tabela 11 - Médias (±EP) de mortalidade e de peso de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com folhas de milho tratadas com nanoformulações de nim, após 10 dias (4º bioensaio) 57

Tabela 12 - Médias (±EP) de mortalidade e de peso de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com folhas de milho tratadas com nanoformulações de nim, após 10 dias (5º bioensaio) 58

Tabela 13 - Médias (±EP) de mortalidade de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas, durante 10 dias, desde o primeiro ínstar com folhas de milho tratadas com formulações de nim, nos bioensaios instalados aos 1, 3 e 7 dias após a pulverização 62

Tabela 14 - Médias (±EP) de peso de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas, durante 10 dias, desde o primeiro ínstar, com folhas de milho tratadas com nanoformulações de nim, nos bioensaios instalados aos 1, 3 e 7 dias após a pulverização 64

Tabela 15 - Aumento (+) / redução (-) da eficiência de controle das formulações sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com folhas de milho tratadas com nanoformulações de nim 66

Tabela 16 - Área foliar consumida e preferência alimentar de lagartas de terceiro ínstar de *Spodoptera frugiperda,* 24 horas após liberação em arenas com chance de escolha entre discos foliares tratados e não tratados com nanoformulações de nim, aos 1, 3 e 7 dias após a aplicação 68

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda dos mercados nacional e internacional por alimentos de qualidade e com menos agrotóxicos tem incentivado a busca por formas mais eficientes de produção, por novos produtos e compostos mais seguros ao homem e ao meio ambiente.

O ressurgimento dos estudos com inseticidas botânicos, deixados de lado após o surgimento dos sintéticos na década de 40, deveu-se à necessidade de se dispor de novos compostos para uso no controle de pragas, sem os problemas de contaminação ambiental, resíduos nos alimentos, efeitos prejudiciais sobre organismos benéficos e aparecimento de insetos resistentes, causados pelos inseticidas químicos (VENDRAMIM; CASTIGLIONI, 2000).

Uma planta que vem se mostrando bastante promissora é *Azadirachta indica* (A. Juss.), conhecida popularmente no Brasil como nim. É uma árvore utilizada há séculos na Índia, com as mais variadas aplicações, inclusive como inseticida. Seus óleos e extratos têm efeito sobre diversas espécies de insetos, entre as quais se inclui a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), que é considerada a principal praga do milho, cultura de grande expressividade econômica no país. O nim atua principalmente como regulador de crescimento de insetos, mas também apresenta um marcante efeito deterrente alimentar e de oviposição em certas espécies. No entanto, o baixo poder residual que o nim apresenta em condições de campo é hoje um grande entrave para sua utilização em larga escala. Essa é uma característica inerente a todos os compostos naturais, por sofrerem rápida biodegradação, motivo pelo qual os inseticidas vegetais foram substituídos pelos sintéticos no passado. Além disso, a falta de padronização das formulações de nim disponíveis no mercado e de um controle de qualidade fazem com que os resultados sobre os insetos variem muito, diminuindo a credibilidade do mesmo junto aos agricultores.

Assim, há duas grandes barreiras ao setor brasileiro de inseticidas botânicos, como o nim, que precisam ser vencidas. Primeiramente, há a necessidade de pesquisa e desenvolvimento de produtos estáveis e padronizados, com tempo de ação em campo prolongado e mantendo sua baixa toxicidade ao homem e aos organismos não-alvo. Em segundo, há necessidade de técnicas de enriquecimento e controle de qualidade nos produtos a serem disponibilizados no comércio assegurando a reprodutibilidade de sua eficácia inseticida.

A encapsulação dos compostos do nim dentro de membranas ou paredes poliméricas pode melhorar sua eficiência. A membrana/parede polimérica protege o conteúdo (ingrediente ativo) contra reações diversas, pode controlar a taxa de liberação dos compostos e prevenir a perda de compostos voláteis, aumentando sua estabilidade no ambiente. Além disso, a microencapsulação pode converter líquidos em pós, de modo que possam ser mais facilmente manipulados (RIYAJAN; SAKDAPIPANICH, 2009).

Com esse intuito, novas formulações à base de nim vêm sendo produzidas por meio de processos nanotecnológicos, em que as formulações são obtidas a partir de biopolímeros nanométricos associados a óleos e extratos de nim, visando proteger e prolongar a ação dos compostos nas culturas (M.R. Forim, informação pessoal).

Assim, o objetivo deste trabalho foi testar nanoformulações à base de óleo e extratos de nim, com diferentes tipos de nanopartículas e de material polimérico, em relação à atividade inseticida e ao poder residual sobre a lagarta *S. frugiperda.*

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) na cultura do milho (*Zea mays* L.)

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho (DUARTE et al., 2006), cuja produção de grãos para a safra 2008/2009 está estimada em 52,3 milhões de toneladas (CONAB, 2009). Seu cultivo é realizado tanto em pequenas quanto em grandes propriedades, em caráter de subsistência ou como insumo para produção de uma centena de produtos (SILOTO, 2002). A lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada uma das mais importantes pragas dessa cultura. É uma espécie polífaga, que pode ocorrer também no algodão, amendoim, arroz, trigo, soja, hortaliças, e cana-de-açúcar, sendo assim de ampla distribuição no Brasil (GALLO et al., 2002), embora seja marcante a preferência do inseto por plantas de milho (LARA, 1979).

Os adultos são mariposas que medem cerca de 15 mm de comprimento por 35 a 40 mm de envergadura, com as asas anteriores pardo-escuras e as posteriores branco-acinzentadas. Apresentam dimorfismo sexual, sendo que as asas anteriores dos machos apresentam manchas mais claras. As fêmeas colocam seus ovos em massas nas folhas, em número variável de 50 a 300, em camadas superpostas. A coloração varia do cinza-claro ao esverdeado, escurecendo gradualmente até a eclosão (ALVES et al., 1992; CRUZ, 1995; GALLO et al., 2002).

Após três dias em média as lagartas eclodem, medindo cerca de 1,90 mm. O corpo é branco apresentando cinco estrias escuras, e a cabeça é quase negra, com três estrias claras em forma de Y invertido (LEIDERMAN; SAUER, 1953; CRUZ et al., 1999). As larvas recém-eclodidas imediatamente começam a se alimentar das folhas, iniciando pelas partes mais tenras. As lagartas de primeiro ínstar raspam a folha de um dos lados, deixando a epiderme membranosa do outro lado intacta (CRUZ, 1995). No terceiro ínstar, as lagartas penetram no cartucho, comendo as folhas centrais, sendo facilmente percebidas pelos excrementos encontrados nessa região da planta. Quando as folhas se abrem, as áreas atacadas se tornam aparentes. Devido ao canibalismo, é comum encontrar-se apenas uma lagarta desenvolvida por cartucho, embora possam ser encontradas lagartas em diferentes ínstares no mesmo cartucho, separadas pelas lâminas das folhas (SOUZA; SOUZA, 2002).

As lagartas de 4º a 6º ínstares podem destruir completamente as plantas pequenas e causar severos danos em plantas maiores (CRUZ, 1995). O ataque nas lavouras deve ser detectado logo que as folhas de milho apresentarem sinais de raspagem pelas lagartas de primeiros ínstares, ocasião em que deve ser feito o controle (SOUZA; SOUZA, 2002). Em estádios mais adiantados, pode-se encontrar a lagarta-do-cartucho atacando o pendão e até mesmo espigas em formação (WAQUIL et al., 1982).

A duração de cada ínstar larval pode variar de acordo com a temperatura, sendo que, dentro de certo limite, quanto maior a temperatura, menor a fase larval. A duração dessa fase é de 12 a 30 dias, em temperaturas variando de 35 a 20°C, respectivamente. A lagarta passa por seis a sete ínstares, chegando a medir aproximadamente 50 mm de comprimento no final da fase (FERRAZ, 1982; GALLO et al., 2002). Outros fatores podem interferir na duração do ciclo, como espécie ou genótipo da planta hospedeira (VENDRAMIM; FANCELLI, 1988; GIOLO et al., 2002), quantidade e qualidade do alimento consumido durante a fase larval (SCRIBER; SLANSKY JUNIOR, 1981).

Após o completo desenvolvimento, a lagarta deixa a planta e vai pupar no solo ou sob a palha de milho, após passar por um período de pré-pupa que dura de dois a três dias. A pupa mede em média 17 mm de comprimento, e essa fase pode durar de 6 a 55 dias, conforme a temperatura. Após cerca de 11 dias emergem os adultos, cuja longevidade é de aproximadamente 12 dias (LEIDERMAN; SAUER, 1953; CRUZ, 1995).

À temperatura média acima de 25ºC, o ciclo total do inseto pode ser completado em menos de 30 dias, possibilitando a essa espécie a produção de várias gerações durante o ano (CRUZ; MONTEIRO, 2004). Nos períodos mais frios a duração do ciclo pode chegar a 50 dias. A longevidade do adulto pode variar de 4,4 a 13,3 dias, conforme a temperatura e a disponibilidade de alimento (CRUZ, 1995).

O dano causado pelo ataque é variável em função da idade da planta, sendo a redução máxima atingida no estádio de 8-10 folhas, aproximadamente 40 dias após o plantio (CRUZ; TURPIN, 1982). Segundo Carvalho (1970), a redução na produção pode chegar até a 34%.

Apesar dos grandes avanços da pesquisa, ainda é a praga de maior preocupação na cultura do milho, não só no Brasil, mas em toda a América (FIGUEIREDO; PENTEADO-DIAS; CRUZ, 2005). O controle da lagarta-do-cartucho é efetuado normalmente com inseticidas sintéticos que, entretanto, não apresentam resultados satisfatórios, uma vez que já existem populações

resistentes. Além disso, são produtos que acarretam riscos ao ambiente e à saúde humana. As pesquisas de métodos alternativos ao controle químico incluem a utilização de produtos naturais, destacando-se entre estes os extratos vegetais (ROEL; VENDRAMIM, 2006). O óleo e os extratos de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.), uma árvore originária da Índia, têm grande destaque nas pesquisas com plantas inseticidas. Seu efeito tem sido relatado sobre aproximadamente 400 espécies de insetos (MARTINEZ, 2002), dentre as quais se inclui *S. frugiperda.*

2.2 Considerações gerais sobre o nim

Segundo a classificação taxonômica de De Jussieu (1830), o nim é classificado na ordem Rutales, subordem Rutineae, família Meliaceae, sub-família Melioideae, tribo Melieae, gênero *Azadirachta* e espécie *Azadirachta indica* (BISWAS et al., 2002). É uma árvore originária do sul e sudeste da Ásia (SCHMUTTERER, 1990), hoje disseminada por todos os países da África e outras regiões tropicais e subtropicais pelo mundo, como Filipinas, Ilhas do Pacífico, Austrália e Américas, devido à sua rusticidade e adaptação a regiões áridas (MARTINEZ, 2002). Há séculos o nim é utilizado na Índia como antisséptico, antimicrobiano, no tratamento de distúrbios urinários, diarréias e doenças do couro cabeludo. Da mesma forma, suas propriedades inseticidas já eram conhecidas, tendo sua aplicação através da mistura de folhas secas de nim a grãos armazenados ou entre as roupas, para repelir os insetos (KOUL; ISMAN; KETKAR, 1990). A torta de nim, resultante da extração do óleo das sementes, era aplicada em campos de cultivo de arroz para controlar as pragas e era usada também como medida preventiva contra formigas (SAXENA, 1989). O óleo é usado também na indústria cosmética, para a fabricação de xampus, tônicos capilares, sabonetes e cremes dentais (NEVES; NOGUEIRA, 1996). A madeira do nim é dura, relativamente pesada, e usada na confecção de carretas, ferramentas e implementos agrícolas. É ideal para programas de reflorestamento e para recuperação de áreas degradadas, áridas e costeiras (NEVES; OLIVEIRA; NOGUEIRA, 2003).

As primeiras introduções do nim no Brasil para pesquisa como planta inseticida foram realizadas pelo Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), em 1986. Assim como outras meliáceas, o nim possui compostos limonóides com reconhecida ação sobre insetos (MARTINEZ, 2002).

Embora seja estudado desde o início do século XX na Índia, o nim só teve sua importância como planta inseticida e repelente reconhecida em 1952, quando o Prof. Dr. Heinrich Schmutterer (Universidade de Giessen, Alemanha) observou que gafanhotos (*Schistocerca gregaria* (Forskal)) não se alimentavam de suas folhas (MORDUE (LUNTZ); NISBET, 2000; MARTINEZ, 2002). Seguiram-se estudos sobre a composição química da planta, conduzidos por vários pesquisadores pelo mundo. Em 1967, um triterpenóide foi isolado do óleo de *A. indica* e dos frutos de *Melia azedarach* L. por Lavie, Jain e Shpan-Gabrielith (1967), denominado meliantriol, um deterrente alimentar para insetos. Em 1968, foi isolado outro composto deterrente a partir das sementes de *A. indica*, a azadiractina, por David Morgan (BUTTERWORTH; MORGAN, 1968). Entretanto, o meliantriol e a azadiractina têm estrutura química bastante diferente e apresentam diferente potencial de deterrência alimentar, sendo o último mais potente. Por ser uma molécula muito complexa, a estrutura da azadiractina foi completamente determinada apenas 17 anos depois, com trabalhos simultâneos nos laboratórios de Steven Ley, W. Kraus e K. Nakanishi (BILTON et al., 1987; KRAUS et al., 1987; TURNER et al., 1987). A azadiractina é um limonóide tetranortriterpenóide formado por um grupo fechado de isômeros relacionados, denominados comumente de AZ-A até AZ-G. O isômero AZ-A é o componente encontrado em maior quantidade nas sementes (SCHMUTTERER, 1990). Os análogos minoritários contribuem pouco para a eficiência dos extratos (ISMAN, 2006).

Devido à complexidade da estrutura molecular da azadiractina, sua síntese ainda não foi possível em laboratório. Extratos de sementes de nim, contendo azadiractina e outras moléculas estruturalmente relacionadas, têm constituído a base do uso do nim no controle de insetos (ISMAN, 1997). Atualmente, são conhecidos mais de 50 compostos terpenóides da planta, a maioria com ação sobre os insetos, afetando em maior ou menor grau o crescimento ou comportamento dos mesmos (MARTINEZ, 2008). Dentre eles estão nimbina, salanina e meliantrol, além da azadiractina; porém, esta é a principal responsável por seu efeito inseticida (CIOCIOLA JR.; MARTINEZ, 2002; MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005).

Os extratos de nim produzem múltiplos efeitos sobre os insetos, como repelência, redução da alimentação, diminuição da oviposição, interrupção do desenvolvimento e da ecdise, redução da fertilidade e fecundidade, alterações no comportamento, atraso no desenvolvimento e mortalidade (MORDUE (LUNTZ); NISBET, 2000). A azadiractina, especificamente, tem dois efeitos marcantes sobre os insetos. Em nível fisiológico, bloqueia a síntese e liberação de

ecdisteróides pela glândula protorácica, agindo como regulador de crescimento, levando à ecdise incompleta em insetos imaturos. Pode também gerar pupas e adultos com deformações e fêmeas estéreis. Em adição, a azadiractina é um potente deterrente alimentar para muitos insetos (ISMAN, 2006). Nimbina e salanina causam principalmente repelência e deterrência alimentar em vários insetos das ordens Coleoptera, Hemiptera e Orthoptera (CIOCIOLA JR.; MARTINEZ, 2002). A salanina provoca redução dos movimentos das paredes do intestino do inseto e, por consequência, redução na alimentação, o que pode finalmente resultar em morte por inanição (AGUIAR-MENEZES, 2005). O efeito regulador de crescimento foi observado somente com a azadiractina, em todas as espécies de insetos já testadas; entretanto o seu efeito deterrente alimentar varia muito entre as ordens de insetos e também entre espécies da mesma ordem (MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993; MORDUE (LUNTZ); NISBET, 2000).

Todas as partes da planta possuem esses compostos, mas a quantidade varia entre elas e, portanto, os efeitos dos extratos variam segundo a matéria prima utilizada. Geralmente, a concentração de azadiractina, salanina e nimbina é mais alta nas sementes, porém, fatores como as condições ambientais e o tratamento durante o processamento, despolpamento, secagem e armazenamento das sementes podem interferir (CIOCIOLA JR.; MARTINEZ, 2002; MARTINEZ, 2002). Outros limonóides e compostos sulfurados com propriedades repelente, antisséptica, contraceptiva, antipirética e antiparasítica são encontrados em outras partes da planta, como nas folhas, flores, cascas e raízes (MORDUE (LUNTZ); NISBET, 2000).

Pelo fato de possuir inúmeros compostos com propriedades semelhantes, os extratos de nim apresentam uma importante característica, que é a probabilidade bastante reduzida de que um inseto desenvolva resistência (CIOCIOLA JR.; MARTINEZ, 2002). Além disso, estudos feitos com a azadiractina têm mostrado notável seletividade, não apresentando toxicidade a vertebrados e efeito relativamente baixo sobre predadores e parasitóides (MORDUE (LUNTZ); MORGAN; NISBET, 2005), dependendo o efeito, nesse caso, da formulação e concentração utilizada, da forma de aplicação e estágio em que o inseto se encontra (CÓNDOR-GOLEC, 2007).

2.2.1 Efeito do nim sobre *S. frugiperda*

Diversos trabalhos vêm mostrando o potencial do nim para controle de insetos. No que se refere a *S. frugiperda*, os extratos aquosos de folhas de nim causam atraso no desenvolvimento e

mortalidade de lagartas. Prates, Viana e Waquil (2003) conduziram bioensaios com diferentes concentrações de extrato aquoso de folhas de nim em dieta artificial com lagartas recém-eclodidas. O extrato foi obtido por suspensão do pó das folhas em água (1:10 p/v) por 24h e posterior filtração e liofilização, e em seguida dissolvido em uma mistura de acetona e água (7:3) para ser incorporado à dieta de modo a se obterem as concentrações finais de 10,000; 3,600; 1,756 e 0,500 mg/ml do extrato/alimento. Após 12 dias, observaram eficiência equivalente entre as concentrações 3,60 (79,37%) e 10,00 mg/ml (100,00%). A análise de Probit indicou uma CL_{50} equivalente a 2,67 mg/ml.

Viana e Prates (2003) também estudaram o efeito do extrato aquoso de folhas de nim, com adjuvantes, sobre lagartas de *S. frugiperda* recém-eclodidas. Compararam o efeito de contato, pulverizando as lagartas, e de ingestão, submergindo as folhas no extrato (10 mg/ml) e/ou pulverizando-as no campo e oferecendo-as depois às lagartas. A pulverização direta sobre o inseto não prejudicou o desenvolvimento larval, entretanto as folhas de milho submergidas e pulverizadas com o extrato causaram elevada mortalidade (equivalente à causada pelo inseticida clorpirifós) e prejudicaram o desenvolvimento das lagartas sobreviventes. Observaram também que a adição de espalhante adesivo e óleo de soja ao extrato melhoraram a eficiência do mesmo.

Posteriormente, os mesmos autores avaliaram o efeito do período de alimentação sobre a mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* de diferentes idades, alimentando-as com folhas de milho tratadas com o extrato aquoso de folhas. No primeiro experimento, lagartas recém-eclodidas foram alimentadas por períodos de um a seis dias e, em seguida, alimentadas com folhas não tratadas. No segundo, lagartas com diferentes idades (1 a 13 dias) foram alimentadas com as folhas tratadas durante todo o período experimental. As lagartas recém-eclodidas, alimentadas com folhas de milho tratadas com extrato de nim por um dia, tiveram alta mortalidade (99,0 a 100,0%), indicando que mesmo um curto período de alimentação em plantas tratadas é suficiente para que o seu desenvolvimento seja afetado. A mortalidade de lagartas com até oito dias (3º ínstar) tratadas durante todo o período foi elevada (90,0%), decrescendo acentuadamente após dez dias de idade. Isso indica que, quanto mais avançada a idade das lagartas submetidas ao tratamento, menor o efeito do extrato de nim e, consequentemente, o controle (VIANA; PRATES, 2005).

Muitos trabalhos têm sido feitos também com produtos formulados. Lima et al. (2008) estudaram a eficiência de alguns produtos comerciais à base de nim em campo: NeemAzal-T/S®

(0,25% e 0,5%), Rotenat CE® (0,5%), Natuneem® (0,5%), Rotenat CE® + Natuneem® (0,25+0,25%), Dalneem® (0,5%) e Organic Neem® (0,5%). Os autores fizeram três pulverizações dos tratamentos, em duas épocas de semeadura (novembro e dezembro de 2005), determinando oito dias após cada aplicação a porcentagem de plantas atacadas e o rendimento de grãos. Obtiveram diferença significativa no controle da lagarta-do-cartucho entre as épocas de semeadura, com maior eficiência de controle para a primeira época, destacando-se os tratamentos com NeemAzal-T/S (0,5%) e Dalneem (0,5%). Quanto ao rendimento de grãos, não constataram diferença entre as épocas de semeadura, destacando-se o NeemAzal-T/S (0,5%) na primeira época, causando a menor redução dentre os inseticidas à base de nim testados.

Pérez et al. (1997) avaliaram, em Cuba, três inseticidas à base de nim para controle de *S. frugiperda* em campo. Os produtos testados foram Cubanim-t® (pó seco), Oleonim-80® CE e Oleonim-50® CE, em comparação ao inseticida químico Karate® EC. Os três produtos reduziram a população da lagarta no campo, com melhor eficiência com 3 e 4 aplicações, embora nenhum deles tenha superado o tratamento químico.

Correia et al. (2007) testaram sobre a lagarta-do-cartucho o produto Rot-nim® que, além de nim, contém rotenona piretro, pirolenhoso, *Allamanda nobilis* e *Piper nigrum.* O mesmo foi preparado nas concentrações 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,00%, nas quais seções foliares eram submersas e posteriormente oferecidas a lagartas de 3° ínstar, sendo substituídos após 48h por folhas não tratadas, trocadas diariamente até o final da fase larval. Avaliaram então a sobrevivência larval, a duração da fase larval (3° ínstar até pupa), duração e peso das pupas com 24h de idade e razão sexual. Na concentração de 1,0% a sobrevivência larval foi de 36,67%, sendo a única a diferir da testemunha. Os outros parâmetros biológicos não foram afetados por nenhuma das concentrações testadas. Os autores observaram, ainda, que as lagartas que se alimentaram de folhas tratadas com Rot-nim, principalmente nas maiores concentrações, reduziram a alimentação, apresentaram retenção de exúvias e ecdises incompletas, e atribuíram esse fato ao efeito do produto como regulador de crescimento.

Lima, Oliveira e Marques (2009) testaram em campo, casa de vegetação e laboratório, as formulações comerciais de nim Natuneem® e Neemseto®, além do inseticida biológico Bta (Xentari®). As aplicações dos produtos em campo foram feitas aos 15, 30 e 45 e aos 15, 25 e 35 dias após a emergência das plantas, em dois experimentos, um em 2005 e outro em 2006, sendo a eficiência avaliada por meio da escala de danos (injúrias) de Carvalho (1970), variando de 0

(plantas sem injúrias nas folhas) a 5 (plantas mortas). Em 2005, apenas Neemseto foi eficiente aos 30 dias. Em 2006, as parcelas tratadas com Neemseto e com Bta, com notas médias de 0,93 e 0,98, respectivamente, diferiram da testemunha, cuja nota foi 2,38, na avaliação realizada aos 35 dias. Em casa de vegetação, plantas de milho com cerca de 40 dias de idade foram pulverizadas e posteriormente infestadas artificialmente com lagartas recém-eclodidas da lagarta-do-cartucho. Após 10 dias verificaram que os tratamentos foram igualmente eficientes, diferindo da testemunha, tanto em relação às notas de dano quanto ao número de lagartas sobreviventes, sendo então promissores para uso em programas de manejo desse inseto.

2.2.2 Barreiras à expansão e comercialização do nim

Até o momento há apenas quatro tipos principais de produtos botânicos em uso para o controle de insetos (piretro, rotenona, nim e óleos essenciais), juntamente com três outros de uso limitado (riania, nicotina e sabadila). O piretro é o inseticida botânico predominante em uso, ocupando cerca de 80% do mercado global de inseticidas botânicos (ISMAN, 2006).

O principal entrave à chegada desses produtos ao mercado é o registro. Em geral, não se trata de uma única substância de origem vegetal, ou um complexo de substâncias quimicamente similares, mas várias moléculas com distintas estruturas, de maneira que as instituições de registro em todos os países solicitam a identificação de todas elas e os correspondentes testes toxicológicos (AGUIAR-MENEZES, 2005). Na Alemanha, o processo de registro de um extrato de nim (com azadiractina como ingrediente ativo) como inseticida para permissão em todos os cultivos leva em torno de 8 anos, a um custo médio de 8 milhões de dólares (ISMAN, 1997).

No Brasil, atualmente há vários produtos formulados à base de nim, como Neemseto® (Cruangi Neem do Brasil Ltda., Timbaúba, PE), Organic Neem® (Dalquim Indústria e Comércio, Itajaí, SC), Natuneem® (Natural Rural, Araraquara, SP), Base Nim® (Base Fértil Comercial Agrícola Ltda., Ribeirão Preto, SP), Azamax® (DVA Agro do Brasil, Campinas, SP), entre outros, sendo este último o único com registro no Ministério da Agricultura, para controle de *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) na cultura do citros (AGROFIT, 2009).

Outros fatores que têm dificultado o aumento do uso do nim no mercado são a falta de suprimento de sementes com conteúdo conhecido de azadiractina, a falta de padronização dos

produtos formulados e o custo do produto (MORDUE (LUNTZ); NISBET, 2000). Além disso, por se tratar de um produto natural, os compostos do nim apresentam persistência limitada sob condições de campo. Temperatura, luz ultravioleta, pH das partes da planta tratadas, chuva e outros fatores ambientais exercem influência negativa sobre os princípios ativos. O efeito residual de produtos à base de nim é relativamente baixo, em torno de 5 a 7 dias, o que geralmente torna necessário repetir a aplicação em um curto período de tempo (SCHMUTTERER, 1990). A azadiractina é suscetível à fotodegradação e se decompõe com o calor, por isso a hora apropriada para sua aplicação é ao amanhecer ou entardecer. Após 4h de exposição à luz solar, a atividade da azadiractina pode ser reduzida a quase 60% (CIOCIOLA JR.; MARTINEZ, 2002; MARTINEZ, 2002).

Caboni et al. (2002) estudaram a degradação da azadiractina A em frutos de oliveira pulverizados e em testes de laboratório, utilizando uma formulação comercial Oikos® (AZ-A 3,2%, Sipcam, Itália) na dose recomendada. Nos testes com os frutos, os mesmos foram coletados 1, 2, 3 e 7 dias após a aplicação da formulação, a partir dos quais foram obtidos extratos para quantificação do resíduo de azadiractina. O resíduo encontrado logo após o tratamento foi de 0,35 mg/kg; no dia 1, o resíduo foi 0,28 mg/kg; no dia 3, constatou-se redução de 90%, com 0,03 mg/kg de resíduo e, no dia 7, a azadiractina não foi detectada. A meia-vida da azadiractina foi calculada em 0,8 dias. Em laboratório, os autores simularam testes de evaporação, termodegradação e fotodegradação, com a formulação comercial e também com a azadiractina isolada, e verificaram que a fotodegradação é o principal fator responsável pela degradação do composto. A meia-vida calculada para a azadiractina isolada foi de 13,2h, enquanto que para a formulação foi de 2,7h, ou seja, uma taxa de degradação cinco vezes maior. Isso mostra que os aditivos na formulação aceleram a fotodegradação da azadiractina, atuando como catalisadores. Assim, é necessário que haja mais pesquisas visando à obtenção de novas formulações, mais estáveis e com maior persistência, melhorando consequentemente sua eficiência (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1992).

2.3 A nanotecnologia e o desenvolvimento de novas formulações de nim

O inseticida mais simples de nim é um óleo ou extrato cru. Entretanto, várias modificações podem ser feitas para aumentar a estabilidade e a reprodutibilidade do produto: os

extratos de nim podem ser convertidos na forma de grânulos, pós, pós molháveis ou concentrados emulsionáveis. Outras formulações podem envolver a adição de produtos químicos ou mesmo a modificação química dos ingredientes ativos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1992). Produtos com características melhoradas poderiam ser obtidos através de uma área ampla e interdisciplinar da ciência que vem crescendo rapidamente nos últimos anos, a nanotecnologia**.** Esta se baseia na manipulação de partículas subatômicas, as nanopartículas. Um nano é a unidade de medida que corresponde à milionésima parte de um milímetro (GRUPO ETC, 2004). O domínio da nanotecnologia encontra-se compreendido entre 0,1 e 100 nm, ou seja, desde as dimensões dos átomos e moléculas até próximo a valores do comprimento de onda da luz visível (MEDEIROS; PATERNO; MATTOSO, 2006).

No Brasil, a partir de 2001, o Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT) começou um esforço conjunto nesta área, conhecido como Iniciativa Brasileira em Nanotecnologia, formando uma rede de pesquisa cooperativa neste tema, que conta com a participação de mais de uma centena de instituições de pesquisa e ensino em todo o país (GONGORA-RUBIO; SEABRA, 2005; DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006).

A nanotecnologia tem provocado uma revolução em vários setores da ciência e tecnologia, pela descoberta de que os materiais em escala nanométrica (nanoescala) podem apresentar novas propriedades físicas e químicas e melhores desempenhos do que aqueles que geralmente são apresentados em escala micro ou macroscópica (MEDEIROS; PATERNO; MATTOSO, 2006). Os materiais se comportam de maneira diferente na nanoescala porque nesta tem-se, proporcionalmente, uma superfície muito grande em relação à massa do material, o que implica que nenhum átomo esteja muito longe de uma interface e, portanto, fique sujeito a interações com o mundo exterior, tornando-se mais reativo (GONGORA-RUBIO; SEABRA, 2005).

A indústria está explorando essas alterações que a matéria sofre na nanoescala para criar novos produtos. A maior parte das aplicações comerciais está na engenharia de materiais, informática, medicina, agricultura e alimentação (GRUPO ETC, 2004). Podem-se obter materiais mais leves, pneus mais duráveis e plásticos não inflamáveis; aumento na velocidade de processamento de informação nos sistemas de comunicação, sistemas de comunicação *wireless*; confecção de tecidos inteligentes que repelem manchas, reduzem a absorção de umidade e são antiestáticos; obtenção de nanopartículas poliméricas para administração de fármacos, além de

novos medicamentos baseados em nanoestruturas e até *kits* de autodiagnóstico; membranas seletivas para remoção de contaminantes, novas possibilidades de reciclagem e pesticidas mais seguros aplicados via nanoencapsulamento (GONGORA-RUBIO; SEABRA, 2005).

No setor agrícola, grandes corporações como a BASF, Bayer, Syngenta e Monsanto estão patenteando agrotóxicos nanoencapsulados, que se dissolvem mais facilmente na água, requerem menor quantidade de produto ativo e têm maior poder letal, ou alcançam exclusivamente o objetivo, sem maiores efeitos secundários (GRUPO ETC, 2004). Produtos com maior eficácia na aplicação são desejáveis não apenas pela vantagem econômica, mas, sobretudo, pela diminuição da toxicidade para o homem durante a sua aplicação e diminuição da carga poluente para o meio ambiente. Assim, a aplicação da nanotecnologia no setor de insumos agropecuários tem a finalidade de melhorar a eficiência funcional de produtos como nutrientes e agrotóxicos e a segurança no manuseio desses produtos, reduzindo riscos de toxicidade para o homem, de contaminação ambiental e das concentrações aplicadas na lavoura (MATTOSO; MEDEIROS; MARTIN NETO, 2005).

As nanopartículas são preparadas a partir de polímeros biodegradáveis em sistemas coloidais aquosos que podem ser compostos por nanocápsulas ou nanoesferas, as quais diferem entre si pela presença ou ausência de óleo em suas composições. As nanocápsulas são vesículas constituídas por um invólucro polimérico disposto em torno de um núcleo oleoso. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica (MAGENHEIM; BENITA, 1991). Nas nanoesferas, os compostos bioativos podem encontrar-se retidos ou dispersos na matriz, enquanto que nas nanocápsulas eles estarão distribuídos na vesícula ou adsorvidos na parede polimérica (Figura 1) (SCHAFFAZICK et al., 2003).

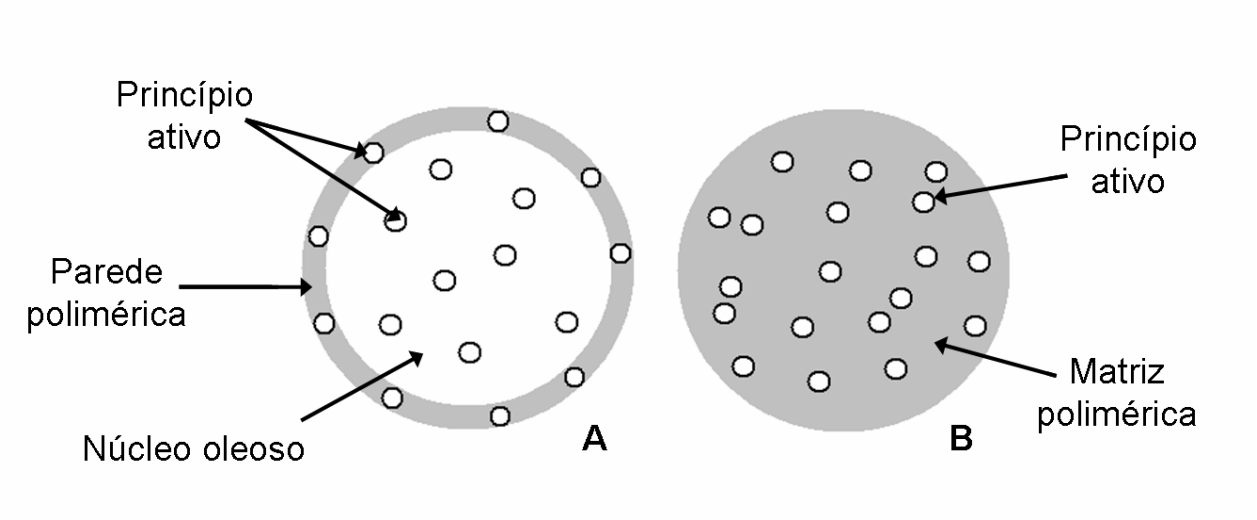

Figura 1 - Representação esquemática de nanopartículas poliméricas. A) Nanocápsula, com o princípio ativo dissolvido no núcleo oleoso e/ou adsorvido na parede polimérica; B) Nanoesfera, com o princípio ativo retido (adsorvido e/ou disperso) na matriz polimérica. (Adaptado de Schaffazick et al., 2003)

As nanopartículas poliméricas podem ser preparadas de diversos métodos. De uma forma geral, esses métodos podem ser classificados em duas categorias principais, levando-se em consideração se a formação das nanopartículas requer uma reação de polimerização (polimerização *in situ*) ou se estas são formadas diretamente utilizando-se um polímero pré-formado (SCHAFFAZICK et al., 2003; SOPPIMATH et al., 2001). Dentre essas técnicas destaca-se a deposição interfacial de polímero pré-formado, seguida da evaporação do solvente, considerado um método simples, baseado na precipitação de polímeros. No processo, uma separação de fases é induzida pela adição da solução de polímero em um não solvente para o mesmo. Assim, as partículas formam-se espontânea e instantaneamente (FESSI et al., 1989).

Entre os polímeros biodegradáveis utilizados, os polihidroxialcanoatos (PHAs), em particular o poli-ß-hidroxibutirato (PHB) e poli-ε-caprolactona (PCL), têm despertado o interesse de muitos pesquisadores, por serem poliésteres biodegradáveis no ambiente. O PHB é produzido pela bactéria *Cupriavidus necator*, que o acumula sob a forma de grânulos intracelulares a partir de substâncias como a glicose e a sacarose. O polímero é completamente degradado, gerando CO_2 e convertido à biomassa por bactérias, fungos e leveduras. É muito aplicado em diversas áreas como na indústria de embalagens, na agricultura, em áreas médicas com ênfase na ortopedia e em sistemas de liberação de drogas (ROSA; PENTEADO; CALIL, 2000). O PCL é um poliéster biocompatível geralmente preparado pela abertura do anel de polimerização do ε-

caprolactona (CHANDRA; RUSTGI, 1998) e degradado por muitos microorganismos, em particular pelo fungo *Pullularia pullulans* (MOCHIZUCHI et al., 1999). Está sendo investigado particularmente no contexto de sistemas de liberação de drogas (CHIELLINI; SOLARO, 1996).

Outro polímero biocompatível de grande interesse é o polimetacrilato de metila ou polimetilmetacrilato (PMMA), obtido através da polimerização do metacrilato de metila (MMA). O PMMA é um termoplástico amplamente usado nos mais variados campos devido às suas excelentes propriedades, tais como transparência e baixa densidade. Conhecido como acrílico, é utilizado em revestimentos de superfície, plásticos, próteses dentárias, em substituição ao vidro em aviões e barcos, clarabóias, iluminação exterior, painéis para anúncios de publicidade, lentes para as luzes traseiras dos automóveis, revestimentos protetores, óculos de proteção, puxadores e maçanetas (ANTÓNIO, 2007). Ele degrada-se sob ação do calor quase exclusivamente em metacrilato de metila, com rendimentos que podem atingir 97%, gerando além do monômero, produtos secundários como CO_2, CO, CH_4, CH_3OH, hidrocarbonetos e resíduos carbonizados (ARISAWA; BRILL, 1997).

A velocidade de degradação dos polímeros biodegradáveis pode ser modificada e regulada por variações na composição, no peso molecular do polímero e nos métodos de preparação das nanopartículas, entre outros. A possibilidade de produção de uma diversidade de polímeros com propriedades variadas representa uma ferramenta importante para a engenharia de nanopartículas (RÉ; RODRIGUES, 2006).

Assim, a obtenção de formulações encapsuladas em que o princípio ativo pudesse ter sua liberação controlada, prolongaria sua atividade biológica, uma vez que o envoltório polimérico propiciaria redução das perdas do produto por evaporação e protegeria os ingredientes ativos da degradação pela luz solar (GRUPO ETC, 2004). No caso do nim, uma formulação com essas características poderia representar uma alternativa mais econômica e eficiente de controle.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Plantas Inseticidas, em condições controladas (25±3ºC, UR 60±10% e fotofase de 14 horas), e em casa de vegetação, no Setor de Entomologia, Departamento de Entomologia e Acarologia, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ/USP, em Piracicaba, SP.

3.1 Criação de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)

A criação de *S. frugiperda* foi mantida no referido laboratório, onde as lagartas foram alimentadas com dieta artificial (BURTON; PERKINS, 1972), e os adultos receberam apenas água. Periodicamente, posturas provenientes de criações mantidas em outros laboratórios do mesmo setor foram introduzidas na criação, para aumentar a variabilidade genética e evitar degeneração da população.

3.2 Bioensaios com aplicação das formulações em dieta artificial

3.2.1 Estimativa da CL_{50} de uma formulação comercial de óleo de nim

Nessa primeira etapa, foram realizados testes para estimativa da CL_{50} (concentração necessária para matar 50% da população de lagartas) por meio da aplicação de uma formulação comercial de óleo de nim (Organic Neem®, Dalquim Indústria e Comércio) em dieta artificial oferecida a lagartas de segundo ínstar de *S. frugiperda*. Antes de cada teste, a quantidade de azadiractina A em mg/L presente no produto foi quantificada e utilizada como referência para fins de padronização das concentrações.

Foram realizados testes preliminares com a referida formulação para estimar as concentrações básicas do produto que provocam mortalidade larval de 95% e mortalidade semelhante à obtida no controle (água destilada). Com base nessas concentrações, foram estabelecidas as concentrações a serem testadas, através da fórmula (FINNEY, 1971):

$$q = \sqrt[n+1]{\frac{a_n}{a_1}},$$

onde: q = razão de progressão geométrica (p.g.); n = número de concentrações a extrapolar; a_n = limite superior da p.g. (concentração que provoca mortalidade de cerca de 95%, estimada através dos testes preliminares); a_1= limite inferior da p.g. (concentração que provoca mortalidade semelhante ao controle, estimada através dos testes preliminares).

Para a realização dos testes preliminares e do teste para determinação da CL_{50}, foram utilizadas placas de Elisa com 24 células cada, onde foram colocados 2 ml de dieta artificial (GREENE; LEPLA; DICKERSON, 1976) por célula, utilizando um pipetador (Boeco Germany® Series Pipetor). As diferentes concentrações da referida formulação foram obtidas por diluição em água destilada e em cada célula foram aplicados 30 µl, sobre a dieta, com auxílio de uma micropipeta (Exacta® Micro Pipette). As placas foram mantidas abertas por duas horas para permitir a evaporação do excesso de água e em seguida foi inoculada uma lagarta de segundo ínstar por célula. Foram feitas quatro repetições por tratamento, cada uma consistindo de uma placa de Elisa, totalizando 96 lagartas. As avaliações de mortalidade foram feitas diariamente, até o 10º dia após a instalação do experimento.

3.2.2 Seleção das nanoformulações mais promissoras em dieta artificial

Nessa etapa foram testadas 24 nanoformulações em suspensão, incluindo formulações sem princípio ativo, ou seja, sem óleo e/ou extrato de nim (brancos), para verificação de algum possível efeito adverso dos polímeros sobre as lagartas (Quadro 1). As nanoformulações foram obtidas pelo método de deposição de polímeros pré-formados (FESSI et al., 1989), sendo utilizado nas esferas um extrato de nim obtido em laboratório por percolação em solvente, e nas cápsulas óleo comercial Organic Neem, além do extrato. As primeiras nanoformulações testadas variaram principalmente quanto ao tipo e quantidade de polímero utilizado e tipo de nanopartícula. Assim, foram utilizados dois polímeros: PCL (poli-ε-caprolactona) e PHB (poli-ß-hidroxibutirato), e ainda uma blenda (mistura) dos dois (PCL+PHB). As quantidades de polímero utilizadas foram 0,25; 0,5 e 0,75 g. Quanto ao tipo de nanopartícula foram avaliados: nanocápsula

(NC, composta por uma camada polimérica envolvendo óleo comercial Organic Neem + extrato de nim) e nanoesfera (NS, composta por uma matriz polimérica contendo apenas extrato de nim).

Código	Descrição
Formulações com nim	
[S]NC-PCL(0,25)	Nanocápsulas PCL (0,25g) + óleo de nim + extrato de nim + Tween
[S]NC-PCL(0,50)	Nanocápsulas PCL (0,50g) + óleo de nim + extrato de nim + Tween
[S]NC-PCL(0,75)	Nanocápsulas PCL (0,75g) + óleo de nim + extrato de nim + Tween
[S]NC-PHB(0,50)	Nanocápsulas PHB (0,50g) + óleo de nim + extrato de nim + Tween
[S]NC-PCL/PHB(0,50)	Nanocápsulas PCL e PHB (0,50g) + óleo de nim + extrato de nim + Tween
[S]NC-PCL(0,50)+TF	Nanocápsulas PCL (0,50g) + óleo de nim + extrato de nim + Tween + Tampão fosfato
[S]NC-PCL(0,50)+ TiO_2	Nanocápsulas PCL (0,50g) + óleo de nim + extrato de nim + Tween + TiO_2 (0,025%)
[S]NS- PCL(0,25)	Nanoesferas PCL (0,25g) + extrato de nim + Tween
[S]NS-PCL(0,50)	Nanoesferas PCL (0,50g) + extrato de nim + Tween
[S]NS-PCL(0,75)	Nanoesferas PCL (0,75g) + extrato de nim + Tween
[S]NS-PHB(0,50)	Nanoesferas PHB (0,50g) + extrato de nim + Tween
[S]NS-PCL/PHB(0,50)	Nanoesferas PCL e PHB (0,50g) + extrato de nim + Tween
[S]NS-PCL(0,50)+TF	Nanoesferas PCL (0,50g) + extrato de nim + Tween + Tampão fosfato
[S]NS-PCL(0,50)+ TiO_2	Nanoesferas PCL (0,50g) + extrato de nim + Tween + TiO_2 (0,025%)
Formulações sem nim (brancos)	
[S]NC-PCL(0,25)-B	Nanocápsulas PCL (0,25g) + Oleato de isodecila + Tween
[S]NC-PCL(0,50)-B	Nanocápsulas PCL (0,50g) + Oleato de isodecila + Tween
[S]NC-PCL(0,75)-B	Nanocápsulas PCL (0,75g) + Oleato de isodecila + Tween
[S]NC-PHB(0,50)-B	Nanocápsulas PHB (0,50g) + Oleato de isodecila + Tween
[S]NC-PCL/PHB(0,50)-B	Nanocápsulas PCL e PHB (0,50g) + Oleato de isodecila + Tween
[S]NS-PCL(0,25)-B	Nanoesferas PCL (0,25g) + Tween
[S]NS-PCL(0,50)-B	Nanoesferas PCL (0,50g) + Tween
[S]NS-PCL(0,75)-B	Nanoesferas PCL (0,75g) + Tween
[S]NS-PHB(0,50)-B	Nanoesferas PHB (0,50g) + Tween
[S]NS-PCL/PHB(0,50)-B	Nanoesferas PCL e PHB (0,50g) + Tween

Quadro 1 - Nanoformulações em suspensão aplicadas sobre dieta artificial para avaliação de eficiência sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda*

[S] = suspensão; NC = nanocápsula; NS = nanoesfera; PCL = poli-ε-caprolactona;
PHB = poli-ß-hidroxibutirato; TF = tampão fosfato; B = branco; TiO_2 = dióxido de titânio.

Algumas formulações foram acrescidas de tampão fosfato, que teria a função de equilibrar o pH e assim reduzir a degradação dos compostos, e outras de dióxido de titânio (TiO_2), que atua como protetor solar e bactericida, também para proteger os compostos da degradação pela luz e calor solar, assim como por microorganismos. O agente tensoativo utilizado nas nanoformulações foi o Tween®80. O oleato de isodecila foi utilizado nos brancos de nanocápsulas pelo fato de estas serem formadas por uma matriz oleosa, e na ausência do óleo de nim esse óleo mineral é utilizado. Além disso, é uma forma de avaliar se o óleo pode ter alguma atividade sobre as lagartas. Essas nanoformulações foram testadas em quatro bioensaios separados, com delineamento inteiramente casualizado. Foram incluídos ainda um tratamento com Organic Neem como padrão e um controle (água destilada), em cada um dos bioensaios. As formulações foram preparadas por diluição em água destilada, para obtenção da concentração (mg/L) correspondente à CL_{50} obtida no item 3.2.1, e aplicadas sobre dieta artificial conforme descrito no referido item. As avaliações de mortalidade foram feitas até o 10° dia, ocasião em que as lagartas sobreviventes foram pesadas.

Foi realizado também um teste para avaliar o efeito das nanoformulações sobre o desenvolvimento do inseto. Para tanto, algumas das formulações foram selecionadas ([S]NC-PCL(0,50); [S]NC-PCL/PHB(0,50); [S]NC-PHB(0,50) e respectivos brancos) e avaliadas em comparação ao padrão e ao controle, aplicadas sobre dieta artificial em tubos de ensaio, sendo quatro repetições de 20 tubos cada tratamento. As avaliações foram feitas até a emergência do adulto, considerando a viabilidade e a duração das fases larval e pupal, e peso médio de lagartas (14 dias após a instalação do experimento) e de pupas (24 horas).

3.3 Bioensaios com aplicação das formulações em plantas de milho em casa de vegetação

3.3.1 Cultivo das plantas de milho

Sementes de milho (híbrido 2B710, Dow AgroSciences) foram semeadas em vasos plásticos contendo solo, areia e húmus. Após a germinação foi realizado o desbaste, de modo a restarem de quatro a seis plantas por vaso. As plantas foram adubadas com sulfato de amônio aos 20 dias após a germinação e regadas diariamente. Para os experimentos, foram utilizadas plantas com 30-40 dias de idade.

3.3.2 Estimativa da CL_{50} de uma formulação comercial de óleo de nim em plantas de milho

Foram realizados novamente testes para estimativa da CL_{50} da formulação comercial de óleo de nim (Organic Neem), desta vez em plantas de milho, mantidas em casa de vegetação. O conteúdo de azadiractina A do produto foi quantificado periodicamente, sendo utilizado como referência. As concentrações básicas foram estimadas por meio de testes preliminares e pela fórmula de Finney (1971), conforme descrito no item 3.2.1.

Plantas de milho com 30-40 dias de idade foram pulverizadas com as diferentes concentrações do produto, diluído em água destilada e espalhante adesivo (Extravon® 0,2%). Para cada tratamento foram utilizados seis vasos com quatro a seis plantas, e para cada vaso o volume de solução aplicado foi de 10-15 ml. As aplicações foram feitas ao final da tarde e, na manhã do dia seguinte, seções foliares foram cortadas e colocadas em tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura), sendo em cada um inoculada uma lagarta de 1º ínstar (com 48 horas de idade, previamente mantida em dieta artificial). Os tubos foram fechados com algodão hidrófugo e mantidos em laboratório com condições controladas como descrito anteriormente. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 80 lagartas por tratamento, divididas em quatro repetições de 20 cada. As avaliações de mortalidade foram feitas diariamente, ocasião em que as seções foliares eram trocadas, sendo considerada para determinação da CL_{50} a mortalidade total seis dias após a instalação do experimento.

3.3.3 Seleção de nanoformulações em plantas de milho em casa de vegetação

Para os bioensaios em casa de vegetação, foram testadas algumas nanoformulações com a mesma composição daquelas testadas em dieta artificial, além de outras não testadas anteriormente. Foram produzidas 22 formulações em suspensão (Quadro 2), a partir das quais foram obtidas outras 22 em pó, através de secagem por aspersão (Quadro 3). Dessa forma, a composição das formulações era a mesma, variando apenas a forma de apresentação (suspensão ou pó), sendo este um outro fator avaliado, além do tipo e quantidade de polímero e do tipo de nanopartícula. Foi testada ainda uma formulação adicional, um pó obtido a partir de secagem por

aspersão do óleo Organic Neem, para verificar se o processo poderia comprometer os compostos do nim. Portanto, foram testadas nessa etapa 45 formulações, incluindo os brancos.

Código	Descrição
Formulações com nim	
[S]NC-PCL(0,25)*	Nanocápsulas PCL (0,25g) + óleo de nim + extrato de nim + Tween
[S]NC-PCL(0,50)*	Nanocápsulas PCL (0,50g) + óleo de nim + extrato de nim + Tween
[S]NC-PCL(0,75)*	Nanocápsulas PCL (0,75g) + óleo de nim + extrato de nim + Tween
[S]NC-PHB(0,25)	Nanocápsulas PHB (0,25g) + óleo de nim + extrato de nim + Tween
[S]NC-PHB(0,50)*	Nanocápsulas PHB (0,50g) + óleo de nim + extrato de nim + Tween
[S]NC-PHB(0,75)	Nanocápsulas PHB (0,75g) + óleo de nim + extrato de nim + Tween
[S]NC-PMMA(0,25)	Nanocápsulas PMMA (0,25g) + óleo de nim + extrato de nim + Tween
[S] NC-PCL(0,25)+PVA	Nanocápsulas PCL (0,25g) + óleo de nim + extrato de nim + Polivinil álcool
[S]NS-PCL(0,25)*	Nanoesferas PCL (0,25g) + extrato de nim + Tween
[S]NS-PCL(0,50)*	Nanoesferas PCL (0,50g) + extrato de nim + Tween
[S]NS-PCL(0,75)*	Nanoesferas PCL (0,75g) + extrato de nim + Tween
[S]NS-PHB(0,25)	Nanoesferas PHB (0,25g) + extrato de nim + Tween
[S]NS-PHB(0,50)*	Nanoesferas PHB (0,50g) + extrato de nim + Tween
[S]NS-PHB(0,75)	Nanoesferas PHB (0,75g) + extrato de nim + Tween
[S]NS-PMMA(0,25)	Nanoesferas PMMA (0,25g) + extrato de nim + Tween
[S]NS-PCL(0,25)+PVA	Nanoesferas PCL (0,25g) + extrato de nim + Polivinil álcool
Formulações sem nim (brancos)	
[S] NC-PCL(0,25)-B*	Nanocápsulas PCL (0,25g) + Oleato de Isodecila + Tween
[S] NC-PHB(0,25)-B	Nanocápsulas PHB (0,25g) + Oleato de Isodecila + Tween
[S] NC-PMMA(0,25)-B	Nanocápsulas PMMA (0,25g) + óleo e extrato de nim + Tween
[S]NS-PCL(0,25)-B*	Nanoesferas PCL (0,25g) + Tween
[S]NS-PHB(0,25)-B	Nanoesferas PHB (0,25g) + Tween
[S]NS-PMMA(0,25)-B	Nanoesferas PMMA (0,25g) + extrato de nim + Tween

Quadro 2 – Nanoformulações em suspensão pulverizadas em folhas de milho para avaliação de eficiência sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda*

* Testadas também em dieta artificial, nos bioensaios anteriores.
[S] = suspensão; NC = nanocápsula; NS = nanoesfera; PCL = poli-ε-caprolactona; PHB = poli-ß-hidroxibutirato; PPMA = polimetilmetacrilato; TF = tampão fosfato; B = branco; TiO_2 = dióxido de titânio; PVA = polivinil álcool.

Código	Descrição
Formulações com nim	
[P]NC-PCL(0,25)	Nanocápsulas PCL (0,25g) + óleo de nim + extrato de nim + Tween
[P]NC-PCL(0,50)	Nanocápsulas PCL (0,50g) + óleo de nim + extrato de nim + Tween
[P]NC-PCL(0,75)	Nanocápsulas PCL (0,75g) + óleo de nim + extrato de nim + Tween
[P]NC-PHB(0,25)	Nanocápsulas PHB (0,25g) + óleo de nim + extrato de nim + Tween
[P]NC-PHB(0,50)	Nanocápsulas PHB (0,50g) + óleo de nim + extrato de nim + Tween
[P]NC-PHB(0,75)	Nanocápsulas PHB (0,75g) + óleo de nim + extrato de nim + Tween
[P]NC-PMMA(0,25)	Nanocápsulas PMMA (0,25g) + óleo de nim + extrato de nim + Tween
[P]NC-PCL(0,25)+PVA	Nanocápsulas PCL (0,25g) + óleo de nim + extrato de nim + Polivinil álcool
[P]NS-PCL(0,25)	Nanoesferas PCL (0,25g) + extrato de nim + Tween
[P]NS-PCL(0,50)	Nanoesferas PCL (0,50g) + extrato de nim + Tween
[P]NS-PCL(0,75)	Nanoesferas PCL (0,75g) + extrato de nim + Tween
[P]NS-PHB(0,25)	Nanoesferas PHB (0,25g) + extrato de nim + Tween
[P]NS-PHB(0,50)	Nanoesferas PHB (0,50g) + extrato de nim + Tween
[P]NS-PHB(0,75)	Nanoesferas PHB (0,75g) + extrato de nim + Tween
[P]NS-PMMA(0,25)	Nanoesferas PMMA (0,25g) + extrato de nim + Tween
[P]NS-PCL(0,25)+PVA	Nanoesferas PCL (0,25g) + extrato de nim + Polivinil álcool
Formulações sem nim (brancos)	
[P]NC-PCL(0,25)-B	Nanocápsulas PCL (0,25g) + Oleato de Isodecila + Tween
[P]NC-PHB(0,25)-B	Nanocápsulas PHB (0,25g) + Oleato de Isodecila + Tween
[P]NC-PMMA(0,25)-B	Nanocápsulas PMMA (0,25g) + óleo de nim + extrato de nim + Tween
[P]NS-PCL(0,25)-B	Nanoesferas PCL (0,25g) + Tween
[P]NS-PHB(0,25)-B	Nanoesferas PHB (0,25g) + Tween
[P]NS-PMMA(0,25)-B	Nanoesferas PMMA (0,25g) + extrato de nim + Tween
Adicional	
[P]ON	Pó de óleo de nim Organic Neem obtido por secagem por aspersão

Quadro 3 – Nanoformulações em pó pulverizadas em folhas de milho para avaliação de eficiência sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda*

[P] = pó; NC = nanocápsula; NS = nanoesfera; PCL = poli-ε-caprolactona; PHB = poli-ß-hidroxibutirato; PPMA = polimetilmetacrilato; TF = tampão fosfato; B = branco; TiO_2 = dióxido de titânio; PVA = polivinil álcool.

Em algumas formulações o agente tensoativo Tween foi substituído por outro, PVA (polivinil álcool), para determinar o mais eficiente, uma vez que o tipo de tensoativo utilizado na formulação influencia na estabilidade das nanopartículas em suspensão e na velocidade de liberação dos compostos nanoencapsulados.

As nanoformulações foram testadas em cinco bioensaios separados, sempre em comparação a um padrão (Organic Neem) e um controle (água destilada). As soluções foram preparadas por diluição em água destilada contendo espalhante adesivo (Extravon® 0,2%), para obtenção da concentração de azadiractina A (mg/L) correspondente à CL_{50} obtida no item 3.3.2. Plantas de milho com 30-40 dias de idade foram pulverizadas com as formulações, utilizando-se um pulverizador manual (Guarany® 500 ml), seguindo os mesmos procedimentos descritos naquele item. As avaliações de mortalidade eram feitas diariamente, ocasião em que as seções foliares eram trocadas, sendo considerada a mortalidade total após 10 dias da instalação do experimento. Após esse período, as lagartas sobreviventes foram pesadas.

Após a conclusão dos cinco bioensaios, os resultados obtidos em todos eles foram comparados para seleção das melhores formulações. Para isso, foi feita a correção da mortalidade pela fórmula de Abbott (1925), sendo então selecionadas para os testes subseqüentes as formulações com maior eficiência de controle, que causaram também redução de peso significativa e que diferiram dos brancos.

3.3.4 Efeito residual das nanoformulações selecionadas sobre o inseto

Nesse experimento, além das quatro formulações selecionadas no item 3.3.3, foram incluídos ainda o óleo de nim comercial Organic Neem (padrão) e água destilada (controle). Os tratamentos foram pulverizados sobre as plantas de milho ao final da tarde, em casa de vegetação, conforme referido no item 3.3.2, utilizando-se a concentração correspondente à CL_{50} obtida no mesmo item.

Visando avaliar o poder residual das diferentes formulações o experimento foi realizado em três épocas, cada uma correspondendo a uma época a contar da pulverização: 1 DAP (1 dia após a pulverização); 3 DAP e 7 DAP. Seções de folhas de milho pulverizadas foram coletadas (com início nos respectivos dias após a pulverização) e oferecidas a lagartas recém-eclodidas mantidas em tubos de vidro (8,5 x 2,5 cm) fechados com algodão hidrófugo. As folhas eram

trocadas diariamente, ocasião em que era avaliada a mortalidade larval. Foram utilizadas 60 lagartas para cada tratamento e cada época, em quatro repetições de 15 lagartas cada. Os parâmetros avaliados foram: mortalidade larval em cada uma das épocas e peso das lagartas sobreviventes 10 dias após a instalação de cada bioensaio.

3.3.5 Efeito das nanoformulações selecionadas sobre o consumo foliar

Para avaliar a deterrência alimentar provocada pelas diferentes formulações foi realizado um teste de preferência alimentar, em condições de dupla escolha (tratamento x controle), utilizando-se os mesmos tratamentos empregados no item anterior. Foram então três bioensaios, coletando-se as folhas de milho nos mesmos períodos (1, 3 e 7 DAP) e cortando-se discos foliares com área de cerca de 6,15 cm^2 (vazador de 2,8 cm de diâmetro). Como arenas, foram utilizadas placas de Petri (15 cm de diâmetro), com fundo coberto por gesso, que foram umedecidas antes do início do experimento. Cada placa foi dividida em quatro quadrantes: em dois deles foram colocados dois discos de folhas (opostos) pulverizadas com uma das formulações à base de nim e nos outros dois quadrantes foram colocados dois discos pulverizados com água destilada (controle). No centro de cada placa foi liberada uma lagarta de terceiro ínstar de *S. frugiperda*, e após 24 horas foi determinada a área restante dos discos foliares (Figura 2), por meio de um medidor da área foliar (Li-Cor, modelo LI-3000A). A área consumida foi calculada pela diferença entre a área fornecida e a área restante. Foram realizados bioensaios independentes para cada um dos cinco tratamentos (quatro nanoformulações selecionadas e a formulação comercial de nim), sempre em comparação com o controle, utilizando-se 20 repetições para cada tratamento. Em cada bioensaio foi mantida uma alíquota, medindo-se 10 discos foliares inteiros e usando-se a média das 10 medidas como área fornecida.

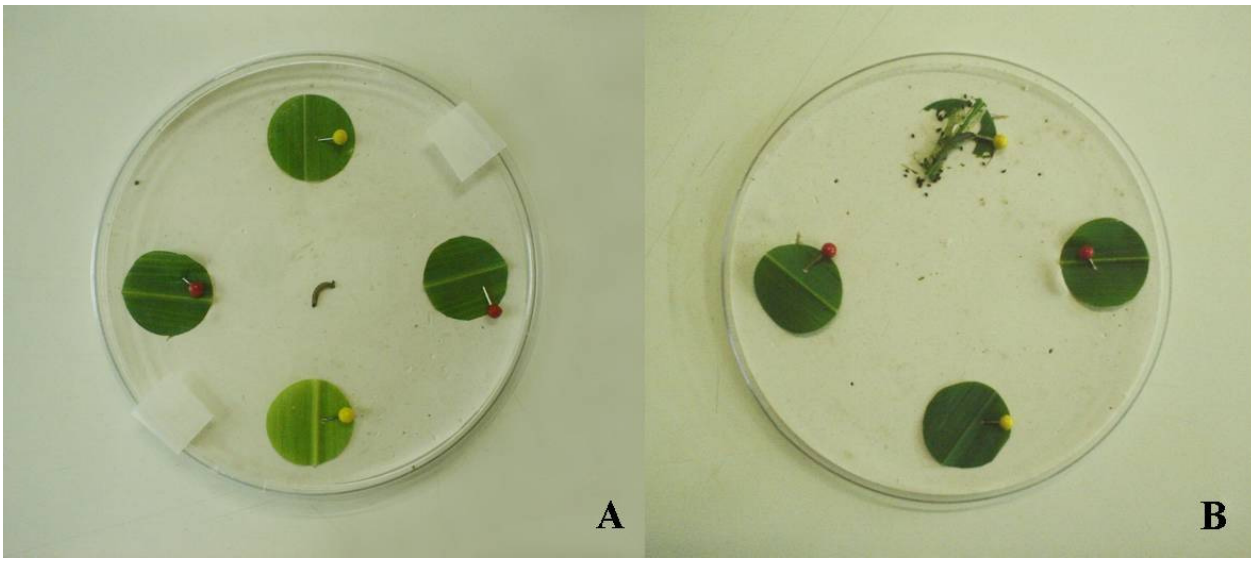

Figura 2 - Arena utilizada para o teste de deterrência alimentar. A) No início do teste, com uma lagarta de terceiro ínstar recém-liberada no centro da arena; B) Após 24 horas, onde se observa um dos discos foliares quase inteiramente consumido pela lagarta

A comparação da área consumida entre os diferentes tratamentos foi feita por meio de um índice de preferência, adaptado de Kogan e Goeden (1970):

$$IP = \frac{2 \times T}{C + T} \quad ,$$

onde: IP = índice de preferência; T = área consumida no disco de folha tratado; C = área consumida no disco de folha controle. Para a interpretação dos resultados, foi determinado o Intervalo de Classificação (*IClass*) para as médias de tratamentos, com base no IP e desvio padrão, pela fórmula:

$$IClass = 1 \pm t\,(n\text{-}1;\ \alpha=0{,}05) \times \frac{DP}{\sqrt{n}} \quad ,$$

onde t = valor de "t" tabelado; DP = desvio padrão; n = número de repetições.

Os tratamentos foram considerados neutros quando o valor do IP ficou compreendido dentro do *IClass*; fagodeterrente quando o valor do IP foi inferior ao menor valor obtido para o *IClass*, e fagoestimulante quando o IP foi superior ao maior *IClass* calculado. Assim:

IP=1 ± *IClass*, indica efeito neutro;

IP>1 ± *IClass*, indica efeito fagoestimulante;

IP<1 ± *IClass*, indica efeito fagodeterrente.

3.4 Análises dos dados

As CL_{50} foram estimadas através da análise de Probit (FINNEY, 1971), com o programa PoloPlus 1.0 (LEORA SOFTWARE, 2003).

Os dados dos experimentos com nanoformulações foram submetidos ao teste de Bartlett para verificação da homocedasticidade de variâncias dos tratamentos e de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade dos dados. Nos casos em que essas condições não foram satisfeitas, os dados foram transformados pelo método da potência ótima de Box-Cox. Quando satisfeitas as condições, foi feita a análise de variância e, havendo diferença significativa entre as médias dos tratamentos ($p<0,05$), foi feita a comparação entre as mesmas pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Nos casos em que a transformação dos dados não atendeu às condições para o teste paramétrico, foi feita a análise não-paramétrica, com o teste de Kruskal-Wallis para indicação das diferenças, e teste de comparação múltipla de Kruskal-Wallis. As análises foram feitas com o programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Bioensaios com aplicação das formulações em dieta artificial

4.1.1 Estimativa da CL_{50} de uma formulação comercial de óleo de nim

Pela análise de Probit estimou-se que a CL_{50} do óleo de nim Organic Neem para lagartas de segundo ínstar de *S. frugiperda* em dieta artificial, em 10 dias, é 0,74% do produto comercial (Tabela 1).

Tabela 1 - Coeficiente angular, valor de CL_{50} e intervalo de confiança do óleo de nim comercial Organic Neem para lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o segundo ínstar com dieta artificial tratada com diferentes concentrações do produto, após 10 dias

Nº total de insetos avaliados	Coeficiente angular ± EP	CL_{50} e intervalo de confiança (95%)	χ^2	g.l.
576	2,447 ± 0,233	0,744 (0,623-0,862)	2,282	3

Assim, a concentração determinada para ser utilizada nos bioensaios seguintes, como padrão de comparação com as nanoformulações, foi de 0,74% do produto comercial, correspondendo a 5,72 mg AZ-A/L, valor calculado com base no teor de azadiractina A do óleo comercial.

4.1.2 Seleção das nanoformulações mais promissoras em dieta artificial

Em todos os bioensaios, as nanoformulações causaram baixa mortalidade de lagartas de *S. frugiperda*, com efeito significativo sendo observado apenas no tratamento com Organic Neem.

No primeiro bioensaio, em que foram testadas nanoformulações em suspensão com diferentes polímeros e nanopartículas, e ainda as duas formulações contendo tampão fosfato, não se observou efeito inseticida com nenhuma das formulações (mortalidades variando de 0 a

14,58%), sendo que apenas o produto comercial apresentou efeito significativo (38,54% de mortalidade) diferindo das formulações e do controle (3,13%). Entretanto, foram observadas diferenças em relação ao peso médio das lagartas ao final do período de avaliação, sendo que as lagartas alimentadas em dietas tratadas com o produto comercial e com as nanoformulações contendo óleo/extrato de nim apresentaram menores pesos (18,0 mg no produto comercial e de 35,0 a 90,5 mg nas nanoformulações com nim) em relação às nanoformulações sem nim (brancos) (variação de 287,1 a 345,8 mg) e em relação ao controle (341,7 mg) (Tabela 2).

Tabela 2 - Médias (±EP) de mortalidade e peso de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o segundo ínstar com dieta artificial tratada com nanoformulações de nim, após 10 dias

Tratamento	Mortalidade (%)[1]	Peso (mg) [1]
Controle	3,13 ± 0,48 b	341,7 ± 16,70 b
[S]NC-PCL(0,50)-B	2,08 ± 0,50 b	287,1 ± 29,17 b
[S]NC-PHB(0,50)-B	0,00 ± 0,00 b	344,3 ± 26,30 b
[S]NC-PCL/PHB(0,50)-B	0,00 ± 0,00 b	336,3 ± 29,74 b
[S]NC-PCL(0,50)	14,58 ± 1,50 b	50,7 ± 3,98 a
[S]NC-PHB(0,50)	14,58 ± 0,87 b	41,9 ± 5,47 a
[S]NC-PCL/PHB(0,50)	8,33 ± 0,71 b	39,7 ± 10,74 a
[S]NC-PCL(0,50)+TF	2,08 ± 0,29 b	90,5 ± 20,55 a
[S]NS-PCL(0,50)-B	1,04 ± 0,25 b	345,8 ± 19,75 b
[S]NS-PHB(0,50)-B	1,04 ± 0,25 b	287,6 ± 13,30 b
[S]NS-PCL/PHB(0,50)-B	1,04 ± 0,25 b	341,9 ± 27,33 b
[S]NS-PCL(0,50)	9,38 ± 0,48 b	47,3 ± 6,53 a
[S]NS-PHB(0,50)	6,25 ± 0,29 b	49,1 ± 4,17 a
[S]NS-PCL/PHB(0,50)	11,46 ± 1,11 b	35,0 ± 3,89 a
[S]NS-PCL(0,50)+TF	4,17 ± 0,41 b	65,6 ± 5,76 a
Organic Neem	38,54 ± 1,38 a	18,0 ± 2,22 a

[1] Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey, 5%).
[S] = suspensão; NC = nanocápsulas; NS = nanoesferas; PCL = poli-ε-caprolactona; PHB = poli-ß-hidroxibutirato; TF = tampão fosfato; B = branco

No segundo bioensaio (Tabela 3), em que foram testadas suspensões de nanocápsulas de PCL variando a quantidade de polímero utilizada na formulação, novamente não houve efeito significativo de nenhuma das formulações quanto à mortalidade das lagartas. Nem mesmo o produto comercial (4,16%) diferiu do controle (2,08%), o que foi totalmente inesperado e pode

ter ocorrido por problemas no preparo da solução ou na sua aplicação. Ainda assim, observou-se novamente redução de peso das lagartas tratadas com o Organic Neem (99,86 mg) e com as formulações com nim (variação de 153,79 a 186,64 mg), sendo que os brancos (372,13 a 405,78 mg) não diferiram do controle (416,92 mg), não causando redução de peso, como esperado. Ressalte-se que não foram constatadas diferenças de peso larval entre as nanoformulações com diferentes quantidades de polímero.

Tabela 3 - Médias (±EP) de mortalidade e peso de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o segundo ínstar com dieta artificial tratada com formulações contendo nanocápsulas de nim com diferentes concentrações de polímero, após 10 dias

Tratamento	Mortalidade (%)[1]	Peso (mg)[1]
Controle	2,08 ± 0,29 a	416,92 ± 13,90 c
[S]NC-PCL(0,25)-B	3,13 ± 0,48 a	372,13 ± 14,47 c
[S]NC-PCL(0,50)-B	0,00 ± 0,00 a	395,35 ± 2,16 c
[S]NC-PCL(0,75)-B	2,08 ± 0,29 a	405,78 ± 9,83 c
[S]NC-PCL(0,25)	1,04 ± 0,25 a	186,64 ± 17,09 ab
[S]NC-PCL(0,50)	1,04 ± 0,25 a	153,79 ± 13,69 ab
[S]NC-PCL(0,75)	3,13 ± 0,48 a	241,68 ± 41,99 b
Organic Neem	4,16 ± 0,41 a	99,86 ± 17,13 a

[1] Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey 5%).
[S] = suspensão; NC = nanocápsulas; PCL = poli-ε-caprolactona; B = branco

No terceiro bioensaio (Tabela 4), em que também foram comparadas suspensões de PCL com diferentes quantidades de polímero, porém com nanoesferas, e ainda duas formulações contendo dióxido de titânio (TiO_2, protetor solar e bactericida), apenas o Organic Neem provocou efeito inseticida (54,17%), diferindo de todos os outros tratamentos (variação de 2,08 a 13,54%), que não diferiram do controle (2,08%).

Tabela 4 - Médias (±EP) de mortalidade e peso de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o segundo ínstar com dieta artificial tratada com formulações contendo nanoesferas de nim com diferentes concentrações de polímero, após 10 dias

Tratamento	Mortalidade (%)[1]	Peso (mg)[1]
Controle	2,08 ± 0,29 b	377,08 ± 7,70 c
[S]NS-PCL(0,75)-B	2,08 ± 0,29 b	377,28 ± 18,35 c
[S]NS-PCL(0,50)-B	2,08 ± 0,29 b	377,61 ± 13,97 c
[S]NS-PCL(0,25)-B	5,21 ± 0,75 b	376,51 ± 29,14 c
[S]NS-PCL(0,75)	13,54 ± 1,60 b	84,64 ± 15,04 ab
[S]NS-PCL(0,50)	8,33 ± 0,71 b	74,96 ± 12,44 ab
[S]NS-PCL(0,25)	6,25 ± 0,87 b	54,63 ± 10,38 ab
[S]NC-PCL(0,50) + TiO_2	2,08 ± 0,50 b	130,41 ± 26,32 b
[S]NS-PCL (0,50) + TiO_2	3,13 ± 0,48 b	105,17 ± 24,92 ab
Organic Neem	54,17 ± 0,41 a	31,43 ± 5,84 a

[1] Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey 5%).
[S] = suspensão; NS = nanoesferas; PCL = poli-ε-caprolactona; B = branco; TiO_2 = dióxido de titânio

Novamente observou-se efeito das nanoformulações em relação ao peso médio de lagartas, sendo que todas as nanoformulações contendo nim, para as quais os valores variaram de 54,63 a 130,41 mg, diferiram do controle (377,08 mg) e dos respectivos brancos (376,51 a 377,61 mg), mas não diferiram do produto comercial (31,43 mg). Também não foram observadas diferenças entre as formulações com diferentes quantidades de polímero. As nanoformulações com TiO_2 não diferiram das demais nanoformulações com nim, permitindo concluir que a presença do TiO_2 na formulação não interfere no efeito da mesma.

No bioensaio para avaliar o desenvolvimento de lagartas tratadas com nanoformulações, em que foram testadas as suspensões de nanocápsulas variando quanto ao tipo de polímero, somente o Organic Neem afetou a viabilidade larval (0,00%). Nenhuma das nanoformulações afetou as viabilidades larval e pupal, nas quais os valores variaram de 71,25 a 98,75% e de 81,94 a 96,10%, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 – Médias (±EP) de viabilidades larval e pupal de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o segundo ínstar com dieta artificial tratada com nanoformulações de nim

Tratamento	Viabilidade larval (%)[1]	Viabilidade pupal (%)[1]
Controle	97,50 ± 0,29 b	96,15 ± 0,48 b
[S]NC- PCL(0,50)-B	97,50 ± 0,29 b	94,87 ± 0,29 b
[S]NC- PHB(0,50)-B	98,75 ± 0,25 b	94,94 ± 0,48 b
[S]NC-PCL/PHB(0,50)-B	96,25 ± 0,48 b	96,10 ± 0,29 b
[S]NC-PCL(0,50)	71,25 ± 1,70 b	91,23 ± 2,27 b
[S]NC-PHB(0,50)	90,00 ± 0,41 b	81,94 ± 1,03 b
[S]NC-PCL/PHB(0,50)	98,75 ± 0,25 b	91,14 ± 0,71 b
Organic Neem	0,00 ± 0,00 a	---

[1] Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey 5%).
[S] = suspensão; NC = nanocápsulas; PCL = poli-ε-caprolactona; PHB = poli-ß-hidroxibutirato; B = branco

Lagartas alimentadas em dietas tratadas com nanoformulações com nim apresentaram, em média, fase larval maior em comparação ao controle e aos brancos (cerca de dois dias). Não foi possível determinar a duração média da fase larval quando as lagartas se alimentaram em dieta tratada com Organic Neem, pois todas morreram antes de chegar à fase de pupa (Tabela 6).

Tabela 6 – Médias (±EP) de duração e peso das fases de lagarta (14 dias após a instalação) e de pupa (com 24 horas de idade) de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o segundo ínstar com dieta artificial tratada com nanoformulações de nim

Tratamento	Duração (dias)[1]		Peso (mg)[1]	
	Lagartas	Pupas	Lagartas	Pupas
Controle	18,39 ± 0,19 b	9,50 ± 0,29 a	669,33 ± 23,10 a	265,78 ± 3,11 a
[S]NC-PCL(0,50)-B	18,27 ± 0,11 b	9,29 ± 0,07 a	569,45 ± 34,13 ab	255,49 ± 1,29 a
[S]NC-PHB(0,50)-B	18,16 ± 0,10 b	9,71 ± 0,07 a	531,55 ± 20,83 bc	260,93 ± 4,12 a
[S]NC-PCL/PHB(0,50)-B	18,62 ± 0,16 b	9,43 ± 0,06 a	546,85 ± 18,99 b	252,80 ± 5,17 a
[S]NC-PCL(0,50)	21,31 ± 0,39 a	10,02 ± 0,18 a	442,20 ± 17,73 c	222,40 ± 3,35 a
[S]NC-PHB(0,50)	21,35 ± 0,25 a	9,86 ± 0,03 a	430,20 ± 5,42 c	217,79 ± 1,78 a
[S]NC-PCL/PHB(0,50)	20,68 ± 0,26 a	9,92 ± 0,27 a	483,15 ± 31,12 bc	244,15 ± 21,46 a
Organic Neem	---	---	54,45 ± 5,61 d	---

[1] Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey 5%).
[S] = suspensão; NC = nanocápsulas PCL = poli-ε-caprolactona; PHB = poli-ß-hidroxibutirato; B = branco

O peso médio das lagartas 14 dias após a instalação do experimento também diferiu entre os tratamentos, entretanto houve menor diferenciação entre as nanoformulações com nim (442,20 a 483,15 mg) e os brancos (531,55 a 569,45 mg), sendo que apenas a nanoformulação [S]NC-PCL(0,50) (569,45 mg) diferiu do respectivo branco [S]NC-PCL(0,50)-B (442,20 mg). Todas as nanoformulações com nim diferiram do controle, como também observado no primeiro bioensaio (Tabela 2). Como em todos os bioensaios anteriores, o Organic Neem causou a maior redução de peso. Por outro lado, não houve diferença significativa entre as médias de peso de pupas (que variaram entre 217,79 a 265,78 mg), o mesmo ocorrendo com a duração dessa fase (9,29 a 10,02 dias).

Nos bioensaios anteriores, em que foi observada maior diferenciação de peso entre brancos e formulações com nim, as lagartas haviam sido pesadas aos 10 dias após a instalação do bioensaio, enquanto neste, a pesagem foi feita aos 14 dias após a instalação. Esse intervalo de quatro dias talvez justifique a diferença nos resultados, podendo indicar que a lagarta se recuperou do efeito do nim, conseguindo concluir seu desenvolvimento, apenas alongando o período larval para poder se alimentar mais até atingir o peso crítico para mudar de ínstar ou pupar. É possível que a quantidade de nim liberada pelas cápsulas tenha sido insuficiente para causar efeitos mais severos sobre as lagartas, gerando apenas um efeito fagodeterrente inicial que não foi sustentado ao longo do tempo, permitindo à lagarta se recuperar e continuar seu desenvolvimento até a fase adulta. O fato de o peso médio das pupas também não ter sido afetado reforça a suposição de que a lagarta foi capaz de se recuperar do efeito inicial do nim e completar seu desenvolvimento.

4.1.3 Considerações gerais sobre os bioensaios em dieta artificial

Em todos os bioensaios em dieta, os brancos não apresentaram efeito nem na sobrevivência e nem no peso das lagartas de *S. frugiperda*. Isso indica que o efeito observado nas formulações se deve realmente ao nim, e não a qualquer outro composto presente na formulação, como o polímero.

Para todas as nanoformulações com nim houve efeito apenas sobre o ganho de peso, ficando as lagartas com peso médio reduzido em comparação aos brancos e ao controle, não havendo efeito na sobrevivência. Isso pode indicar que, na dieta, o polímero sofreu pouca ou

nenhuma degradação, talvez por se tratar de um ambiente estéril e reduzido, isolado das condições ambientais, propícias para a degradação polimérica. Cara et al. (2003) verificaram que os polímeros PCL e PHB não se degradam em meio contendo apenas água, mas sim em um meio contendo microorganismos que ocorrem naturalmente no meio ambiente. Assim, pode ser que uma pequena quantidade de polímero apenas tenha se degradado na dieta, que a degradação tenha ocorrido muito lentamente ou, ainda, que as lagartas tenham ingerido as nanopartículas com nim e estas tenham se degradado e liberado os compostos apenas no interior do trato digestivo, causando efeitos tóxicos às células do mesmo, pela azadiractina, ou ainda interferido nos movimentos peristálticos, efeito causado pela salanina, dificultando a digestão (AGUIAR-MENEZES, 2005; MORDUE (LUNTZ) et al., 2005). Esses efeitos fazem com que a lagarta pare de se alimentar e, então, ganhe menos peso do que lagartas que não tenham recebido alimento tratado.

Não houve diferenças entre tratamentos com diferentes polímeros nem entre tratamentos com diferentes quantidades do mesmo polímero. Entretanto só foi possível fazer as comparações com base nos resultados para peso, uma vez que a baixa mortalidade obtida com as nanoformulações não permitiu diferenciá-las com base nesse parâmetro.

Os resultados obtidos nos bioensaios com dieta artificial indicam que as condições experimentais não foram favoráveis à degradação dos polímeros, não permitindo avaliar seu real efeito, sendo esta metodologia inadequada para avaliar a bioatividade das nanoformulações. Com base nisso, foram realizados também testes em plantas de milho mantidas em casa de vegetação, o que permitiu que as plantas tratadas com as formulações ficassem expostas às condições ambientais e, consequentemente, os resultados obtidos ficassem mais próximos à realidade.

4.2 Bioensaios com pulverização das formulações em plantas de milho em casa de vegetação

4.2.1 Estimativa da CL_{50} de uma formulação comercial de óleo de nim em plantas de milho

Pela análise de Probit estimou-se que a CL_{50} do óleo de nim Organic Neem para lagartas de primeiro ínstar de *S. frugiperda* é de 0,64% do produto comercial, quando aplicado em folhas de milho em casa de vegetação (Tabela 7). Não se observou fitotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas.

Tabela 7 - Coeficiente angular, valor de CL_{50} e intervalo de confiança do óleo de nim comercial Organic Neem para lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com folhas de milho tratadas com diferentes concentrações do produto, após seis dias

Nº total de insetos avaliados	Coeficiente angular ± EP	CL_{50} e intervalo de confiança (95%)	χ^2	g.l.
480	2,048 ± 0,304	0,644 (0,443-0,829)	0,681	2

Considerando a quantidade de azadiractina A presente no produto, a CL_{50} estimada (0,64% p.c.), correspondeu a 3,87 mg AZ-A/L. Essa concentração foi inferior àquela obtida para os testes em dieta, provavelmente devido às condições ótimas que a dieta oferece, propiciando mais nutrientes e um melhor desenvolvimento às lagartas em relação às folhas de milho.

4.2.2 Seleção de nanoformulações em plantas de milho em casa de vegetação

Nos cinco bioensaios realizados para seleção de nanoformulações em folhas de milho, nenhuma delas causou mortalidade próxima ou superior à do Organic Neem, entretanto foi possível diferenciar os tratamentos com relação à mortalidade, o que não foi possível nos bioensaios em dieta artificial. Também não se observou fitotoxicidade com nenhuma das nanoformulações.

No primeiro bioensaio, em que foram avaliadas nanoformulações em suspensão e em pó, de nanocápsulas e nanoesferas com o polímero PMMA (Tabela 8), os brancos (nos quais as mortalidades variaram de 8,75 a 11,25%) não diferiram do controle (8,75%), e as nanoformulações que mais se destacaram foram as suspensões [S]NC-PMMA(0,25) e [S]NS-PMMA(0,25) (48,75 e 45,00%), com maior efeito do que aquelas em pó ([P]NC-PMMA(0,25) e [P]NS-PMMA(0,25), com 20,00 e 26,25% de mortalidade, respectivamente). Comparando o pó obtido por secagem por aspersão do óleo Organic Neem ([P]ON) com o produto na formulação em óleo, não se constatou diferença entre ambas, embora a mortalidade com o óleo em pó (75,00%) tenha tendido a ser inferior à causada pelo Organic Neem (100,00%).

Tabela 8 - Médias (±EP) de mortalidade e de peso de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com folhas de milho tratadas com nanoformulações de nim, após 10 dias (1º bioensaio)

Tratamento	Mortalidade (%)[1]	(Soma de Ranks)	Peso (mg)[1]	(Soma de Ranks)
Controle	8,75 ± 1,18 a	(41,5)	72,42 ± 9,46 a	(129,0)
[P]NC-PMMA(0,25)	20,00 ± 1,29 b	(77,5)	34,80 ± 4,34 bc	(62,0)
[S]NC-PMMA(0,25)	48,75 ± 1,31 d	(129,5)	11,32 ± 2,01 d	(23,0)
[P]NS-PMMA(0,25)	26,25 ± 1,11 c	(93,5)	43,68 ± 2,59 b	(72,0)
[S]NS-PMMA(0,25)	45,00 ± 0,71 d	(127,5)	16,07 ± 1,46 cd	(40,0)
[P]NC-PMMA(0,25)-B	10,00 ± 0,91 ab	(49,5)	72,24 ± 2,48 a	(124,0)
[S]NC-PMMA(0,25)-B	8,75 ± 0,75 a	(46,0)	72,83 ± 2,43 a	(123,0)
[P]NS-PMMA(0,25)-B	8,75 ± 0,48 a	(46,0)	71,91 ± 3,24 a	(125,0)
[S]NS-PMMA(0,25)-B	11,25 ± 0,63 ab	(55,0)	62,33 ± 4,75 a	(107,0)
[P]ON	75,00 ± 0,71 de	(154,0)	8,55 ± 1,12 d	(15,0)
Organic Neem	100,00 ± 0,00 e	(170,0)	---	---

[1] Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Kruskal-Wallis, 5%).
Os valores entre parêntesis indicam a soma de ranks obtidas no teste de Kruskal-Wallis.
[S] = suspensão; [P] = pó; NC = nanocápsulas; NS = nanoesferas; PMMA = polimetilmetacrilato; B = branco; ON = Organic Neem

Como a mortalidade de lagartas tratadas com Organic Neem foi 100,00%, não foi possível estimar o peso médio, entretanto com o óleo em pó houve grande redução de peso em relação ao controle (8,55 e 72,42 mg, respectivamente). As duas nanoformulações que causaram a maior mortalidade, [S]NC-PMMA(0,25) e [S]NS-PMMA(0,25), foram também as que causaram maior redução de peso (11,32 e 16,07 mg, respectivamente), com destaque para a primeira.

No segundo bioensaio, em que foram avaliadas as suspensões de nanocápsulas de PCL e PHB com diferentes quantidades de polímero, além de uma formulação com outro tensoativo, o PVA, em lugar do Tween, usado nas demais nanoformulações, o Organic Neem (56,25%) foi o único tratamento que diferiu do controle (18,75%) em relação à mortalidade. Apenas a nanoformulação [S]NC-PCL(0,75) (45,00%) diferiu do branco (17,50%), porém não diferiu do controle (Tabela 9).

Tabela 9 - Médias (±EP) de mortalidade e de peso de lagartas *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com folhas de milho tratadas com nanoformulações de nim, após 10 dias (2º bioensaio)

Tratamento	Mortalidade (%)[1]	Peso (mg)[2]	(Soma de Ranks)
Controle	18,75 ± 0,48 bc	39,77 ± 3,85 a	(170)
[S]NC-PCL(0,25)+PVA	16,25 ± 0,63 c	10,26 ± 0,91 bc	(76)
[S]NC-PCL(0,25)	25,00 ± 0,91 bc	12,01 ± 1,90 bc	(88)
[S]NC-PCL(0,50)	33,75 ± 0,95 abc	6,98 ± 0,83 d	(29)
[S]NC-PCL(0,75)	45,00 ± 1,58 ab	10,87 ± 1,81 bc	(83)
[S]NC-PHB(0,25)	42,50 ± 0,50 ab	7,31 ± 0,63 d	(30)
[S]NC-PHB(0,50)	28,75 ± 1,03 abc	8,94 ± 0,32 c	(60)
[S]NC-PHB(0,75)	16,25 ± 0,75 c	12,73 ± 0,86 b	(105)
[S]NC-PCL(0,25)B	17,50 ± 0,96 c	24,54 ± 0,36 a	(143)
[S]NC-PHB(0,25)-B	20,00 ± 0,82 bc	26,58 ± 2,04 a	(149)
Organic Neem	56,25 ± 1,03 a	9,10 ± 1,78 cd	(57)

[1] Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%).
[2] Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Kruskal-Wallis, 5%).
[S] = suspensão; NC = nanocápsulas; PCL = poli-ε-caprolactona; PHB = poli-ß-hidroxibutirato; B = branco; PVA = polivinil álcool

Todas as nanoformulações reduziram o peso médio de lagartas (6,98 a 12,73 mg), diferindo do controle (39,77 mg) e dos brancos (24,54 e 26,58 mg), entretanto duas se destacaram, [S]NC-PCL(0,50) e [S]NC-PHB(0,25), com peso médio de lagartas de 6,98 mg e 7,31 mg, respectivamente. Portanto, formulações com ambos os polímeros apresentaram efeito de redução de peso. Não foi observada diferença entre a formulação contendo PVA ([S]NC-PCL(0,25)+PVA) e a respectiva formulação com Tween ([S]NC-PCL(0,25), nem quanto à mortalidade nem quanto ao peso, não havendo, portanto, diferença na eficiência dos dois agentes tensoativos utilizados na formulação

No terceiro bioensaio, em que foram testadas as mesmas nanoformulações do segundo, porém na forma de pó, obtidas a partir daquelas por secagem por aspersão, apenas uma nanoformulação se destacou quanto à mortalidade, a [P]NC-PCL(0,25)+PVA (55,00%), que diferiu do controle e do branco (ambos com 16,25%), mas não diferiu do Organic Neem (86,25%). Duas outras não diferiram do produto comercial ([P]NC-PCL(0,50) e [P]NC-PCL(0,75), com 31,25 e 37,50% de mortalidade, respectivamente), entretanto também não diferiram do controle. Quanto ao peso, as nanoformulações [P]NC-PCL(0,75) e [P]NC-PHB(0,25) causaram as maiores reduções (20,16 e 24,52 mg, respectivamente), não diferindo do

Organic Neem (2,45 mg). Outras duas também reduziram o peso, [P]NC-PCL(0,50) e [P]NC-PCL(0,25)+PVA (29,47 e 32,81 mg, respectivamente), diferindo do controle (46,09 mg). Neste bioensaio, a nanoformulação [P]NC-PCL(0,25)+PVA também não diferiu da sua correspondente contendo Tween ([P]NC-PCL(0,25)) nos dois parâmetros avaliados, entretanto apenas aquela contendo PVA diferiu do controle (Tabela 10).

Tabela 10 - Médias (±EP) de mortalidade e de peso de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com folhas de milho tratadas com nanoformulações de nim, após 10 dias (3º bioensaio)

Tratamento	Mortalidade (%)[1]	Peso (mg)[2]	(Soma de Ranks)
Controle	16,25 ± 0,75 c	46,09 ± 11,74 def	(122)
[P]NC-PCL(0,25)+PVA	55,00 ± 2,16 ab	32,81 ± 3,64 bc	(91)
[P]NC-PCL(0,25)	22,50 ± 0,87 bc	34,94 ± 2,54 cde	(107)
[P]NC-PCL(0,50)	31,25 ± 0,63 abc	29,47 ± 1,72 b	(71)
[P]NC-PCL(0,75)	37,50 ± 1,50 abc	20,16 ± 1,91 a	(31)
[P]NC-PHB(0,25)	21,25 ± 1,49 bc	24,52 ± 0,72 a	(39)
[P]NC-PHB(0,50)	15,00 ± 0,41 c	40,72 ± 2,34 ef	(135)
[P]NC-PHB(0,75)	25,00 ± 0,91 bc	43,22 ± 2,03 f	(148)
[P]NC-PCL(0,25)-B	16,25 ± 0,65 c	32,83 ± 1,74 bcd	(93)
[P]NC-PHB(0,25)-B	15,00 ± 0,82 c	43,14 ± 3,37 f	(143)
Organic Neem	86,25 ± 0,63 a	2,45 ± 1,67 a	(10)

[1] Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%).
[2] Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Kruskal-Wallis, 5%).
[P] = pó; NC = nanocápsulas; PCL = poli-ε-caprolactona; PHB = poli-ß-hidroxibutirato; B = branco; PVA = polivinil álcool

As formulações em suspensão de nanoesferas com os polímeros PCL e PHB nas três quantidades de polímero foram testadas no quarto bioensaio (Tabela 11). Nenhuma nanoformulação teve efeito igual ao do Organic Neem quanto à mortalidade (86,25%), mas cinco delas diferiram do controle (20,00%) e dos brancos (26,25 e 18,75%): [S]NS-PCL(0,25) (42,50%), [S]NS-PCL(0,50) (40,00%), [S]NS-PCL(0,75) (41,25%), [S]NS-PHB-0,25 (56,25%) e [S]NS-PHB-0,25(0,50) (53,75%), com destaque para as formulações com PHB. A nanoformulação com PVA (25,00%) não diferiu do controle quanto à mortalidade, mas diferiu da sua correspondente com Tween ([S]NS-PCL(0,25), com 42,50%), tendo efeito inferior à esta, também em relação ao peso.

Tabela 11 - Médias (±EP) de mortalidade e de peso de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com folhas de milho tratadas com nanoformulações de nim, após 10 dias (4º bioensaio)

Tratamento	Mortalidade (%)[1]	(Soma de Ranks)	Peso (mg) [1]	(Soma de Ranks)
Controle	20,00 ± 1,08 a	(38,5)	52,47 ± 2,01 a	(149)
[S]NS-PCL(0,25) + PVA	25,00 ± 0,00 a	(50)	13,57 ± 2,30 b	(93)
[S]NS-PCL(0,25)	42,50 ± 1,44 b	(104)	7,07 ± 1,52 d	(40)
[S]NS-PCL(0,50)	40,00 ± 1,08 b	(100)	13,27 ± 2,96 b	(83)
[S]NS-PCL(0,75)	41,25 ± 0,75 b	(104,5)	10,48 ± 0,72 bc	(74)
[S]NS-PHB(0,25)	56,25 ± 1,11 c	(139,5)	7,44 ± 0,42 cd	(50)
[S]NS-PHB(0,50)	53,75 ± 1,25 c	(134)	7,57 ± 1,36 cd	(47)
[S]NS-PHB(0,75)	28,75 ± 1,38 a	(62)	15,19 ± 1,79 b	(103)
[S]NS-PCL(0,25)-B	26,25 ± 0,85 a	(55,5)	61,90 ± 4,35 a	(160)
[S]NS-PHB(0,25)-B	18,75 ± 1,11 a	(32)	50,62 ± 10,81 a	(152)
Organic Neem	86,25 ± 0,63 d	(170)	8,13 ± 3,71 d	(38)

[1] Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Kruskal-Wallis, 5%).
[S] = suspensão; NS = nanoesferas; PCL = poli-ε-caprolactona; PHB = poli-ß-hidroxibutirato; B = branco; PVA = polivinil álcool

Quanto ao peso médio, todas as formulações causaram efeito significativo (variação de 7,07 a 15,19 mg), tanto em relação ao controle (52,47 mg) quanto aos brancos (61,90 e 50,62 mg para os brancos de PCL e PHB, respectivamente). As formulações [S]NS-PCL(0,25) (7,07 mg), [S]NS-PHB(0,25) (7,44 mg) e [S]NS-PHB(0,50) (7,57 mg) foram as que mais se destacaram, não diferindo do Organic Neem (8,13 mg).

No último bioensaio para seleção de nanoformulações, em que foram avaliadas as mesmas testadas no quarto bioensaio, mas na forma de pó, obtidas a partir daquelas, por secagem por aspersão (Tabela 12), as formulações que causaram mortalidade significativa tanto em relação ao controle (20,00%) quanto em relação aos brancos (18,75 e 21,25%), foram [P]NS-PCL(0,25)+PVA (27,50%), [P]NS-PCL(0,50) (28,75%) e [P]NS-PHB(0,75) (26,25%). Entretanto, a mortalidade causada por todas as nanoformulações foi inferior a 30%. As formulações [P]NS-PCL(0,25)+PVA e [P]NS-PCL(0,50) causaram as reduções de peso mais significativas (5,55 mg e 6,07 mg, respectivamente), diferindo do controle (14,92 mg) e dos brancos (11,47 e 10,67 mg). Embora a nanoformulação com PVA tenha diferido da sua correspondente com Tween, as mortalidades foram muito próximas, havendo diferença maior

apenas para as médias de peso (5,55 e 13,81 mg, respectivamente), sendo mais eficiente aquela com PVA.

Tabela 12 - Médias (±EP) de mortalidade e de peso de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com folhas de milho tratadas com nanoformulações de nim, após 10 dias (5º bioensaio)

Tratamento	Mortalidade (%)[1]	(Soma de Ranks)	Peso (mg) [1]	(Soma de Ranks)
Controle	20,00 ± 0,00 a	(60)	14,92 ± 3,20 a	(119)
[P]NS-PCL(0,25)+PVA	27,50 ± 0,65 c	(118,5)	5,55 ± 0,61 e	(23)
[P]NS-PCL(0,25)	20,00 ± 0,41 ab	(62)	13,81 ± 0,70 a	(125)
[P]NS-PCL(0,50)	28,75 ± 0,48 c	(130,5)	6,07 ± 0,94 e	(30)
[P]NS-PCL(0,75)	20,00 ± 0,41 ab	(62)	11,53 ± 0,64 bc	(86)
[P]NS-PHB(0,25)	20,00 ± 0,41 ab	(62)	12,76 ± 1,37 abc	(100)
[P]NS-PHB(0,50)	22,50 ± 0,65 b	(83)	10,17 ± 1,61 cd	(75)
[P]NS-PHB(0,75)	26,25 ± 0,48 c	(115)	13,06 ± 1,73 ab	(110)
[P]NS-PCL(0,25)-B	18,75 ± 0,48 a	(51)	11,47 ± 4,96 cd	(75)
[P]NS-PHB(0,25)-B	21,25 ± 0,48 ab	(75)	10,67 ± 0,51 cd	(77)
Organic Neem	100,00 ± 0,00 d	(164)	---	---

[1] Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Kruskal-Wallis, 5%).
[P] = pó; NS = nanoesferas; PCL = poli-ε-caprolactona; PHB = poli-ß-hidroxibutirato; B = branco;
PVA = polivinil álcool

4.2.3 Considerações gerais sobre os bioensaios com folhas de milho

De forma geral, entre os cinco bioensaios, observou-se que as nanoformulações que apresentaram maior efeito em relação ao controle diferiram também dos seus respectivos brancos, enquanto aquelas que não diferiram dos brancos também não diferiram do controle ou apresentaram baixa eficiência, confirmando que os outros componentes da formulação não foram os responsáveis pelo efeito observado, sendo a mortalidade realmente causada pelos compostos do nim. As nanoformulações que causaram mortalidade significativa também causaram redução de peso. Correia et al. (2009) descreveram alterações morfológicas no mesêntero de lagartas de terceiro ínstar de *S. frugiperda* alimentadas por 48 horas com folhas de milho tratadas com nim (Neemseto®) nas concentrações de 0,5 e 1,0%, como degeneração do epitélio, redução de células regenerativas e de atividade secretora no mesêntero. Essas alterações comprometem a renovação

celular e a absorção de nutrientes, prejudicando a conversão alimentar e fazendo com que as lagartas ganhem menos peso.

O fato de algumas das nanoformulações terem apresentado pouca ou nenhuma eficiência pode ter se devido a uma baixa taxa de degradação do polímero, liberando quantidades muito pequenas dos compostos de nim, ou ainda degradação dos compostos antes ou após a liberação.

Entre os tratamentos mais eficientes há nanoformulações com PMMA, PCL e PHB, assim como com nanocápsulas e nanoesferas, indicando que os três polímeros podem ser utilizados para nanoformulações de nim, assim como cápsulas e esferas, todos sendo eficientes na liberação do nim em alguma das nanoformulações e em alguma das combinações. Os resultados sugerem que o polímero PMMA é eficiente tanto quando em nanocápsulas quanto em nanoesferas, enquanto o PHB é mais eficiente quando em nanoesferas e o PCL em nanocápsulas, este particularmente em pó, com PVA como agente tensoativo.

Acreditava-se que as nanoformulações armazenadas na forma de pós poderiam se manter mais estáveis, uma vez que em suspensão poderiam ocorrer reações de hidrólise e consequentemente degradação dos compostos. Entretanto, entre as nanoformulações que apresentaram a maior eficiência, a maioria estava na forma de suspensão. Na forma de pó, apenas a [P]NC-PCL(0,25)+PVA se destacou. No caso do óleo em pó ([P]ON), o efeito não diferiu do Organic Neem (óleo), apesar da tendência de ser menos eficiente. No caso das nanoformulações com PMMA, as duas em suspensão apresentaram efeito significativo, enquanto as duas em pó, não. Entretanto, a nanoformulação em pó [P]NC-PCL(0,25)+PVA foi eficiente, enquanto sua versão em suspensão, [S]NC-PCL(0,25)+PVA, não o foi.

O efeito das nanoformulações com PVA variou bastante conforme a composição da formulação. A nanoformulação com PVA em lugar de Tween teve efeito significativo para as formulações em pó, tanto de nanocápsulas ([P]NC-PCL(0,25)+PVA) quanto de nanoesferas ([P]NS-PCL(0,25)+PVA), embora esta última tenha causado baixa mortalidade. Contudo, para as suspensões, o efeito observado com a nanoformulação com PVA foi igual ou inferior ao observado com Tween. Vale ressaltar que a maioria das nanoformulações com melhor efeito foram as suspensões; apenas uma formulação em pó foi mais eficiente, a [P]NC-PCL(0,25)+PVA, contendo PVA em lugar de Tween. Assim, as suspensões preparadas com Tween parecem ser mais estáveis que suspensões com PVA, enquanto formulações em pó são mais estáveis quando se utiliza o PVA como agente tensoativo. Embora tenha sido feito um

controle da quantidade de azadiractina A após a secagem por aspersão, o mesmo não foi feito com os demais compostos, ou seja, os outros limonóides podem ter sofrido degradação pelo processo, causando redução do efeito das nanoformulações em pó, exceto aquela com PVA. Esse agente tensoativo pode ter protegido os compostos presentes nas formulações durante o processo de secagem, de forma mais eficiente que o Tween. Outra possibilidade seria a de que os compostos liberados das nanopartículas em pó são melhor estabilizados pelo PVA do que pelo Tween em solução, quando ressuspendidos para pulverização.

Quanto à quantidade de polímero, verificou-se efeito de nanoformulações com as três quantidades testadas. Entretanto a maioria daquelas que se destacou quanto ao efeito inseticida tinha 0,25 e 0,50 g de polímero. Como a degradação do polímero é condição para que o óleo e/ou extrato de nim sejam liberados, a quantidade de polímero pode influenciar na velocidade da degradação do mesmo, sendo que em menores quantidades o polímero se degrada mais rápido, liberando mais rápido o conteúdo da nanopartícula polimérica.

Os bioensaios realizados com folhas de milho apresentaram resultados melhores do que aqueles realizados em dieta artificial, em que as nanoformulações eram aplicadas na superfície da dieta. Possivelmente, as condições ambientais às quais as nanoformulações foram expostas nos testes em plantas (calor e radiação solar e presença de microorganismos de ocorrência natural no ambiente), uma vez que as mesmas foram mantidas em casa de vegetação, tenham permitido a degradação mais rápida dos polímeros e, consequentemente, liberação mais rápida do óleo e/ou do extrato de nim. Como mencionado nos bioensaios com dieta artificial, os polímeros PCL e PHB não se degradam em meio contendo apenas água, mas sim em meio contendo microorganismos, conforme observado por Cara et al. (2003). As diferenças observadas entre os bioensaios em dieta e em folhas de milho confirmam que a dieta não é um meio propício para a degradação dos polímeros, não permitindo avaliar seu real efeito sobre o inseto.

Para melhor comparar a eficiência de cada formulação, a mortalidade foi corrigida em cada bioensaio pelo seu respectivo controle (ABBOTT, 1925), agrupando-se então os dados em um gráfico (Figura 3). Foram selecionadas as nanoformulações que apresentaram maior eficiência de controle das lagartas e que causaram redução de peso significativa. Um terceiro critério foi ter diferido do respectivo branco, dentro do bioensaio em que foi testada.

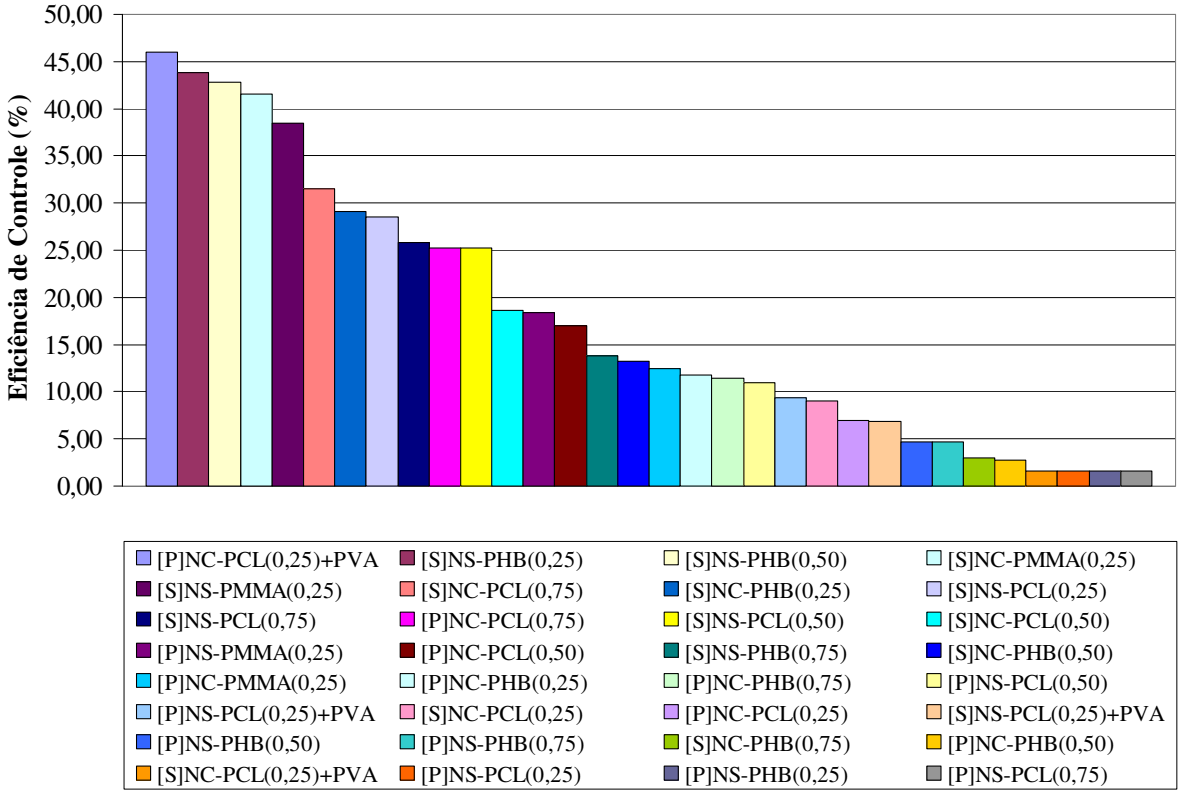

Figura 3 - Eficiência de controle das nanoformulações testadas nos cinco bioensaios em casa de vegetação, sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda*, alimentadas desde o primeiro ínstar com nanoformulações de nim, após 10 dias. (Mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott, 1925)

As nanoformulações com maior eficiência, acima de 40%, foram:

- [P]NC-PCL(0,25)+PVA;
- [S]NS-PHB(0,25);
- [S]NS-PHB(0,50),
- [S]NC-PMMA(0,25).

Essas nanoformulações também causaram redução de peso significativa e diferiram dos brancos, sendo, portanto, selecionadas para os testes de efeito residual e de preferência alimentar.

4.2.3 Efeito residual das nanoformulações selecionadas sobre *S. frugiperda*

Nos bioensaios para avaliação do efeito residual, as nanoformulações selecionadas foram comparadas ao produto comercial. Verificou-se que nenhuma das formulações manteve seu efeito ao longo do tempo, tendo uma redução relativamente pequena até 3 DAP (dias após a pulverização) e uma redução maior até 7 DAP. No bioensaio iniciado com 1 DAP, todos os tratamentos diferiram do controle quanto à mortalidade larval aos 10 dias, com destaque para [S]NS-PHB(0,25) (76,67%), que foi tão eficiente quanto o Organic Neem (88,33%). As outras três nanoformulações, [S]NS-PHB(0,50), [P]NC-PCL(0,25)+PVA e [S]NC-PMMA(0,25) não diferiram entre si (50,00, 46,67 e 40,00% de mortalidade, respectivamente), mas foram menos eficientes do que aquelas. Já com 3 DAP, as nanoformulações [S]NC-PMMA(0,50) (53,33%) e [S]NS-PHB(0,50) (43,33%) foram tão eficientes quanto o Organic Neem (80,00%). A nanoformulação ([S]NS-PHB(0,25), que foi a mais eficiente com 1 DAP, ficou logo em seguida, causando mortalidade de 40,00% das lagartas. A [P]NC-PCL(0,25)+PVA (23,33%) foi a única que não diferiu do controle (15,00%). Aos 7 DAP, foi possível diferenciar apenas o Organic Neem (38,33%) do controle (13,33%). As nanoformulações não diferiram entre si (15,00 a 26,27% de mortalidade), nem do Organic Neem e tampouco do controle, não sendo possível destacar nenhuma delas (Tabela 13).

Tabela 13 – Médias (±EP) de mortalidade de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas, durante 10 dias, desde o primeiro ínstar com folhas de milho tratadas com formulações de nim, nos bioensaios instalados aos 1, 3 e 7 dias após a pulverização

Tratamento	Mortalidade (%)[1]		
	1 DAP	3 DAP	7 DAP
Controle	11,67 ± 0,48 c	15,00 ± 0,25 d	13,33 ± 0,41 b
[P]NC-PCL(0,25)+PVA	46,67 ± 1,08 b	23,33 ± 0,50 cd	15,00 ± 0,48 ab
[S]NS-PHB(0,25)	76,67 ± 0,50 a	40,00 ± 1,29 bc	20,00 ± 0,71 ab
[S]NC-PMMA(0,25)	40,00 ± 1,08 b	53,33 ± 1,08 ab	20,00 ± 0,41 ab
[S]NS-PHB(0,50)	50,00 ± 0,29 b	43,33 ± 1,55 abc	26,67 ± 0,71 ab
Organic Neem	88,33 ± 0,48 a	80,00 ± 1,08 a	38,33 ± 1,25 a

[1] Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey, 5%).
DAP = dias após a pulverização; [S] = suspensão; [P] = pó; NC = nanocápsulas; NS = nanoesferas;
PCL = poli-ε-caprolactona; PHB = poli-ß-hidroxibutirato; PMMA = polimetilmetacrilato; B = branco;
PVA = polivinil álcool.

A mortalidade obtida com as nanoformulações em 1 DAP foi semelhante à obtida com as mesmas nos bioensaios para seleção de nanoformulações, embora [S]NS-PHB(0,25) tenha causado neste bioensaio um efeito mais pronunciado.

O efeito significativo de todas as nanoformulações logo em 1 DAP indica a rápida liberação dos compostos presentes nas cápsulas/esferas, embora provavelmente não tenha sido liberado todo o conteúdo, já que houve menor mortalidade com as nanoformulações do que com o produto comercial, indicando haver menor quantidade de óleo/extrato de nim agindo sobre os insetos alimentados em folhas tratadas com nanoformulações. Como ainda se observou efeito em 3 DAP para algumas das formulações, é provável que mesmo 3 dias após a aplicação nas plantas as nanopartículas ainda estivessem liberando o seu conteúdo. Apesar disso, o efeito não se manteve ao longo do tempo, ou seja, a liberação parece ter ocorrido apenas nos primeiros dias, e não gradativamente. Outra possibilidade é que tenha ocorrido apenas uma pequena liberação, devido à degradação de pequena quantidade de polímero das nanopartículas, ficando ainda uma grande quantidade de compostos retida nas mesmas.

Quanto ao peso das lagartas com 10 dias, no bioensaio iniciado em 1 DAP, a nanoformulação [S]NS-PHB(0,25) foi também a mais eficiente resultando em lagartas com apenas 3,30 mg, valor que não diferiu do constatado com Organic Neem (3,00 mg). As outras três, [S]NC-PMMA(0,25) (5,85 mg), [S]NS-PHB(0,50) (7,98 mg) e [P]NC-PCL(0,25)+PVA (13,86 mg), embora também tenham apresentado redução de peso significativa em relação ao controle (52,01 mg), foram menos eficientes que as citadas anteriormente. Observa-se que a [P]NC-PCL(0,25)+PVA foi a que causou a menor redução, assim como no bioensaio para seleção de nanoformulações, em que essa formulação causou alta mortalidade mas uma redução de peso não tão elevada. Como já mencionado, a azadiractina foi quantificada após a secagem por aspersão para obtenção da formulação em pó, mas os outros compostos não. Assim, durante o processo, a azadiractina pode ter se mantido estável, talvez devido à presença do PVA, mas os outros compostos com efeito fagodeterrente, como a salanina e a nimbina, normalmente presentes em óleo e extrato de nim, podem ter sofrido degradação. Aos 3 DAP, com a nanoformulação [P]NC-PCL(0,25)+PVA o peso larval (49,12 mg) já não diferiu do controle (54,78 mg), assim como ocorreu em relação à mortalidade. As outras três nanoformulações apresentaram peso (8,57

a 12,89 mg) inferior ao controle, entretanto nenhuma se igualou ao Organic Neem (3,74 mg). A nanoformulação [P]NC-PCL(0,25)+PVA (67,73 mg) também não diferiu do controle (68,95 mg) aos 7 DAP, enquanto as demais diferiram, com destaque para [S]NS-PHB(0,25) (15,51 mg), que não diferiu do Organic Neem (9,49 mg), ocorrendo nas demais, [S]NC-PMMA(0,25) e [S]NS-PHB(0,50), valores intermediários (32,30 e 37,48 mg, respectivamente) (Tabela 14).

Tabela 14 - Médias (±EP) de peso de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas, durante 10 dias, desde o primeiro ínstar, com folhas de milho tratadas com nanoformulações de nim, nos bioensaios instalados aos 1, 3 e 7 dias após a pulverização

Tratamento	Peso (mg)[1]		
	1 DAP	3 DAP	7 DAP
Controle	52,01 ± 4,14 d	54,78 ± 2,98 d	68,95 ± 2,79 c
[P]NC-PCL(0,25)+PVA	13,86 ± 1,83 c	49,12 ± 5,60 d	67,73 ± 6,93 c
[S]NS-PHB(0,25)	3,30 ± 0,53 a	8,72 ± 0,78 b	15,51 ± 1,81 a
[S]NC-PMMA(0,25)	5,85 ± 0,52 b	8,57 ± 0,79 b	32,30 ± 2,75 b
[S]NS-PHB(0,50)	7,98 ± 1,15 bc	12,89 ± 1,31 c	37,48 ± 3,36 b
Organic Neem	3,00 ± 0,43 a	3,74 ± 0,29 a	9,49 ± 1,71 a

[1] Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey, 5%).
DAP = dias após a pulverização; [S] = suspensão; [P] = pó; NC = nanocápsulas; NS = nanoesferas;
PCL = poli-ε-caprolactona; PHB = poli-ß-hidroxibutirato; PMMA = polimetilmetacrilato; B = branco;
PVA = polivinil álcool

Embora as nanoformulações não tenham causado mortalidade significativa no bioensaio iniciado aos 7 DAP, com relação ao peso larval observou-se que três delas ainda apresentaram atividade ([S]NS-PHB(0,25), [S]NC-PMMA(0,25) e [S]NS-PHB(0,50)), causando redução no valor deste parâmetro. A nanoformulação em pó [P]NC-PCL(0,25)+PVA perdeu a ação já aos 3 DAP, o que foi comprovado tanto pela avaliação da mortalidade quanto do peso.

Comparando-se os tratamentos entre os três bioensaios, observa-se que a eficiência de controle de todos diminuiu com o passar do tempo, com exceção apenas da nanoformulação [S]NC-PMMA(0,25), cuja eficiência aumentou de 1 para 3 DAP, mas diminuiu de 3 para 7 DAP (Figura 3). O aumento da eficiência em 3 DAP em relação a 1 DAP pode ter sido causada por uma degradação mais lenta do polímero PMMA, liberando mais lentamente o nim, talvez com a maior liberação em 3 DAP, ou a partir de 3 DAP, tendo maior ação então nesse período.

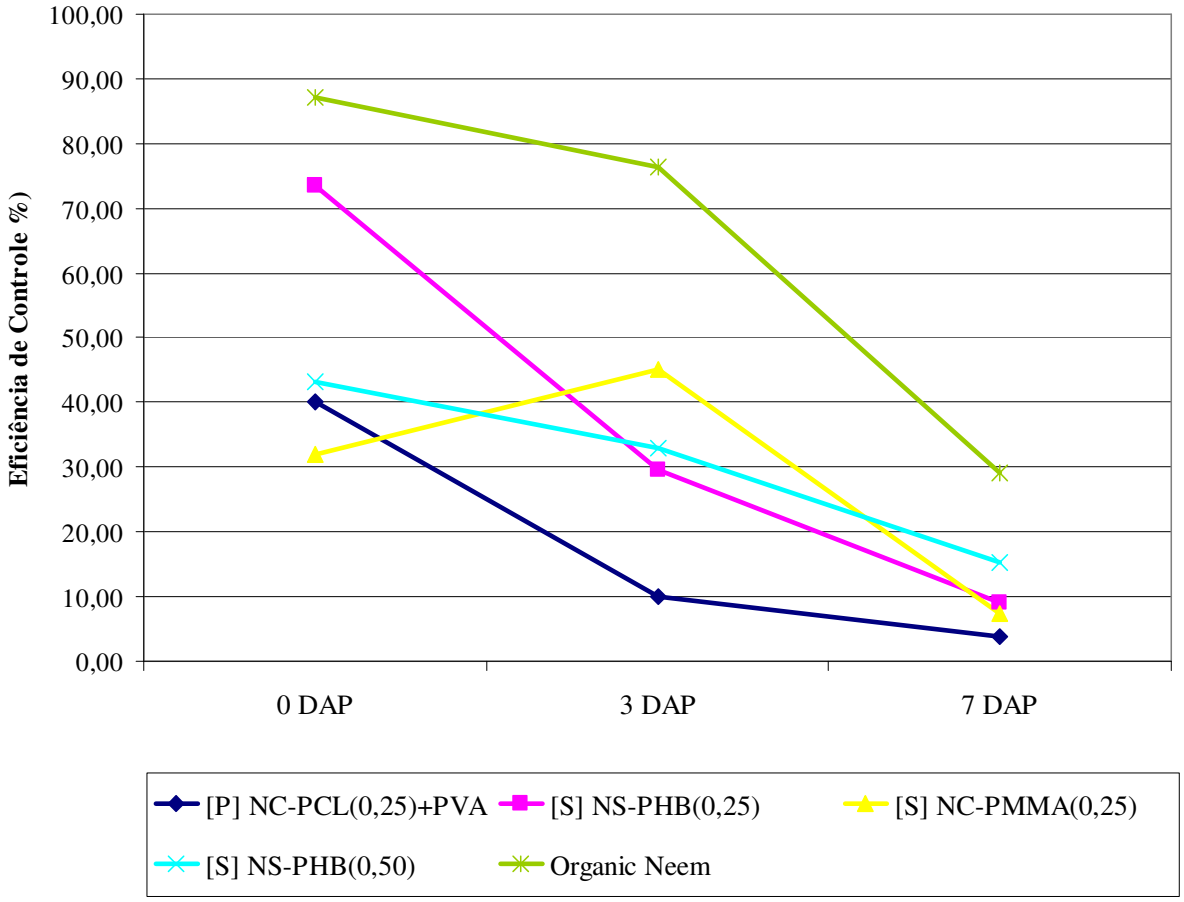

Figura 3 - Eficiência de controle das nanoformulações de nim sobre lagartas de primeiro ínstar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de milho tratadas, 1, 3 e 7 dias após a aplicação (dados corrigidos por Abbott, em cada bioensaio)

Entre 1 e 3 DAP, a maior redução de eficiência foi observada com a nanoformulação [P]NC-PCL(0,25)+PVA (redução de 75,22%), seguida de [S]NS-PHB(0,25) (59,89%) e [S]NS-PHB(0,50) (23,40%) (Tabela 15). A maior redução na eficiência de [P]NC-PCL(0,25)+PVA sugere que nessa formulação a liberação dos compostos foi mais rápida, logo após a aplicação, e que a degradação dos compostos após a liberação foi rápida. A única nanoformulação que apresentou aumento na eficiência foi [S]NC-PMMA(0,25) (41,62%), indicando que esta pode ter sofrido uma degradação gradativa do polímero, com consequente liberação gradativa do nim, o que se esperava que ocorresse com todas as nanoformulações, ou que ao menos elas mantivessem

o efeito por mais tempo. Ainda que nas nanoformulações os compostos estivessem protegidos pelas nanopartículas, visando evitar a biodegradação dos mesmos, a menor redução de eficiência foi observada com o Organic Neem (12,21%), em que os compostos não estavam protegidos. A maior redução da eficiência nas nanoformulações do que no produto comercial pode ter se devido à degradação dos compostos antes ou depois da liberação, ou mesmo por redução na liberação após alguns dias da aplicação.

Tabela 15 - Aumento (+) / redução (-) da eficiência de controle das formulações sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com folhas de milho tratadas com nanoformulações de nim

Tratamento	Eficiência de Controle (%)[1]		
	1 DAP-3 DAP	3 DAP -7 DAP	1 DAP -7 DAP
[P]NC-PCL(0,25)+PVA	-75,22	-62,67	-90,75
[S]NS-PHB(0,25)	-59,89	-62,24	-87,67
[S]NC-PMMA(0,25)	+41,62	-83,58	-76,75
[S]NS-PHB(0,50)	-23,40	-56,68	-64,52
Organic Neem	-12,21	-61,91	-66,56

[1] Valores calculados com base na mortalidade corrigida (Abbott, 1925).
DAP = dias após a pulverização; [S] = suspensão; [P] = pó; NC = nanocápsulas; NS = nanoesferas;
PCL = poli-ε-caprolactona; PHB = poli-ß-hidroxibutirato; PMMA = polimetilmetacrilato; B = branco;
PVA = polivinil álcool.

Entre 3 e 7 DAP, a eficiência de todos os tratamentos reduziu, sendo maior para [S]NC-PMMA(0,25) (83,58%), enquanto para as demais a redução ficou entre 56,68 e 62,67%, sendo de 61,91% para Organic Neem. A eficiência da nanoformulação [P]NC-PCL(0,25)+PVA em 7 DAP reduziu 90,75% em relação à eficiência inicial (1 DAP), para a [S]NS-PHB(0,25) a redução foi de 87,67%, para a [S]NC-PMMA(0,25) foi de 76,75%, e de 64,52% para a [S]NS-PHB(0,50). Para o Organic Neem, a redução foi de 66,56%.

Segundo Schmutterer (1990), o efeito residual de produtos à base de nim é em média de 5 a 7 dias. Stokes e Redfern (1982) relataram que a ação da azadiractina sobre *S. frugiperda*, após exposição direta à luz solar, fica reduzida a cerca de 80% após 3 dias e a 50% após 7 dias. No presente estudo, a redução da ação do Organic Neem após 3 dias foi de 12,21%, restando assim

cerca de 87% da atividade, se aproximando dos resultados obtidos por aqueles autores, porém após 7 dias restava apenas 33,44% da atividade inicial.

Com as nanoformulações, em três dias a atividade restante da [S]NS-PHB(0,50) era de 76,6%, semelhante à do Organic Neem, mas [P]NC-PCL(0,25)+PVA e [S]NS-PHB(0,25) apresentavam apenas 24,78 e 40,11% de atividade, respectivamente. A única que teve sua atividade aumentada foi [S]NC-PMMA(0,25), com 41,62% de aumento. Após sete dias, a atividade da [S]NS-PHB(0,50) também era semelhante à do Organic Neem (35,48%), mas a das outras nanoformulações era muito inferior (9,25% com [P]NC-PCL(0,25)+PVA, 12,33% com [S]NS-PHB(0,25) e 23,25% com [S]NC-PMMA(0,25). Assim, a atividade das nanoformulações diminuiu mais que a do produto comercial, ao longo do tempo.

Caboni et al. (2002) verificaram redução de 90% na quantidade de azadiractina A encontrada em frutos de oliveira tratados, após 3 dias, sendo que após 7 dias nenhum resíduo foi detectado. Calcularam uma meia-vida da azadiractina A igual a 0,8 dias, em condições de campo com temperatura variando de 18,7 a 26,5°C e sem ocorrência de chuvas.

Esperava-se que a degradação do polímero fosse lenta e contínua, permitindo liberação gradativa do óleo/extrato de nim, mantendo assim o efeito por um tempo maior. Entretanto, as nanoformulações não aumentaram o efeito residual dos compostos do nim, apresentando maior redução da eficiência ao longo do tempo em relação ao produto comercial. Assim, o efeito residual do Organic Neem foi de 7 dias, enquanto para a nanoformulação [P]NC-PCL(0,25)+PVA foi de apenas 1 dia, e para as outras três foi de 3 dias.

O fato de as nanoformulações terem apresentado efeito maior 1 e 3 dias após a aplicação poderia estar associado também à taxa de encapsulação da azadiractina. Nem todo o conteúdo de azadiractina presente no óleo/extrato de nim foi encapsulado, ou seja, uma certa quantidade ficou livre na formulação, sendo que algumas nanoformulações apresentaram uma taxa de encapsulação maior que outras. Em geral, as nanocápsulas apresentaram eficiência de encapsulação entre 40 e 60%, enquanto as nanoesferas, de 15 a 40%. Assim, o efeito inicial observado com algumas das nanoformulações pode ter se devido aos compostos ativos não encapsulados, e não àqueles liberados pelas nanopartículas.

4.2.4 Efeito das nanoformulações selecionadas sobre o consumo foliar

Nos bioensaios de preferência alimentar, em 1 DAP somente o Organic Neem e a nanoformulação [S]NS-PHB(0,25) apresentaram efeito fagodeterrente, enquanto as outras nanoformulações não tiveram qualquer efeito sobre o consumo de alimento por lagartas de *S. frugiperda*. Aos 3 e 7 DAP, nenhum tratamento apresentou efeito fagodeterrente, sendo todos classificados como neutros. Nenhum tratamento apresentou efeito fagoestimulante, em nenhum dos bioensaios (Tabela 16).

Tabela 16 - Área foliar consumida e preferência alimentar de lagartas de terceiro ínstar de *Spodoptera frugiperda,* 24 horas após liberação em arenas com chance de escolha entre discos foliares tratados e não tratados com nanoformulações de nim, aos 1, 3 e 7 dias após a aplicação

Tratamento	Área foliar consumida (± EP)		IP[1] ± EP	IClass[2]	Classificação
	Tratamento	Controle			
1 DAP					
[P]NC-PCL(0,25)+PVA	2,28 ± 0,32	3,67 ± 0,40	0,78 ± 0,11	1 ± 0,23	Neutro
[S]NS-PHB(0,25)	2,27 ± 0,30	3,62 ± 0,30	0,76 ± 0,09	1 ± 0,20	Fagodeterrente
[S]NC-PMMA(0,25)	2,51 ± 0,29	3,29 ± 0,38	0,90 ± 0,10	1 ± 0,22	Neutro
[S]NS-PHB(0,50)	2,35 ± 0,39	3,49 ± 0,42	0,81 ± 0,13	1 ± 0,27	Neutro
Organic Neem	1,75 ± 0,37	4,14 ± 0,47	0,63 ± 0,14	1 ± 0,30	Fagodeterrente
3 DAP					
[P]NC-PCL(0,25)+PVA	5,90 ± 0,63	5,81 ± 0,70	1,03 ± 0,11	1 ± 0,23	Neutro
[S]NS-PHB(0,25)	2,99 ± 0,63	4,35 ± 0,75	0,90 ± 0,18	1 ± 0,38	Neutro
[S]NC-PMMA(0,25)	2,38 ± 0,49	3,04 ± 0,64	0,90 ± 0,16	1 ± 0,33	Neutro
[S]NS-PHB(0,50)	2,60 ± 0,56	1,76 ± 0,39	1,04 ± 0,18	1 ± 0,37	Neutro
Organic Neem	1,78 ± 0,47	2,18 ± 0,44	0,96 ± 0,19	1 ± 0,41	Neutro
7 DAP					
[P]NC-PCL(0,25)+PVA	2,42 ± 0,63	2,35 ± 0,52	1,00 ± 0,21	1 ± 0,44	Neutro
[S]NS-PHB(0,25)	2,36 ± 0,50	1,41 ± 0,41	1,25 ± 0,20	1 ± 0,41	Neutro
[S]NC-PMMA(0,25)	2,51 ± 0,53	1,84 ± 0,56	1,23 ± 0,23	1 ± 0,49	Neutro
[S]NS-PHB(0,50)	2,07 ± 0,43	2,20 ± 0,52	1,04 ± 0,22	1 ± 0,45	Neutro
Organic Neem	1,94 ± 0,54	3,01 ± 0,52	0,75 ± 0,21	1 ± 0,44	Neutro

[1] Índice de Preferência; [2] Intervalo de Classificação.
DAP = dias após a pulverização; [S] = suspensão; [P] = pó; NC = nanocápsulas; NS = nanoesferas;
PCL = poli-ε-caprolactona; PHB = poli-ß-hidroxibutirato; PMMA = polimetilmetacrilato; B = branco;
PVA = polivinil álcool

Embora aos 3 e 7 DAP o efeito do Organic Neem não tenha tido efeito, tendo sido classificado como neutro, observa-se que as folhas tratadas com o produto foram relativamente menos consumidas em relação às folhas tratadas com as nanoformulações, nos três bioensaios. Assim, embora só tenha sido classificado como fagodeterrente em 1 DAP, parece que as lagartas foram sensibilizadas pelos compostos do nim nos outros dois bioensaios, ainda que em menor proporção.

O fato de a formulação [S]NS-PHB(0,25) ter apresentado efeito fagodeterrente com 1 DAP, com 0,25 g do polímero, e isto não ter ocorrido quando esta mesma formulação foi usada contendo 0,50 do polímero talvez possa ser explicado justamente pela variação nesta quantidade. Assim, em 1 DAP as formulações tinham sido recém-aplicadas, tendo havido pouco tempo para degradação do polímero e, portanto, a nanoformulação com menor quantidade do mesmo (0,25 g) pode ter liberado o princípio ativo mais rapidamente do que a outra.

A nanoformulação [S]NS-PHB(0,25), que em 1 DAP apresentou efeito fagodeterrente, foi também a nanoformulação que causou maior mortalidade e menor peso das lagartas no bioensaio residual, em 1 DAP. Assim, parece que seu efeito foi imediato, ou seja, que houve liberação do nim logo após a pulverização nas plantas. As demais podem ter tido uma liberação não tão imediata ou em quantidade muito pequena, não sendo possível observar efeito logo no primeiro dia, quando foi instalado o teste de preferência alimentar de 1 DAP. Quanto a 3 e 7 DAP, é possível que aqueles compostos com ação fagodeterrente, como nimbina e salanina, além da azadiractina, já tivessem sido degradados, por isso os tratamentos não apresentaram efeito. Caboni et al. (2006) extraíram alguns compostos a partir do extrato metanólico de sementes de nim e deixaram expostos à luz solar direta. A meia-vida calculada para as azadiractinas A e B foram de 11,34 e 5,52 horas, respectivamente, enquanto para nimbina foi de 0,30 e para salanina de 0,09 horas, ou seja, estes dois compostos apresentam degradação muito mais rápida quando expostos à luz solar.

Considerando que essas nanoformulações não apresentaram efeito fagodeterrente mas causaram redução de peso no bioensaio de efeito residual, parece que o nim não atuou estimulando células fagodeterrentes específicas, e sim causando efeitos tóxicos no mesêntero, após a ingestão.

No bioensaio residual para avaliação de mortalidade e peso, em 1 DAP todas as formulações apresentaram efeito significativo, enquanto no bioensaio de preferência alimentar apenas [S]NS-PHB(0,25) e Organic Neem apresentaram efeito significativo (fagodeterrência). Essa diferença pode ser explicada pelo fato de que o bioensaio de preferência alimentar é realizado em apenas 24 horas, sendo o resultado dependente da condição das formulações na planta no dia exato da instalação, enquanto no bioensaio residual as lagartas receberam folhas tratadas diariamente, durante 10 dias e, assim a ação pode ter sido resultante da liberação do nim em quaisquer destes 10 dias, não sendo possível afirmar com exatidão quando o nim foi liberado e começou a agir.

5 CONCLUSÕES

- A metodologia de aplicação nanoformulações em dieta artificial não é eficiente para avaliar o efeito sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), uma vez que estas formulações necessitam de condições específicas para degradação do polímero e liberação dos compostos ativos, como luz solar e presença de microorganismos, sendo melhor o teste com aplicação em plantas de milho, mantidas em casa de vegetação sob condições ambientais.
- Os polímeros PMMA (polimetilmetacrilato), PCL (poli-ε-caprolactona) e PHB (poli-β-hidroxibutirato), assim como os dois tipos de nanopartículas (nanocápsulas e nanoesferas) podem ser utilizados para o preparo de nanoformulações de nim.
- As nanoformulações [P]NC-PCL(0,25)+PVA, [S]NS-PHB(0,25), [S]NS-PHB(0,50) e [S]NC-PMMA(0,25) apresentam maior eficiência de controle e redução de peso das lagartas de *S. frugiperda* que se alimentam de folhas de milho tratadas, embora com efeito inferior ao do produto comercial Organic Neem.
- Com 0,25 e 0,50g de polímero, a degradação e, conseqüentemente, a liberação dos compostos é mais rápida do que com 0,75 g.
- As nanoformulações em suspensão contendo Tween 80 como agente tensoativo apresentam maior eficiência que aquelas em pó, entretanto nanoformulações em pó são mais eficientes do que em suspensão quando se utiliza o PVA (polivinil álcool) em lugar de Tween.80.
- Apenas a nanoformulação [S]NS-PHB(0,25) e o Organic Neem causam fagodeterrência nas lagartas de *S. frugiperda*, e apenas no primeiro dia após a aplicação.
- O efeito residual do Organic Neem é de 7 dias, enquanto o da nanoformulação [P]NC-PCL(0,25)+PVA é de 1 dia, e de 3 dias para as nanoformulações [S]NS-PHB(0,25), [S]NS-PHB(0,50) e [S]NC-PMMA(0,25).
- As nanoformulações não aumentam a ação residual do nim, apresentando maior redução da eficiência ao longo do tempo, durante o período avaliado.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 18, p. 265-266, 1925.

AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Ministério de Agricultura)**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10 jun. 2009.

AGUIAR-MENEZES, E.L. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica: EMBRAPA AGROBIOLOGIA, 2005. 58p. (EMBRAPA AGROBIOLOGIA, Documentos, 205).

ALVES, S.B.; ZUCCHI, R.A.; VENDRAMIM, J.D. Pragas do milho, arroz, trigo e sorgo. In: CURSO DE ENTOMOLOGIA APLICADA À AGRICULTURA. Piracicaba: FEALQ, 1992. p.273-310.

ANTÓNIO, N.N. **Estudo dos mecanismos de despolimerização térmica do poli(metacrilato de metila) - Escolha de solventes compatíveis com PMMA.** 2007. 53p. Dissertação (Mestrado, Engenharia Química) - Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior Técnico, Lisboa, 2007.

ARISAWA, H.; BRILL, T.B. Kinetics and mechanisms of flash pyrolysis of poly(methyl methacrylate) (PMMA). **Combustion and Flame,** New York, v.109, p.415-426, 1997.

BILTON, J.N.; BROUGHTON, H.B.; JONES, P.S.; LEY, S.V.; LIDERT, Z.; MORGAN, E.D.; RZEPA, H.S.; SHEPPARD, R.N.; SLAWIN. A.M.Z.; WILLIAMS, D.J. An X-ray crystallographic, mass spectroscopic, and NMR study of the limonoid insect antifeedant azadirachtin and related derivatives. **Tetrahedron**, Oxford, v.43, p.2805-2815, 1987.

BISWAS, K.; CHATTOPADHYAY, I.; BANERJEE, R.N.; BANDYOPADHYAY, U. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). **Current Science,** Bangalore, v.82, n.11, p.1336-1345, 2002.

BURTON, R.L.; PERKINS, W.D. WSB, a new laboratory diet for the corn earworm and the fall armyworm. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.65, n.2, p.385-386, 1972.

BUTTERWORTH, J.H.; MORGAN, E.D. Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. **Journal of the Chemical Society**, London, v.35, n.1, p.23-24, 1968.

CABONI, P.; CABRAS, M.; ANGIONI, A.; RUSSO, M.; CABRAS, P. Persistence of azadirachtin residues on olives alter field treatment. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Davis, v.50, p.3491-3494, 2002.

CABONI, P.; SARAIS, G.; ANGIONI, A.; GARCIA, A. J.; LAI, F.; DEDOLA, F.; CABRAS, P. Residues and persistence of neem formulations on strawberry after field treatment. **Journal of Agriculture and Food Chemistry,** Davis, v.54. p.10026-10032. 2006.

CARA, F.; IMMIRZI, B.; IONATA, E.; MAZZELLA, A.; PORTOFINO, S.; ORSELLO, G.; PRISCO, P.P. Biodegradation of poly-ε-caprolactone/poly-β-hydroxybutyrate blend. **Polymer Degradation and Stability**, Barking v.79, p.37-43, 2003.

CARVALHO, R.P.L. **Danos, flutuação populacional, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) e suscetibilidade de diferentes genótipos de milho em condições de campo.** 1970. 170p. Tese (Doutorado na área de Entomologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1970.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. **Progress in Polymer Science**, Pittsburgh, v.23, p.1273-1335, 1998.

CHIELLINI, E.; SOLARO, R. Biodegradable polymeric materials. **Advanced Materials**, Weinheim, v.8, n.4, p.305-313, 1996.

CIOCIOLA JR.; A.I; MARTINEZ. S.S. **Nim:** alternativa no controle de pragas e doenças**.** Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. 24p.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira :** grãos - quarto levantamento, janeiro/2009**.** Brasília : CONAB, 2009.

CÓNDOR-GOLEC, A.F. Effect of neem (*Azadirachta indica* A Juss.) insecticides on parasitoids. **Revista Peruana de Biologia**, Lima, v.14, n.1, p.69-74, 2007.

CORREIA, A.A. ; BREDA, M.O. ; LIMA, M.P.L.; OLIVEIRA, J.V.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V. Bioatividade do Rot-nim sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797)

(Lepidoptera: Noctuidae) em milho. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UFRPE - JEPEX, 7, 2007, Recife. **Anais...** Recife, 2007.

CORREIA, A.A.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A.A.C.; OLIVEIRA, J.V.; TORRES, J.B. Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com nim. **Neotropical Entomology,** Londrina, v.38, n.1, p.829-837, 2009.

CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1995. 45p. (EMBRAPA-CNPMS, Circular Técnica, 21).

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. C. L. ; OLIVEIRA. A. C. ; VASCONCELOS, C. A. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. **International Journal of Pest Management**. V.45. n.4. p.293-296. 1999.

CRUZ, I.; MONTEIRO, M.A.R. **Controle biológico da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, utilizando o parasitóide *Trichogramma pretiosum*.** Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2004. 4 p. (EMBRAPA-CNPMS. Comunicado técnico, 98).

CRUZ, I.; TURPIN, F.T. Efeito de *Spodoptera frugiperda* em diferentes estágios de crescimento da cultura de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, n.3, p.355-359, 1982.

DE JUSSIEU, A. Mémoire sur le groupe des Méliaceés. **Mémoires du Muséum d'Histoire Naturelle,** Paris, v.19, p.153-304, 1830.

DUARTE, J.O.; CRUZ, J.C.; GARCIA, J.C.; MATTOSO, M.J. **Economia da Produção e Utilização do Milho.** Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2006. (EMBRAPA-CNPMS, Sistemas de Produção 1.) Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/economiadaprodu.htm>. Acesso em: 18 mar. 2007.

DURÁN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. **Nanotecnologia:** Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**.** São Paulo: Artliber Editora, 2006. 208p.

FERRAZ, M.C.V.D. **Determinação das exigências térmicas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) em milho**. Piracicaba, 1982. 81p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.55, n.1, p.R1-R4, 1989.

FIGUEIREDO, M.L.C.; PENTEADO-DIAS, A.M,; CRUZ, I. **Danos provocados por *Spodoptera frugiperda* na produção de matéria seca e nos rendimentos de grãos, na cultura do milho.** Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2005. 6p. (EMBRAPA-CNPMS, Comunicado Técnico, 130).

FINNEY, D.J. **Probit analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. 255p.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; DE BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GIOLO, F. P.; GRÜTZMACHER, A. D. ; GARCIA, M. S. ; BUSATO, G. R Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lep.: Noctuidae) oriundas de diferentes localidades e hospedeiros. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.8. n.3. p.219-224. 2002.

GONGORA-RUBIO M.R.; SEABRA, A.C. Nanotecnologia: A última fronteira tecnológica. **Revista da FAT (Fundação de Apoio à Tecnologia),** São Paulo, 2005. p.7-13.

GREENE, G.L.; LEPPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.69, n.4, p.487-488, 1976.

GRUPO ETC (Action Group on Erosion Technology and Concentration). Tradução: PEDROSO, J.F. **A invasão invisível do campo – O impacto das nanotecnologias na alimentação e na agricultura.** Novembro, 2004. Disponível em: <http://www.etcgroup.org>. Acesso em: 10 mar. 2007.

ISMAN, M.B. Neem and other botanical insecticides: Barriers to commercialization. **Phytoparasitica,** Netherlands**,** v.25, p.339 - 344, 1997.

ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, Washington, v.51, p.45-66, 2006.

KOGAN, M.; GOEDEN, R.D. The host-plant range of *Lema trilineata daturaphila* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Annals of Entomological Society of America**, Lanham, v.63, p.1175-1180, 1970.

KOUL, O.; ISMAN, M.B.; KETKAR, C.M. Properties and uses of neem, *Azadicachta indica*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.68, p.1-11, 1990.

KRAUS, W.; BOKEL, M.; BRUHN, A.; CRAMER, R.; KLAIBER, I.; KLENCK, A.; NAGL, G.; PÖHNL, H.; SADLO, H.; VOGLER, B. Structure determination by NMR of azadirachtin and related compounds from *Azadirachta indica* (Meliaceae). **Tetrahedron**, Oxford, v.43, p.2817-2830, 1987.

LARA, F.M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. Piracicaba: Livroceres, 1979. 201p.

LAVIE, D.; JAIN, M.K.; SHPAN-GABRIELITH, S.R. A locust phagorepellent from two *Melia* species. **Chemical Communication**, Cambridge, v.18, p.910-911, 1967.

LEIDERMAN, L.; SAUER, H.F.G. A lagarta dos milharais *Laphygma frugiperda* (Abbott e Smith, 1797). **O Biológico**, São Paulo, v.19, n.6, p.105-113, 1953.

LeORA SOFTWARE. **Poloplus 1.0 probit and logit analysis**. Berkeley, 2003. 1 CD-ROM.

LIMA, J.F.M.; GRÜTZMACHER, A.D.; CUNHA, U.S.; PORTO, M.P.; MARTINS, J.F.S.; DALMAZO, G.O. Ação de inseticidas naturais no controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho cultivado em agroecossistema de várzea. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p.607-613, mai-jun, 2008.

LIMA, M.P.L.; OLIVEIRA, J.V.; MARQUES, E.J. Manejo da lagarta-do-cartucho em milho com formulações de nim e *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.4, 2009.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharma Sciences**, Paris, v.1, n.4, p.221-241, 1991.

MARTINEZ, S.S. (Ed.) **O Nim -** ***Azadirachta indica:*** natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), 2002. 142p.

MARTINEZ, S.S. O nim – *Azadirachta* indica – um inseticida natural. Londrina: Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), 2008. (Atualizado em 20 de fevereiro de 2008). Disponível em: <http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/O%20NimDownloadFev2008PDF.pdf>. Acesso em: 29 maio 2009.

MATTOSO, L.H.C.; MEDEIROS, E.S.; MARTIN NETO, L. A revolução nanotecnológica e o potencial para o agronegócio. **Revista de Política Agrícola,** Brasília, n.4, p.38-46, 2005.

MEDEIROS, E.S.; PATERNO, L.G.; MATTOSO, L.H.C. Nanotecnologia. In: DURÁN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação.** São Paulo: Artliber Editora, 2006. cap.1, p.13-30.

MOCHIZUCHI, M.; HAYASHI, T.; NAKAYAMA, K.; MASUDA, T. Studies on biodegradabile poly(texano-6-lactone) fibers. Part 2: environmental degradation. **Pure and Applied Chemistry,** London, v.71, n.11, p.2177–2188, 1999.

MORDUE (LUNTZ), A.J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: an update. **Journal of Insect Physiology,** Oxford, v.39, n.11, p.903-924, 1993.

MORDUE (LUNTZ), A.J.; MORGAN, E.D.; NISBET, A.J. Azadirachtin, a natural product in insect control. In: GILBERT, L.; IATROU, K.; GILL, S.S. **Comprehensive molecular insect science**. Amsterdam: Elsevier BV, v.6, 2005. p.117-135.

MORDUE (LUNTZ), A.J.; NISBET, A.J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil,** Londrina, v.29, n.4, p.615-632, 2000.

MOSSINI, S.A.G.; KEMMELMEIER, C. A árvore nim (***Azadirachta indica***. A. Juss.): múltiplos usos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v.24, n.1, p.139-148, 2005.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (Washington, Estados Unidos). **Neem**: a tree for solving global problems. Washington: National Academy Press, 1992. 139 p.

NEVES, B.P.; OLIVEIRA, I.T.; NOGUEIRA, J.C.M. **Cultivo e utilização do nim indiano**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA/CNPAF, 2003. 12p. (EMBRAPA/CNPAF, Circular Técnica, 62).

NEVES, B.P.; NOGUEIRA, J.C.M. **Cultivo e utilização do nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.).** Goiânia: EMBRAPA/CNPAF/APA, 1996. 32p. (Circular Técnica, 28).

PÉREZ, G.; PADRÓN, R.; SOTO, R.; BERTSCH, F. Efecto de tres plaguicidas naturales derivados del nim sobre el combate de plagas en col y maiz en el campo, y en *Vigna unguiculata* en almacenamiento. **Agronomía Costarricense,** San José, v.21, n.2, p.259-266, 1997.

PRATES, H.T.; VIANA, P.A.; WAQUIL, J.M. Atividade de extrato aquoso de folhas de nim (*Azadirachta indica*) sobre *Spodoptera frugiperda*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 3, p. 437-439, 2003.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2009. Disponível em: <http://www.R-project.org.> Acesso em 12 fev. 2009.

RÉ, M.I.; RODRIGUES, M.F.A. Polímeros biodegradáveis. In: DURÁN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. **Nanotecnologia:** Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Paulo: Artliber Editora, 2006. cap.8, p.149-160.

RIYAJAN, S.; SAKDAPIPANICH, J.T. Development of a controlled release neem capsule with a sodium alginate matrix, crosslinked by glutaraldehyde and coated with natural rubber. **Polymer Bulletin**, Berlin, 2009. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/b6661941kq293859/>. Acesso em 20 jul. 2009.

ROEL, A.R.; VENDRAMIM, J.D. Efeito residual do extrato de acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) para lagartas de diferentes idades de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1049-1054, 2006.

ROSA, D.S.; PENTEADO, D.F.; CALIL, M.R. Propriedades térmicas e biodegradabilidade de PCL e PHB em um *pool* de fungos. **Revista de Ciência e Tecnologia**, Recife, v.15, p.75-80, 2000.

SAXENA, R.C. Insecticides from neem. In: ARNASON, J.T.; PHILOGENE, B.J.R.; MORAND, P.(Ed.). **Insecticides of plant origin**. Washington: American Chemical Society, 1989. p.110-135.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L., POHLMANN, A.R. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Química Nova**, São Paulo, v.26, n.5, p.726-737, 2003.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, Washington, v.35, p.271-297, 1990.

SCRIBER, J.M.; SLANSKY JÚNIOR, F. The nutritional ecology of immature insects. **Annual Review of Entomology,** Stanford, v.26, n.1, p.183-211, 1981.

SILOTO, R.C. **Danos e biologia de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho.** 2002. 93p. Dissertação (Mestrado, Entomologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,Universidade de São Paulo, Piracicaba,2002.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v.70, n.1/2, p.1-20, 2001.

SOUZA,J.C.; SOUZA, M.A. **Lagarta-do-cartucho e besourinho-das-plântulas**: principais pragas do milho em plantio direto no sul de Minas. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. 32p. (EPAMIG, Boletim Técnico, 68).

STOKES, J.B.; REDFERN, R.E. Effect of sunlight on azadirachtin: antifeeding potency. **Journal of Environmental Science and Health,** Philadelphia, Part A, v.17, n.1, p.57-65, 1982.

TURNER, C.J.; TEMPESTA, M.S.; TAYLOR, R.B.; ZAGORSKI, M.G.; TERMINI, J.C.; SCHROEDER, D.R.; NAKANISHI, K. An NMR spectroscopic study of azadirachtin and its trimethylether. **Tetrahedron,** Oxford, v.43, p.2789-2803, 1987.

VENDRAMIM, J.D.; CASTIGLIONI, E. Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas. In: GUEDES, J.C.; COSTA, I.D.; CASTIGLIONI, E. **Bases e técnicas do manejo de insetos.** Santa Maria: UFSM/CCR/DFS, 2000. p.113-128.

VENDRAMIM, J. D.; FANCELLI, M. Efeito de genótipos de milho na biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Londrina,** v.17 (supl.), p.141-150. 1988.

VIANA, P.A.; PRATES, H.T. Desenvolvimento e mortalidade larval de *Spodoptera frugiperda* em folhas de milho tratadas com extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica*. **Bragantia**, Campinas, v.62, n.1, p.69-74, 2003.

VIANA, P.A.; PRATES, H.T. Mortalidade de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de milho tratadas com extrato aquoso de folhas de nim *Azadirachta indica.* **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.4, n.3, p.316-322, 2005.

WAQUIL, J.M.; VIANA, P.A.; LORDELLO, A.I.; CRUZ, I.; OLIVEIRA, A.C. Controle da lagarta-do-cartucho em milho com inseticidas químicos e biológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, n.2, p.163-166. 1982.