**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Avaliação do efeito sistêmico de nanoformulações à base de derivados de
nim (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B
(Hemiptera: Aleyrodidae) em tomateiro**

Sheila Salles de Carvalho

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

**Piracicaba
2012**

Sheila Salles de Carvalho
Bacharel e licenciada em Ciências Biológicas

**Avaliação do efeito sistêmico de nanoformulações à base de derivados de nim
(*Azadirachta indica* A. Juss) sobre *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera:
Aleyrodidae) em tomateiro**

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ DJAIR VENDRAMIM**

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

**Piracicaba
2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Carvalho, Sheila Salles de

Avaliação do efeito sistêmico de nanoformulações à base de derivados de nim
(*Azadirachta indica* A. Juss) sobre *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera:
Aleyrodidae) em tomateiro / Sheila Salles de Carvalho. - Piracicaba, 2012.
78 p: il.

Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Mosca-branca 2. Nanotecnologia 3. Nim 4. Plantas inseticidas 5. Polímeros
I. Título

CDD 632.752
C331a

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

Aos meus pais, Izildinha de O. Salles de Carvalho e
João Ferreira de Carvalho Sobrinho
E ao meu irmão, Hugo Salles de Carvalho,

OFEREÇO E DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Gloriosa, por fazer parte do meu desenvolvimento profissional e pessoal desde a graduação. Espero cumprir minha missão vitoriosa!

Ao professor José Djair Vendramim, pela orientação, atenção, ensinamentos e grande exemplo de pessoa que é.

Ao Programa de Pós Graduação-Entomologia, pela oportunidade a mim concedida.

Aos professores do Departamento de Entomologia e Acarologia, pelos ensinamentos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Resistência de Plantas e Plantas Inseticidas, pelo companheirismo, puxões de orelha e incentivo: Angelina Marcomini, Eliane Grisoto, Gabriel, Kaira Pauli, Leandro Ribeiro, Márcio Alves, Marcos Aurélio, Mônica Silva e Thiago.

Àqueles que por aqui passaram: Fátima, Rafael, Paulo, Karla, Gerane e Cristina.

Àqueles que contribuíram para que eu aqui estivesse: Patrícia Milano e Rafael Pitta.

Ao Paulo Bogorni, pela ajuda no desenvolvimento do projeto.

Aos meus amigos Aline, Larissa, Viviane, Micheline, Cleber e Gustavo, pelos momentos de descontração e companheirismo.

Ao meu Maurito, pelo companheirismo, amor e carinho e por estar sempre presente e solícito.

Aos professores da UFSCAR Maria Fátima G. F. da Silva e Moacir Rossi Forim, pelo apoio no projeto e ao doutorando Israel Cívico, pela realização das quantificações e preparação das nanoformulações.

Aos colegas da turma do PPG Entomologia 2010, pelas campanhas de estudo durante as disciplinas e a ajuda na difícil preparação da coleção entomológica.

Aos meus pais, Izildinha e João, e ao meu irmão, Hugo, pelo apoio nesta jornada desde meus primeiros dias em Piracicaba.

À minha prima-madrinha, Claudia, por sempre me incentivar a seguir em frente na minha formação acadêmica.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À Marineia Lara Haddad, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Leandro Ribeiro, ela ajuda na correção do abstract.

Ao Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos, pela cessão de espaço para o congelamento do material vegetal.

Às bibliotecárias Eliana Maria Garcia e Silvia Maria Zinsly, pela correção da formatação da dissertação.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização desta conquista.

Obrigada!!!

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Aspectos taxonômicos e distribuição geográfica de <i>Bemisia tabaci</i>	23
2.2 Aspectos bioecológicos de <i>B. tabaci</i> biótipo B	24
2.3 Considerações gerais sobre derivados botânicos no controle de insetos	25
2.4 Ação de extratos de nim sobre insetos com ênfase para <i>B. tabaci</i> biótipo B	26
2.5 Utilização da nanotecnologia no controle de pragas.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Criação de manutenção de <i>B. tabaci</i> biótipo B.....	31
3.2 Obtenção de plantas de tomateiro para os ensaios.....	31
3.3 Estimativa da CL ₅₀ para o óleo de nim	32
3.4 Seleção das nanoformulações mais promissoras	33
3.4.1 Efeito das nanoformulações NC L2	34
3.4.2 Efeito das nanoformulações NC L3	35
3.4.3 Efeito das nanoformulações NC L4	36
3.4.4 Efeito das nanoformulações NC L5	38
3.4.5 Efeito das nanoformulações NC L6	38
3.5 Influência da aplicação sistêmica de óleo com derivados de nim na oviposição, viabilidade de ovos e mortalidade ninfal de <i>B. tabaci</i> biótipo B	40
3.6 Efeito das nanoformulações selecionadas	40
3.7 Efeito residual das nanoformulações selecionadas	41
3.8 Detecção e quantificação de azadiractina e de 3-tigloilazadiractol nas plantas de tomateiro tratadas com óleo de nim aplicado via sistêmica	41

3.9 Análise estatística.....	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 Estimativa da CL ₅₀ para óleo de nim	45
4.1.1 Ensaio 1	45
4.1.2 Ensaio 2	46
4.2 Seleção das nanoformulações mais promissoras	48
4.2.1 Efeito das nanoformulações NC L2	48
4.2.2 Efeito das nanoformulações NC L3	49
4.2.3 Efeito das nanoformulações NC L4	51
4.2.4 Efeito das nanoformulações NC L5	54
4.2.5 Efeito das nanoformulações NC L6	55
4.3 Influência da aplicação sistêmica de óleo com derivados de nim na oviposição, viabilidade de ovos e mortalidade ninfal de <i>B. tabaci</i> biótipo B.....	57
4.4 Efeito das nanoformulações selecionadas	58
4.6 Detecção e quantificação de azadiractina e de 3-tigloilazadiractol nas plantas de tomateiro tratadas com óleo de nim aplicado via sistêmica	64
5 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS.....	71

RESUMO

Avaliação do efeito sistêmico de nanoformulações à base de derivados de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em tomateiro

A nanotecnologia é cada vez mais empregada em métodos alternativos de controle de pragas. Em virtude disso, nanoformulações foram preparadas com nanocápsulas (NC) utilizando os polímeros poli-metacrilato de metila (PMMA), poli- ϵ -caprolactona (PCL) e poli- β -hidroxibutirato (PHB) como agentes encapsulantes de duas moléculas inseticidas (azadiractina e 3-tigloilazadiractol), e tendo como matriz oleosa o óleo de nim ou o óleo comercial Azamax[®], ambos com teor de azadiractina enriquecido. O objetivo foi avaliar a eficácia de 19 nanoformulações no controle de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B, importante praga nas condições tropicais, por meio da ação sistêmica do ingrediente ativo liberado. Primeiramente foi estimada a CL₅₀ para ação sistêmica de soluções contendo óleo de nim em tomateiro sobre ninfas da mosca-branca. As plantas de tomateiro utilizadas nesse experimento foram congeladas e analisadas quanto ao teor de azadiractina. Posteriormente, cinco lotes de nanoformulações, os quais variaram no tipo e na quantidade dos polímeros e da matriz oleosa, foram testados quanto à ação sistêmica. Duas nanoformulações em suspensão aquosa foram selecionadas (NC L5-2 e NC L6-1) por causarem mortalidade comparável à do óleo comercial, e, juntamente com uma nanoformulação em pó (NC L5-3) foram avaliadas quanto ao seu efeito residual. Os valores estimados para a CL₅₀ foram diferentes sendo 180,67 ppm de azadiractina no primeiro e 54,75 ppm no segundo ensaio. As nanoformulações dos lotes 2, 3 e 4 causaram mortalidade acumulada inferior a 30%, mesmo quando aplicadas no dobro da concentração do segundo ensaio da CL₅₀. Os lotes 5 e 6 apresentaram mortalidades superiores, sendo o lote 6 aquele com maior eficiência ocasionando mortalidade variável de 73,43 a 91,11%. Verificou-se que a ação sistêmica de óleos e nanoformulações contendo compostos de nim depende das condições ambientais em que são aplicados; quando soluções de azadiractina e 3-tigloilazadiractol são aplicadas no solo, as maiores concentrações da primeira substância são encontradas na parte superior da planta e da segunda nas folhas inferiores; o óleo comercial Azamax[®] não afeta a oviposição e a viabilidade dos ovos da mosca-branca quando aplicado no solo no momento da infestação, as nanoformulações selecionadas são bioativas mesmo cerca de 30 dias após a aplicação, não diferindo, porém, do óleo comercial.

Palavras-chave: Nanotecnologia; Polímeros; Plantas inseticidas; Mosca-branca

ABSTRACT

Evaluation of the systemic effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) nanoformulations against *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) in tomato plants

Nanotechnology is more used as an alternative method of pest control. Therefore, nanoformulations were prepared with nanocapsules (NC) using the polymers methyl polymethacrylate (PMMA), poly-ε-caprolactone (PCL) e poly-β-hydroxybutyrate (PHB) as encapsulating agents of two insecticide molecules (azadirachtin and 3-tigloylazadirachtol). Neem oil or commercial oil Azamax[®], both with level of azadirachtin-enriched, were used as oily matrix. The objective was to evaluate the effectiveness of 19 nanoformulations against nymphs of *Bemisia tabaci* biotype B, an important pest in tropical conditions, by means of systemic action of the released active ingredient. Firstly, the LC₅₀ was estimated for a systemic action of neem oil solutions applied on tomato plants against nymphs of whitefly. The tomato plants used in this experiment were frozen and the level of azadirachtin was quantified. After that, five lots of nanoformulations, which varied in type and amount of polymers and oily matrix, were tested by means of a systemic action. Two nanoformulations in aqueous suspension were selected (NC L5-2 and NC L6-1) because they provoked both mortality and commercial oil. To these a powder nanoformulation (NC L-3) was included, and all of them were evaluated according to their residual effect. The value of LC₅₀ estimated was different in two experiments: 180.67 ppm of azadirachtin in the first one and 54.75 ppm in the second one. The lots 2, 3 and 4 of nanoformulations caused cumulative mortality in less than 30%, although, in some cases, it had been applied in concentration equal to twice the LC₅₀ of the second experiment. The lots 5 and 6 showed higher mortality, and the lot 6 presented higher efficiency causing mortality between 73.43 and 91.11%. It was observed that the systemic action of oils and nanoformulations containing compounds from neem depends on environmental conditions in which they are applied; when azadirachtin solutions are applied to the soil, the highest concentrations of this substance are found at the top of the plant and to the 3-tigloylazadirachtol, the higher concentration is in the lower leaves; the commercial oil Azamax[®] does not affect the oviposition and egg viability of whitefly when applied to the soil at the time of infestation; the selected nanoformulations are bioactive at least 30 days after their application. However, they are not different from commercial oil.

Keywords: Nanotechnology; Polymers; Insecticidal plants; Whitefly

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Principais moléculas inseticidas presentes em extratos de nim 26
- Figura 2 - Representação esquemática de nanopartículas poliméricas. A. Nanocápsula (NC) com ingrediente ativo dissolvido no núcleo oleoso e adsorvido à parede polimérica; B. Nanoesfera (NE) com ingrediente ativo retido, adsorvido ou disperso na matriz polimérica. (Adaptado de Schaffazick et al., 2003)..... 28
- Figura 3 - Planta de tomateiro com os folíolos apicais da segunda e quarta folhas com as gaiolas de infestação. A. Pote de 0,5 L; B. Primeiro par de folhas compostas; C. Folíolos infestados. 32
- Figura 4 - Corte das plantas de tomateiro para congelamento. A. Corte da parte aérea em superior e inferior; B. Parte aérea superior e inferior; C. Separação de folhas e caule; D. Raiz; E. Partes embaladas e identificadas para congelamento 42
- Figura 5 - Cromatograma XIC (*Extracted Ion Chromatogram*) de MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) para as transições selecionadas de azadiractina (Aza A) e 3-tigloilazadiractol (Aza B)..... 42
- Figura 6 - Curva concentração-resposta (log da concentração em %) para ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com diferentes concentrações de óleo de nim enriquecido via sistêmica. Mortalidades esperadas e observadas são representadas por linhas e pontos, respectivamente. 5 probits = 50% de mortalidade. 46
- Figura 7 - Curva concentração-resposta (log da concentração em %) para ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas tratadas com diferentes concentrações de óleo de nim enriquecido via sistêmica. Mortalidades esperadas e observadas são representadas por por linhas e pontas, respectivamente. 5 probits = 50% de mortalidade. 47
- Figura 8 - Mortalidade acumulada de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PCL do lote 2 aplicadas no solo em casa de vegetação. Diferença não significativa entre os tratamentos dentro de cada período. Temperatura: $22,05 \pm 1,94^{\circ}\text{C}$, UR (dados perdidos) e fotofase: 11h. 49
- Figura 9 - Mortalidade acumulada de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PCL do lote 3 aplicadas no solo em cada de vegetação. Temperatura: $17,34 \pm 0,16^{\circ}\text{C}$, UR $82,1 \pm 0,48\%$ e fotofase: 10h40min..... 51

- Figura 10 - Mortalidade acumulada de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com aplicações no solo de nanoformulações do lote 4 ao longo do período de avaliação. Temperatura: $18,92 \pm 0,18^{\circ}\text{C}$, UR: $81,1 \pm 0,52\%$ e fotofase: 11h. 53
- Figura 11 - Mortalidade acumulada de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PCL do lote 5 aplicadas no solo em casa de vegetação, em três períodos de avaliação. Temperatura: $25,18 \pm 0,29^{\circ}\text{C}$, UR: $63 \pm 0,8\%$ e fotofase: 12h30min.. 55
- Figura 12 - Mortalidade acumulada de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PHB do lote 6 aplicadas no solo em casa de vegetação, em três períodos de avaliação. Temperatura: $24,99 \pm 0,23^{\circ}\text{C}$, UR: $61,37 \pm 0,54\%$ e fotofase: 13h..... 57
- Figura 13 - Mortalidade acumulada, em três períodos de avaliação, de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PCL do lote 5 e PHB do lote 6 aplicadas no solo em casa de vegetação. Temperatura: $25,79 \pm 0,19^{\circ}\text{C}$, UR: $71,9 \pm 0,51\%$ e fotofase: 13h30min 60
- Figura 14 - Mortalidade de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B, aos 22 dias após a infestação, em plantas de tomateiro com diferentes épocas de infestação em relação ao dia da aplicação de solução com o óleo comercial Azamax[®] com teor de azadiractina enriquecido aplicada no solo em casa de vegetação. DAA (Dias Antes da Aplicação); DA (Dia da Aplicação); DDA (Dias Depois da Aplicação). Temperatura: $27,48 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$, UR: $71,06 \pm 0,35\%$ e fotofase: 13h 62
- Figura 15 - Mortalidade de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B, aos 22 dias após a infestação, em plantas de tomateiro com diferentes épocas de infestação em relação ao dia da aplicação da nanoformulação NC L5-2, com nanocápsulas de PCL, aplicada no solo em casa de vegetação. DAA (Dias Antes da Aplicação); DA (Dia da Aplicação); DDA (Dias Depois da Aplicação). Temperatura: $27,48 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$, UR: $71,06 \pm 0,35\%$ e fotofase: 13h..... 62
- Figura 16 - Mortalidade - Mortalidade de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B, aos 22 dias após a infestação, em plantas de tomateiro com diferentes épocas de infestação em relação ao dia da aplicação da nanoformulação NC L5-3, com nanocápsulas de PCL, aplicada no solo em casa de vegetação. DAA (Dias Antes da Aplicação); DA (Dia da Aplicação); DDA (Dias Depois da Aplicação). Temperatura: $27,48 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$, UR: $71,06 \pm 0,35\%$ e fotofase: 13h 63

- Figura 17 - Mortalidade de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B, aos 22 dias após a infestação, em plantas de tomateiro com diferentes épocas de infestação em relação ao dia da aplicação da nanoformulação NC L6-1, com nanocápsulas de PHB, aplicada no solo em casa de vegetação. DAA (Dias Antes da Aplicação); DA (Dia da Aplicação); DDA (Dias Depois da Aplicação). Temperatura: $27,48 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$, UR: $71,06 \pm 0,35\%$ e fotofase: 13h..... 63
- Figura 18 - Cromatograma XIC de MRM para raiz do tomateiro. Em vermelho, transição predominante de azadiractina. Em verde, transição predominante de 3-tigloilazadiractol..... 66
- Figura 19 - Cromatograma XIC de MRM para caule superior do tomateiro. Em vermelho, transição predominante de azadiractina. Em verde, transição predominante de 3-tigloilazadiractol..... 67
- Figura 20 - Cromatograma XIC de MRM para as folhas inferiores do tomateiro. Em vermelho, transição predominante de azadiractina. Em verde, transição predominante de 3-tigloilazadiractol..... 67
- Figura 21 - Cromatograma XIC de MRM para as folhas superiores do tomateiro. Em vermelho, transição predominante de azadiractina. Em verde, transição predominante de 3-tigloilazadiractol..... 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PCL do lote 2	34
Tabela 2 - Descrição das nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PCL do lote 3	36
Tabela 3 - Descrição das nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PMMA do lote 4	37
Tabela 4 - Descrição das nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PCL do lote 5	38
Tabela 5 - Descrição das nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PHB do lote 6	39
Tabela 6 - Médias $\pm$ erro padrão da mortalidade (%) de ninfas de <i>Bemisia tabaci</i> biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com diferentes concentrações de óleo de nim aplicadas no solo em casa de vegetação. Temperatura: $28,6 \pm 6,21^{\circ}\text{C}$, UR: 36% $\pm 12,68\%$ e fotofase natural: 11h40min.....	45
Tabela 7 - Valor de CL_{50} estimado, coeficiente angular e intervalo de confiança obtidos na avaliação do efeito do óleo de nim sobre <i>Bemisia tabaci</i> biótipo B	45
Tabela 8 - Médias $\pm$ erro padrão da mortalidade (%) de ninfas de <i>Bemisia tabaci</i> biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com diferentes concentrações de óleo de nim aplicadas no solo em casa de vegetação. Temperatura: $28,2 \pm 3,93^{\circ}\text{C}$ e fotofase natural: 12h.....	46
Tabela 9 - Valor de CL_{50} estimado, coeficiente angular e intervalo de confiança obtidos na avaliação do efeito do óleo de nim sobre <i>Bemisia tabaci</i> biótipo B.....	47
Tabela 10 - Médias $\pm$ erro padrão da mortalidade (%) de ninfas de <i>Bemisia tabaci</i> biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PCL do lote 2 aplicadas no solo em casa de vegetação. Temperatura: $22,05 \pm 1,94^{\circ}\text{C}$, UR (dados perdidos) e fotofase: 11h.....	48
Tabela 11 - Médias $\pm$ erro padrão da mortalidade (%) de ninfas de <i>Bemisia tabaci</i> biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PCL do lote 3 aplicadas no solo em cada de vegetação. Temperatura: $17,37 \pm 0,16^{\circ}\text{C}$, UR: $82,1 \pm 0,48\%$ e fotofase: 10h40min.....	50

- Tabela 12 - Médias $\pm$ erro padrão da mortalidade (%), em três períodos de avaliação, de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PMMA do lote 4 aplicadas no solo em casa de vegetação. Temperatura: $18,92 \pm 0,18^{\circ}\text{C}$, UR: $81,1 \pm 0,52\%$ e fotofase natural: 11h..... 52
- Tabela 13 - Médias $\pm$ erro padrão da mortalidade (%), em três períodos de avaliação, de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PCL do lote 5 aplicadas no solo em casa de vegetação. Temperatura: $25,18 \pm 0,29^{\circ}\text{C}$, UR $63 \pm 0,8\%$ e fotofase: 12h30min 54
- Tabela 14 - Médias $\pm$ erro padrão da mortalidade (%), em três períodos de avaliação, de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PHB do lote 6 aplicadas no solo em casa de vegetação. Temperatura: $24,99 \pm 0,23^{\circ}\text{C}$, UR: $61,37 \pm 0,54\%$ e fotofase: 13h..... 56
- Tabela 15 - Médias $\pm$ erro padrão do número de ovos e do número de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B eclodidas em folíolos de tomateiro, aos 22 dias após a aplicação de óleo contendo derivados de nim no solo utilizado para o cultivo de plantas de tomateiro em casa de vegetação. Temperatura: $27,45 \pm 0,18^{\circ}\text{C}$, UR: $65,45 \pm 0,47\%$ e fotofase: 13h30min..... 57
- Tabela 16 - Médias $\pm$ erro padrão da mortalidade (%), em três períodos de avaliação, de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PCL do lote 5 e PHB do lote 6 aplicadas no solo em casa de vegetação. Temperatura: $25,79 \pm 0,19^{\circ}\text{C}$, UR: $71,9 \pm 0,51\%$ e fotofase: 13h30min 59
- Tabela 17 – Média $\pm$ erro padrão da mortalidade (%) de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B, aos 22 dias após a infestação, em plantas de tomateiro com diferentes épocas de infestação em relação ao dia da aplicação de nanoformulações de derivados de nim aplicadas no solo em casa de vegetação. Temperatura: $27,48 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$, UR: $71,06 \pm 0,35\%$ e fotofase: 13h 61
- Tabela 18 - Teor de azadiractina encontrado nas diferentes partes do tomateiro tratado com solução de óleo nim a 302,4 ppm no solo..... 64

1 INTRODUÇÃO

Muitas investigações têm sido realizadas visando à obtenção de derivados vegetais passíveis de serem utilizados na proteção de cultivos e de produtos armazenados da ação de insetos-praga, sendo esta uma técnica tradicional e centenária, especialmente em regiões tropicais (BOEKE et al., 2004).

O nim, *Azadirachta indica* A. Juss, pertencente à família Meliaceae, é a planta inseticida melhor estudada e considerada a mais eficiente pelos seus efeitos contra os insetos. Entre suas substâncias inseticidas está a azadiractina, conhecida por sua eficiência na inibição alimentar de artrópodes, por prejudicar o desenvolvimento da fase imatura, reduzir a fecundidade e fertilidade dos adultos, provocar alterações comportamentais, anomalias celulares, mortalidade de larvas e adultos e ter atividade ovicida (SCHMUTTERER, 1990; MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993; BOEKE et al., 2004; MARTINEZ, 2011). No entanto, o mecanismo exato de sua ação permanece incerto (GENTZ; MURDOCH; KING, 2010).

Pelo fato de essa molécula apresentar baixa estabilidade em condições de campo devido principalmente à fotodegradação (STOKES; REDFERN, 1982), são necessárias aplicações repetidas em um curto período (SCHMUTTERER, 1990) tornando a operação mais onerosa.

Novas técnicas visando melhorar o desempenho dos produtos fitossanitários estão sendo usadas pela indústria agroquímica, utilizando os conhecimentos em nanotecnologia para encapsulamento das moléculas do ingrediente ativo. Mattoso et al. (2005) relatam algumas aplicações da nanotecnologia no setor agrícola, como melhoria da eficiência funcional de pesticidas sintetizados quimicamente, ou de natureza biológica (microorganismos com atividade contra uma praga-alvo) por diminuir problemas de fotodegradação; liberação controlada dos ingredientes ativos; e segurança no manuseio desses produtos, reduzindo riscos de toxicidade para os mamíferos.

Polímeros biodegradáveis podem ser utilizados como agentes encapsulantes. Entre eles estão poli- ϵ -caprolactona (PCL) e poli- β -hidroxibutirato (PHB), que juntamente com o polímero poli-metacrilato de metila ou polimetilmetacrilato (PMMA), foram investigados no que se refere à eficiência do material encapsulado (MARCOMINI, 2009; FERREIRA, 2011).

Entre os insetos que se busca controlar com a aplicação de extratos botânicos, inclui-se a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Genn., 1889) biótipo B, um hemíptero da família Aleyrodidae que se alimenta no floema e causa danos diretos e indiretos às plantas. Os danos diretos estão

relacionados à sucção de seiva, injeção de toxinas e liberação de uma substância açucarada ao se alimentar (*honeydew*) provocando a proliferação do fungo *Capnodium* sp. (fumagina), o que diminui a área fotossintética da planta e, conseqüentemente, sua produtividade. Os danos indiretos causados por *B. tabaci* são relacionados à transmissão de várias espécies de vírus de plantas durante a alimentação dos adultos (BYRNE et al., 1990; HILJE, 1996). Em tomateiro, muitas espécies de geminivírus são transmitidas causando geralmente clorose entre as nervuras na base do folíolo que evolui para um mosaico-amarelo, sintomas que se generalizam por toda a planta e são seguidos por intensa rugosidade dos folíolos (VILLAS-BÔAS et al., 1997).

Essa praga, de hábito alimentar polífono, tem causado grandes prejuízos socioeconômicos na América tropical atacando culturas como feijoeiro, tomateiro, cucurbitáceas e algodoeiro (BYRNE et al., 1990; HILJE, 1996). De acordo com o Anuário da Agricultura Brasileira (FNP, 2012), a produção de tomates no Brasil para o ano de 2011 foi estimada em 4.103.435 toneladas. Essa produção poderia ter sido maior caso os prejuízos devido à ação de pragas, como *B. tabaci* biótipo B, fossem sanados.

O controle de *B. tabaci* é realizado normalmente com inseticidas sintéticos, no entanto, o uso apenas dessa tática de controle pode levar a perda de sua eficácia por selecionar populações resistentes (PRABHAKER; COUDRIET; MEYERDIRK, 1985; DITTRICH et al., 1990a, 1990b; NAUEM; DENHOLM, 2005), além dos efeitos nocivos desses produtos no agroecossistema. Sendo assim, têm-se buscado métodos alternativos de controle (PRABHAKER et al, 1998; SOUZA, 2004; SOUZA; VENDRAMIM, 2005), sendo os extratos botânicos uma alternativa promissora (SOUZA; VENDRAMIM, 2000a, 2000b).

Com o emprego da nanotecnologia, é possível aumentar a eficiência do óleo de nim no controle de pragas por reduzir a rápida degradação de azadiractina, além de proporcionar uma liberação controlada do ingrediente ativo aumentando o intervalo entre as aplicações.

Nesse contexto, objetivou-se avaliar o efeito da ação sistêmica do ingrediente ativo liberado por nanoformulações à base de derivados de nim sobre *B. tabaci* biótipo B, bem como seu poder residual, utilizando os polímeros poli-metacrilato de metila (PMMA), poli- ϵ -caprolactona (PCL) e poli- β -hidroxibutirato (PHB) como agentes encapsulantes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos taxonômicos e distribuição geográfica de *Bemisia tabaci*

As moscas-brancas são insetos pertencentes à ordem Hemiptera, Subordem Sternorrhyncha e família Aleyrodidae. A família se divide em Aleurodicinae e Aleyrodinae, a qual *B. tabaci* pertence. Cerca de 1.200 espécies foram descritas, embora o número real provavelmente seja bem maior. O número de espécies que ocorrem nos trópicos é maior do que aquele encontrado nas regiões temperadas, mostrando que sua distribuição está relacionada com a latitude (BINK-MOENEN; MOUND, 1990; HILJE, 1996).

De acordo com Brown, Frohlicw e Rosell (1995), a espécie proposta por Bellows e Perring (1994), *B. argentifoli* (o biótipo B) e *B. tabaci* (o biótipo A) podem representar um complexo de espécies em constante mudança evolutiva, sendo encontrados outros biótipos relacionados a hospedeiros ou pressão de seleção causada por inseticidas.

A ampla distribuição desse inseto está relacionada à sua associação com os cultivos e o transporte de material vegetal em escala mundial. O transporte inadvertido de plantas ornamentais infestadas por *B. tabaci* biótipo B iniciado nos anos 1985-1986 é considerado a causa do estabelecimento dessa praga na Europa, Costa do Mediterrâneo, África, Ásia e todo Novo Mundo. O biótipo B apresenta algumas características que o diferencia do biótipo A, como maior fecundidade, maior número de hospedeiros, resistência a vários inseticidas e capacidade de induzir anomalias fisiológicas às plantas, tais como o prateamento foliar em cucurbitáceas e o amadurecimento irregular de frutos do tomateiro (BROWN; FROHLICW; ROSELL, 1995).

Lourenção e Nagai (1994) constataram que o biótipo B de *B. tabaci* foi introduzido no Brasil por volta de 1991. Os autores observaram a partir daquele ano elevadas densidades populacionais desse biótipo em algumas cidades paulistas, fato evidenciado pelos sintomas característicos causados por essa praga como o prateamento da face superior das folhas em conjunto com a queda drástica da produção, em aboboreira, além de amadurecimento irregular dos frutos de tomateiro causado pela injeção de toxinas durante a alimentação. Além de esses frutos tornarem-se internamente esbranquiçados e com aspecto esponjoso, o fato de crescerem desuniformes dificulta reconhecer o ponto de colheita e reduz a produção (VILLAS-BÔAS et al., 1997).

A pressão de seleção sobre *B. tabaci* devido à aplicação de inseticidas propiciou o surgimento de um biótipo resistente a neonicotinoides na região do Mediterrâneo/Norte da

África: o biótipo Q, o qual já foi encontrado na China (CHU et al., 2006). A inspeção das plantas ornamentais a serem exportadas é de extrema importância para que não ocorra uma distribuição geográfica maior como ocorreu com o biótipo B.

2.2 Aspectos bioecológicos de *B. tabaci* biótipo B

A maior parte das espécies de moscas-brancas pode se reproduzir por partenogênese arrenótoca (somente descendentes machos), mas quando ocorre a cópula ocorrem fêmeas e machos (BYRNE; BELLOWS, 1991). Eichelkraut e Cardona (1989) observaram que as fêmeas possuíam maior longevidade, mas era mantida a relação sexual de 1:1.

Segundo Fancelli et al. (2003), as fêmeas de *B. tabaci* biótipo B têm preferência em ovipositar na face abaxial de folhas jovens. Após a eclosão, as ninfas são móveis, fixando-se posteriormente num local adequado para a tomada de alimento, onde permanecem até o final do estágio ninfal (ORTEGA ARENAS, 2001). No final do quarto ínstar, a ninfa cessa a alimentação e aparentemente sofre mudanças morfológicas para se transformar em “pupa”. O adulto torna-se visível pelo tegumento da “pupa” quando está próximo da emergência (EICHELKRAUT; CARDONA, 1989).

A duração do ciclo de vida de *B. tabaci* varia de acordo com a planta hospedeira e a temperatura (VILLAS-BÔAS et al., 1997). Albergaria e Cividanes (2002) encontraram variação para o período de incubação de 22,4 dias (a 15°C) a 5,1 dias (a 30°C) em plantas de soja (cultivar Msoy 800). Nava-Camberos, Riley e Harris (2001) observaram que, para a cultivar de algodão Deltapine 50, o período total de desenvolvimento dos estádios imaturos variou de 38 dias a 20°C para 16 dias a 30°C. Já para a cultivar Tum Sun de melão, o autor constatou que o desenvolvimento ovo-adulto variou de 36 dias a 20°C para 15 dias a 30°C. Takahashi, Berti Filho e Lourenção (2008) registraram, a 25°C, 21,2 dias para o desenvolvimento desse período de *B. tabaci* biótipo B em soja (cultivar IAC 15), enquanto em plantas de tomate (cultivar Santa Clara) o referido período foi de 22 dias, diferindo estatisticamente.

Torres et al. (2007) encontraram diferença significativa na sobrevivência do período ovo-adulto a 27°C em cultivares de algodão, visto que para a cultivar BRS Ipê a sobrevivência foi de 33% e para as demais cultivares (BRS 186-Precoco 3, BRS Acala, BRS Verde, BRS 200-Marrom, BRS Cedro, BRS Ita 90-2 e BRS Aroeira) a sobrevivência variou de 60% a 78,3%, não diferindo entre si. Assim, os autores demonstraram que a sobrevivência

do período ovo-adulto é influenciada pela planta hospedeira, que pode apresentar maior ou menor resistência à praga.

Albergaria e Cividanes (2002) verificaram que a emergência dos adultos ocorre após 21,8 dias a 30°C e 40,4 dias a 20°C e delimitaram que o limite térmico superior de *B. tabaci* biótipo B deve estar situado na faixa de temperatura que se inicia pouco acima de 30°C até 35°C.

2.3 Considerações gerais sobre derivados botânicos no controle de insetos

A aplicação de extrato vegetal para proteção das culturas contra insetos é tradicional e centenária, especialmente em regiões tropicais (BOEKE et al., 2004).

Os primeiros inseticidas botânicos comercializados incluem as piretrinas derivadas de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Asteraceae); rotenona, derivada de *Derris* spp. e *Lonchocarpus* spp. (Fabaceae); nicotina extraída de *Nicotiana tabacum* (Solanaceae); rianodina extraída de *Ryania speciosa* (Flacuortiaceae) e sabadina derivada de *Schoenocaulon officinale* (Melanthiaceae) (LAGUNES; RODRÍGUEZ, 1989), porém deixaram de ser utilizados devido ao surgimento dos inseticidas organoclorados por serem mais eficientes e baratos (VENDRAMIM, 1997).

A retomada dos estudos com inseticidas botânicos deveu-se à necessidade de novos compostos passíveis do uso no manejo integrado de pragas e cujos efeitos nocivos ao agroecossistema fossem reduzidos (VENDRAMIM, 1997). A utilização de substâncias extraídas de plantas com propriedades inseticidas apresenta, por vezes, vantagens em relação aos produtos sintéticos por aquelas serem renováveis, degradarem-se com maior velocidade (sem contaminação do meio ambiente e com reduzido impacto sobre organismos não-alvo), ter ação rápida, raramente levar ao desenvolvimento de resistência dos insetos, não deixar resíduos nos alimentos, apresentar baixa toxicidade a mamíferos e às plantas nas quais são aplicadas, serem seguros aos operadores e apresentar baixo custo, tornando-se economicamente viáveis para pequenos produtores (WIESBROOK, 2004; OLIVEIRA et al., 2007).

Há diversas formas nas quais as plantas inseticidas podem ser utilizadas, sendo as mais comuns o pó seco, os óleos essenciais e os extratos aquosos e não aquosos (orgânicos).

Alguns efeitos de extratos de plantas inseticidas constatados sobre insetos são inibição da alimentação ou fagodeterrência, redução do consumo alimentar, atraso no desenvolvimento, deformações, esterilidade e mortalidade (COSTA; SILVA; FIUZA, 2004).

Apesar do uso do termo “planta inseticida”, a mortalidade nem sempre é observada, sendo apenas um dos efeitos do uso de extratos vegetais, cuja principal finalidade é reduzir o crescimento da população de pragas (GALLO et al., 2002).

2.4 Ação de extratos de nim sobre insetos com ênfase para *B. tabaci* biótipo B

Já foram testados muitos extratos de plantas a fim de controlar *B. tabaci* biótipo B, sendo observados efeitos como deterrência para oviposição e alimentação e mortalidade nas diversas fases do ciclo biológico dessa praga, sendo o efeito ovicida observado apenas com extratos da família Meliaceae (SOUZA; VENDRAMIM, 2000a; SOUZA, 2004; BEZERRA-SILVA et al., 2010). O nim, *Azadirachta indica*, tem se mostrado uma das plantas mais eficazes entre as espécies testadas (SCHUMUTTERER, 1990; SOUZA, 2004).

É possível extrair compostos bioativos de todas as estruturas da planta de nim, mas a maior concentração é encontrada nas sementes (THOEMING; DRAEGER; POEHLING, 2006). Entre os compostos presentes em extratos obtidos de estruturas de nim, a azadiractina e o 3-tigloilazadiractol são aqueles que possuem maior bioatividade e que aparecem em maior quantidade (THOEMING; DRAEGER; POEHLING, 2006; MORGAN, 2009) (Figura 1). Além desses compostos, extratos de nim contêm muitos outros compostos triterpenoides que também têm mostrado ou suspeita-se que tenham atividade inseticida, sendo constatada a bioatividade de extratos de sementes de nim sobre mais de 500 espécies de insetos pragas (SCHMUTTERER, 1990; THOEMING; DRAEGER; POEHLING, 2006; MORGAN, 2009).

Figura 1 - Principais moléculas inseticidas presentes em extratos de nim

Butterworth e Morgan (1968) isolaram o triterpenoide azadiractina de sementes de nim, o que permitiu verificar os efeitos dessa molécula não tóxica a vertebrados sobre os

insetos como: fagodeterrência, repelência, regulação de crescimento, promoção de esterilidade, deterrência de oviposição e redução do *fitness* (SCHMUTTERER, 1990). Agindo como inibidora de alimentação, essa molécula pode atuar sobre os quimiorreceptores estimulando as “células deterrentes específicas” ou bloqueando os fagoestimulantes (MORDUE (LUNTZ); NISBET, 2000). A fagodeterrência pode causar atraso no desenvolvimento ou deformações (COSTA; SILVA; FIUZA, 2004).

As fases dos insetos mais sensíveis aos formulados de nim são a larval ou ninfal, pois são as fases em que a alimentação do inseto-alvo é mais ativa (SCHMUTTERER, 1988; SOUZA, 2004). Além dessas fases, o período da metamorfose também é fortemente afetado, porque as formulações resultam em vários defeitos morfogénéticos bem como na mortalidade (SCHMUTTERER, 1990).

Souza e Vendramim (2005) demonstraram que os modos de ação de extratos aquosos de sementes de nim sobre ninfas de *B. tabaci* biótipo B são sistêmico, translaminar e de contato, sendo este último mais pronunciado. De acordo com esses autores, a aplicação do nim na água de irrigação possivelmente aumenta a persistência do produto quando comparada à aplicação na face adaxial das folhas devido à fotossensibilidade das substâncias inseticidas.

2.5 Utilização da nanotecnologia no controle de pragas

Como outros inseticidas botânicos, o nim apresenta limitações para seu uso no campo pela sua rápida degradação devido aos fatores ambientais como temperatura, luz ultravioleta, pH, precipitação entre outros, que influenciam na degradação dos princípios ativos (ex. azadiractina), promovendo um período residual de apenas 4 a 8 dias (SCHMUTTERER, 1988, 1990).

As duas maiores abordagens para evitar essa rápida degradação no campo são por meio da adição de um antioxidante a uma solução de nim (RIYAJAN; SAKDAPIPANICH, 2009) e do uso de sistemas de proteção e liberação controlada das moléculas com nanopartículas, assim prolongando e melhorando o controle das pragas (SCHAFFAZICK et al., 2003; SANTOS; FIALHO, 2007; AZEVEDO, 2008; RIYAJAN; SAKDAPIPANICH, 2009).

As nanopartículas são sistemas carreadores com diâmetro inferior a 1 µm e referem-se a dois tipos de estruturas: as nanoesferas, que são sistemas em que a molécula de interesse (ingrediente ativo) encontra-se homogeneamente dispersa ou adsorvida no interior da matriz polimérica; e as nanocápsulas, que correspondem a um sistema do tipo reservatório, onde há

um núcleo diferenciado envolto por uma membrana polimérica. O ingrediente ativo pode estar dissolvido no material oleoso ou líquido que forma o núcleo ou estar adsorvido à membrana polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003; ABDELWAHED; DEGOBERT; FESSI, 2006; AZEVEDO, 2008) (Figura 2).

Figura 2 - Representação esquemática de nanopartículas poliméricas. A. Nanocápsula (NC) com ingrediente ativo dissolvido no núcleo oleoso e adsorvido à parede polimérica; B. Nanoesfera (NE) com ingrediente ativo retido, adsorvido ou disperso na matriz polimérica. (Adaptado de Schaffazick et al., 2003)

A preparação de nanopartículas poliméricas pode ser feita por meio de vários métodos. Esses métodos podem ser classificados, de uma forma geral, em duas categorias: aquela onde há necessidade de uma reação de polimerização (polimerização *in situ*) e outra onde os métodos são baseados na precipitação de um polímero pré-formado (SCHAFFAZICK et al., 2003). Nessa última categoria destaca-se o procedimento baseado na deposição interfacial de polímeros pré-formados, bem definidos e biodegradáveis, seguida de evaporação do solvente semipolar miscível em água. Essa técnica permite que a formação das nanocápsulas seja instantânea e reproduzível (FESSI et al., 1989).

Polímeros biodegradáveis são largamente utilizados na preparação de nanopartículas por promoverem a preservação ambiental. Um exemplo é o polímero sintético poli- ϵ -caprolactona (PCL), que tem despertado o interesse de muitos pesquisadores, e que de acordo com Fessi et al. (1989), pode ser utilizado para encapsular substâncias. Trata-se de um poliéster alifático obtido pela polimerização de ϵ -caprolactona na presença de isopropóxido de alumínio, investigado particularmente no contexto de sistemas de liberação de drogas (CHIELLINI; SOLARO, 1996), mas também utilizado na construção civil (ALMEIDA; FERREIRA, 2006).

O polímero poli- β -hidroxibutirato (PHB) também tem sido muito utilizado. Esse polímero é produzido pela bactéria *Cupriavidus necator*, que transforma os açúcares dos quais se alimenta em grânulos intracelulares, que são os poliésteres. Esse polímero é utilizado tanto

na indústria de embalagens e na área médica, quanto na agricultura (ROSA; PENTEADO; CALIL, 2000).

Outro polímero também de grande interesse é o poli-metacrilato de metila ou polimetilmetacrilato (PMMA), o qual é obtido a partir da polimerização do metacrilato de metila na presença de um catalisador de peróxido. Também conhecido como acrílico, é um material termoplástico rígido e transparente considerado de alta qualidade comercial devido a propriedades como facilidade em adquirir formas, leveza e alta resistência, além de sua reciclagem ser viável. Serve como matéria-prima para resinas de revestimento de superfície, plásticos, resinas de troca iônica, prótese dentária, além de ser utilizado em substituição do vidro em muitos casos (ANTÔNIO, 2007). Os três polímeros citados foram utilizados na preparação de nanoformulações contendo moléculas inseticidas e testados sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (MARCOMINI, 2009) e *Tuta absoluta* (Meyrick) (FERREIRA, 2011), manifestando bioatividade em alguns casos.

A degradação das nanopartículas depende de fatores como morfologia e estrutura dos polímeros, radiação, tratamentos químicos e peso molecular. Agentes biológicos como bactérias, fungos e suas enzimas presentes no ambiente onde os polímeros se encontram, são importantes biodegradadores, pois consomem as substâncias poliméricas como uma fonte alimentar de maneira que sua forma original desaparece. Em condições adequadas de umidade, temperatura e disponibilidade de oxigênio, a biodegradação é um processo relativamente rápido (CHANDRA; RUSTGI, 1998).

A síntese e a montagem de nanopartículas podem beneficiar o desenvolvimento de práticas limpas, não tóxicas e ambientalmente aceitáveis da "química verde", provavelmente envolvendo organismos desde bactérias, fungos ou até mesmo vegetais (SASTRY et al., 2004 apud MOHANPURIA et al., 2008; BHATTACHARYA; RAJINDER, 2005). Como exemplo disso, a multinacional Syngenta produz o inseticida lambdacialotrina (Karate Zeon®), com suas moléculas do ingrediente ativo envoltas por um polímero, permitindo forte aderência às folhas da cultura, evitando perdas de lavagem do produto pela chuva, promovendo proteção contra luz ultravioleta e maior atividade residual (SYNGENTA, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os bioensaios foram conduzidos em casa de vegetação com manta termorrefletora de aluminete, no Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP, em Piracicaba/SP.

A produção das nanoformulações e a quantificação de azadiractina em tomateiro foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, em São Carlos/ SP.

3.1 Criação de manutenção de *B. tabaci* biótipo B

A população inicial de mosca-branca, identificada pela Dra. Judith K. Brown, Universidade do Arizona, EUA, como *B. tabaci* biótipo B foi obtida do Setor de Entomologia do Centro de Fitossanidade do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Uma nova identificação dos insetos foi realizada pelo Prof. Aurino Florêncio de Lima, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica/RJ, onde se constatou não ter havido mistura de espécies na criação.

A criação foi mantida em casa de vegetação com aproximadamente 2,5 m² com armação de ferro e tela antiafídeo (0,2 x 0,2 mm). O inseto foi criado concomitantemente em plantas de soja cv. CD-215, tomateiro cv. Santa Clara e couve cv. Manteiga, que eram substituídas periodicamente.

3.2 Obtenção de plantas de tomateiro para os ensaios

Em casa de vegetação, a semeadura foi realizada em bandejas de isopor com 200 células contendo substrato para hortaliças onde foram alojadas as sementes de tomateiro cv. Santa Clara.

Em torno de 15 a 20 dias após a semeadura, as mudas eram transplantadas para potes plásticos com 0,5 L de capacidade contendo substrato para hortaliças, vermiculita e terra de barranco na proporção de 3:2:1 em volume, aos quais foram adicionados 2% de NPK (4:14:8) e 4% de calcário calcítico. Os pesos fresco e seco do solo em cada pote foram de aproximadamente 274 e 239 g, respectivamente.

3.3 Estimativa da CL_{50} para o óleo de nim

As plantas de tomateiro utilizadas nestes e nos demais ensaios apresentavam quatro folhas com o folíolo apical totalmente distendido, não considerando o primeiro par de folhas compostas, no momento da infestação. Para tal, foi utilizada uma gaiola cilíndrica (15 cm de comprimento e 6 cm de diâmetro) confeccionada com tecido de *voile*, que envolveu um folíolo apical para evitar a fuga dos insetos. Essas gaiolas apresentam aberturas na parte superior e inferior que são fechadas por um barbante. Foram mantidas duas gaiolas por planta, uma na segunda e outra na quarta folha, sendo que em cada uma foram liberados cerca de 30 adultos de mosca-branca durante 24 h para oviposição (Figura 3). Após a eclosão e a fixação das ninfas de primeiro ínstar, o número destas foi contado na face abaxial dos folíolos com auxílio de microscópio estereoscópico e a aplicação dos tratamentos realizada.

Figura 3 - Planta de tomateiro com os folíolos apicais da segunda e quarta folhas com as gaiolas de infestação. **A.** Pote de 0,5 L; **B.** Primeiro par de folhas compostas; **C.** Folíolos infestados

No primeiro ensaio para estimativa da CL_{50} , os tratamentos constaram de quatro concentrações de óleo de nim com teor de azadiractina enriquecido, ao qual foram adicionados os tensoativos Renex[®] e Extravon[®] 0,2% na proporção de 5% cada. Como tratamento controle foi usada a água deionizada. Ensaio preliminares mostraram que os tensoativos, quando aplicados no solo, não afetam a sobrevivência das ninfas. As

concentrações utilizadas corresponderam aos seguintes teores de azadiractina: 37,8 ppm; 75,6 ppm; 151,2 ppm e 302,4 ppm em soluções de 100 ml.

Foram aplicados 20 ml de solução (tratamento) sobre solo seco, na base de cada planta. A mortalidade foi avaliada após sete dias com auxílio de microscópio estereoscópico, período no qual as plantas foram irrigadas com 30 ml de água quando apresentavam sinais de murcha. As ninfas foram consideradas mortas quando apresentavam tamanho pequeno (cerca de 0,25 x 0,15 mm) e formato elíptico semelhante ao de ninfas de primeiro ínstar conforme descrito por Eichelkraut e Cardona (1989) e Patel et al. (1992), e/ou quando se apresentavam ressecadas. A soma das ninfas nos dois folíolos infestados foi considerada uma repetição.

O ensaio, contendo cinco repetições por tratamento, ficou sujeito à temperatura de $27,8 \pm 5,18^{\circ}\text{C}$, UR de $44,5 \pm 11,47\%$ e fotofase de 11h40min.

Um segundo ensaio, seguindo a mesma metodologia, foi realizado para confirmação dos resultados obtidos (temperatura de $28,2 \pm 3,93^{\circ}\text{C}$, UR (dados perdidos) e fotofase de 12h).

3.4 Seleção das nanoformulações mais promissoras

Nanoformulações preparadas por meio do processo de emulsão-difusão de Moinard-Chécot et al. (2008) modificado, contendo dois derivados de nim, a azadiractina e o 3-tigloilazadiractol, foram testadas quanto a sua eficácia no controle da mosca-branca por meio da ação sistêmica do ingrediente ativo liberado.

A infestação das plantas foi realizada como descrito no item anterior. Após a emergência e a fixação das ninfas de primeiro ínstar, o número destas foi contado na face abaxial dos folíolos com auxílio de microscópio estereoscópico e a aplicação dos tratamentos realizada. A soma das ninfas nos dois folíolos infestados foi considerada uma repetição.

As soluções foram preparadas tendo como base a CL_{50} estimada. Foram aplicados 20 ml de solução do tratamento sobre solo seco, na base de cada planta. Os tratamentos controles constaram de: água deionizada; óleo, o mesmo utilizado na matriz oleosa da nanoformulação; e os brancos das nanoformulações, solução contendo, entre outros componentes, o polímero utilizado na nanoformulação, porém sem o óleo.

A eficiência de encapsulamento não foi analisada para todas as nanoformulações, uma vez que, devido à falta de equipamentos com poros menores que 200 nm, houve dificuldade de se estimar tal dado para nanocápsulas com diâmetro menor que esse valor.

3.4.1 Efeito das nanoformulações NC L2

Neste ensaio foram testadas nanocápsulas (NC) do lote 2 (L2) produzidas com o polímero PCL (poli- ϵ -caprolactona) 65000 (Tabela 1).

Tabela 1 - Descrição das nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PCL do lote 2

Nanoformulação	Composição	pH	Diâmetro de partículas	Teor de azadiractina	Potencial zeta	Efic. enc.
NC L2-1	PCL 65000 (1,0 g) Extrato L-23 (2,0 g) Extrato MeOH (2,0 g) Óleo Azamax (4,0 g) Tween 80 (0,8 g)	4,05	206,6 nm	312 mg/L	-16,12 mV	10,0%
NC L2-2	PCL 65000 (1,0 g) Extrato L-23 (3,0 g) Extrato MeOH (3,8 g) Óleo Azamax (2,0 g) Tween 80 (0,8 g)	4,59	14,96 nm	333 mg/L	-10,64 mV	-
NC L2-3	PCL 65000 (1,0 g) Extrato L-23 (3,0 g) Extrato MeOH (4,1g) Óleo OR-1 (4,0 g) Tween 80 (0,8 g)	4,51	265,1 nm	264 mg/L	-22,84 mV	9,1%
NC L2-4	PCL 65000 (0,5 g) Óleo 3,0 g Extrato MeOH (5,0 g) Óleo OR-1 (4,0 g) Tween 80 (0,8 g)	4,02	47,30 nm	225 mg/L	-4,18 mV	-
NC L2-5	PCL 65000 (0,5 g) Óleo 3,0g Extrato MeOH (2,7g) Óleo Azamax (4,0 g) Tween 80 (0,8 g)	4,05	256,9 nm	384 mg/L	-3,77 mV	48,0%
Branco	PCL 65000 Oleato de isodecila Água Mili-Q Tween 80	-	-	-	-	-

NC = nanocápsula. PCL = Poli- ϵ -caprolactona. L-23 = extrato de sementes de nim. Efic. enc. = Eficiência de encapsulamento

As matrizes oleosas das nanocápsulas constaram de óleo de nim enriquecido ou o óleo comercial Azamax[®] (contendo azadiractina e 3-tigloilazadiractol em óleo de gergelim)

enriquecido. Foi utilizada a CL_{50} estimada no segundo ensaio como base para preparação das soluções. O branco das nanoformulações foi utilizado no mesmo volume que a nanoformulação com menor teor de azadiractina (NC L2-4).

A mortalidade das ninfas foi avaliada após 5, 10 e 13 dias da aplicação, período no qual as plantas foram irrigadas com 30 ml de água por dia. As ninfas mortas foram retiradas dos folíolos com alfinete entomológico a cada avaliação.

Foram feitas quatro repetições dos tratamentos água, branco das nanoformulações e Azamax[®], e cinco repetições dos demais tratamentos (nanoformulações e óleo de nim+tensoativos) (temperatura de $22,05 \pm 1,94^{\circ}\text{C}$, UR (dados perdidos) e fotofase de 11h).

3.4.2 Efeito das nanoformulações NC L3

Novamente o polímero PCL 65000 foi utilizado na preparação das nanocápsulas (lote 3) tendo óleo de nim ou Azamax[®] com teor de azadiractina enriquecido como matriz oleosa, com variação na quantidade de polímero e dos óleos nas formulações (Tabela 2). Tanto o óleo de nim quanto o Azamax[®] foram utilizados como controle positivo.

A CL_{50} estimada no segundo ensaio foi utilizada como base para o preparo das soluções. As nanoformulações NC L3-1 e NC L3-3 também foram aplicadas numa concentração equivalente ao dobro da CL_{50} . O branco das nanoformulações foi utilizado no mesmo volume que a nanoformulação com menor teor de azadiractina (NC L3-1).

A mortalidade das ninfas foi avaliada na face abaxial dos folíolos após 5, 9 e 15 dias da aplicação dos tratamentos, período no qual as plantas foram irrigadas com 30 ml de água por dia. As ninfas mortas foram retiradas dos folíolos com alfinete entomológico a cada avaliação. Foram feitas cinco repetições por tratamento mantidas à temperatura de $17,37 \pm 0,16^{\circ}\text{C}$, UR de $82,1 \pm 0,48\%$ e fotofase de 10h40min.

Tabela 2 - Descrição das nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PCL do lote 3

Nanoformulação	Composição	pH	Diâmetro de partículas	Teor de azadiractina	Potencial zeta	Efic. enc.
NC L3-1	PCL 65000 (0,8 g) Extrato L-23 (2,07 g) Extrato MeOH (2,39 g) Óleo Azamax [®] (4,0 g) Tween 80 (0,813 g)	4,72	381,0 nm	254 mg/L	-7,44 mV	47%
NC L3-2	PCL 65000 (0,8 g) Extrato L-23 (4,04 g) Extrato MeOH (4,16 g) Óleo OR-1 (4,0 g) Tween 80 (0,87 g)	4,66	83,10 nm	124 mg/L	-12,07 mV	-
NC L3-3	PCL 65000 (0,3 g) Extrato L-23 (3,0 g) Extrato MeOH (2,12 g) Óleo Azamax [®] (4,0 g) Tween 80 (0,88 g)	4,4	394,0 nm	236 mg/L	-4,63 mV	46%
NC L3-4	PCL 65000 (0,3 g) Óleo 4,0 g Extrato MeOH (4,16 g) Óleo OR-1 (4,0 g) Tween 80 (0,83 g)	4,68	314,0 nm	123 mg/L	-11,71 mV	38%
Branco	PCL 65000 Oleato de isodecila Água Mili-Q Tween 80	-	-	-	-	-

NC = nanocápsula. PCL = Poli-ε-caprolactona. L-23 = extrato de sementes de nim. Efic. enc. = Eficiência de encapsulamento

3.4.3 Efeito das nanoformulações NC L4

Neste ensaio foram testadas nanocápsulas do lote 4 produzidas com o polímero PMMA (poli-metacrilato de metila ou polimetil-metacrilato), tendo o óleo comercial Azamax[®] enriquecido em azadiractina como matriz oleosa (Tabela 3). As soluções com as nanoformulações e o controle positivo foram preparadas tendo como base o dobro da CL₅₀ estimada no segundo ensaio. O óleo Azamax[®] foi aplicado também na concentração equivalente à CL₅₀. O volume dos brancos utilizado foi o mesmo da respectiva nanoformulação.

A mortalidade das ninfas na face abaxial dos folíolos foi avaliada após 5, 10 e 15 dias da aplicação dos tratamentos, período no qual as plantas foram irrigadas com 30 ml de água

por dia. As ninfas mortas foram retiradas dos folíolos com alfinete entomológico a cada avaliação. Cada tratamento teve cinco repetições mantidas à temperatura de $18,92 \pm 0,18^\circ\text{C}$, UR de $81,1 \pm 0,52\%$ e fotofase de 11h.

Tabela 3 - Descrição das nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PMMA do lote 4

Nanoformulação	Composição	pH	Diâmetro de partículas	Teor de azadiractina	Potencial zeta	Efic. enc.
NC L4-1	PMMA (0,246 g) Extrato L-23 (3,106 g) Extrato MeOH (2,51 g) Óleo Azamax® (4,01 g) Tween 80 (0,817 g)	4,27	281 ηm	277,0 mg/Kg	8,84 mV	40,0%
NC L4-2	PMMA (0,50g) Extrato L-23 (3,01 g) Extrato MeOH (2,5 g) Óleo Azamax® (4,02 g) Tween 80 (0,84 g)	4,29	173,8 ηm	302,0 mg/Kg	-7,68 mV	47,0%
NC L4-3	PMMA (0,75g) Extrato L-23 (3,02 g) Extrato MeOH (2,12 g) Óleo Azamax® (4,0 g) Tween 80 (0,863 g)	4,37	40,30 ηm	303,0 mg/Kg	9,69 mV	46,0%
NC L4-4	PMMA (1,01 g) Extrato L-23 (3,02 g) Extrato MeOH (2,54 g) Óleo Azamax® (4,04 g) Tween 80 (0,813 g)	4,35	142,8 ηm	283,0 mg/Kg	-12,08 mV	43,0%
Branco NC L4-1	PMMA (0,246 g) Oleato de isodecila Água Mili-Q Tween 80	-	-	-	-	-
Branco NC L4-2	PMMA (0,50 g) Oleato de isodecila Água Mili-Q Tween 80	-	-	-	-	-
Branco NC L4-3	PMMA (0,75 g) Oleato de isodecila Água Mili-Q Tween 80	-	-	-	-	-
Branco NC L4-4	PMMA (1,01g) Oleato de isodecila Água Mili-Q Tween 80	-	-	-	-	-

NC = nanocápsula. PMMA = poli-metacrilato de metila. L-23 = extrato de sementes de nim. Efic. enc. = Eficiência de encapsulamento

3.4.4 Efeito das nanoformulações NC L5

Devido à baixa mortalidade ocorrida nos ensaios com as nanoformulações anteriores, mesmo quando utilizado o dobro da CL_{50} estimada no ensaio 2, decidiu-se utilizar a CL_{50} do ensaio 1 nos ensaios subsequentes.

As nanoformulações testadas neste lote constaram de nanocápsulas formadas com o polímero PCL 60000, sendo que o óleo comercial Azamax[®] com o teor de azadiractina enriquecido foi utilizado como matriz oleosa (Tabela 4).

Tabela 4 - Descrição das nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PCL do lote 5

Nanoformulação	Composição	pH	Diâmetro de partículas	Teor de azadiractina	Potencial zeta	Efic. enc.
NC L5-1	PCL 60000 (0,8 g) Extrato EtOH (2,0 g) Óleo Azamax (8,0 g) Tween 80 (0,8 g)	-	-	633 mg/Kg	-	98,8%
NC L5-2	PCL 60000 (0,8 g) Extrato L-23 (4,04 g) Extrato MeOH (4,16 g) Óleo OR-1 (4,0 g) Tween 80 (0,87 g)	3,4	208 η m	453,2 mg/Kg	-7,16 mV	85,4%
Branco	PCL 60000 Oleato de isodecila Água Mili-Q Tween 80	-	-	-	-	-

NC = nanocápsula. PCL = Poli- ϵ -caprolactona. L-23 = extrato de semente de nim. Efic. enc. = Eficiência de encapsulamento

As soluções foram preparadas na concentração equivalente à CL_{50} do primeiro ensaio. O volume do branco das nanoformulações foi o mesmo da nanoformulação com menor teor de azadiractina (NC L5-1).

A mortalidade das ninfas foi avaliada após 5, 10 e 15 dias da aplicação dos tratamentos, período no qual as plantas foram irrigadas com 30 ml de água sempre que apresentavam sinais de murcha. As ninfas mortas foram retiradas do folíolo com alfinete entomológico a cada avaliação. Cada tratamento teve cinco repetições mantidas à temperatura de $25,18 \pm 0,29^\circ\text{C}$, UR de $63 \pm 0,8\%$ e fotofase de 12h30min.

3.4.5 Efeito das nanoformulações NC L6

Nanoformulações do lote 6, tendo como cápsula o polímero poli- β -hidroxibutirato (PHB) e matriz oleosa o óleo comercial Azamax[®] com o teor de azadiractina enriquecido, foram testadas nesse ensaio (Tabela 5).

O volume do branco das nanoformulações utilizado foi o mesmo da nanoformulação com maior teor de azadiractina (NC L6-2), em razão da pouca disponibilidade de material. As soluções foram preparadas na concentração equivalente à CL₅₀ do primeiro ensaio.

Tabela 5 - Descrição das nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PHB do lote 6

Nanoformulação	Composição	pH	Diâmetro de partículas	Teor de azadiractina	Potencial zeta	Efic. enc.
NC L6-1	PHB (1,0 g) Extrato MeOH (4,3 g) Óleo Azamax (6,0 g) Tween 80 (0,8 g) SPAN 60 (0,6 g)	4,8	137 nm	753 mg/Kg	2,51 mV	99,0%
NC L6-2	PHB (0,75 g) Extrato MeOH (2,0 g) Óleo Azamax (4,0 g) Tween 80 (0,8 g)	-	-	300 mg/Kg	-	97,5%
NC L6-3	PHB (0,5 g) Extrato MeOH (2,0 g) Óleo Azamax (4,0 g) Tween 80 (0,8 g)	-	109 nm	230 mg/Kg	12,69mV	96,8%
NC L6-4	PHB (0,25 g) Extrato MeOH (2,0 g) Óleo Azamax (4,0 g) Tween 80 (0,8 g)	-	99,5 nm	268 mg/Kg	5,03 mV	97,2%
Branco	PHB Oleato de isodecila Água Mili-Q Tween 80	-	-	-	-	-

NC = nanocápsula. PHB = poli- β -hidroxibutirato. Efic. enc. = Eficiência de encapsulamento

A época e a técnica de avaliação da mortalidade das ninfas, bem como a irrigação das plantas, foram feitas conforme descrito no item 3.4.4. Devido ao baixo teor de azadiractina nas nanoformulações, foram feitas quatro repetições por tratamento mantidas à temperatura de $24,99 \pm 0,23^{\circ}\text{C}$, UR de $61,37 \pm 0,54\%$ e fotofase de 13h.

3.5 Influência da aplicação sistêmica de óleo com derivados de nim na oviposição, viabilidade de ovos e mortalidade ninfal de *B. tabaci* biótipo B

Uma solução com óleo comercial Azamax[®] com o teor de azadiractina enriquecido foi preparada na concentração da CL₅₀ do primeiro ensaio. O ensaio constou de 10 repetições por tratamento, onde foram aplicados 20 ml da solução na base de cada planta com solo seco. As plantas dos dois tratamentos, água deionizada e solução com óleo, ficaram separadas para a infestação a fim de evitar que voláteis do óleo interferissem na oviposição no tratamento água.

Logo após a aplicação dos tratamentos, a infestação das plantas foi realizada liberando-se 30 adultos de mosca-branca nas gaiolas previamente acopladas ao folíolo apical da terceira folha composta (excluindo o par inicial) de cada planta. Após 24 h, as gaiolas, bem como os adultos, foram retirados e as plantas distribuídas aleatoriamente. O número de ovos depositados tanto na face adaxial quanto abaxial dos folíolos foi contado com auxílio de microscópio estereoscópico.

Dez dias após a aplicação, foi avaliada a eclosão das ninfas e após 14, 18 e 22 dias, foi avaliada a mortalidade das mesmas, sendo aquelas mortas retiradas do folíolo com alfinete entomológico a cada avaliação. Durante todo o período as plantas foram irrigadas com 30 ml de água quando apresentavam sinais de murcha e mantidas à temperatura de $27,45 \pm 0,18^{\circ}\text{C}$, UR de $65,45 \pm 0,47\%$ e fotofase de 13h30min.

3.6 Efeito das nanoformulações selecionadas

Foram selecionadas as duas nanoformulações mais eficientes, uma do lote 5 e outra do lote 6. Uma terceira nanoformulação, NC L5-3, formulada em pó (PCL 60000 - 0,8 g; extrato EtOH - 6,5 g; Azamax[®] - 10 g; Tween 80 - 0,8 g), com 98,8% de eficiência de encapsulamento, foi também utilizada para comparação com as duas nanoformulações selecionadas, as quais encontravam-se em suspensão aquosa. Não foi selecionada nenhuma nanoformulação do lote 4 devido aos resultados de mortalidade inferiores e pelo fato de o polímero PMMA não ser biodegradável.

As soluções para aplicação foram preparadas tendo como base a concentração do primeiro ensaio da CL₅₀. A metodologia de infestação e a aplicação dos tratamentos seguiram como nos demais ensaios com as nanoformulações. Foram feitas cinco repetições por tratamento mantidas à temperatura de $25,79 \pm 0,19^{\circ}\text{C}$, UR de $71,9 \pm 0,51\%$ e fotofase de 13h30min.

3.7 Efeito residual das nanoformulações selecionadas

Neste ensaio, o número de folhas das plantas para infestação foi padronizado (conforme item 3.3). Para tanto, a semeadura ocorreu de forma escalonada, com intervalos de cinco dias, totalizando cinco lotes de plantas. Passados 15 dias da semeadura, as mudas foram transplantadas para potes plásticos de 0,5 L seguindo metodologia já explanada.

A infestação das plantas também ocorreu com intervalos de cinco dias, seguindo a ordem de plantio. Dez dias após a infestação do primeiro lote de plantas, correspondendo, portanto, ao dia da infestação do terceiro lote, os tratamentos foram aplicados na base de cada planta com solo seco dos cinco lotes. Desse modo, a infestação do quarto e do quinto lote ocorreu cinco e 10 dias após a aplicação, respectivamente. O número de ninfas foi avaliado na face abaxial do folíolo em cada lote 10 dias após a respectiva infestação.

Foram feitas cinco repetições para cada tratamento em cada lote mantidas à temperatura de $27,48 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$, UR de $71,06 \pm 0,35\%$ e fotofase de 13 h. As avaliações de mortalidade ninfal foram realizadas lote por lote 14, 18 e 22 dias após a infestação de cada lote de plantas, sendo a última avaliação do quinto lote realizada 32 dias após a aplicação dos tratamentos. As ninfas mortas foram retiradas com auxílio de alfinete entomológico a cada avaliação. Durante todo o período as plantas foram irrigadas com 30 ml de água sempre que apresentavam sinais de murcha.

3.8 Detecção e quantificação de azadiractina e de 3-tigloilazadiractol nas plantas de tomateiro tratadas com óleo de nim aplicado via sistêmica

Após a avaliação da mortalidade de ninfas do segundo ensaio da CL_{50} , o material vegetal de todos os tratamentos foi coletado. As plantas foram separadas em folhas superiores, caule superior, folhas inferiores, caule inferior e raiz, sendo o material posteriormente congelado em *freezer* a -80°C (Figura 4).

Foi feita análise MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) por meio da técnica de LC-MS/MS para detecção de azadiractina e 3-tigloilazadiractol (azadiractina B) no material vegetal (GRIMALT et al., 2011, modificado). As transições escolhidas foram $719,0 \text{ m/z} \rightarrow 687,0 \text{ m/z}$ e $719,0 \text{ m/z} \rightarrow 193,0 \text{ m/z}$ para azadiractina e $661,0 \text{ m/z} \rightarrow 599,0 \text{ m/z}$ e $661,0 \text{ m/z} \rightarrow 194,0 \text{ m/z}$ para 3-tigloilazadiractol para monitoramento dessas substâncias nas diferentes partes das plantas (Figura 5).

Selecionaram-se as plantas onde foram aplicados 302,4 ppm de azadiractina (maior concentração) e as plantas testemunha, onde foi aplicada apenas água. Foram feitas cinco análises para cada parte da planta.

Figura 4 - Corte das plantas de tomateiro para congelamento. **A.** Corte da parte aérea em superior e inferior; **B.** Parte aérea superior e inferior; **C.** Separação de folhas e caule; **D.** Raiz; **E.** Partes embaladas e identificadas para congelamento

Figura 5 - Cromatograma XIC (*Extracted Ion Chromatogram*) de MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) para as transições selecionadas de azadiractina (Aza A) e 3-tigloilazadiractol (Aza B)

3.9 Análise estatística

Todos os ensaios de avaliação do efeito dos derivados de nim sobre a mosca-branca foram conduzidos em delineamento inteiramente aleatorizado. Os dados em porcentagem foram transformados em arcsen (raiz (mortalidade+1)) para ajustarem-se à normalidade dos dados e homocedasticidade das variâncias. Posteriormente, foi aplicado o teste t nos ensaios com dois tratamentos, e Tukey ou correção de Bonferroni seguida de teste t nos demais casos. Em todas essas análises foi utilizado o programa SAS 9.2. Para a estimativa da CL₅₀, os dados foram submetidos à análise de Probit (FINNEY, 1971) utilizando o software POLO-PC (LEORA SOFTWARE, 1987).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estimativa da CL₅₀ para óleo de nim

4.1.1 Ensaio 1

No primeiro ensaio, o tratamento onde foi aplicada a maior concentração de óleo de nim (302,4 ppm) ocasionou a maior mortalidade (78,21%), que foi significativamente diferente dos outros tratamentos, com exceção da segunda maior concentração (151,2 ppm). Como esperado, houve redução da sobrevivência com o aumento da concentração das soluções aplicadas nas plantas, embora não tenha havido diferença entre as mortalidades obtidas numa concentração e na concentração subsequente e nem entre os valores obtidos na menor concentração e no controle (Tabela 6).

Tabela 6 - Médias $\pm$ erro padrão da mortalidade (%) de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com diferentes concentrações de óleo de nim aplicadas no solo em casa de vegetação. Temperatura: $28,6 \pm 6,21^\circ\text{C}$, UR: $36\% \pm 12,68\%$ e fotofase natural: 11h40min

Tratamento	N	Mortalidade (%) ¹
Água	194	$0,39 \pm 0,3922$ d
37,8 ppm	182	$4,10 \pm 2,6738$ cd
75,6 ppm	177	$18,53 \pm 12,0803$ bc
151,2 ppm	188	$41,33 \pm 6,6316$ ab
302,4 ppm	179	$78,21 \pm 4,3899$ a

¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A CL₅₀ estimada pela análise de Probit foi de 180,67 ppm de azadiractina em uma solução de 100 ml (Tabela 7), o que correspondeu a 3,61 mg de azadiractina nos 20 ml de solução aplicados por planta.

Tabela 7 - Valor de CL₅₀ estimado, coeficiente angular e intervalo de confiança obtidos na avaliação do efeito do óleo de nim sobre *Bemisia tabaci* biótipo B

Nº total de insetos avaliados	Coeficiente angular $\pm$ erro padrão	CL ₅₀ e intervalo de confiança a 95 %	X ²	Gl	p
920	$3,112 \pm 0,224$	180,67 ppm (164,1–198,37)	1,625	2	0,556

A figura 6 mostra que o Probit observado está muito próximo do estimado, havendo sobreposição em alguns casos, o que demonstra que os dados se ajustaram ao modelo.

Figura 6 - Curva concentração-resposta (log da concentração em %) para ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com diferentes concentrações de óleo de nim enriquecido via sistêmica. Mortalidades esperadas e observadas são representadas por linhas e pontos, respectivamente. 5 probits = 50% de mortalidade

4.1.2 Ensaio 2

Neste ensaio, também não houve diferença significativa entre as duas maiores concentrações aplicadas, bem como entre as concentrações intermediárias (75,6 e 151,2 ppm), sendo que as três causaram mortalidades superiores à observada na menor concentração e todas diferiram do controle (Tabela 8).

Tabela 8 - Médias $\pm$ erro padrão da mortalidade (%) de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com diferentes concentrações de óleo de nim aplicadas no solo em casa de vegetação. Temperatura: $28,2 \pm 3,93^{\circ}\text{C}$ e fotofase natural: 12h

Tratamentos	N	Mortalidade (%) ¹
Água	344	$2,08 \pm 0,109$ d
37,8 ppm	411	$39,05 \pm 0,524$ c
75,6 ppm	449	$64,83 \pm 0,909$ b
151,2 ppm	379	$87,52 \pm 0,460$ ab
302,4 ppm	480	$95,80 \pm 0,198$ a

¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Por meio da análise de Probit, estimou-se que a CL_{50} para o óleo de nim aplicado no solo foi de 54,75 ppm em 100 ml de água (Tabela 9), que corresponde a 1,09 mg de azadiractina nos 20 ml de solução aplicados nas plantas, menos da metade daquela estimada no primeiro ensaio.

Tabela 9 - Valor de CL_{50} estimado, coeficiente angular e intervalo de confiança obtidos na avaliação do efeito do óleo de nim sobre *Bemisia tabaci* biótipo B

Nº total de insetos avaliados	Coeficiente angular $\pm$ erro padrão	CL_{50} e intervalo de confiança a 95%	X^2	Gl	p
1719	$2,513 \pm 0,128$	54,75 ppm (50,37–58,99)	1,877	2	0,609

Com base na Figura 7, verifica-se que o Probit observado está muito próximo do estimado, havendo sobreposição em alguns casos, o que demonstra que os dados se ajustaram ao modelo.

Figura 7 - Curva concentração-resposta (log da concentração em %) para ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas tratadas com diferentes concentrações de óleo de nim enriquecido via sistêmica. Mortalidades esperadas e observadas são representadas por linhas e pontos, respectivamente. 5 probits = 50% de mortalidade

A comparação entre os dois ensaios para se estimar a CL_{50} evidencia que os resultados foram variáveis, o que provavelmente seja devido à diferença no metabolismo das plantas, uma vez que os dois ensaios foram realizados em épocas diferentes e, consequentemente, em condições ambientais diferentes.

De acordo com Bennett (1957), quando inseticidas são aplicados via sistêmica, a planta torna-se um participante ativo nos processos que regulam a eficiência da aplicação. Variações fisiológicas e bioquímicas ocorrem não só em plantas de diferentes espécies, mas também dentro de uma mesma espécie em diferentes épocas do ano, ou possivelmente mesmo em diferentes momentos do dia, e também sob as variações das condições ambientais de luz, temperatura, umidade, nutrição etc. Ainda segundo o autor, é provável que as diferenças em

algumas dessas condições sejam responsáveis pela variação de resultados obtidos com inseticidas sistêmicos reportados na literatura.

Carvalho et al. (2012), utilizando o óleo de nim Organic Neem[®], estimaram valor de CL₅₀ bem inferior ao desse trabalho (0,08 mg de azadiractina para uma solução de 50 ml), o que provavelmente se deve ao fato de a aplicação ter sido realizada diretamente sobre as folhas de soja contendo ninfas de *B. tabaci* biótipo B de primeiro ínstar e, portanto, os compostos ativos não precisaram translocar-se pela planta e correrem o risco de ser degradados para chegar até os folíolos infestados, como ocorreu no presente trabalho.

4.2 Seleção das nanoformulações mais promissoras

4.2.1 Efeito das nanoformulações NC L2

As nanoformulações do lote 2 ocasionaram baixa mortalidade nos três períodos de avaliação. Considerando as mortalidades acumuladas ao 13^o dia, os valores constatados variaram entre 12,11 e 22,17%, não diferindo significativamente entre si e tampouco dos valores registrados nos controles negativos (6,84 e 10,62%) e nos controles positivos (20,87 e 26,07%) (Tabela 10).

Tabela 10 - Médias $\pm$ erro padrão da mortalidade (%) de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PCL do lote 2 aplicadas no solo em casa de vegetação. Temperatura: $22,05 \pm 1,94^{\circ}\text{C}$, UR (dados perdidos) e fotofase: 11h

Tratamento	N	Mortalidade 1-5 dias (%) ^{ns}	Mortalidade 6-10 dias (%) ^{ns}	Mortalidade 11-13 dias (%) ^{ns}	Mortalidade 1-13 dias (%) ^{ns}
Água	316	$1,03 \pm 0,407$	$5,50 \pm 2,881$	$0,31 \pm 0,313$	$6,84 \pm 2,858$
Branco	225	$0,92 \pm 0,532$	$9,34 \pm 2,354$	$1,28 \pm 0,438$	$10,62 \pm 2,376$
Azamax [®]	320	$1,14 \pm 0,402$	$16,22 \pm 3,235$	$4,66 \pm 1,464$	$20,87 \pm 4,482$
Óleo	347	$4,08 \pm 2,769$	$19,10 \pm 4,657$	$6,97 \pm 2,705$	$26,07 \pm 5,340$
NC L2-1	471	$1,84 \pm 1,133$	$16,68 \pm 4,372$	$5,43 \pm 2,008$	$22,11 \pm 5,048$
NC L2-2	380	$1,83 \pm 0,968$	$17,76 \pm 5,704$	$4,42 \pm 1,513$	$22,17 \pm 6,427$
NC L2-3	343	$3,49 \pm 1,781$	$11,01 \pm 3,853$	$6,67 \pm 1,677$	$17,68 \pm 5,405$
NC L2-4	462	$1,76 \pm 1,184$	$7,21 \pm 2,040$	$4,90 \pm 1,657$	$12,11 \pm 2,364$
NC L2-5	468	$1,85 \pm 1,171$	$10,65 \pm 2,712$	$4,87 \pm 1,284$	$15,52 \pm 2,820$

ns = não significativo pelo teste t após correção de Bonferroni a 5% de significância. NC = nanocápsula. PCL = poli-ε-caprolactona

As temperaturas amenas em que este ensaio foi conduzido provavelmente influenciaram no metabolismo das plantas e, conseqüentemente, na translocação das moléculas inseticidas. No caso da NC L2-5, onde a eficiência de encapsulamento foi maior (48%) do que nas outras onde se conseguiu estimar essa variável, pode também não ter havido o rompimento dos polímeros, impedindo que a azadiractina se translocasse pela planta, uma vez que a mortalidade ocasionada tendeu a ser menor que em NC L2-1 e NC L2-3, que tiveram eficiência de encapsulamento menor (10 e 9,1% respectivamente).

A maior mortalidade das ninfas ocorreu entre o sexto e o décimo dias após a aplicação dos tratamentos. Houve tendência de estabilização da mortalidade das ninfas, principalmente nos tratamentos água e branco (controles negativos), após os 10 dias da aplicação. As nanoformulações NC L2-1 e NC L2-2 foram as que apresentaram comportamento mais próximo do óleo de nim enriquecido (Figura 8).

Figura 8 - Mortalidade acumulada de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PCL do lote 2 aplicadas no solo em casa de vegetação. Diferença não significativa entre os tratamentos dentro de cada período. Temperatura: $22,05 \pm 1,94^{\circ}\text{C}$, UR (dados perdidos) e fotofase: 11h

4.2.2 Efeito das nanoformulações NC L3

Assim como no ensaio com as NC L2, também neste com as NC L3, não houve diferença significativa entre os tratamentos nos três períodos de avaliação. No entanto, considerando-se a mortalidade acumulada aos 15 dias após a aplicação, a única diferença significativa encontrada pelo teste de Bonferroni ao nível de 5% de probabilidade foi entre os tratamentos óleo e água. Para os demais tratamentos, mesmo naqueles onde foi utilizado o dobro da concentração da CL_{50} do segundo ensaio, com registro de mortalidades variáveis

entre 8,64 e 12,99% nas nanoformulações, estas não diferiram dos valores encontrados nos controles negativos (4,16 e 6,14%) e tampouco nos controles positivos (12,49 e 20,99%) (Tabela 11).

Comparando-se as mortalidades constatadas nos lotes 2 e 3, verifica-se que, embora baixas nos dois lotes, houve uma tendência de valores ainda menores no lote 3. Uma das explicações seria o não rompimento dos polímeros, uma vez que a eficiência de encapsulamento foi maior do que no lote 2, havendo, portanto, menor quantidade de óleo livre na solução. Uma outra explicação para essa tendência de menor mortalidade com o emprego das nanoformulações do lote 3 seria a ocorrência de temperaturas mais baixas (17,37°C) nessa época em relação à do ensaio do lote 2 (22,05°C), o que teria reduzido o metabolismo da planta. Isso explicaria principalmente a baixa mortalidade encontrada nos dois tratamentos onde foi aplicado o dobro da concentração.

Tabela 11 - Médias $\pm$ erro padrão da mortalidade (%) de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PCL do lote 3 aplicadas no solo em cada de vegetação. Temperatura: $17,37 \pm 0,16^\circ\text{C}$, UR: $82,1 \pm 0,48\%$ e fotofase: 10h40min

Tratamento	N	Mortalidade 1-5 dias (%) ^{ns}	Mortalidade 6-9 dias (%) ^{ns}	Mortalidade 11-15 dias (%) ^{ns}	Mortalidade 1-15 dias (%) ¹
Água	326	$0,19 \pm 0,002$	$1,64 \pm 1,031$	$2,33 \pm 1,004$	$4,16 \pm 1,594$ b
Branco	271	$1,58 \pm 0,008$	$2,72 \pm 1,441$	$1,84 \pm 1,129$	$6,14 \pm 1,412$ ab
Azamax [®]	397	$1,53 \pm 0,009$	$1,08 \pm 0,666$	$9,88 \pm 6,265$	$12,49 \pm 6,805$ ab
Óleo	463	$3,14 \pm 0,009$	$3,31 \pm 1,841$	$14,54 \pm 6,030$	$20,99 \pm 7,079$ a
NC L3-1	402	$1,70 \pm 0,006$	$4,07 \pm 2,024$	$4,27 \pm 1,739$	$10,05 \pm 3,546$ ab
NC L3-2	364	$2,51 \pm 0,013$	$3,29 \pm 1,659$	$2,83 \pm 1,209$	$8,64 \pm 1,872$ ab
NC L3-3	353	$3,28 \pm 0,014$	$3,10 \pm 1,055$	$2,84 \pm 1,766$	$9,22 \pm 0,928$ ab
NC L3-4	384	$1,43 \pm 0,009$	$4,35 \pm 1,534$	$4,89 \pm 2,073$	$10,38 \pm 1,411$ ab
NC L3-1 (Dobro)	411	$3,57 \pm 0,020$	$1,87 \pm 0,596$	$6,41 \pm 2,131$	$11,85 \pm 3,685$ ab
NC L3-3 (Dobro)	385	$0,95 \pm 0,004$	$5,63 \pm 1,779$	$6,41 \pm 2,092$	$12,99 \pm 3,493$ ab

ns= não significativo. ¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste t após correção de Bonferroni a 5% de significância. NC = nanocápsula. PCL = poli-ε-caprolactona.

De acordo com o observado na Figura 9, ainda que, de modo geral, as mortalidades tenham sido baixas, houve aumento progressivo destas ao longo dos períodos avaliados. Isso ocorreu especialmente com o óleo de nim, cuja mortalidade apresentou variação relativamente alta do nono (6,45%) para o décimo quinto dia (20,99%) após a aplicação, não se comparando

a nenhum outro tratamento. Entretanto, devido à grande variação entre as repetições desse tratamento (o que se refletiu num elevado erro padrão), essa mortalidade acumulada não foi significativamente diferente dos outros tratamentos, com exceção da água.

Figura 9 - Mortalidade acumulada de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PCL do lote 3 aplicadas no solo em cada de vegetação. Temperatura: $17,34 \pm 0,16^{\circ}\text{C}$, UR $82,1 \pm 0,48\%$ e fotofase: 10h40min

4.2.3 Efeito das nanoformulações NC L4

Não houve diferença significativa entre as mortalidades das ninfas nos diversos tratamentos (variação entre 0,68 e 3,18%) até o quinto dia após a aplicação (DAA). Entre o sexto e o décimo DAA, entretanto, as mortalidades nas nanoformulações (variáveis entre 6,27 e 12,46%) foram, de modo geral, superiores às registradas nos controles negativos (água e brancos das nanoformulações), nos quais as mortalidades variaram de 0,22 a 1,02%. Já entre o décimo primeiro e décimo quinto DAA, a maior mortalidade (15,15%) foi ocasionada pelo tratamento com óleo Azamax[®] empregado no dobro da concentração da CL₅₀ do segundo ensaio, cujo valor não diferiu apenas daqueles observados com a nanoformulação NC L4-4 (7,45%) e com o óleo Azamax[®] na concentração da CL₅₀ do segundo ensaio (7,66%). Com as demais nanoformulações, as mortalidades variaram entre 2,58 e 6,70% e com exceção do valor constatado na NC L4-2 (6,70%), não diferiram significativamente das constatadas nos controles e nos brancos, para os quais ocorreu variação de 0,11 a 1,17% (Tabela 12).

Considerando a mortalidade acumulada ao final do experimento, a NC L4-4 foi a nanoformulação que provocou maior mortalidade (21,63%), porém não houve diferença

estatística entre ela e as demais nanoformulações, bem como em relação aos controles positivos (Azamax[®] nas duas concentrações).

Tabela 12 - Médias $\pm$ erro padrão da mortalidade (%), em três períodos de avaliação, de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PMMA do lote 4 aplicadas no solo em casa de vegetação. Temperatura: $18,92 \pm 0,18^{\circ}\text{C}$, UR: $81,1 \pm 0,52\%$ e fotofase natural: 11h

Tratamento	N	Mortalidade 1-5 dias (%) ^{ns}	Mortalidade 6-10 dias (%) ¹	Mortalidade 11-15 dias (%) ¹	Mortalidade 1-15 dias (%)
Água	531	$2,15 \pm 0,787$	$0,22 \pm 0,217$ c	$0,11 \pm 0,106$ d	$2,47 \pm 0,756$ c
Branco 1	463	$0,81 \pm 0,251$	$0,73 \pm 0,533$ c	$0,86 \pm 0,385$ cd	$2,41 \pm 0,685$ c
Branco 2	477	$1,67 \pm 0,472$	$1,02 \pm 0,588$ c	$0,35 \pm 0,224$ d	$3,05 \pm 0,882$ c
Branco 3	536	$0,73 \pm 0,344$	$0,90 \pm 0,553$ c	$1,17 \pm 0,673$ cd	$3,25 \pm 1,001$ c
Branco 4	481	$0,68 \pm 0,684$	$0,83 \pm 0,342$ c	$0,30 \pm 0,188$ d	$1,82 \pm 0,697$ c
Azamax [®]	600	$2,35 \pm 0,877$	$10,81 \pm 2,600$ ab	$7,66 \pm 1,397$ ab	$20,82 \pm 3,775$ ab
Azamax [®] (dobro)	465	$3,18 \pm 1,800$	$23,60 \pm 6,087$ a	$15,15 \pm 3,229$ a	$41,94 \pm 8,842$ a
NC L4-1	426	$2,28 \pm 0,971$	$6,27 \pm 1,964$ bc	$2,58 \pm 1,271$ bcd	$11,12 \pm 1,513$ bc
NC L4-2	456	$2,66 \pm 1,722$	$9,49 \pm 1,795$ ab	$6,70 \pm 3,380$ bc	$18,85 \pm 3,301$ ab
NC L4-3	477	$2,08 \pm 1,240$	$7,24 \pm 2,298$ bc	$2,83 \pm 0,400$ bcd	$12,89 \pm 3,627$ bc
NC L4-4	508	$1,72 \pm 0,606$	$12,46 \pm 3,897$ ab	$7,45 \pm 1,817$ ab	$21,63 \pm 5,601$ ab

ns= não significativo. ¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste t após correção de Bonferroni a 5% de significância. NC = nanocápsula. PMMA = poli-metacrilato de metila.

O grande pico de mortalidade nos controles positivos e nas nanoformulações ocorreu até o segundo dia de avaliação (10 dias após a aplicação), enquanto que nos controles negativos não houve grande variação da mortalidade nos dias avaliados (Figura 10).

Figura 10 - Mortalidade acumulada de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com aplicações no solo de nanoformulações do lote 4 ao longo do período de avaliação. Temperatura: $18,92 \pm 0,18^{\circ}\text{C}$, UR: $81,1 \pm 0,52\%$ e fotofase: 11h

4.2.4 Efeito das nanoformulações NC L5

No que se refere ao lote 5, constata-se que não houve diferença significativa nas mortalidades causadas pelas nanoformulações e pelos controles após cinco dias da aplicação, com valores variando 1,22 e 3,75%. Entre o sexto e décimo dias, as mortalidades registradas nas duas nanoformulações (23,50 e 24,90%) não diferiram do controle positivo (36,59%), mas todas elas foram superiores aos valores verificados nos controles negativos (2,18 e 2,41%). Situação análoga ocorreu para as mortalidades entre o décimo primeiro e décimo quinto dias, com valores de 14,77 e 15,46% nas duas nanoformulações, 13,53% no controle positivo e 0,51 e 2,64% nos controles negativos (Tabela 13 e Figura 11).

Tabela 13 - Médias $\pm$ erro padrão da mortalidade (%), em três períodos de avaliação, de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PCL do lote 5 aplicadas no solo em casa de vegetação. Temperatura: $25,18 \pm 0,29^\circ\text{C}$, UR $63 \pm 0,8\%$ e fotofase: 12h30min

Tratamento	N	Mortalidade 1-5 dias (%) ^{ns}	Mortalidade 6-10 dias (%) ¹	Mortalidade 11-15 dias (%) ¹	Mortalidade 1-15 dias (%) ¹
Água	773	$1,22 \pm 0,409$	$2,18 \pm 0,500$ b	$0,51 \pm 0,314$ b	$3,91 \pm 0,744$ b
Branco	791	$1,55 \pm 0,753$	$2,41 \pm 0,665$ b	$2,64 \pm 0,795$ b	$6,60 \pm 1,098$ b
Azamax [®]	799	$3,75 \pm 0,725$	$36,59 \pm 6,709$ a	$13,53 \pm 3,684$ a	$53,87 \pm 10,333$ a
NC L5-1	772	$1,83 \pm 1,099$	$23,50 \pm 3,333$ a	$15,46 \pm 2,111$ a	$40,78 \pm 4,966$ a
NC L5-2	734	$2,57 \pm 0,696$	$24,90 \pm 6,508$ a	$14,77 \pm 2,736$ a	$41,79 \pm 7,090$ a

ns= não significativo. ¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste t após correção de Bonferroni a 5% de significância. NC = nanocápsula. PCL = poli-ε-caprolactona.

Quando se considera a mortalidade acumulada em todo o período, verifica-se que os valores registrados no controle positivo (Azamax[®]) (53,87%) e nas nanoformulações (40,78 e 41,79%) não diferiram significativamente entre si, mas foram maiores que nos controles negativos (água e branco) (3,91 e 6,60%).

Percebe-se uma tendência de aumento da mortalidade do primeiro para o segundo período de avaliação com ligeira queda entre o segundo e o terceiro períodos.

Figura 11 - Mortalidade acumulada de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PCL do lote 5 aplicadas no solo em casa de vegetação, em três períodos de avaliação. Temperatura: $25,18 \pm 0,29^{\circ}\text{C}$, UR: $63 \pm 0,8\%$ e fotofase: 12h30min

4.2.5 Efeito das nanoformulações NC L6

Diferentemente dos ensaios com as nanoformulações dos outros lotes, as nanoformulações do lote 6, bem com o controle positivo óleo Azamax®, provocaram elevada mortalidade logo no primeiro período de avaliação (1-5 dias após a aplicação), cujos valores (24,15 a 41,67% nas nanoformulações e 42,91% no óleo) diferiram significativamente dos valores constatados nos controles negativos (0,85 e 1,45%). No período seguinte (6-10 dias após a aplicação), também ocorreu elevada mortalidade (40,84 a 52,87% nas nanoformulações e 48,65% no óleo), sendo os valores superiores aos observados nos controles negativos (0,61 e 1,90%). No último período (11-15 dias após a aplicação), como era de se esperar pelo reduzido número de ninfas restantes em relação ao número inicial, os valores de mortalidade foram drasticamente reduzidos não ultrapassando 8,44% nos tratamentos, sendo, por outro lado, mantidos baixos os valores nos controles negativos (0,58 e 1,33%) (Tabela 14 e Figura 12).

Considerando o perfil das mortalidades ocasionadas nesse ensaio, este não seguiu o padrão esperado. Era esperada baixa mortalidade no primeiro período e aumento progressivo nas avaliações subsequentes, o que não foi observado. Isto pode ter ocorrido devido a fatores não controláveis como luz, temperatura, umidade, nutrição, que podem ter acelerado o rompimento dos polímeros e o metabolismo da planta, fazendo com que esta absorvesse mais rapidamente as moléculas inseticidas. É reconhecido que a radiação ultravioleta age como fator degradante de materiais poliméricos, uma vez que está associada ao mecanismo de

fotodegradação (ALMEIDA; FERREIRA, 2006). De acordo com Chandra e Rustgi (1998), a temperatura desempenha importante papel na degradação de polímeros, cuja taxa aumenta com o aumento da temperatura.

Tabela 14 - Médias $\pm$ erro padrão da mortalidade (%), em três períodos de avaliação, de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PHB do lote 6 aplicadas no solo em casa de vegetação. Temperatura: $24,99 \pm 0,23^{\circ}\text{C}$, UR: $61,37 \pm 0,54\%$ e fotofase: 13h

Tratamento	N	Mortalidade 1-5 dias (%) ¹	Mortalidade 6-10 dias (%) ¹	Mortalidade 11-15 dias (%) ¹	Mortalidade 1-15 dias (%) ¹
Água	522	0,85 $\pm$ 0,688 c	0,61 $\pm$ 0,454 b	0,58 $\pm$ 0,214 b	2,05 $\pm$ 1,282 b
Branco	538	1,45 $\pm$ 0,957 c	1,90 $\pm$ 0,646 b	1,33 $\pm$ 0,814 ab	4,67 $\pm$ 1,381 b
Azamax [®]	439	42,91 $\pm$ 1,141 ab	48,65 $\pm$ 3,259 a	5,81 $\pm$ 1,203 ab	97,36 $\pm$ 2,637 a
NC L6-1	450	26,41 $\pm$ 3,913 ab	52,87 $\pm$ 1,817 a	7,02 $\pm$ 2,535 ab	86,30 $\pm$ 5,859 a
NC L6-2	470	24,15 $\pm$ 2,886 b	40,84 $\pm$ 6,937 a	8,44 $\pm$ 3,067 a	73,43 $\pm$ 8,598 a
NC L6-3	494	35,09 $\pm$ 4,014 ab	49,17 $\pm$ 2,639 a	6,85 $\pm$ 1,217 ab	91,11 $\pm$ 4,061 a
NC L6-4	527	41,67 $\pm$ 4,824 a	44,07 $\pm$ 8,408 a	5,83 $\pm$ 1,499 ab	90,66 $\pm$ 3,016 a

¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste t após correção de Bonferroni a 5% de significância. NC = nanocápsula. PHB = poli- β -hidroxibutirato.

Considerando a mortalidade acumulada, as nanoformulações provocaram a morte de mais de 70% das ninfas, variando de 73,43% na NC L6-2 a 91,11% na NC L6-3, enquanto o óleo Azamax[®] ocasionou quase 100% de mortalidade. Em princípio, esses valores de mortalidade estão acima do esperado, uma vez que foi utilizada a concentração referente à CL₅₀. Isso, entretanto, pode ter ocorrido em razão dos diferentes períodos de avaliação para os dois experimentos. Assim, enquanto no experimento de estimativa da CL₅₀ a avaliação foi feita sete dias após a aplicação, neste último experimento as avaliações foram feitas até 15 dias após a aplicação. Assim, caso tivesse ocorrido uma avaliação posterior no experimento da CL₅₀, é provável que a mortalidade tivesse sido maior, pois as moléculas inseticidas, como a azadiractina, ainda poderiam continuar ativas na planta.

Figura 12 - Mortalidade acumulada de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PHB do lote 6 aplicadas no solo em casa de vegetação, em três períodos de avaliação. Temperatura: $24,99 \pm 0,23^{\circ}\text{C}$, UR: $61,37 \pm 0,54\%$ e fotofase: 13h

4.3 Influência da aplicação sistêmica de óleo com derivados de nim na oviposição, viabilidade de ovos e mortalidade ninfal de *B. tabaci* biótipo B

A oviposição e a viabilidade dos ovos (avaliada com base no número de ninfas eclodidas) não foram afetadas pelo óleo contendo derivados de nim aplicado no solo, quando a oviposição foi realizada em plantas recém-tratadas. Já a mortalidade ninfal acumulada no tratamento com óleo (43,93%) foi significativamente superior à registrada no controle (13,70%) (Tabela 15).

Tabela 15 - Médias $\pm$ erro padrão do número de ovos e do número de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B eclodidas em folíolos de tomateiro, aos 22 dias após a aplicação de óleo contendo derivados de nim no solo utilizado para o cultivo de plantas de tomateiro em casa de vegetação. Temperatura: $27,45 \pm 0,18^{\circ}\text{C}$, UR: $65,45 \pm 0,47\%$ e fotofase: 13h30min

	Tratamento	
	Água	Óleo
Nº de ovos adaxial ^{ns}	13,70 $\pm$ 2,422	14,10 $\pm$ 2,514
Nº de ovos abaxial ^{ns}	63,60 $\pm$ 9,083	56,30 $\pm$ 6,347
Nº total de ovos no folíolo ^{ns}	77,30 $\pm$ 8,387	70,40 $\pm$ 6,843
Nº de ninfas eclodidas adaxial ⁿ	13,50 $\pm$ 2,409	14,10 $\pm$ 2,514
Nº de ninfas eclodidas abaxial ^{ns}	63,20 $\pm$ 9,193	55,40 $\pm$ 6,353
Nº total de ninfas eclodidas ^{ns}	76,70 $\pm$ 8,463	69,50 $\pm$ 6,789
Eclosão (%) ^{ns}	99,03 $\pm$ 0,462	98,80 $\pm$ 0,802
Mortalidade ninfal acumulada (%) ¹	6,22 $\pm$ 1,530 b	43,93 $\pm$ 6,734 a

ns= não significativo. ¹Médias seguidas mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de t a 5% de probabilidade.

Diferentemente dos resultados encontrados no presente estudo, Prabhaker, Toscano e Henneberry (1999) observaram redução, ainda que limitada, na oviposição e na porcentagem de eclosão de ovos de *B. tabaci* biótipo B em algodão tratado com soluções contendo extratos de sementes de nim aplicadas no solo. Os autores, entretanto, realizaram a infestação das plantas 48 horas após a aplicação dos tratamentos e assim, pode ter havido tempo suficiente para que os compostos inseticidas se translocassem pelas plantas e chegassem até as folhas que serviram de substrato para oviposição. Provavelmente, essa tenha sido a razão de a oviposição não ter sido afetada no presente ensaio.

Quintela e Pinheiro (2009) também observaram redução da oviposição de mosca-branca chegando a quase 100% em folhas de feijoeiro tratadas com vários extratos botânicos, incluindo óleos comerciais de nim. De acordo com esses autores, a azadiractina presente no substrato de oviposição pode alterar o comportamento dos adultos repelindo-os, além do que, alguns compostos lipídicos presentes nos extratos de nim podem afetar a eficiência da substância que “cola” o pedicelo dos ovos ao substrato, prejudicando a aderência destes às folhas.

Durante as avaliações, não foi possível separar a mortalidade das ninfas em função da localização nas faces adaxial e abaxial, pois muitas delas migraram de face foliar após a eclosão, razão pela qual foi considerada a mortalidade total no folíolo. A elevada mortalidade ninfal acumulada encontrada revela que a azadiractina pode persistir ativa na planta mesmo após vários dias da aplicação.

4.4 Efeito das nanoformulações selecionadas

As nanoformulações selecionadas foram a NC L5-2 e a NC L6-1. Tanto estas quanto a nanoformulação em pó (NC L5-3) provocaram mortalidade acumulada comparável à do óleo Azamax[®] enriquecido, sendo em todos os casos superior a 90% (Tabela 16).

As nanoformulações não seguiram o padrão esperado de ocasionar baixa mortalidade na primeira avaliação e aumentar progressivamente nas avaliações seguintes. Ao contrário, houve elevada mortalidade logo na primeira avaliação (41,39% com Azamax[®] e 55,96 a 58,41% com as nanoformulações), que se manteve na segunda avaliação (47,11% com Azamax[®] e 39,76 a 42,98% com as nanoformulações). Já na terceira avaliação, por haver poucas ninfas sobreviventes, a mortalidade foi baixa. Mesmo a NC L5-2, que no ensaio com as nanoformulações do lote 5 seguiu o padrão esperado, nesse experimento não o manteve. As condições ambientais podem ter influenciado no rápido rompimento dos polímeros, que

provavelmente liberaram os compostos ativos que se translocaram pela planta provocando a mortalidade, pois a eficiência de encapsulamento foi de mais de 90%.

Tabela 16 - Médias $\pm$ erro padrão da mortalidade (%), em três períodos de avaliação, de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PCL do lote 5 e PHB do lote 6 aplicadas no solo em casa de vegetação. Temperatura: $25,79 \pm 0,19^\circ\text{C}$, UR: $71,9 \pm 0,51\%$ e fotofase: 13h30min

Tratamento	N	Mortalidade 1-5 dias (%) ¹	Mortalidade 6-10 dias (%) ¹	Mortalidade 11-15 dias (%) ^{ns}	Mortalidade 1-15 dias (%) ¹
Água	647	$0,94 \pm 0,461\text{b}$	$0,84 \pm 0,282\text{ b}$	$0,13 \pm 0,127$	$1,90 \pm 0,628\text{ b}$
Branco NC L5	729	$0,24 \pm 0,244\text{ b}$	$0,79 \pm 0,327\text{ b}$	$0,59 \pm 0,251$	$1,63 \pm 0,614\text{ b}$
Branco NC L6	611	$1,00 \pm 0,270\text{ b}$	$0,43 \pm 0,176\text{ b}$	$0,18 \pm 0,185$	$1,62 \pm 0,275\text{ b}$
Óleo	723	$41,39 \pm 3,770\text{ a}$	$47,11 \pm 8,210\text{ a}$	$3,17 \pm 1,501$	$91,66 \pm 6,731\text{ a}$
NC L5-2	726	$55,96 \pm 8,314\text{ a}$	$42,98 \pm 8,131\text{ a}$	$0,64 \pm 0,408$	$99,59 \pm 0,261\text{ a}$
NC L5-3	738	$58,41 \pm 5,571\text{ a}$	$39,76 \pm 5,069\text{ a}$	$1,41 \pm 0,585$	$99,58 \pm 0,193\text{ a}$
NC L6-1	701	$56,21 \pm 5,761\text{ a}$	$40,78 \pm 6,099\text{ a}$	$1,84 \pm 0,923$	$98,83 \pm 0,537\text{ a}$

ns = Não significativo. ¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste t após correção de Bonferroni a 5% de significância. NC = nanocápsula. PHB = poli- β -hidroxibutirato. PCL = poli- ϵ -caprolactona.

Divergindo dos resultados deste estudo, Marcomini (2009), trabalhando com nanoformulações com os polímeros PCL, PHB e PMMA, encontrou, em alguns casos, valores relativamente altos de mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* que se alimentaram de folhas de milho tratadas, porém os resultados foram sempre inferiores aos obtidos com a aplicação do óleo de nim. O mesmo ocorreu no estudo de Carvalho et al. (2012), onde foram empregadas nanoformulações contendo os polímeros β -ciclodextrina e PCL sobre ninfas de *B. tabaci* biótipo B.

As condições ambientais em que os últimos experimentos foram realizados podem ser a explicação para o fato de o óleo ter matado mais de 90% das ninfas na concentração da CL₅₀, uma vez que o rápido metabolismo da planta deve ter exigido mais substâncias do solo como a água, sendo os compostos inseticidas translocados juntamente com ela.

Observando a Figura 13, pode-se verificar que os valores de mortalidade acumulada das ninfas foram mínimos nos controles negativos e superior a 50% nas nanoformulações logo no primeiro período de avaliação.

Figura 13 - Mortalidade acumulada, em três períodos de avaliação, de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro tratadas com nanoformulações de derivados de nim em cápsulas de PCL do lote 5 e PHB do lote 6 aplicadas no solo em casa de vegetação. Temperatura: $25,79 \pm 0,19^{\circ}\text{C}$, UR: $71,9 \pm 0,51\%$ e fotofase: 13h30min

4.5 Efeito residual das nanoformulações selecionadas

A mortalidade acumulada das ninfas nos tratamentos (nanoformulações selecionadas no item 4.2) seguiu o mesmo padrão nos cinco lotes de plantas, os quais diferiram em função da época de infestação em relação ao dia da aplicação (único para todos os lotes de plantas), com exceção do lote onde a infestação ocorreu no dia da aplicação (DA). Assim, nos lotes 10 DAA (dias antes da aplicação), 5 DAA, 5 DDA (dias depois a aplicação) e 10 DDA, as mortalidades ocasionadas pelo óleo comercial e pelas duas nanoformulações com o polímero PCL (NC L5-2 e NC L5-3) não diferiram entre si, mas foram significativamente superiores ao valor registrado na nanoformulação com o polímero PHB (NC L6-1), que, ainda assim, provocou mortalidade superior às constatadas nos controles negativos (água e brancos das nanoformulações). Já no lote DA, não houve diferença entre as mortalidades causadas pelo Azamax® e pelas quatro nanoformulações, sendo estas significativamente superiores aos valores constatados nos controles (Tabela 17).

Tabela 17 – Média $\pm$ erro padrão da mortalidade (%) de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B, aos 22 dias após a infestação, em plantas de tomateiro com diferentes épocas de infestação em relação ao dia da aplicação de nanoformulações de derivados de nim aplicadas no solo em casa de vegetação. Temperatura: $27,48 \pm 0,13^\circ\text{C}$, UR: $71,06 \pm 0,35\%$ e fotofase: 13h

Tratamento	Época de Infestação				
	10 DAA	5 DAA	DA	5 DDA	10 DDA
Água	$10,48 \pm 1,523$ c	$1,96 \pm 0,582$ c	$8,75 \pm 1,127$ b	$2,75 \pm 0,948$ c	$3,08 \pm 0,489$ c
Branco NC L5	$9,38 \pm 0,896$ c	$6,34 \pm 1,278$ c	$10,38 \pm 1,989$ b	$2,86 \pm 0,395$ c	$4,86 \pm 0,807$ c
Branco NC L6	$11,13 \pm 1,254$ c	$6,40 \pm 0,686$ c	$6,31 \pm 2,938$ b	$4,03 \pm 0,642$ c	$5,82 \pm 0,723$ c
Azamax®	$95,15 \pm 1,150$ a	$90,23 \pm 4,873$ a	$75,29 \pm 6,480$ a	$72,86 \pm 7,480$ a	$58,78 \pm 2,094$ a
NC L5-2	$98,32 \pm 0,692$ a	$88,38 \pm 3,147$ a	$75,28 \pm 3,537$ a	$80,09 \pm 4,429$ a	$59,91 \pm 7,361$ a
NC L5-3	$91,53 \pm 3,548$ a	$85,56 \pm 1,859$ a	$75,39 \pm 4,313$ a	$76,43 \pm 4,310$ a	$72,92 \pm 3,392$ a
NC L6-1	$70,55 \pm 3,695$ b	$72,78 \pm 8,083$ b	$51,15 \pm 5,819$ a	$54,21 \pm 4,905$ b	$48,98 \pm 4,548$ b

DAA = Dias antes da aplicação. DA = Dia da aplicação. DDA = Dias depois da aplicação. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste t após correção de Bonferroni a 5% de significância.

Nota-se que a nanoformulação NC L6-1 não se comportou como no ensaio anterior, apresentando porcentagem de mortalidade acumulada inferior, mesmo nas plantas infestadas 10 dias antes da aplicação (DAA), que corresponderia ao mesmo período no experimento com as nanoformulações selecionadas (item 4.4). Isso pode ter ocorrido porque, para cada experimento, as nanoformulações eram refeitas e, ainda que fosse sempre seguida a mesma metodologia, visando reproduzir as nanoformulações com as mesmas características, pequenas alterações podem ter ocorrido, o que pode ter provocado diferenças nos resultados.

As figuras que se seguem (14 a 17) mostram a tendência de diminuição da porcentagem de mortalidade das ninfas em cada tratamento do lote de plantas primeiramente intestadas em comparação àquelas infestadas posteriormente, como esperado. Quanto mais distante do primeiro lote de plantas, mais tempo demorou para as ninfas entrarem em contato com as moléculas inseticidas e mais tempo houve para que estas fossem degradadas pelo ambiente e pela própria planta.

Considerando o quinto lote de plantas (10 DDA), pode-se verificar que as moléculas inseticidas permaneceram ativas na planta por cerca de 30 dias, uma vez que a mortalidade acumulada 32 dias após a aplicação foi de cerca de 50%, no mínimo, nas plantas tratadas tanto com o óleo comercial, como com as três nanoformulações, principalmente com a NC L5-3, que, nessa época, tinha causado mortalidade superior a 70%. Deve-se levar em

consideração, entretanto, as condições ambientais, pois se o ensaio tivesse sido realizado em um período com temperaturas mais baixas, a mortalidade poderia não ter sido tão elevada, como ocorreu nos primeiros ensaios com as nanoformulações.

Figura 14 - Mortalidade de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B, aos 22 dias após a infestação, em plantas de tomateiro com diferentes épocas de infestação em relação ao dia da aplicação de solução com o óleo comercial Azamax® com teor de azadiractina enriquecido aplicada no solo em casa de vegetação. DAA (Dias Antes da Aplicação); DA (Dia da Aplicação); DDA (Dias Depois da Aplicação). Temperatura: $27,48 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$, UR: $71,06 \pm 0,35\%$ e fotofase: 13h

Figura 15 - Mortalidade de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B, aos 22 dias após a infestação, em plantas de tomateiro com diferentes épocas de infestação em relação ao dia da aplicação da nanoformulação NC L5-2, com nanocápsulas de PCL, aplicada no solo em casa de vegetação. DAA (Dias Antes da Aplicação); DA (Dia da Aplicação); DDA (Dias Depois da Aplicação). Temperatura: $27,48 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$, UR: $71,06 \pm 0,35\%$ e fotofase: 13h

Figura 16 - Mortalidade - Mortalidade de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B, aos 22 dias após a infestação, em plantas de tomateiro com diferentes épocas de infestação em relação ao dia da aplicação da nanoformulação NC L5-3, com nanocápsulas de PCL, aplicada no solo em casa de vegetação. DAA (Dias Antes da Aplicação); DA (Dia da Aplicação); DDA (Dias Depois da Aplicação). Temperatura: $27,48 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$, UR: $71,06 \pm 0,35\%$ e fotofase: 13h

Figura 17 - Mortalidade de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B, aos 22 dias após a infestação, em plantas de tomateiro com diferentes épocas de infestação em relação ao dia da aplicação da nanoformulação NC L6-1, com nanocápsulas de PHB, aplicada no solo em casa de vegetação. DAA (Dias Antes da Aplicação); DA (Dia da Aplicação); DDA (Dias Depois da Aplicação). Temperatura: $27,48 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$, UR: $71,06 \pm 0,35\%$ e fotofase: 13h

4.6 Detecção e quantificação de azadiractina e de 3-tigloilazadiractol nas plantas de tomateiro tratadas com óleo de nim aplicado via sistêmica

Os cromatogramas XIC (*Extracted Ion Chromatogram*) de MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) das partes das plantas onde foi aplicada apenas água não apresentaram, como esperado, as transições selecionadas correspondentes à fragmentação da azadiractina e do 3-tigloilazadiractol. Já a análise das partes das plantas tratadas com solução contendo 302,4 ppm de azadiractina permitiu detectar a presença de picos com transições características da azadiractina (Aza A) e do 3-tigloilazadiractol (Aza B), em menor quantidade, provavelmente devido à maior concentração daquela no óleo de nim aplicado ou pela degradação da Aza B (Figuras 18 a 21).

A maior quantidade de azadiractina concentrou-se na parte superior das plantas, visto que 6,02 ppm foram encontrados no caule superior e 3,52 ppm nas folhas superiores, enquanto que no caule inferior os teores de Aza A e Aza B provavelmente estavam abaixo do limite de detecção do método MRM e por isso, não foi possível a quantificação (Tabela 18).

Tabela 18 - Teor de azadiractina encontrado nas diferentes partes do tomateiro tratado com solução de óleo nim a 302,4 ppm de azadiractina no solo

Material vegetal	Teor de azadiractina (ppm)
Raiz	2,63
Caule inferior	-
Folhas inferiores	4,10
Caule superior	6,02
Folhas superiores	3,52

Thoeming, Draeger e Poehling (2006) encontraram tanto resultados que corroboram os dados obtidos no presente estudo, quanto resultados diferentes. Essa contradição aparente deu-se pelo fato de os autores realizarem experimentos com dois tipos diferentes de substrato no transplante de mudas de feijoeiro. As plantas em ambos os tipos de substratos foram tratadas com solução contendo 10 mg de azadiractina e 1,2 mg de 3-tigloilazadiractol presente no óleo comercial NeemAzal-U[®] por pote de planta. Para as plantas que foram transplantadas para um substrato comercial rico em matéria orgânica, o pico de concentração de azadiractina nas folhas superiores se deu aos dois dias após a aplicação (0,3% da quantia original aplicada), assim como para as folhas inferiores, onde a concentração foi maior (0,6%). As

maiores concentrações foram encontradas quatro dias após a aplicação na raiz (6,5%) e no caule (2,7%), porém este não foi separado em superior e inferior, como no presente trabalho. Já para as plantas transplantadas para a mistura do substrato comercial com areia (1:1 (p:p)), quatro dias após a aplicação ocorreu o pico de concentração de azadiractina no caule e nas folhas inferiores e superiores (3,4; 2,8 e 7,1%, respectivamente), as quais apresentaram a maior concentração. O pico de concentração na raiz ocorreu dois dias após a aplicação (2,3%). De acordo com os autores, o segundo substrato permitiu que a azadiractina se translocasse mais rapidamente para as folhas devido a maior quantidade de água disponível na mistura, uma vez que a absorção pelas raízes depende da disponibilidade de água e dos compostos ativos livres na rizosfera, o que pode explicar a remoção mais rápida das raízes e o maior acúmulo nas folhas. Os dados do presente trabalho assemelham-se aos resultados obtidos com o substrato que continha maior quantidade de matéria orgânica, principalmente pela presença da terra, que mantém os compostos ativos adsorvidos. Segundo os autores, isso poderia ter facilitado uma liberação lenta a partir de matéria orgânica para a rizosfera e limitado a absorção pelas raízes. A terra de barranco foi utilizada para evitar a perda de material no momento da irrigação e para assemelhar-se mais ao substrato de plantio da cultura do tomateiro.

Em relação ao composto 3-tigloilazadiractol, as maiores concentrações encontradas foram nas folhas inferiores, seguidas das folhas superiores, como demonstram as figuras que se seguem. Concentrações maiores de 3-tigloilazadiractol nas folhas também ocorreram no trabalho de Thoeming, Draeger e Poehling (2006), sendo que nas plantas com mistura de substrato e areia a concentração foi maior nas folhas inferiores (7,1% da quantia original aplicada) e naquelas com substrato puro a maior concentração se deu nas folhas superiores (3,1%). De acordo com os autores, a translocação da azadiractina e do 3-tigloilazadiractol na planta segue distribuição temporal diferente do pico de concentração depois da aplicação no solo. A azadiractina apresenta translocação rápida para todas as partes da planta, enquanto que o do 3-tigloilazadiractol apresenta pico primeiramente nas raízes e no caule e só depois nas folhas.

Dos 6,048 mg de azadiractina aplicados no solo, foi detectado apenas 0,000677 mg somando-se o composto encontrado em todas as partes da planta analisada, o que equivale a um valor de 0,01%. Thoeming, Draeger e Poehling (2006) encontraram porcentagens superiores de azadiractina em relação ao presente estudo, contudo, estes valores ainda foram baixos. A baixa quantidade de azadiractina encontrada na planta pode ter ocorrido devido a vários fatores como à retenção do composto no solo, onde pode ter sido degradado antes que

translocasse; à detoxificação do ingrediente ativo pela planta com a formação de subprodutos, impedindo a detecção; e ao metabolismo da planta devido às condições ambientais, que pode ter exigido menor absorção de substâncias do solo pelas raízes.

Mesmo a azadiractina não tendo sido detectada em grande quantidade, a mortalidade ocorrida no ensaio da CL_{50} , do qual as plantas utilizadas se originaram, foi superior a 90%, fato que leva a especular sobre a possibilidade de os subprodutos da degradação da azadiractina exercerem bioatividade sobre as ninfas de mosca-branca, e/ou de haver sinergismo da azadiractina com outros compostos presentes no óleo, como o 3-tigloilazadiractol. O trabalho de Thoeming, Draeger e Poehling (2006) resultou em elevada mortalidade de ninfas L2 do trips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). Segundo os autores, a quantidade de matéria orgânica no substrato influenciou na mortalidade, uma vez que nas duas concentrações testadas (50 mg L^{-1} e 100 mg L^{-1} de azadiractina), a mortalidade foi maior nas plantas com a mistura de substrato e areia (71 e 95%) do que naquelas em substrato com maior quantidade de matéria orgânica (57 e 86%).

Figura 18 - Cromatograma XIC de MRM para raiz do tomateiro. Em vermelho, transição predominante de azadiractina. Em verde, transição predominante de 3-tigloilazadiractol

Figura 19 - Cromatograma XIC de MRM para caule superior do tomateiro. Em vermelho, transição predominante de azadiractina. Em verde, transição predominante de 3-tigloilazadiractol

Figura 20 - Cromatograma XIC de MRM para as folhas inferiores do tomateiro. Em vermelho, transição predominante de azadiractina. Em verde, transição predominante de 3-tigloilazadiractol

Figura 21 - Cromatograma XIC de MRM para as folhas superiores do tomateiro. Em vermelho, transição predominante de azadiractina. Em verde, transição predominante de 3-tigloilazadiractol

5 CONCLUSÕES

Para as condições em que os bioensaios foram conduzidos é possível concluir que:

- A ação sistêmica de óleos e nanoformulações contendo compostos de nim sobre ninfas da mosca-branca *Bemisia tabaci* biótipo B depende das condições ambientais em que são aplicados.
- Entre as 19 nanoformulações testadas, as mais eficientes são: NC L5-2, com nanocápsulas de PCL e NC L6-1, com nanocápsulas de PHB, ambas em suspensão aquosa.
- O óleo comercial de nim, Azamax[®], não afeta a oviposição e a viabilidade dos ovos da mosca-branca quando aplicado no solo no momento da infestação.
- As nanoformulações selecionadas (NC L5-2 e NC L6-1) e a NC L5-3, com nanocápsulas de PCL em pó, são tão eficazes quanto o Azamax[®], no controle de ninfas de *B. tabaci* biótipo B.
- Dependendo das condições ambientais, os compostos inseticidas presentes nas NC L5-2, NC L5-3, NC L6-1 e no óleo comercial Azamax[®] com teor de azadiractina enriquecido podem ocasionar mortalidade de 50%, no mínimo, da mosca-branca, mesmo cerca de 30 dias após a aplicação.
- Quando soluções de azadiractina e 3-tigloilazadiractol são aplicadas no solo, as maiores concentrações da primeira substância são encontradas na parte superior da planta e da segunda nas folhas inferiores.
- A azadiractina transloca-se mais rapidamente na planta quando comparada ao 3-tigloilazadiractol.

REFERÊNCIAS

- ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): Formulation and process optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 309, p. 178–188, 2006.
- ALBERGARIA, N.M.M.S.; CIVIDANES, F.J. Exigências térmicas de *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 359-363, 2002.
- ALMEIDA, A.E.F.S.; FERREIRA, O.P. Poliuretana derivada de óleos vegetais exposta ao intemperismo artificial. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 16, n. 3, p. 252-256, 2006.
- ANTÔNIO, N.N. **Estudo dos mecanismos de despolimerização térmica do poli(metacrilato de metila)**: escolha de solventes compatíveis com PMMA. 2007. 53 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior Técnico, Lisboa, 2007. Disponível em: <<https://dspace.ist.utl.pt/bitstream/2295/143452/1/Dissertacao.pdf>>. Acesso em: 04 jan. 2012.
- AZEVEDO, M.M.M. **Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos**. 2008. 20 p. Monografia (Graduação em Química - Bacharelado) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008. Disponível em: <http://lqes.iqm.unicamp.br/images/vivencia_lqes_monografias_marcelo_nanoesferas.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2008.
- BELLOWS JR., T.S.; PERRING, T.M.; GILL, R.J.; HEADRICK, D.H. Description of a species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 87, p. 195-206, 1994.
- BENNETT, S.H. The behaviour of systemic insecticides applied to plants. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 2, p. 279-296, 1957.
- BEZERRA-SILVA, G.C.D.; VENDRAMIM, J.D.; SILVA, M.A.; DIAS, C.T.S. Efeito de extratos orgânicos de Meliaceae sobre *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B em tomateiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, p. 477-485, 2010.
- BHATTACHARYA, D.; RAJINDER, G. Nanotechnology and potential of microorganisms. **Critical Review in Biotechnology**, Boca Raton, v. 25, n. 4, p. 199-204, 2005.

BINK-MOENEM, R.M.; MOUND, L.A. Whiteflies: diversity, biosystematics and evolutionary patters. In: GERLING, D. (Ed.). **Whiteflies: their bionomics, pests status and management**. Wimborne: Intercept, 1990. chap. 1, p. 1-12.

BOEKE, S.J.; BOERSMA, M.G.; ALINK, G.M.; VAN LOONA, J.J.A.; VAN HUIS, A.; DICKE, M.; RIETJENS, I.M.C.M. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. **Journal of Ethnopharmacology**. Lausanne, v. 94, p. 25-41, 2004.

BROWN, J.K.; FROHLICH, D.R.; ROSELL, R.C. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 40, p. 511-534, 1995.

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

BYRNE, D.N.; BELLOWS JR, T.S. Whitefly biology. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 36, p. 431-457, 1991.

BYRNE, D.N.; BELLOWS JR, T.S.; PARRELLA, M.P. Whiteflies in agricultural systems. In: GERLING, D. (Ed.) **Whiteflies: their bionomics, pests status and management**. Wimborne: Intercept, 1990. chap. 10, p. 227-261.

CARVALHO, S.S.; VENDRAMIM, J.D.; PITTA, R.M.; FORIM, M.R. Efficiency of neem oil nanoformulations to *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 193-202, 2012.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. **Progress in Polymer Science**, Pittsburgh, v. 23, p. 1273-1335, 1998. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6TX2-3V51F22-4-T&_cdi=5578&_user=5674931&_orig=browse&_coverDate=11%2F30%2F1998&_sk=999769992&view=c&wchp=dGLzVtb-zSkzk&md5=7a443080dd004e913d61225718e83cf6&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2009.

CHIELLINI, E.; SOLARO, R. Biodegradable polymeric materials. **Advanced Materials**, Weinheim, v. 8, n. 4, p. 305-313, 1996. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/109745187/PDFSTART>>. Acesso em: 18 nov. 2009.

CHU, D.; ZHANG, Y.J.; BROWN, J.K.; CONG, B.; XU, B.Y.; WU, Q.J.; ZHU, G.R. The introduction of the exotic Q biotype of *Bemisia tabaci* from the mediterranean region into China on ornamental crops. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 89, n. 2, p. 168-174, 2006.

COSTA, E.L.N.; SILVA, R.F.P.; FIUZA, L.M. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. **Acta Biologica Leopoldensia**, São Leopoldo, v. 26, n. 2, p. 173-185, 2004.

COUDRIET, D.L.; PRABHAKER, N.; MEYERDIRK, D.E. Sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae): effects of neem-seed extract on oviposition and immature stages. **Environmental Entomology**, College Park, v. 14, n. 6, p. 776-779, 1985.

DITTRICH, V.; ERNEST, G.H.; RUESCH, O.; UK, S. Resistance mechanisms in sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Sudan, Turkey, Guatemala, and Nicaragua. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 83, n. 5, p. 1665-1670, 1990a.

DITTRICH, V.; UK, S.; ERNEST, G.H. Chemical control and insecticide resistance in whiteflies. In: GERLING, D. (Ed.) **Whiteflies: their bionomics, pests status and management**. Winborne: Intercept, 1990b. chap. 11, p. 263-285.

EICHELKRAUT, K.; CARDONA, C. Biología, cría masal y aspectos ecológicos de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae), como plaga del frijol común. **Turrialba**, San José, v. 39, n. 1, p. 51-55, 1989.

FANCELLI, M.; VENDRAMIM, J.D.; LOURENÇÃO, A.L.; DIAS, C.T.S. Atratividade e preferência para oviposição de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) biótipo B em genótipos de tomateiro. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 319-328, 2003.

FERREIRA, F.T.R. **Bioatividade de nanoformulações de nim e extratos de outras Meliaceae e sua interação com agentes de controle biológico visando ao controle de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)**. 2011. 176 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

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

FINNEY, D.J. **Probit analysis**. 3rd ed: Cambridge: Cambridge University Press, 1971. 333p.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **AGRIANUAL 2012**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2012. 447 p.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.P.R.; 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.

GENTZ, M.C.; MURDOCH, G.; KING, G.F. Tandem use of selective insecticides and natural enemies for effective, reduced-risk pest management. **Biological Control**, Orlando, v. 52, p. 208-215, 2010.

GRIMALT, S.; THOMPSON, D.G.; COPPENS, M.; CHARTRAND, D.T.; SHORNEY, T.; MEATING, J.; SCARR, T. Analytical study of azadirachtin and 3-tigloylazadirachtol residues in foliage and phloem of hardwood tree species by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 15, p. 8070-8077, 2011.

HILJE, L.Q. **Metodologías para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus**. Turialba: CATIE, 1996. 133 p.

LAGUNES, T.A.; RODRÍGUEZ, H.C. **Busqueda de tecnología apropiada para el combate de plagas del maíz almacenado em condiciones rústicas**. Chapingo: [s.n.], 1989. 150 p.

LEORA SOFTWARE. **POLO-PC**: a user's guide to Probit Logit analysis. Berkeley, 1987.

LOURENÇÃO, A.L.; NAGAI, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, v. 53, n. 1, p. 53-59, 1994.

MARCOMINI, A.M. **Bioatividade e efeito residual de nanoformulações de nim sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)**. 2009. 83 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MARTINEZ, S.S. (Ed.). **O nim: *Azadirachta indica* - natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: Instituto Agronômico do Paraná, 2011. 205 p.

MATTOSO, L.H.C.; MEDEIROS, E.S.; MARTIN NETO, L. A revolução nanotecnológica e o potencial para o agronegócio. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, ano 14, n. 4, p. 38-46, 2005.

MOHANPURIA, P.K.; RANA, N.K.; YADAV, S.K. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. **Journal of Nanoparticle Research**, Amsterdam, v. 10, n. 3, p. 507-517, 2008.

MOINARD-CHÉCOT, D.; CHEVALIER, Y.; BRIANÇON, S.; BENEY, L.; FESSI, H. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion-diffusion process. **Journal of Colloid and Interface Science**, Maryland Heights, v. 17, n. 2, p. 458-468, 2008.

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

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.

MORGAN, E.D. Azadirachtin, a scientific gold mine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, San Diego, v. 17, p. 4096-4105, 2009.

NAUEN, R.; DENHOLM, I. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 58, n. 4, p. 200-215, 2005.

NAVA-CAMBEROS, U.; RILEY, D.G.; HARRIS, M.K. Temperature and host plant effects on development, survival, and fecundity of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 30, n. 1, p. 55-63, 2001.

OLIVEIRA, M.S.S.; ROEL, A.R.; ARRUDA, E.J.; MARQUES, A.S. Eficiência de produtos vegetais no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 326-331, 2007.

ORTEGA ARENAS, L.D. **Control alternativo de mosca blanca**. Texcoco: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, 2001. 16p. (Folheto Técnico).

PATEL, H.M.; JHALA, R.C.; PANDYA, H.V.; PATEL, C.B. Biology of whitefly (*Bemisia tabaci*) on okra (*Hibiscus esculentus*). **Indian Journal of Agricultural Science**, New Delhi, v. 62, n. 7, p. 497-499, 1992.

PRABHAKER, N.; COUDRIET, D.L.; MEYERDIRK, D.E. Insecticide resistance in the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 78, n. 4, p. 748-752, 1985.

PRABHAKER, N.; TOSCANO, N.C.; HENNEBERRY, T.J. Evaluation of insecticide rotations and mixtures as resistance management strategies for *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 91, p. 820-826, 1998.

_____. Comparison of neem, urea, and amitraz as oviposition suppressants and larvicides against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 92, n. 1, p. 40-46, 1999.

QUINTELA, E.D.; PINHEIRO, P.V. Redução da oviposição de *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Homoptera: Aleyrodidae) em folhas de feijoeiro tratadas com extratos botânicos. **BioAssay**, Londrina, v. 4, n. 8, p. 1-10, 2009.

RIYAJAN, S.A.; 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**, Heidelberg, v. 63, n. 4, p. 609-622, 2009.

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 & Tecnologia**, Piracicaba, v. 15, p. 75-80, 2000.

SANTOS, R.M.M.; FIALHO, S.L. Nanopartículas: uma alternativa para a administração de biofármacos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, ano 10, n.37, p. 52-59, 2007.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHMUTTERER, H. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 34, n. 1, p.713-719, 1988.

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

SOUZA, A.P. **Atividade inseticida e modo de ação de extratos de meliáceas sobre *Bemisia tabaci* (Genn., 1889) biótipo B**. 2004. 101 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

SOUZA, A.P.; VENDRAMIM, J.D. Atividade ovicida de extratos aquosos de meliáceas sobre a mosca branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B em tomateiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 403-406, 2000a.

_____. Efeito de extratos aquosos de meliáceas sobre *Bemisia tabaci* biótipo B em tomateiro. **Bragantia**, Campinas, v. 59, p. 173-179, 2000b.

_____. Efeito translaminar, sistêmico e de contato de extrato aquoso de sementes de nim sobre *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B em tomateiro. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 1, p. 83-87, 2005.

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

SYNGENTA. Disponível em:

<<http://www.syngentacropprotection.com/prodrender/index.aspx?prodid=420>>. Acesso em: 23 nov. 2008.

TAKAHASHI, K.M.; BERTI FILHO, E.; LOURENÇÃO, A.L. Biology of *Bemisia tabaci* (Genn.) B-biotype and parasitism by *Encarsia formosa* (Gahan) on collard, soybean and tomato plants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 6, p. 639-642, 2008.

THOEMING, G.; DRAEGER, G.; POEHLING, H.M. Soil application of azadirachtin and 3-tigloyl-azadirachtol to control western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae): translocation and persistence in bean plants. **Pest Management Science**, Sussex, v. 62, p. 759-767, 2006.

TORRES, L.C.; SOUZA, B.; AMARAL, B.B.; TANQUE, R.L. Biologia e não-preferência para oviposição por *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em cultivares de algodoeiro. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, n. 3, p. 445-453, 2007.

VENDRAMIM, J.D. Plantas inseticidas In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., 1997, Salvador. **Resumos...** Salvador: SEB, 1997. p.10.

VILLAS-BÔAS, G.V.; FRANÇA, F.H.; ÁVILA, A.C. de; BEZERRA, I.C. **Manejo integrado da mosca-branca *Bemisia argentifolii***. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 1997. 11 p. (Circular Técnica, 9).

WIESBROOK, M.L. Natural indeed: are natural insecticides safer and better than conventional insecticides? **Illinois Pesticide Review**, Urbana, v. 17, n. 304.