



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**NANOFORMULAÇÕES À BASE DE ÓLEO ESSENCIAL DE
Lippia sidoides E TIMOL PARA O MANEJO DE POPULAÇÕES
DE *Sitophilus zeamais***

ALEXANDRE PASSOS OLIVEIRA

2016



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

ALEXANDRE PASSOS OLIVEIRA

**NANOFORMULAÇÕES À BASE DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides* E
TIMOL PARA O MANEJO DE POPULAÇÕES DE *Sitophilus zeamais***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador
Prof. Dr. Leandro Bacci

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2016

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

O48n Oliveira, Alexandre Passos.
Nanoformulações à base de óleo essencial de *Lippia sodoides* e timol para o manejo de populações de *Sitophilus zeamais* / Alexandre Passos Oliveira; orientador Leandro Bacci. – São Cristóvão, 2016.
32 f.

Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade)–
Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1. Essências e óleos essenciais. 2. Inseticidas. 3. Nanotecnologia. 4. Milho – Doenças e pragas. I. Bacci, Leandro, orient. II. Título.

CDU 665.52/.54:632.951

ALEXANDRE PASSOS OLIVEIRA

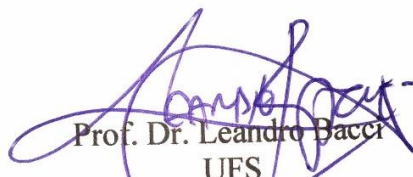
**NANOFORMULAÇÕES À BASE DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides* E
TIMOL PARA O MANEJO DE POPULAÇÕES DE *Sitophilus zeamais***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

APROVADA em 29 de Julho de 2016

Prof. Dr. Vinícius Albano Araújo
UFRJ

Dra. Shênia Santos Silva
EMBRAPA



Prof. Dr. Leandro Bacci
UFS
(Orientador)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

*Aos meus pais pelo amor e apoio
incondicional*
Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me dar a dádiva da vida e por me dar forças nos momentos de fragilidade, tornando possível seguir sempre em frente, encarando as dificuldades impostas pela vida.

À Universidade Federal de Sergipe e ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade, pela oportunidade de fazer esse mestrado.

As agências financiadoras, em especial ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por conceder a bolsa de estudos, a FAPITEC e a CAPES pelos recursos financeiros cedidos.

Ao meu orientador professor Dr. Leandro Bacci que se tornou mais que um orientador, se tornou um amigo. Obrigado pela confiança, ensinamentos, conselhos, paciência e atenção em todos os anos de convívio. A sua esposa, a professora Dr. Ana Paula Albano Araújo, agradeço pelos conhecimentos transmitidos.

A meu pai Jose Carlos (Pio) e a minha mãe Sônia por todos os anos de amor, carinho, compreensão e apoio em todas as decisões que tomei em minha vida, por muitas das vezes abriram mão de algo para si próprio para tornar possível algo para mim. Te amo, meus pais. Ao meu irmão Eric pelos momentos de descontração e alegria.

Agradeço a minha namorada Mayara por toda demonstração de paciência, companheirismo, confiança, amor, compreensão e carinho em diversos momentos em que estive ocupado e estressado. Obrigado também por diversas vezes me acompanhar em alguns finais de semana na avaliação dos experimentos. Seu apoio foi fundamental para a realização e finalização dessa etapa, você é muito importante para mim. Aos pais de Mayara, Sr. Airton e Dona Aparecida, agradeço por toda atenção e carinho.

A tia Solange e padrinho Marcio, pelo amor transmitido, por todos os momentos de alegria proporcionados e pelos conselhos dados. A tia Soneide e Adelson pelo carinho e atenção. Aos meus primos maternos Genacto, Ane Larissa, Ysleide, Dara e Maycon pelos finais de semana de diversão e lazer, muito obrigado.

Aos meus avós paternos, João Oliveira e Dalvina, pela paz interior que demonstra e pelo amor ao próximo. Vocês são modelos de vida para qualquer pessoa. E aos meus avós maternos, João Corró e Dete pelos conselhos passados, preocupação e amor.

Muito obrigado a família Oliveira, que por ser muito grande não citarei nomes, por acreditarem em mim e pela demonstração de carinho.

Agradeço também a todos que fazem parte da Clínica Fitossanitária: Abraão, Ane, Ângela, Ana Paula, Alisson, Bia, Bruna, Carlisson, Emile, Lucas, Morgana, Ruan, Victor e Wallace por todos esses anos de convivência, paciência e momentos de descontração e muitos trabalhos vividos. Acho que sem essa família construída entre nós, nos apoiando sempre que possível e descontraindo, não aguentaria todos os problemas e pressão enfrentados. Agradeço também aos mestrandos que passaram pela Clínica Fitossanitária Anderson, Fabiana, Janaína, Roseane, Elânia e Felipe, pelas experiências e conhecimentos transmitidos.

Agradeço as novas amigas construídas ao longo desse mestrado, dentre elas, a Camila e Nayara, obrigado por toda atenção e pelos momentos de descontração, sejam eles no trabalho em campo, no qual foi surreal, sejam eles até altas horas no laboratório contando cupins. Foi uma experiência cansativa, mas divertida. Também agradeço a Mariana e Daniel pela amizade construída ao longo desse mestrado.

Aos meus amigos de infância, de colégio e das peladas de futebol, não citarei nomes para não ser injusto de esquecer alguém, agradeço pela amizade e pelos momentos de lazer.

Agradeço a Associação Olímpica de Itabaiana por sua existência e por me proporcionar diversos momentos de emoção, nas quais é uma mistura de tristeza (principalmente nas derrotas) e alegria (nas vitórias), muito amor e vibração, tornando meus finais de semana mais alegres ao apenas o acompanhar onde quer que esteja. Agradeço também a todos meus amigos que pertence à torcida intitulada Chapeleiros Tricolores pela

amizade e pelos momentos de vibração e loucuras atrás de nossa amada Associação Olímpica de Itabaiana.

Agradeço a todos os professores que passaram por minha vida. Muito obrigados por todos os ensinamentos e conhecimentos passados.

“O conhecimento
caminha lento feito lagarta.
Primeiro não sabe que sabe
e voraz contenta-se com cotidiano orvalho
deixado nas folhas vividas das manhãs.

Depois pensa que sabe
e se fecha em si mesmo:
faz muralhas,
cava trincheiras,
ergue barricadas.

Defendendo o que pensa saber
levanta certeza na forma de muro,
orgulha-se de seu casulo.

Até que maduro
explode em voos
rindo do tempo que imagina saber
ou guardava preso o que sabia.

Voa alto sua ousadia
reconhecendo o suor dos séculos
no orvalho de cada dia.

Mas o voo mais belo
descobre um dia não ser eterno.
É tempo de acasalar:
voltar à terra com seus ovos
à espera de novas e prosaicas lagartas.

O conhecimento é assim:
ri de si mesmo
e de suas certezas.
É meta de forma
metamorfose
movimento
fluir do tempo
que tanto cria como arrasa

a nos mostrar que para o voo
é preciso tanto o casulo
como a asa.”

Aula de vôo - Mauro Iasi

BIOGRAFIA

ALEXANDRE PASSOS OLIVEIRA, filho de José Carlos Oliveira e Sônia Maria Passos Oliveira, nasceu em Itabaiana, no estado de Sergipe, no dia 29 de novembro de 1992.

Cursou o ensino fundamental no Colégio Dimensão e o ensino médio no Colégio Alternativo concluindo-o em 2009, ambos situados em Itabaiana-SE.

Em março de 2010 ingressou no curso de Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Sergipe. Em Julho de 2014, concluiu a graduação em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, onde foi bolsista de iniciação científica na clínica fitossanitária, sob orientação do Prof Dr. Leandro Bacci, entre os anos de 2010 e 2014.

Em agosto de 2014, iniciou o mestrado no Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	5
2. REFERENCIAL TEÓRICO	7
2.1 Manejo de pragas de grãos armazenados.....	7
2.2 Gorgulho-do-milho <i>Sitophilus zeamais</i>	7
2.3 Resistência de populações de <i>S. zeamais</i>	8
2.4 Óleos essenciais como alternativa para o controle de pragas	8
2.5 Óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>	9
2.6 Nanoformulações	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Populações de <i>S. zeamais</i>	12
3.2 Óleo essencial de <i>L. sidoides</i>	12
3.3 Protótipo das nanoformulações.....	12
3.3.1 Caracterização química e física	13
3.3.2 Microscopia de luz polarizada	13
3.4 Bioensaios	13
3.4.1 Toxicidade aguda	13
3.4.2 Taxa instantânea de crescimento (ri) e consumo de grãos.....	14
3.4.3 Eficácia das nanoformulações ao longo do tempo.....	14
3.5 Análises estatísticas	14
4. RESULTADOS	15
4.1 Caracterização química do óleo essencial e da nanoformulação	15
4.2 Caracterização física das nanoformulações	15
4.3 Dose letal	15
4.4 Tempo letal	16
4.5 Eficiência das nanoformulações ao longo do tempo	16
4.6 Taxa instantânea de crescimento (ri) e consumo de grãos.....	16
5. DISCUSSÃO	16
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
ANEXOS	26

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Locais de coleta das cinco populações do gorgulho-do-milho <i>Sitophilus zeamais</i> oriundas de todas as regiões brasileiras (Nordeste: Aracaju-SE, Sul: Jacarezinho-PR, Norte: Rio Branco-AC, Centro-oeste: Maracaju-MS e Sudeste: Sete Lagoas-MG).	26
2	Imagem obtida por microscopia de luz polarizada e propriedades físicas das nanoformulações de <i>Lippia sidoides</i> (A) e timol (B)	28
3	Curvas de sobrevivência e tempo letal (TL ₅₀) das populações de <i>Sitophilus zeamais</i> provenientes de Maracaju (A) e Jacarezinho (B) expostas por aplicação tópica (DL ₉₅) ao óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> , timol e suas nanoformulações	30
4	Taxa instantânea de crescimento (ri) e consumo de grãos de milho (g) das populações de <i>Sitophilus zeamais</i> provenientes de Maracaju (A e C) e Jacarezinho (B e D) após 90 dias de exposição às nanoformulações contendo o óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> e timol em diferentes concentrações	31
5	Mortalidade das populações de <i>Sitophilus zeamais</i> provenientes de Maracaju e Jacarezinho expostas por aplicação tópica (DL ₉₀) as nanoformulações contendo o óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> e timol armazenadas por 210 dias	32

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Composição química do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> (antes do preparo da nanoformulação) e do óleo na nanoformulação ao longo do tempo de armazenamento.	27
2	Toxicidade por aplicação tópica do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> , do timol e de suas nanoformulações sobre adultos de populações de <i>Sitophilus zeamais</i> após 72 horas de exposição.....	29

RESUMO

OLIVEIRA, Alexandre Passos. **NANOFORMULAÇÕES À BASE DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides* E TIMOL PARA O MANEJO DE POPULAÇÕES DE *Sitophilus zeamais***. São Cristóvão: UFS, 2016. 32p. (Dissertação - Mestrado em Agricultura e Biodiversidade).

Sitophilus zeamais é uma praga de importância mundial que ocasiona danos em grãos durante sua produção e estocagem. Um dos principais problemas da utilização de inseticidas organosintéticos, usados para o controle desta praga, consiste no desenvolvimento de populações de insetos resistentes. Óleos essenciais de plantas tem sido considerados uma boa alternativa ao manejo convencional, porém sua utilização direta apresenta limitações devido à instabilidade de sua composição e a alta volatilidade. Neste sentido, a tecnologia de produção de nanoformulações pode aumentar a potencialidade do uso dos óleos essenciais e seus compostos por aumentar a eficiência e a estabilidade destes compostos. No presente estudo analisamos os efeitos letais e subletais do óleo essencial de *Lippia sidoides*, de seu composto majoritário (timol) e de protótipos de nanoformulações a base destes compostos sobre populações de *S. zeamais* ($N = 5$) provenientes de diferentes regiões do Brasil. A composição química do óleo essencial e da nanoformulação foram analisadas por CG/EM/DIC. O delineamento experimental inteiramente casualizado, consistiu em quatro repetições para cada combinação de tratamento \times população de *S. zeamais*. Bioensaios de toxicidade aguda foram conduzidos em placas de Petri (6 x 1,5 cm) contendo 10 adultos não sexados. As doses letais (DL_{50} e DL_{90}) e o tempo letal (TL_{50}) foram determinados em bioensaios de aplicação tópica. Para a eficiência do armazenamento das nanoformulações utilizou-se a DL_{95} . Nos bioensaios de crescimento populacional e consumo de grãos foram utilizadas diferentes concentrações das nanoformulações para o tratamento da massa de grãos. O composto majoritário presente no óleo essencial de *L. sidoides* foi o timol (68,5%). Durante o armazenamento da nanoformulação esse composto aumentou, chegando a até 82% da composição do óleo. As doses letais do óleo essencial de *L. sidoides* necessárias para matar 50% das populações de *S. zeamais* variaram de 7,1 a 19,9 $\mu\text{g mg}^{-1}$. As populações de Jacarezinho e Maracaju foram, respectivamente, a mais tolerante e susceptível ao óleo essencial de *L. sidoides*. Susceptibilidades intermediárias foram observadas para as populações de Aracaju, Rio Branco e Sete Lagoas. O timol apresentou DL_{50} que variou de 17,1 a 25,7 $\mu\text{g mg}^{-1}$. Os protótipos das nanoformulações (18%) contendo óleo essencial de *L. sidoides* e timol apresentaram DL_{50} que variaram de 26,4 a 36 e 20,8 a 27,7 $\mu\text{g mg}^{-1}$, respectivamente. O óleo essencial de *L. sidoides*, o timol e suas nanoformulações atuaram rapidamente sobre as populações de *S. zeamais*. Os tempos letais necessários para matar 50% das populações variaram de 5,8 a 62 horas. Em todos os casos as nanoformulações demoram mais tempo para causar a mesma mortalidade. As nanoformulações causaram mortalidades superiores a 80% nas populações de *S. zeamais* até 210 dias de armazenamento. Concentrações crescentes das nanoformulações ocasionaram redução da taxa intrínseca de crescimento (r_i) e do consumo de grãos das populações de *S. zeamais*. Este trabalho comprova que os protótipos de nanoformulação a base do óleo essencial de *L. sidoides* e seu composto majoritário são promissores para o manejo de populações de *S. zeamais* uma vez que demonstraram alta eficácia, liberação lenta das substâncias e boa estabilidade no armazenamento.

Palavras-chave: Verbenaceae, inseticidas botânicos, controle alternativo, inseto, gorgulho-do-milho, grãos armazenados.

* Comitê Orientador: Leandro Bacci – UFS (Orientador).

ABSTRACT

OLIVEIRA, Alexandre Passos. **NANOFORMULATIONS BASED ON ESSENTIAL OIL OF *Lippia sidoides* AND THYMOL TO THE MANAGEMENT OF *Sitophilus zeamais* POPULATIONS.** São Cristóvão: UFS, 2016. 32p. (Dissertation - Master of Science in Agriculture and Biodiversity).

Sitophilus zeamais is a global important pest-insect, known for the losses that it causes during production and grain storage. One of the main problems caused by synthetic pesticides use is the development of resistant insect populations. Essential oils of plants have been considered a promising alternative to the conventional management of pests insects, however, its direct application has limitations due to the instability of its composition and high volatility. According to this, the technology of nanoformulations production can increase the potential of essential oil use, and its compounds, by increasing the efficiency, and stability of these compounds. The aim of this study was evaluate the lethal and sub lethal effects of *Lippia sidoides* essential oil, its majoritary compound (thymol), and nanoformulations of essential oil based prototypes, under *S. zeamais* populations ($N = 5$) from different regions of Brazil. The chemical composition of the essential oil, and nanoformulation was analyzed by GC/MS/DIC. The completely random design consisted in four replications for each combination of treatment x populations of *S. zeamais*. Bioassays of acute toxicity were conducted in Petri dishes (6 x 1,5 cm) with 10 unsexed adults. The lethal doses (LD₅₀ and LD₉₀), and the lethal time (LT₅₀) were obtained through topic application bioassays. To the nanoformulation storage efficiency was used the LD₉₅. On the population growth, and grain consume bioassays were used different concentrations of nanoformulations to mass grain treatment. The major compound present in the *L. sidoides* essential oil was thymol (68.5%). During nanoformulation storage, the concentration of these compound increased, getting to 82% of the essential oil composition. *L. sidoides* essential oil lethal doses, needed to kill 50% of *S. zeamais* populations, vary between 7.1 to 19.9 $\mu\text{g mg}^{-1}$. Jacarezinho, and Maracaju populations were, respectively, the most tolerant and susceptible populations to *L. sidoides* essential oil. Intermediates susceptibilities were observed to Aracaju, Rio Branco, and Sete Lagoas populations. To thymol LD₅₀ were observed variations between 17.1 to 25.7 $\mu\text{g mg}^{-1}$. To nanoformulations prototypes (18%) containing *L. sidoides* essential oil, and thymol were observed LD₅₀ variations between 26.4 to 36 e 20.8 a 27.7 $\mu\text{g mg}^{-1}$, respectively. *L. sidoides* essential oil, thymol, and their nanoformulations had a fast action under *S. zeamais* populations. Lethal times needed to kill 50% of the population vary between 5.8 to 62 hours. In all of those cases, the nanoformulations took longer to cause the same mortality. The nanoformulations caused mortalities higher than 80% of *S. zeamais* populations of over 210 storage days. Nanoformulations increasing concentrations resulted on intrinsic tax (*ri*), and grain consume reduction of *S. zeamais* populations. This study prove that nanoformulations of *L. sidoides* oil essential based prototypes and its majoritary compound are promising alternatives to the management of *S. zeamais* once these demonstrated high efficacy, low liberation of the substances, and good storage stability.

Key-words: Verbenaceae, botanical insecticides, alternative control, insect, maize weevil, stored grain.

* Supervising Committee: Leandro Bacci – UFS (Orientador).

1. INTRODUÇÃO

As perdas pós-colheita resultantes da atividade de insetos normalmente são irrecuperáveis e consistem em uma crescente restrição de segurança alimentar, especialmente nos países tropicais em desenvolvimento. As infestações, que muitas vezes se iniciam no campo, persistem na fase de armazenamento onde ocasionam perdas consideráveis (20 a 60%) no peso dos grãos e sementes (CASTRO-ÁLVAREZ et al., 2015). Assim, o armazenamento de grãos por longos períodos de tempo, só é possível mediante um manejo eficiente de pragas, a fim de garantir a manutenção do valor de mercado e a qualidade dos produtos estocados.

O gorgulho-do-milho *Sitophilus zeamais* Mots. 1855 (Coleoptera: Curculionidae) é a mais importante praga primária de grãos armazenados no mundo. A infestação de cereais (ex. milho, arroz, trigo) por este inseto ocorre em grãos intactos, no interior dos quais as larvas e adultos alimentam-se (LI et al., 2013; NUKENINE; TOFEL; ADLER, 2011; WEI et al., 2014). Mundialmente, o controle de populações de *S. zeamais* é baseado em aplicações contínuas de inseticidas sintéticos, muitas vezes realizada de forma indiscriminada, o que tem resultado em uma série de problemas, como: índices de resíduos de pesticidas nos grãos acima dos limites aceitáveis e principalmente, a seleção de resistência a esses inseticidas (LI et al., 2013; NUKENINE; TOFEL; ADLER, 2011; WEI et al., 2014).

A resistência de *S. zeamais* aos inseticidas sintéticos e preocupações sobre os riscos associados a estes produtos para a saúde humana têm impulsionado a busca por métodos alternativos de controle desta praga (SOUSA; FARONI; GUEDES, 2016). Dentre algumas alternativas, os óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas - formados por uma ampla variedade de misturas de compostos orgânicos (ex.: monoterpenos e sesquiterpenos) têm sido considerados promissores. Além de possuírem atividade biológica já comprovada sobre vários organismos (ALBUQUERQUE et al., 2013; BACCI et al., 2015; CAMPOS et al., 2015; PEIXOTO et al., 2015); os óleos essenciais ainda são considerados ambientalmente mais seguros (LIMA et al., 2013). Devido ao baixo peso molecular dos seus compostos, os óleos essenciais são altamente voláteis e, conseqüentemente possuem baixa persistência no meio ambiente, apresentando menor toxicidade para organismos não alvo de controle (CAMPOS et al., 2015; FREIRES et al., 2015; LIMA et al., 2013; MONTEFUSCOLI et al., 2014). Por outro lado, algumas características destes compostos (ex. insolubilidade em água, instabilidade química, alta volatilidade, curta atividade residual devido à degradação por temperatura e luz) podem consistir em entraves à sua utilização em situações naturais (ATTIA et al., 2013; GONZÁLEZ et al., 2014; MONTEFUSCOLI et al., 2014).

O desenvolvimento de nanoformulações (gotículas em nanômetro entre 10-100 nm) dos óleos essenciais pode permitir a eficiente utilização destes compostos em situações naturais, uma vez que tal tecnologia protege as substâncias bioativas da degradação e perda por evaporação, além de permitir uma liberação controlada dos compostos (GONZÁLEZ et al., 2014). As nanoformulações podem contribuir ainda, para aumentar a eficácia bioativa dos compostos, por apresentarem maior área de superfície, solubilidade e mobilidade e, menor toxicidade a mamíferos devido à eliminação dos solventes orgânicos, quando comparadas aos inseticidas convencionais (GONZÁLEZ et al., 2015; MONTEFUSCOLI et al., 2014).

Estudos têm demonstrado que o óleo essencial do arbusto *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) - planta nativa do semiárido do nordeste brasileiro - apresenta bioatividade contra diferentes organismos (GOMES et al., 2014; VERAS et al., 2012). Esta bioatividade parece ser devida, pelo menos em parte, ao timol (FARAONE; HILLIER; CUTLER, 2015; MA et al., 2014), composto majoritário do óleo essencial desta planta. No entanto, até o momento, nenhum estudo desenvolveu uma nanoformulação deste óleo essencial de *L. sidoides* para o controle de *S. zeamais*.

Uma vez que populações de insetos são isoladas espacialmente e podem estar sujeitas a diferentes pressões seletivas, espera-se que as mesmas possam apresentar diferentes níveis de tolerância ou susceptibilidade aos inseticidas convencionais ou naturais (ex. óleos

essenciais de plantas). Assim, neste estudo analisamos os efeitos letais e subletais do óleo essencial de *L. sidoides*, de seu composto majoritário e das nanoformulações a base destes compostos sobre populações de *S. zeamais*. Algumas das populações utilizadas aqui já tiveram sua resistência a inseticidas convencionais analisadas (BRAGA et al., 2011; CORRÊA et al., 2011a, 2011b). Os resultados desse trabalho permitirão avaliar não somente a bioatividade do óleo essencial de *L. sidoides* e do seu composto majoritário sobre populações distintas, como também a eficácia e de seus respectivas nanoformulações.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Manejo de pragas de grãos armazenados

Sementes e grãos representam a base da alimentação mundial. Globalmente mais de dois bilhões de toneladas de cereais, oleaginosas e leguminosas são produzidos anualmente para atender a exigências nutricionais de humanos e animais domesticados (JAYAS, 2012; PIMENTEL et al., 2012). No entanto, as perdas destes produtos - desde o plantio até a colheita - (ex. decorrente de fatores como a ação de insetos, doenças, ervas daninhas e clima) são estimadas em aproximadamente 30%. As perdas causadas apenas por insetos podem variar de 10% a 40%. As pragas mais importantes desses produtos pertencem às ordens Lepidoptera e Coleoptera, que causam danos ao alimentarem-se dos grãos, resultando em: perda de peso, baixa germinação, aumento da temperatura e umidade na massa de grãos, como também a contaminação dos produtos por resíduos (fezes e fragmentos do corpo) e obstrução de equipamentos agrícolas (KHANI; ASGHARI, 2012; NEGRISOLI et al., 2013).

Embora várias estratégias de controle de pragas de grãos armazenados sejam utilizadas, o manejo ocorre principalmente através de aplicações de produtos químicos sintéticos, por vias de contato, fumigação ou pulverização com organofosforados, piretróides e reguladores de crescimento. Apesar de eficaz, o repetido e indiscriminado uso desses produtos tem resultado na seleção de mecanismos de resistência, em longo prazo. Este fenômeno contribui para a utilização de doses cada vez maiores para o controle. Por isso, os resíduos de pesticidas sintéticos têm excedido os limites aceitáveis em alimentos e têm poluído o ambiente, afetando diretamente a saúde dos aplicadores e consumidores (BRAGA et al., 2011; JEON; LEE, 2014; WEI et al., 2014).

A resistência aos inseticidas em pragas de grãos armazenados tem sido amplamente registrada em diversos países (COLLINS et al., 2005). No Brasil, as principais pragas de grãos armazenados já apresentam populações resistentes aos inseticidas organossintéticos utilizados no mercado, incluindo produtos não liberados para comercialização no país. Dentre os insetos que possuem populações resistentes, estão incluídos: *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae), *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae), *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera: Laemophloeidae) (PIMENTEL et al., 2007).

Visando diminuir os efeitos adversos das pragas na produção de grãos, novas formas de controle vêm sendo pesquisadas e desenvolvidas. Tais estratégias incluem a utilização de bactérias, fungos, radiação ionizante, ozonização, atmosferas modificadas, e principalmente compostos botânicos, os quais são reconhecidos como alternativas ambientalmente seguras e economicamente viáveis (HALLMAN, 2013; OPPERT; MORGAN; KRAMER, 2011; TIWARI et al., 2010).

2.2 Gorgulho-do-milho *Sitophilus zeamais*

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura única em sua versatilidade, sendo o terceiro cereal mais importante mundialmente. Esta cultura consiste no principal alimento básico e importante fonte da receita econômica de muitos países em desenvolvimento. Já nos países desenvolvidos, constitui importante fonte de alimentação, biocombustível e matéria-prima para indústrias (SULEIMAN et al., 2015). Assim como para os demais grãos, o aumento da produção agrícola do milho, tem sido acompanhado por uma constante busca na manutenção da quantidade e qualidade da produção. No entanto, um dos principais entraves à qualidade de grãos de milho, em regiões tropicais e subtropicais, consiste na infestação por insetos praga (PAES et al., 2012).

O gênero *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae) tem sido bastante estudado por incluir espécies amplamente distribuídas e frequentemente associadas a produtos armazenados. Os gorgulhos atacam diversos produtos armazenados como aveia, centeio, cevada, milho, trigo e raízes de mandioca secas, bem como alimentos processados como massas alimentícias, biscoitos e bolo (MIKAMI; CARPENTIERI-PÍPOLO; VENTURA, 2012; SOUSA; CONTE, 2013; UKEH et al., 2012). O gênero *Sitophilus* possui 14 espécies mas apenas três são consideradas como pragas de importância econômica: *Sitophilus granarius*, o bicudo do arroz *Sitophilus oryzae* e o gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* (CORRÊA et al., 2013).

S. zeamais pode causar danos aos grãos tanto no campo quanto após o armazenamento, com perdas que podem chegar a 60% em seis meses, resultando em diminuição do peso dos grãos acima de 15% (SOUSA; CONTE, 2013).

O *S. zeamais* é um inseto pequeno (2,5 mm a 4 mm), cuja fêmea causa danos aos grãos ao perfurá-los para oviposição. A prole (larvas) se alimentam das partes internas do grão, reduzindo seu peso. Com a perda de peso, o dano causado pela alimentação do gorgulho leva a reduções severas nos valores nutritivos e econômicos, reduzindo a viabilidade da semente, bem como causando contaminação por excreções e fragmentos de seus corpos (SULEIMAN et al., 2015; WEI et al., 2014). Por serem capazes de infestar o grão intacto, *S. zeamais* é considerada uma praga primária de grãos (CHU et al., 2012).

2.3 Resistência de populações de *S. zeamais*

Um dos principais objetos de estudos da biologia evolutiva é o entendimento das adaptações das populações quando expostas às modificações no ambiente. A resistência a inseticidas constitui por duas razões principais: a seleção extremamente intensa e a rápida evolução do fenômeno. Esses dois fatores têm sido também os principais obstáculos a serem superados no manejo satisfatório da resistência em insetos-praga, principalmente se forem considerados os ambientes onde o controle químico é o método mais utilizado, como no caso de pragas de grãos armazenados (OLIVEIRA et al., 2005).

Resistência a pesticidas é importante não só como modelo de micro-evolução adaptativa, mas também devido à sua utilização como estratégia na monitorização biológica *in-situ* de poluição por pesticidas (por causa da associação com o uso de altas dosagens) e à preocupação econômica e ambiental (GUEDES et al., 2010).

Nos locais onde inseticidas têm sido amplamente utilizados, a resistência é evidente em muitas populações de insetos, como por exemplo, *S. zeamais*. A sucessão de inseticidas usados contra *S. zeamais* no Brasil começou com o uso do DDT seguido por organofosforados e piretróides. Este histórico de manejo sugere a possibilidade de múltiplas resistências dentre as populações deste inseto. De fato, o uso excessivo destes inseticidas para o controle do gorgulho do milho conduziu à frequente seleção de resistência nas populações (FRAGOSO; GUEDES; REZENDE, 2003; RIBEIRO et al., 2003). A seleção para resistência a inseticidas é associada com efeitos pleiotrópicos, que podem colocar os insetos resistentes em desvantagem quando o uso de inseticidas é descontinuado, diminuído ou alterado devido aos custos associados de *fitness* (CORRÊA et al., 2011b). Para gerenciar a infestação de insetos pragas de grãos armazenados (assim como de outras culturas), a resistência adquirida dos insetos contra os pesticidas sintéticos e a toxicidade residual de tais produtos, tem ocorrido uma crescente procura por fontes biodegradáveis de pesticidas (JAYA et al., 2014).

2.4 Óleos essenciais como alternativa para o controle de pragas

Nos últimos anos, uma série de estudos tem demonstrado que os produtos derivados de plantas podem consistir em potenciais inseticidas, representando uma alternativa para novos

métodos de controle de pragas (ALBUQUERQUE et al., 2013; BACCI et al., 2015; CAMPOS et al., 2015; LIMA et al., 2013). Uma grande variedade de compostos químicos tem sido estudada como alternativa aos inseticidas convencionais devido ao seu potencial bioativo (GUO et al., 2016; KUMAR et al., 2011; PEIXOTO et al., 2015; SONG et al., 2016). Os óleos essenciais (OEs) de plantas medicinais e aromáticas apresentam ampla variedade de misturas de compostos orgânicos naturais produzidos pelo metabolismo secundário e representam a principal linha de defesa das plantas contra o ataque de herbívoros e patógenos, entre outras funções (ISMAN, 2006; REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2012).

Devido à sua atividade biológica, os OEs podem ser utilizados como aromatizantes, inseticidas (BACCI et al., 2015), acaricidas (CAMPOS et al., 2015), herbicidas, fungicidas, fármacos, dentre outros (CAMPOS et al., 2012).

Os produtos naturais de plantas apresentam uma vasta gama de diferentes compostos, que variam de moléculas relativamente simples à moléculas complexas (STANIEK et al., 2014). Os principais grupos de compostos oriundos do metabolismo secundário das plantas são os terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (IRCHHAIYA et al., 2015), os quais podem representar fontes para novos compostos sintéticos.

A eficiência dos OEs para o controle de insetos é devido em grande parte à sua complexidade e potencial para efeitos sinérgicos ou aditivos entre os componentes que podem conferir diferente modo de ação durante a sua ação pesticida (JAYA et al., 2014). Esta mistura pode contribuir para dificultar o desenvolvimento de resistência por organismos-alvo. Devido ao baixo peso molecular dos seus compostos, os OEs são altamente voláteis e são assim caracterizados por uma baixa persistência no meio ambiente que contribui para sua seletividade em organismos não-alvo (ALBUQUERQUE et al., 2013; LIMA et al., 2013; PEIXOTO et al., 2015).

O modo de ação dos OEs e seus constituintes podem afetar a fisiologia dos insetos de diversas maneiras por meio de processos bioquímicos, que perturbam o equilíbrio endócrino ou causam neurotoxicidade (KUMAR et al., 2011), podem ter portanto, efeitos letais e subletais. Euphorbiaceae (MARTÍNEZ et al., 2015), Poaceae (SOONWERA; PHASOMKUSOLSIL, 2015) Myrtaceae (CHATTOPADHYAY et al., 2015), Verbenaceae (VERA et al., 2014) e Lamiaceae (ELIOPOULOS et al., 2015) são importantes famílias de plantas medicinais e aromáticas com potencial ação inseticida.

2.5 Óleo essencial de *Lippia sidoides*

A família Verbenaceae é composta de mais de 150 gêneros e cerca de 2.300 espécies, amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (FARIAS-JUNIOR et al., 2012; FUNARI et al., 2012). O gênero *Lippia* é o segundo maior gênero desta família e possui cerca de 200 espécies medicinais e aromáticas incluindo ervas, arbustos e pequenas árvores de propagação vegetativa, que são encontrados na América do Sul (cerca de 70-75% das espécies conhecidas estão no Brasil), América Central, e África tropical (FABRI et al., 2011; GOMES et al., 2012; SANTOS et al., 2014; VERAS et al., 2014).

As plantas pertencentes ao gênero *Lippia* têm sido amplamente utilizadas em etnobotânica, como alimentos, medicamentos, adoçantes e aromatizantes em bebidas. Muitas espécies de *Lippia* são aromáticas e estudos das plantas deste gênero têm centrado principalmente em seus óleos essenciais (FUNARI et al., 2012). *Lippia sidoides* Cham, popularmente conhecida como alecrim-pimenta, é um arbusto com caule e folhas odoríferas que é rico em óleos essenciais, nativo da região semiárida do nordeste do Brasil. A espécie é propagada vegetativamente através do corte ou por alporquia (FARIAS-JUNIOR et al., 2012; LEITE et al., 2013; LOBO et al., 2014; RAJGOPAL et al., 2015; VERAS et al., 2014).

O óleo essencial de *L. sidoides* tem potencial valor econômico por causa da utilização industrial na produção comercial de perfumes, cremes, loções e desodorantes (SILVA et al.,

2013); e possui propriedades anti-infecciosa, antisséptica e anti-inflamatória (RAJGOPAL et al., 2015); antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 2014), inseticida (LIMA et al., 2011), acaricida (GOMES et al., 2012), fungicida e bactericida (SILVA et al., 2013).

A composição química do óleo essencial de *L. sidoides* tem sido atribuída principalmente à presença de timol, sendo este mais relatado como componente majoritário (VERAS et al., 2014). No entanto, alguns trabalhos apontam que os dois principais componentes do óleo essencial são os monoterpenos timol (50-70%) e o carvacrol (7-16%) (LOBO et al., 2014; OLIVEIRA; PAULA; PAULA, 2014; SANTOS et al., 2014). Acredita-se que o principal representante, o timol, é responsável pelas atividades biológicas deste óleo essencial, mas isto ainda não foi comprovado, pois o óleo essencial pode conter compostos em menores quantidades que também podem ser responsáveis para as atividades biológicas, ou a atuação de forma sinérgica ou aditiva entre esses compostos (VERAS et al., 2013).

2.6 Nanoformulações

Diante das desvantagens da aplicação prática dos óleos essenciais (fotoinstabilidade, alta volatilidade e mistura em água), diversos estudos têm sido realizados para aumentar a eficiência destes. Nestes estudos, tem-se verificado que a utilização desses compostos em nanosistemas aumenta a efetividade da atividade (BILIA et al., 2014). Outra motivação é a possibilidade de usar ingredientes ativos de inseticidas alternativos que são menos prejudiciais para os organismos não alvos e que podem potencialmente reduzir o desenvolvimento de resistências (KAH; HOFMANN, 2014).

A nanotecnologia é definida como a ciência que se refere a dimensões de tamanho de partículas de 10-100 nm. Nesta escala as propriedades dos materiais diferem no que diz respeito às propriedades física, química e biológica dos que estão em uma escala de tamanho maior, possibilitando novas aplicações (KAH; HOFMANN, 2014; MONTEFUSCOLI et al., 2014). Essas nanoformulações são ainda definidas como misturas isotópicas de óleo e água estabilizada por um sistema tensoativo em uma nano-fase aquosa. Devido ao menor tamanho de gotícula, as nanoformulações impedem a sedimentação e oferecem uma maior estabilidade para os óleos, uma vez que as moléculas ativas são dissolvidas e/ou adsorvidas sobre o núcleo oleoso da nanoestrutura (DIAS et al., 2014; MONTEFUSCOLI et al., 2014).

A definição de nanosistemas pode abranger ainda o tipo de material utilizado como materiais metálicos, semicondutores e nanopartículas poliméricas (LIU, 2006). Diversos materiais são utilizados na preparação das nanoformulações como polietilenoglicérol (GONZÁLEZ et al., 2014), tween (MONTEFUSCOLI et al., 2014) e água (NENAAH, 2014).

O método de preparação da nanoformulação afeta consideravelmente suas propriedades físicas e químicas, visto que o diâmetro das partículas formado é o aspecto mais relevante neste contexto (DIAS et al., 2014). O menor diâmetro e tamanho da partícula aumentam a superfície de contato do óleo essencial sendo este um parâmetro desejável (GONZÁLEZ et al., 2014).

Os benefícios da utilização de nanoformulações à base de compostos botânicos são: alta eficácia devido à maior área de superfície, controlada liberação, capacidade de estabilizar algumas substâncias, indução de atividade sistêmica devido ao menor tamanho da partícula, fotoestabilidade e estabilidade térmica, e, possivelmente, menor ecotoxicidade devido à maior solubilidade em água convencionais. Além disso, demonstraram eficácia biológica como produto ecologicamente correto, podendo assim ter utilização em sistemas de grãos armazenados (COSTA et al., 2014a; DIAS et al., 2014; GONZÁLEZ et al., 2014).

A nanoencapsulação permite a liberação lenta de um produto no controle de pragas de insetos por meio de mecanismos de liberação, que incluem: a dissolução, biodegradação, difusão e pressão osmótica com pH específico (por exemplo, as condições alcalinas no intestino de insetos). Essas nanopartículas são absorvidas pelos lipídios cuticulares

(compostos que reduzem a dessecação) dos insetos causando a morte dos mesmos quando aplicado nas superfícies de grãos e sementes (SINGH SEKHON, 2014).

Singh Sekhon (2014) e Oliveira (2014) afirmam que a nanotecnologia será uma força motriz para a economia visando a sustentabilidade dos sistemas produtivos. Entretanto, conforme ressalta Mukhopadhyay (2014) o ritmo de desenvolvimento da nanotecnologia na agricultura ainda é modesto quando comparada com outras áreas. De fato, poucos estudos têm avaliado os efeitos letais e subletais das nanoformulações sobre insetos-praga. As recentes pesquisas realizadas envolvem pragas como *Zabrotes subfasciatus* (COSTA et al., 2014a), *Tribolium castaneum* (GONZÁLEZ et al., 2014; NENAAH, 2014), *Blatella germanica* (GONZÁLEZ et al., 2015) e *Culex pipiens pipiens* (MONTEFUSCOLI et al., 2014). Contudo, até o momento, nenhum estudo foi realizado avaliando o efeito de nanoformulações sobre *S. zeamais*. Assim, a possibilidade de inovação tecnológica para as nanoformulações aliada à aplicação no controle de pragas, especialmente as pragas de grãos armazenados, surge como uma alternativa aos atuais métodos de controle utilizados, contribuindo para construção do conhecimento científico-tecnológico.

3. Material e Métodos

3.1. Populações de *S. zeamais*

Foram utilizadas populações de *S. zeamais* provenientes de todas as regiões do Brasil (Fig. 1): norte (município de Rio Branco, Acre), nordeste (Aracaju, Sergipe), sul (Jacarezinho, Paraná); sudeste (Sete Lagoas, Minas Gerais) e centro-oeste (Maracaju, Mato Grosso do Sul). As populações foram mantidas na Clínica Fitossanitária da Universidade Federal de Sergipe, município de São Cristóvão (10°54' S, 37°04' W e altitude 7m), Sergipe, Brasil, onde os bioensaios foram realizados. Para a multiplicação das populações foram fornecidos grãos de milho, previamente lavados e matindos em freezer (-10°C) por trinta dias, a fim de eliminar possíveis resíduos de inseticidas e organismos presentes nos mesmos. As criações foram mantidas em frascos plásticos (1 L), vedados com organza, em temperatura (26°C±1°C), fotoperíodo 12h e umidade 50% ± 2%. Os grãos de milho foram renovados sempre que necessário.

3.2. Óleo essencial de *L. sidoides*

O óleo essencial das folhas de *L. sidoides* utilizado neste estudo foi obtido através do arraste a vapor e fornecido pela empresa PRONAT (Horizonte, Ceará, Brasil).

A composição do óleo essencial foi analisada utilizando CG/EM/DIC (GCMSQP2010 Ultra, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com um amostrador com injeção automática AOC-20i (Shimadzu). As separações foram realizadas em coluna capilar de sílica fundida Rtx®-5MS Restek (5%-difênil-95%-dimetilpolisiloxano) de 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno; 0,25 mm de espessura de filme, em um fluxo constante de Hélio 5.0 com taxa de 1,0 mL min⁻¹. A temperatura de injeção foi de 280 °C e 1,0 µL (10 mg mL⁻¹) de amostra foi injetada, com uma razão de *split* de 1:30. A programação de temperatura do forno iniciou a partir de 50 °C (isoterma durante 1,5 min), com um aumento de 4 °C min⁻¹, até 200 °C, em seguida, a 10 °C min⁻¹ até 300 °C, permanecendo por 5 min. Para o CG/EM as moléculas foram ionizadas por ionização por elétrons com energia de 70 eV. Os fragmentos foram analisados por um sistema quadrupolar programado para filtrar fragmentos/íons com *m/z* na ordem de 40 a 500 Da e detectados por um multiplicador de elétrons. O processamento de dados foi realizado com software CGMS Postrun Analysis (Labsolutions- Shimadzu). O processo de ionização para o CG/DIC foi realizado pela chama proveniente dos gases hidrogênio 5.0 (30 mL min⁻¹) e ar sintético (300 mL min⁻¹). As espécies coletadas e a corrente elétrica gerada foram amplificadas e processadas. O processamento de dados foi realizado utilizando o software CG Postrun Analysis (Labsolutions- Shimadzu).

A identificação dos constituintes foi realizada com base na comparação dos índices de retenção da literatura (ADAMS, 2007). Para o índice de retenção foi utilizada a equação de Van Den Dool; Kratz, (1963) em relação a uma série homóloga de *n*-alcanos (*n*C₉- *n*C₁₈). Também foram utilizadas bibliotecas (WILEY8, NIST107 e NIST21) do equipamento para comparação dos dados dos espectros, utilizando um índice de similaridade de 80%.

O timol, constituinte em maior proporção no óleo essencial de *L. sidoides*, foi adquirido da empresa SIGMA-ALDRICH.

3.3. Protótipo das nanoformulações

As nanoformulações foram preparadas no Laboratório de Desenvolvimento Farmacotécnico do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe (UFS), pela adição gota-a-gota de 72 mL de Procetyl® AWS (tensoativo) em recipiente sob agitação magnética durante 10 min. Em seguida foram adicionados vagarosamente 18 mL do princípio ativo (óleo essencial de *L. sidoides* ou o timol - fase oleosa). A mistura de tensoativo e fase oleosa foram homogeneizadas por agitação magnética à temperatura ambiente. Após 20 min foram adicionados 10 mL de água ultra pura miliq (fase aquosa). O sistema foi mantido sob

agitação de acordo com as proporções determinadas à temperatura ambiente, até sua completa homogeneização (EL MAGHRABY, 2008).

3.3.1. Caracterização química e física

Os princípios ativos contidos no óleo essencial presente na nanoformulação foram isolados por hidrodestilação com aparelho tipo Clevenger adaptado com a adição de 1 mL do sistema emulsionado em 2 L de água em um balão volumétrico de 3,0 L por um período de ebulição de 140 min. O óleo foi acondicionado em frasco âmbar de 5 mL. A análise química foi realizada (CG/EM/DIC) da mesma forma descrita anteriormente. Esta caracterização foi realizada a cada dois meses desde o preparo das nanoformulações.

A caracterização física das nanoformulações foram realizadas considerando o potencial Zeta, tamanho da micropartícula, pH e índice de polidispersividade. O potencial Zeta está relacionado com as forças de repulsão existentes entre as micropartículas num sistema emulsionado, onde o aumento destas forças confere maior estabilidade à nanoformulação, evitando assim a aglomeração das mesmas. O índice de polidispersividade, por sua vez indica quanto o tamanho das partículas se desviou da média. O tamanho da micropartícula e os índices de polidispersividade foram determinados por espectrometria de correlação de fótons, após a diluição da amostra com água ultrapurificada na relação de 1:500 (v:v), em Zetasizer Nanoseries Nono-Zs (Malvern Instruments, Worcestershire, RU). A condutividade elétrica de sistemas isotrópicos (IONLAB CON-500) foi mensurada em escala até 2000 $\mu\Omega/\text{cm}$ com solução padrão de KCl de 1412 $\mu\Omega/\text{cm}$ à temperatura ambiente. O pH foi mensurado através de pHmetro microprocessado de bancada, com sensor Pt100 em eletrodo em inox. Todas as caracterizações foram realizadas a 25°C e em triplicata.

3.3.2. Microscopia de luz polarizada

A identificação de isotropia nos sistemas obtidos foi realizada por microscopia de luz polarizada, onde uma gota de cada amostra foi transferida para uma lâmina de vidro, coberta por uma lamínula e posteriormente analisada sob luz polarizada. As análises foram realizadas com microscópio Olympus BX-51 equipado com câmara digital LC Color Evolution (PL-A662) e software analisador de imagem PixelLINK, com um mínimo de 5 dias após a obtenção da nanoformulação.

3.4. Bioensaios

Foram desenvolvidos bioensaios com populações de *S. zeamais* para avaliar a: (i) toxicidade aguda (dose e tempo letal) do óleo essencial de *L. sidoides*, timol e suas nanoformulações, (ii) eficácia dos protótipos de nanoformulações sobre a taxa de crescimento e o consumo de grãos e, (iii) eficácia das nanoformulações ao longo do tempo (p.ex. período de armazenamento).

Em todos os casos foram utilizados insetos adultos não sexados de *S. zeamais*. Os tratamentos foram diluídos em acetona (Panreac, UV-IR-HPLC-GPC PAI-ACS, 99,9% pureza), exceto para os bioensaios de taxa de crescimento e o consumo de grãos. No controle foi utilizado apenas este solvente. Testes preliminares mostraram que a acetona e o agente tensoativo Procetyl® AWS, presente nas nanoformulações, não interferiram na sobrevivência dos insetos.

3.4.1. Toxicidade aguda

Cada unidade experimental consistiu em uma placa de Petri (6 cm x 1,5 cm) forrada com papel filtro, contendo 10 indivíduos adultos de *S. zeamais*. As placas foram mantidas em freezer por 45 s para reduzir a atividade dos insetos e permitir a aplicação. Testes preliminares demonstraram que esta prática não afeta a sobrevivência dos insetos.

O óleo essencial de *L. sidoides*, timol e suas nanoformulações foram aplicados topicamente (0,5 μL) na região protorácica de cada inseto com o auxílio de uma microseringa (Hamilton®, 10 μL). Após a aplicação dos tratamentos, as placas foram cobertas com plástico

filme e acomodadas em estufa tipo B.O.D., à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa 70%, com fotoperíodo de 12 h. Os insetos foram considerados mortos quando se apresentaram imóveis ou com movimentos bastante descoordenados.

Para determinação das doses letais, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada combinação de tratamento \times dose \times população de *S. zeamais* ($N = 5$). Bioensaios iniciais foram realizados com a utilização de três doses (1, 5 e 10 μg das substâncias por mg de inseto). Posteriormente, foram determinadas doses intermediárias (6-12 doses) para obtenção de curvas dose-mortalidade (DL_{50} e DL_{90}). A mortalidade foi avaliada 72 horas após a exposição.

Para a determinação dos tempos letais, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento \times população de *S. zeamais* ($N = 2$; a população mais tolerante e a mais susceptível). As DL_{95} determinadas nos bioensaios anteriores foram utilizadas para determinar os tempos letais (TL_{50}) e as curvas de sobrevivência dos tratamentos sobre as duas populações de *S. zeamais*. A mortalidade foi avaliada em intervalos de 10 minutos até completar 30 minutos; a cada 30 minutos até completar duas horas; e a cada duas horas até a sobrevivência do controle atingir 80%.

3.4.2. Taxa instantânea de crescimento (ri) e consumo de grãos

Os tratamentos consistiram no tratamento de grãos de milho com as nanoformulações do óleo essencial de *L. sidoides* e do timol. No tratamento controle foram utilizados grãos não-tratados. Foram realizadas quatro repetições para cada combinação dose ($N=7$) \times população de *S. zeamais* ($N=2$) \times tratamento.

As substâncias foram aplicadas com uma micropipeta (Labmate Pro) diretamente sobre os grãos de milho (250 g e 14% de umidade) que foram mantidos em frasco de vidro de 0,8 L. Após a aplicação os frascos foram agitados para homogeneização por 40 s. Trinta insetos adultos foram inseridos em cada frasco, que foram vedados hermeticamente e armazenados em temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 h. Após 90 dias foram contabilizados o número de insetos e realizada a pesagem da massa dos grãos em cada frasco.

3.4.3. Eficácia das nanoformulações ao longo do tempo

Para determinar a eficiência temporal durante o armazenamento dos protótipos de nanoformulações do óleo essencial de *L. sidoides* e timol sobre as populações de *S. zeamais* ($N=2$) foram realizados bioensaios de toxicidade semanalmente, a partir da estabilização das mesmas até a trigésima semana (210 dias).

Para a realização destes bioensaios foram utilizadas as DL_{90} determinadas nos bioensaios de toxicidade aguda (item 3.4.1.). Os procedimentos para a montagem foram os mesmos e a mortalidade foi avaliada 72 h após a montagem do bioensaio.

3.5. Análises estatísticas

A mortalidade dos tratamentos foi corrigida em relação ao controle, utilizando-se a fórmula de Abbott (1925). Para cada tratamento \times população foram feitas as curvas dose-mortalidade, após 72 h de exposição, utilizando-se análise de Próbit. Foram aceitas curvas com probabilidade de aceitação da hipótese de nulidade pelo teste χ^2 maior que 0,05. As curvas e as doses letais (DL_{50} e DL_{90}), com seus respectivos intervalos de confiança a 95% de probabilidade, foram obtidas utilizando-se o software SAEG.

As curvas de sobrevivência foram obtidas através dos bioensaios de tempo letal utilizando-se estimadores de Kaplan-Meier, no programa SigmaPlot 11.0. Por meio destas curvas foi possível estimar os tempos necessários para causar mortalidade de 50% dos indivíduos de cada população (TL_{50}).

A taxa instantânea de crescimento populacional (ri) foi calculada utilizando a equação (STARK, J. E.; BANKS, 2003):

$$r_i = \frac{\left[\ln\left(\frac{N_f}{N_o}\right) \right]}{\Delta t}, \text{ onde:}$$

r_i = taxa de crescimento populacional;

N_f = número final de insetos vivos;

N_o = número inicial de insetos vivos; e

ΔT = variação de tempo (número de dias de realização do bioensaio).

O consumo de grãos (g) foi determinado pela subtração da massa inicial dos grãos pela massa de grãos ao final do experimento.

Foi analisada a variação da taxa intrínseca de crescimento e da taxa de consumo de grãos em relação às populações susceptível e tolerante e às doses utilizadas, através de análise de variância (PROC MIXED, SAS). Regressões exponenciais foram ajustadas para os dados de r_i e consumo de grãos.

4. Resultados

4.1. Caracterização química do óleo essencial e da nanoformulação

O composto majoritário presente no óleo essencial de *L. sidoides* foi o timol (68,45%), seguido por ρ -cimeno (10,66%) e (E)-cariofileno (7,28%) (Tabela 1). Os demais compostos estiveram presentes em concentrações inferiores a 3% da totalidade do óleo.

Timol, ρ -cimeno e (E)-cariofileno mantiveram-se em maiores proporções nos óleos essenciais extraídos do protótipo de nanoformulação durante os quatro períodos de armazenamento. No entanto, as concentrações destes terpenos apresentaram variações temporais, havendo na média, aumento de 17% nas concentrações de timol e redução 40 e 10% de ρ -cimeno e (E)-cariofileno, respectivamente. Alguns componentes que estavam presentes em menores concentrações no óleo essencial, não foram detectados na nanoformulação após sete meses de armazenamento (p.ex. γ -terpineno) (Tabela 1).

4.2. Caracterização física das nanoformulações

As imagens de microscopia dos protótipos de nanoformulações do óleo essencial de *L. sidoides* e do timol, revelaram que as partículas formadas foram esféricas e de diâmetro semelhante (Fig. 2).

As nanoformulações apresentaram tamanho de partícula entre 58-78 nm, potencial zeta de -27 e -31 mV; índice de polispersão de 0,37 e 0,28; e pH de 6,97 e 8,85 para as nanoformulações contendo óleo essencial de *L. sidoides* e timol, respectivamente (Fig. 2).

4.3. Dose letal

As populações de *S. zeamais* apresentaram diferentes níveis de susceptibilidade aos tratamentos. Maracaju foi a população mais susceptível, tanto ao óleo essencial de *L. sidoides* como ao timol, com DL_{50} de 7,10 e 17,08 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, respectivamente. Foram necessárias doses superiores do óleo essencial de *L. sidoides* (2,8x) e do timol (1,5x) para matar os mesmos 50% da população de Jacarezinho. As populações de Aracaju, Rio Branco e Sete Lagoas apresentaram susceptibilidades intermediárias a estes compostos (Tabela 2).

Para todas as populações, o óleo essencial de *L. sidoides* foi mais tóxico do que o timol, com exceção da população de Sete Lagoas, na qual não houveram diferenças nas doses destes tratamentos necessárias para matar 50% desta população (Tabela 2).

Quando tratadas com os protótipos de nanoformulações, as populações mostraram o mesmo padrão de susceptibilidade. A população de Maracaju foi cerca de 36 e 34% mais susceptível as nanoformulações a base do óleo essencial e do timol do que a população de Jacarezinho, respectivamente (Tabela 2). Contudo, o padrão de toxicidade entre os tratamentos alterou. A nanoformulação contendo o timol foi mais tóxica para ambas as

populações de *S. zeamais* quando comparada a nanoformulação a base do óleo essencial de *L. sidoides* (Tabela 2).

4.4. Tempo letal

A sobrevivência das populações de *S. zeamais* provenientes de Maracaju (Log-Rank: $\chi^2 = 516,6$; $p < 0,001$) e Jacarezinho (Log-Rank: $\chi^2 = 339,9$; $p < 0,001$) foram reduzidas ao longo do tempo (Fig. 3). Foram necessárias, na média, 50 e 91 horas para causar mortalidade superior a 90% nas populações de Maracaju e Jacarezinho, respectivamente (Fig. 3).

Os tempos letais necessários para matar 50% das populações variaram de 5,8 a 62 horas. O óleo essencial de *L. sidoides* apresentou ação mais rápida para ambas as populações de *S. zeamais* quando comparados ao seu composto majoritário timol (Fig. 3). Em todos os casos as nanoformulações demoram mais tempo para causar a mesma mortalidade (Fig. 3).

4.5. Taxa instantânea de crescimento (ri) e consumo de grãos

Concentrações crescentes da nanoformulação contendo o óleo de *L. sidoides* ou timol resultaram em redução da taxa instantânea de crescimento (Fig. 4 A e B) e do consumo de grãos (Fig. 4 C e D) nas duas populações. A queda destes parâmetros foi mais acentuada na população de Maracaju (Fig. 4).

A concentração de 1600 $\mu\text{l kg}^{-1}$ resultou na morte de todos os insetos (Fig. 4). Concentrações baixas das nanoformulações (p.ex. 50 $\mu\text{l kg}^{-1}$) resultaram em um pequeno aumento do consumo de grãos se comparado ao controle (Fig. 4 C e D)

4.6. Eficiência das nanoformulações ao longo do tempo

Os efeitos do armazenamento dos protótipos de nanoformulações ao longo do tempo sob condições de armazenamento (28 ± 2 °C), durante 210 dias (= 7 meses) são mostrados na Figura 5. As nanoformulações contendo o óleo essencial de *L. sidoides* e timol foram eficientes (mortalidade >80%) no controle das populações de Maracaju e Jacarezinho de *S. zeamais* até 210 dias de armazenamento (Fig. 5). A nanoformulação contendo o óleo essencial de *L. sidoides* foi mais tóxica para ambas as populações quando comparada a nanoformulação a base de timol (Fig. 5).

5. Discussão

A análise química do óleo essencial de *L. sidoides* e deste óleo inserido na nanoformulação demonstrou que este é formado por mono- e sesquiterpenos e que o composto majoritário foi o timol. O teor do timol foi similar aos encontrados por Chagas et al. (2016); Gomes et al., (2012); Santos et al., (2015). As pequenas variações encontradas na composição de óleo essencial podem estar ligadas a fatores bióticos e abióticos, tais como: fatores genéticos e climáticos, origem geográfica, colheita, adubação, sistemas de cultivo, dentre outros (LUZ et al., 2014; SANTOS et al., 2015, 2016).

O óleo essencial de *L. sidoides* presente no protótipo de nanoformulação exibiu variações na sua composição química durante o armazenamento. Estas modificações estão relacionadas a reações dos compostos durante o processo de fabricação da nanoformulação e/ou no armazenamento. Os aumentos das concentrações de timol na nanoformulação durante o armazenamento estão diretamente relacionados a algumas enzimas que utilizam alguns precursores, tais como γ -terpineno e p -cimeno que são estruturalmente relacionados e ocorrem neste óleo para a biossíntese do timol. De fato, estes precursores tiveram suas concentrações diminuídas ao mesmo tempo em que a concentração do timol aumentou. O timol é biossintetizado por aromatização do γ -terpineno em p -cimeno, seguido pelo processo de hidroxilação desse composto (COSTA et al., 2014b; MARCHESE et al., 2016). Isto indica que a nanoformulação potencializa a concentração de timol.

Os resultados encontrados em nosso trabalho são promissores para o manejo de populações de *S. zeamais* com diferentes níveis de tolerância aos inseticidas convencionais.

Encontramos aqui doses letais necessárias para matar 50% das populações de *S. zeamais* próximas ou inferiores as relatadas por Suthisut; Fields; Chandrapatya, (2011), Yang et al., (2011), Li et al., (2013) e Liu et al., (2012) com outros óleos essenciais para este mesmo inseto.

Foi possível observar diferentes níveis de suscetibilidade nas populações de *S. zeamais* ao óleo essencial de *L. sidoides* e ao timol. No entanto, estas variações (*L. sidoides*: 2,8 vezes e timol: 1,5 vezes) foram pequenas se comparadas às variações observadas para estas mesmas populações quando expostas a inseticidas organossintéticos (p.ex.: Maracaju e Jacarezinho foram 25 e 56 vezes mais tolerantes aos piretróides esfenvalerato e permetrina do que Sete Lagoas, respectivamente) (CORRÊA et al., 2011b). Possivelmente isso ocorra devido aos óleos essenciais serem misturas complexas de compostos que podem interagir (p.ex.: sinergismo, aditismo e antagonismo) e atuar em mais de um sítio de ação (TAK; ISMAN, 2015; TAK; JOVEL; ISMAN, 2016). Adicionalmente, o composto majoritário timol apresenta comprovada inibição da enzima acetilcolinesterase em insetos (JUKIC et al., 2007), diferente mecanismo de ação dos piretróides (canais de sódio) para os quais as populações de *S. zeamais* estudadas exibem tolerância.

As maiores doses e tempos letais observados para a população de Jacarezinho, resistente a piretróides (BRAGA et al., 2011; CORRÊA et al., 2011a), indicam que estes compostos ou pelo menos parte deles podem atuar também em sítios de ação dos piretróides e/ou apresentar menor sensibilidade a enzima detoxificativa glutathione S-transferase (ARAÚJO et al., 2011; LOPES et al., 2010).

A toxicidade do óleo essencial de *L. sidoides* e do timol foi rápida, o que pode indicar que estes compostos atuam em sítios de ação no sistema nervoso dos insetos. Os menores tempos letais observados nas populações de *S. zeamais* quando expostas ao óleo essencial de *L. sidoides* em relação ao timol deve-se possivelmente a interações sinérgicas entre os compostos presentes no óleo (TAK; JOVEL; ISMAN, 2016). Em nosso trabalho, foram encontrados tempos letais necessários para matar 50% das populações inferiores aos observados para o piretróide deltametrina, que é um inseticida neurotóxico normalmente utilizado no controle de *S. zeamais* (MORALES et al., 2013).

Os protótipos de nanoformulações criados em nosso trabalho foram muito eficientes para o controle de populações de *S. zeamais*. Eles reduziram a sobrevivência, tiveram ação rápida, afetaram a taxa instantânea de crescimento (r_i) e o consumo de grãos e ainda mantiveram altas toxicidades durante longos períodos de armazenamento.

Considerando que as nanoformulações continham apenas 18% do ingrediente ativo (i.a. - óleo essencial de *L. sidoides* ou timol) observa-se que os protótipos potencializaram a ação do óleo essencial de *L. sidoides* e do timol. Mesmo com a concentração do i.a. sendo 5,6 vezes menor, as doses letais necessárias para matar 50% das populações de *S. zeamais* aumentaram em taxas que variaram de 1,1 a 3,7. Já a alta eficiência das nanoformulações na redução da taxa instantânea de crescimento (r_i) e no consumo de grãos deve-se, além do efeito de contato, a exposições por ingestão e fumigação, uma vez que os insetos caminharam sobre os grãos tratados e permaneceram em uma ambiente fechado (potes de vidro).

A potencialização dos efeitos do óleo essencial de *L. sidoides* e do timol provavelmente se deva a algumas propriedades das nanoformulações, tais como: (i) menor tamanho de partícula, aumentando a superfície de contato, (ii) controlada liberação, evitando perdas excessivas (p.ex. volatilização), e (iii) maior solubilidade, facilitando a penetração no inseto (KAH; HOFMANN, 2014; OLIVEIRA et al., 2014).

Os protótipos das nanoformulações demonstraram ainda boa eficiência no controle de populações de *S. zeamais* durante o armazenamento. Esta eficiência deve-se, além da toxicidade dos princípios ativos (óleo essencial de *L. sidoides* e timol), as propriedades físicas proporcionadas pelo agente surfactante Procetyl® AWS. A maioria dos trabalhos envolvendo nanoformulações para o controle de insetos-praga utilizam outros agentes surfactantes, como o Tween (MONTEFUSCOLI et al., 2014) e o polietilenoglicol (GONZÁLEZ et al., 2014).

Também são comuns pesquisas com agentes encapsulantes como a β -ciclodextrina (GALVÃO et al., 2015), poli- β -hidroxibutirato e poli- ϵ -caprolactona (CARVALHO et al., 2015). Assim, nosso trabalho é pioneiro no uso do Procetyl[®] AWS como agente surfactante para o óleo essencial de *L. sidoides* sobre *S. zeamais* e demonstra que este foi importante para a formação do tamanho das partículas, estabilidade (potencial Zeta) e uniformidade (índice de polidispersão) das nanoformulações.

Ambas as nanoformulações apresentaram os tamanhos médios de partículas dentro do intervalo de 0 a 100nm, o qual indica escala nanométrica (KAH; HOFMANN, 2014). A nanoformulação contendo timol foi mais estável e homogênea se comparada a nanoformulação a base do óleo essencial de *L. sidoides*. Os valores do potencial zeta de -27 e -31mV encontrados em nossas nanoformulações contendo o óleo essencial de *L. sidoides* e timol, indicam incipiente e moderada estabilidade, respectivamente (HONARY; ZAHIR, 2013a). Este potencial refere-se às forças repulsivas entre as partículas do óleo ou timol que se aproximam, e expressa a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a fase estacionária de fluido ligado à partícula dispersa (DIAS et al., 2014; HONARY; ZAHIR, 2013b). Os valores negativos podem está associados aos ácidos livres ou outros componentes presentes no óleo essencial, como também a composição do tensioativo (DIAS et al., 2014).

As nanoformulações contendo o óleo essencial de *L. sidoides* e timol apresentaram índices de polidispersão de 0,37 e 0,28 demonstrando menor e maior homogeneidade no tamanho das partículas presentes na nanoformulação, respectivamente. Valores deste índice abaixo de 0,3 indicam que a população de partículas está homogênea (DAMASCENO et al., 2011; DIAS et al., 2014; FLORES et al., 2011; GONZÁLEZ et al., 2014). Os valores de pH são inversamente proporcionais aos valores do índice de polidispersão (CHEN; ZHANG; ZHONG, 2015; GHIASVAND et al., 2015).

Assim, nosso trabalho demonstra a eficiência de protótipos de nanoformulações a base do óleo essencial de *L. sidoides* e timol para o manejo de populações de *S. zeamais* com diferentes níveis de resistência aos inseticidas convencionais.

6. Referências Bibliográficas

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, p. 265–267, 1925.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, 4th Edition**. [s.l: s.n.].
- ALBUQUERQUE, E. L. D. et al. Insecticidal and repellence activity of the essential oil of *Pogostemon cablin* against urban ants species. **Acta Tropica**, v. 127, n. 3, p. 181–186, set. 2013.
- ARAÚJO, R. A. et al. Pyrethroid resistance in *Sitophilus zeamais* is associated with a mutation (T929I) in the voltage-gated sodium channel. **Insect Molecular Biology**, v. 20, n. 4, p. 437–445, 2011.
- ATTIA, S. et al. A review of the major biological approaches to control the worldwide pest *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) with special reference to natural pesticides: Biological approaches to control *Tetranychus urticae*. **Journal of Pest Science**, v. 86, n. 3, p. 361–386, 2013.
- BACCI, L. et al. Toxicity, behavior impairment, and repellence of essential oils from pepper-rosmarin and patchouli to termites. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 156, n. 1, p. 66–76, jul. 2015.
- BILIA, A. R. et al. Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.
- BRAGA, L. S. et al. Face or flee? Fenitrothion resistance and behavioral response in populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Journal of Stored Products Research**, v. 47, n. 3, p. 161–167, 2011.
- CABALLERO-GALLARDO, K.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. E. Repellent activity of essential oils and some of their individual constituents against *Tribolium castaneum* herbst. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 1690–1696, 2011.
- CAMPOS, R. N. . et al. Óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*. **Archivos de Zootecnia**, v. 61, p. 67–78, 2012.
- CAMPOS, R. N. DE S. et al. Acaricidal properties of vetiver essential oil from *Chrysopogon zizanioides* (Poaceae) against the tick species *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 212, n. 3-4, p. 324–330, 2015.
- CARVALHO, S. S. DE et al. Efeito inseticida sistêmico de nanofórmulas à base de nim sobre *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biótipo B em tomateiro. **Bragantia**, v. 74, n. 3, p. 298–306, 2015.
- CASTRO-ÁLVAREZ, F. F. et al. Genetic mapping of QTL for maize weevil resistance in a RIL population of tropical maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, n. 3, p. 411–419, 2015.
- CHAGAS, A. C. DE S. et al. Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 427–432, 2016.

- CHATTOPADHYAY, P. et al. Essential oil based polymeric patch development and evaluating its repellent activity against mosquitoes. **Acta Tropica**, v. 147, p. 45–53, 2015.
- CHEN, H.; ZHANG, Y.; ZHONG, Q. Physical and antimicrobial properties of spray-dried zein–casein nanocapsules with co-encapsulated eugenol and thymol. **Journal of Food Engineering**, v. 144, p. 93–102, jan. 2015.
- CHU, S. S. et al. Chemical composition and insecticidal activity against *Sitophilus zeamais* of the essential oils derived from *Artemisia giraldii* and *Artemisia subdigitata*. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 7255–7265, 2012.
- COLLINS, P. J. et al. Response of mixed-age cultures of phosphine-resistant and susceptible strains of lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*, to phosphine at a range of concentrations and exposure periods. **Journal of Stored Products Research**, v. 41, n. 4, p. 373–385, 2005.
- CORRÊA, A. S. et al. Bidirectional selection for body mass and correlated response of pyrethroid resistance and fitness in *Sitophilus zeamais*. **Journal of Applied Entomology**, v. 135, n. 4, p. 285–292, 2011a.
- CORRÊA, A. S. et al. Insecticide resistance, mixture potentiation and fitness in populations of the maize weevil (*Sitophilus zeamais*). **Crop Protection**, v. 30, n. 12, p. 1655–1666, 2011b.
- CORRÊA, A. S. et al. Distribution of the related weevil species *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* in Brazil. **Insect Science**, v. 20, n. 6, p. 763–770, 2013.
- COSTA, J. T. DA et al. Effects of different formulations of neem oil-based products on control *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (Coleoptera: Bruchidae) on beans. **Journal of Stored Products Research**, v. 56, p. 49–53, 2014a.
- COSTA, R. G. et al. Essential oil of Pataqueira (*Conobea Scoparioides* Benth .): from natural occurrence and produced by hydroponics. **Advances in Plants & Agriculture Research**, v. 1, n. 3, p. 1–5, 2014b.
- DAMASCENO, B. P. G. L. et al. Microemulsão: Um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacéuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 9–18, 2011.
- DIAS, D. DE O. et al. Optimization of copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 154–162, ago. 2014.
- EL MAGHRABY, G. M. Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: Effects of cosurfactants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1-2, p. 285–292, 1 maio 2008.
- ELIOPOULOS, P. A. et al. Fumigant toxicity of essential oils from basil and spearmint against two major pyralid pests of stored products. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 2, p. 805–810, 2015.
- FABRI, R. L. et al. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography. **Journal of medicinal food**, v. 14, n. 7-8, p. 840–846, 2011.
- FARAONE, N.; HILLIER, N. K.; CUTLER, G. C. Plant essential oils synergize and antagonize toxicity of different conventional insecticides against *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). **PLoS one**, v. 10, n. 5, 2015.
- FARIAS-JUNIOR, A. P. et al. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* cham. **Biological Research**, v. 45, n. 4, p. 399–402, 2012.
- FLORES, F. C. et al. Nanostructured systems containing an essential oil: Protection against

- volatilization. **Quimica Nova**, v. 34, n. 6, p. 968–972, 2011.
- FRAGOSO, D. B.; GUEDES, R. N. C.; REZENDE, S. T. Glutathione S -transferase detoxification as a potential pyrethroid resistance mechanism in the maize weevil , *Sitophilus zeamais*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 109, p. 21–29, 2003.
- FREIRES, I. A. et al. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: A systematic review. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 7329–7358, 2015.
- FUNARI, C. S. et al. High resolution ultra high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of brazilian *Lippia* species. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 167–178, 2012.
- GALVÃO, J. G. et al. β -cyclodextrin inclusion complexes containing *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control *Aedes aegypti* larvae. **Thermochimica Acta**, v. 608, p. 14–19, maio 2015.
- GHIASVAND, A. et al. A solid-phase microextraction platinized stainless steel fiber coated with a multiwalled carbon nanotube-polyaniline nanocomposite film for the extraction of thymol and carvacrol in medicinal plants and honey. **Journal of Chromatography A**, v. 1406, p. 87–93, ago. 2015.
- GOMES, G. A. et al. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 111, n. 6, p. 2423–2430, 2012.
- GOMES, G. A. et al. Acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on unengorged larvae and nymphs of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 41–45, 2014.
- GONZÁLEZ, J. O. W. et al. Essential oils nanoformulations for stored-product pest control – Characterization and biological properties. **Chemosphere**, v. 100, p. 130–138, abr. 2014.
- GONZÁLEZ, J. O. W. et al. Novel nanoinsecticides based on essential oils to control the German cockroach. **Journal of Pest Science**, v. 88, n. 2, p. 393–404, 2015.
- GUEDES, N. M. P. et al. Insecticide-induced hormesis in an insecticide-resistant strain of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Journal of Applied Entomology**, v. 134, n. 2, p. 142–148, 2010.
- GUO, S. et al. Contact and repellent activities of the essential oil from *Juniperus formosana* against two stored product insects. **Molecules**, v. 21, n. 4, p. 504, 16 abr. 2016.
- HALLMAN, G. J. Control of stored product pests by ionizing radiation. **Journal of Stored Products Research**, v. 52, p. 36–41, 2013.
- HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 265–273, 2013a.
- HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano - drug delivery systems - A review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutic al Research**, v. 12, n. 2, p. 255–264, 2013b.
- IRCHHAIYA, R. et al. Metabolites in plants and its classification. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 287–305, 2015.
- ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an

- increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v. 51, n. 1, p. 45–66, jan. 2006.
- JAYA et al. Insecticidal activity of *Ageratum conyzoides* L., *Coleus aromaticus* Benth. and *Hyptis suaveolens* (L.) poit essential oils as fumigant against storage grain insect *Tribolium castaneum* herbst. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 2210–2215, 2014.
- JAYAS, D. S. Storing grains for food security and sustainability. **Agricultural Research**, v. 1, n. 1, p. 21–24, 2012.
- JEON, J. H.; LEE, H. S. Biofunctional constituent isolated from *Citrullus colocynthis* fruits and structure-activity relationships of its analogues show acaricidal and insecticidal efficacy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 34, p. 8663–8667, 2014.
- JUKIC, M. et al. In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivates thymoquinone and thymohydroquinone. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 259–261, 2007.
- KAH, M.; HOFMANN, T. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. **Environment International**, v. 63, p. 224–235, 2014.
- KHANI, A.; ASGHARI, J. Insecticide activity of essential oils of *Mentha longifolia*, *Pulicaria gnaphalodes* and *Achillea wilhelmsii* against two stored product pests, the flour beetle, *Tribolium castaneum*, and the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. **Journal of insect science**, v. 12, p. 73, 2012.
- KUMAR, P. et al. Insecticidal properties of Mentha species: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 802–817, 2011.
- LEITE, G. L. D. et al. Organic fertilization affecting pests and production of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenacea). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 15, n. 4, p. 551–556, 2013.
- LI, S.-G. et al. Fumigant activity of *Illicium verum* fruit extracts and their effects on the acetylcholinesterase and glutathione S -transferase activities in adult *Sitophilus zeamais*. **Journal of Pest Science**, v. 86, n. 4, p. 677–683, 2013.
- LIMA, J. K. A. et al. Biototoxicity of some plant essential oils against the termite *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). **Industrial Crops and Products**, v. 47, p. 246–251, maio 2013.
- LIMA, R. K. et al. Chemical composition and effect of essential oil of *Lippia sidoides* Cham . and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L .) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 4, p. 664–671, 2011.
- LIU, P. et al. Chemical composition and insecticidal activity of the essential oil of *Illicium pachyphyllum* fruits against two grain storage insects. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14870–14881, 2012.
- LIU, W. T. Nanoparticles and their biological and environmental applications. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 102, n. 1, p. 1–7, 2006.
- LOBO, P. L. D. et al. The efficacy of three formulations of *Lippia sidoides* Cham. essential oil in the reduction of salivary *Streptococcus mutans* in children with caries: A randomized, double-blind, controlled study. **Phytomedicine**, v. 21, n. 8-9, p. 1043–1047, 2014.
- LOPES, K. V. G. et al. Modified α -amylase activity among insecticide-resistant and -susceptible strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Journal of Insect Physiology**, v.

56, n. 9, p. 1050–1057, 2010.

LUZ, J. M. Q. et al. Produção de óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. em diferentes épocas, sistemas de cultivo e adubações [Production of *Ocimum basilicum* L. essential oil in different seasons, systems of planting and types of fertilizers]. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, n. 1, p. 69–80, 2014.

MA, W. BIN et al. Fumigant activity of eleven essential oil compounds and their selected binary mixtures against *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 113, n. 10, p. 3631–3637, 2014.

MARCHESE, A. et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**, v. 210, p. 402–414, nov. 2016.

MARTÍNEZ, L. C. et al. Bioactivity of six plant extracts on adults of *Demotispa neivai* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of insect science (Online)**, v. 15, 2015.

MIKAMI, A. Y.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; VENTURA, M. U. Resistance of maize landraces to the maize weevil *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v. 41, n. 5, p. 404–408, 2012.

MONTEFUSCOLI, A. R. et al. Design and development of aqueous nanoformulations for mosquito control. **Parasitology Research**, v. 113, n. 2, p. 793–800, 2014.

MORALES, J. A. et al. Weevil x Insecticide: Does “Personality” Matter? **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e67283, 26 jun. 2013.

MUKHOPADHYAY, S. S. Nanotechnology in agriculture: Prospects and constraints. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 7, n. 2, p. 63–71, 2014.

NEGRISOLI, C. R. DE C. B. et al. Activity of eight strains of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) against five stored product pests. **Experimental Parasitology**, v. 134, n. 3, p. 384–388, 2013.

NENAAH, G. E. Chemical composition, toxicity and growth inhibitory activities of essential oils of three *Achillea* species and their nano-emulsions against *Tribolium castaneum* (Herbst). **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 252–260, 2014.

NUKENINE, E. N.; TOFEL, H. K.; ADLER, C. Comparative efficacy of NeemAzal and local botanicals derived from *Azadirachta indica* and *Plectranthus glandulosus* against *Sitophilus zeamais* on maize. **Journal of Pest Science**, v. 84, n. 4, p. 479–486, 2011.

OLIVEIRA, E. F. DE; PAULA, H. C. B.; PAULA, R. C. M. DE. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 146–151, 2014.

OLIVEIRA, J. L. DE et al. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1550–1561, 2014.

OLIVEIRA, E. E. et al. Resistência vs susceptibilidade a piretróides em *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): há vencedor? **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 6, p. 981–990, 2005.

OPPERT, B.; MORGAN, T. D.; KRAMER, K. J. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin and protease inhibitors against coleopteran storage pests. **Pest Management Science**, v. 67, n. 5, p. 568–573, 2011.

PAES, J. L. et al. Insecticidal fumigant action of mustard essential oil against *Sitophilus*

- zeamais* in maize grains. **Crop Protection**, v. 34, p. 56–58, 2012.
- PEIXOTO, M. G. et al. Toxicity and repellency of essential oils of *Lippia alba* chemotypes and their major monoterpenes against stored grain insects. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 31–36, set. 2015.
- PIMENTEL, D. et al. Annual vs. perennial grain production. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 161, p. 1–9, 2012.
- PIMENTEL, M. A. G. et al. Phosphine resistance, respiration rate and fitness consequences in stored-product insects. **Pest Management Science**, v. 63, p. 876–881, 2007.
- RAJGOPAL, A. et al. Immunomodulatory effects of *Lippia sidoides* extract: induction of IL-10 through cAMP and p38 MAPK-dependent mechanisms. **Journal of medicinal food**, v. 18, n. 3, p. 370–377, 2015.
- REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J. T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Annual Review of Entomology**, v. 57, n. 1, p. 405–424, 2012.
- RIBEIRO, B. . et al. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 39, n. 1, p. 21–31, 2003.
- SANTOS, C. P. DOS et al. Chemical diversity and influence of plant age on the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. germplasm. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 416–421, dez. 2015.
- SANTOS, C. P. DOS et al. Harvest time and geographical origin affect the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Industrial Crops and Products**, v. 79, p. 205–210, jan. 2016.
- SANTOS, C. P. et al. Cross-species transferability of microsatellite markers in the genus *Lippia*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 9846–9850, 2014.
- SILVA, T. F. DA et al. Does the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. (pepper-rosmarin) affect its endophytic microbial community? **BMC microbiology**, v. 13, p. 29, 2013.
- SINGH SEKHON, B. Nanotechnology in agri-food production: An overview. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 7, n. 2, p. 31–53, 2014.
- SONG, J. et al. Acaricidal and insecticidal activities of essential oils against a stored-food mite and stored-grain insects. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 1, p. 174–178, 2016.
- SOONWERA, M.; PHASOMKUSOLSIL, S. Efficacy of thai herbal essential oils as green repellent against mosquito vectors. **Acta Tropica**, v. 142, p. 127–130, 2015.
- SOUSA, G. DE; CONTE, H. Midgut morphophysiology in *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae). **Micron**, v. 51, p. 1–8, 2013.
- SOUSA, A. H.; FARONI, L. R. A.; GUEDES, R. N. C. Locomotor behavior of *Sitophilus zeamais* populations under sublethal ozone exposure. **Journal of Pest Science**, p. 1–9, 13 fev. 2016.
- STANIEK, A. et al. Natural products - learning chemistry from plants. **Biotechnology Journal**, v. 9, n. 3, p. 326–336, 2014.
- STARK, J. E.; BANKS, J. D. Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. **Annual Review Entomology**, v. 48, p. 505–519, 2003.
- SULEIMAN, R. et al. Is flint corn naturally resistant to *Sitophilus zeamais* infestation?

Journal of Stored Products Research, v. 60, p. 19–24, 2015.

SUTHISUT, D.; FIELDS, P. G.; CHANDRAPATYA, A. Contact toxicity, feeding reduction, and repellency of essential oils from three plants from the ginger family (Zingiberaceae) and their major components against *Sitophilus zeamais* and *Tribolium castaneum*. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 4, p. 1445–1454, 2011.

TAK, J.-H.; ISMAN, M. B. Enhanced cuticular penetration as the mechanism for synergy of insecticidal constituents of rosemary essential oil in *Trichoplusia ni*. **Scientific Reports**, v. 5, p. 12690, 30 jul. 2015.

TAK, J.-H.; JOVEL, E.; ISMAN, M. B. Comparative and synergistic activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil constituents against the larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, v. 72, n. 3, p. 474–480, mar. 2016.

TIWARI, B. K. et al. Application of ozone in grain processing. **Journal of Cereal Science**, v. 51, n. 3, p. 248–255, 2010.

UKEH, D. A. et al. Identification of host kairomones from maize, *Zea mays*, for the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, n. 11, p. 1402–1409, 2012.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of chromatography**, p. 463–471, 1963.

VERA, S. S. et al. Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 113, n. 7, p. 2647–2654, 2014.

VERAS, H. N. H. et al. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. **Fitoterapia**, v. 83, n. 3, p. 508–512, abr. 2012.

VERAS, H. N. H. et al. Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides*

VERAS, H. N. H. et al. Antimicrobial effect of *Lippia sidoides* and thymol on *Enterococcus faecalis* biofilm of the bacterium isolated from root canals. **The Scientific World Journal**, 2014.

WEI, L. et al. Chemical Composition and biological activity of star anise *Illicium verum* extracts against maize weevil, *Sitophilus zeamais* adults. **Journal of Insect Science**, v. 14, n. 80, p. 1–13, jun. 2014.

YANG, K. et al. Toxicity of *Rhododendron anthopogonoides* essential oil and its constituent compounds towards *Sitophilus zeamais*. **Molecules**, v. 16, n. 9, p. 7320–7330, 2011.

ANEXOS 1

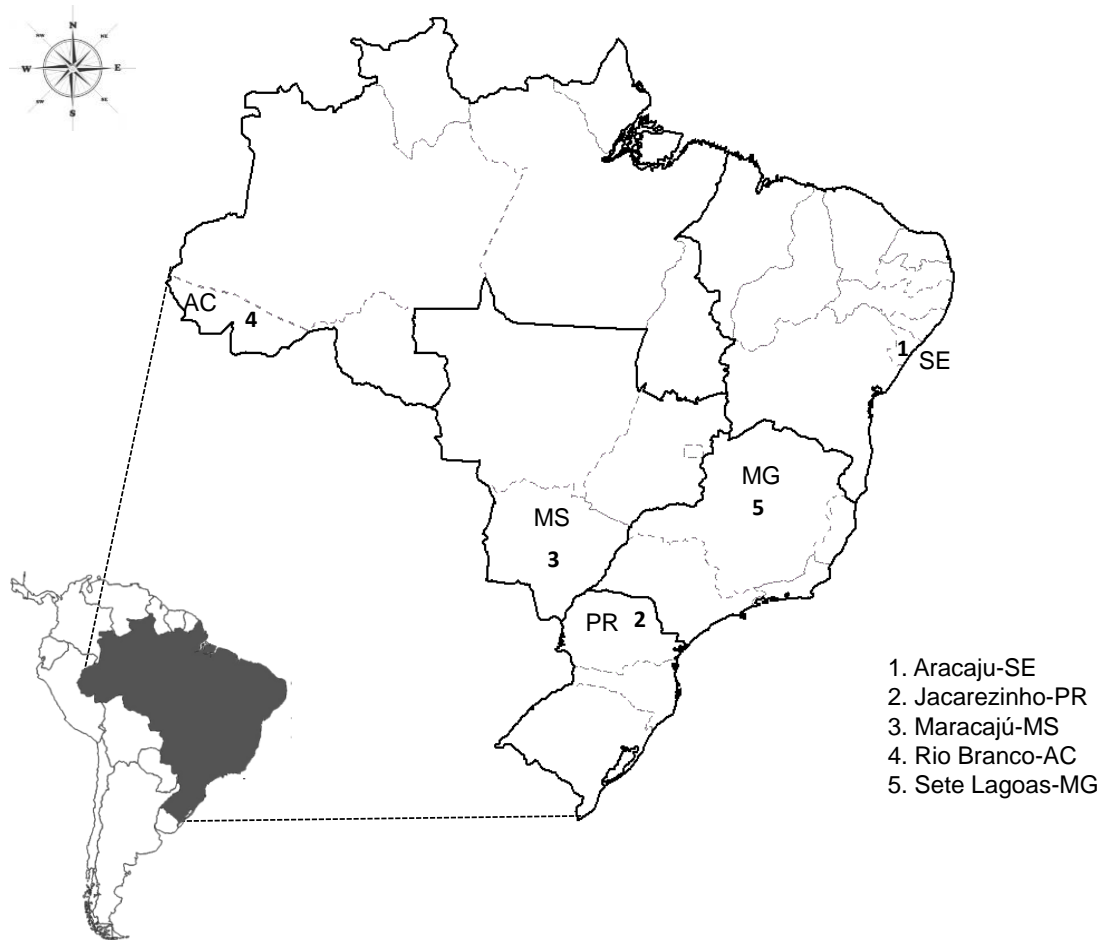


Fig. 1 Locais de coleta das cinco populações do gorgulho-do-milho *Sitophilus zeamais* oriundas de todas as regiões brasileiras (Nordeste: Aracaju-SE, Sul: Jacarezinho-PR, Norte: Rio Branco-AC, Centro-oeste: Maracaju-MS e Sudeste: Sete Lagoas-MG).

Tabela 1 Composição química do óleo essencial de *Lippia sidoides* (antes do preparo da nanoformulação) e do óleo na nanoformulação ao longo do tempo de armazenamento.

Composto	IR ^a	Concentração (%) ^b				
		Antes do preparo	Tempo de armazenamento (dias)			
			30	90	150	210
triciclono	8,38	0,57	0,10	0,10	0,10	0,10
α-tujeno	8,61	0,61	0,10	0,10	0,10	0,10
mirceno	10,27	2,58	0,94	0,55	0,40	0,70
δ-3-careno	11,01	0,17	0,10	0,10	-	-
α-terpineno	11,21	1,06	0,52	-	-	-
ρ-cimeno	11,42	10,66	7,99	5,89	5,95	6,42
limoneno	11,55	0,79	0,65	0,35	0,42	0,39
1,8-cineol	11,65	0,75	0,76	0,60	0,65	0,45
γ-terpineno	12,58	2,12	0,57	0,25	-	-
linalol	13,86	0,34	0,34	0,49	0,35	0,35
3-tujen-2-ona	16,42	0,54	1,16	-	0,36	1,34
terpinen-4-ol	16,85	0,85	0,15	1,58	1,20	0,11
metil timol	18,08	0,99	1,29	1,05	1,26	1,10
timol	19,99	68,45	73,93	81,75	82,01	80,20
α-copaeno	22,43	0,31	0,36	0,16	0,16	0,19
(E)-cariofileno	23,75	7,28	8,03	4,50	4,61	6,54
α-(E)-bergamoteno	24,09	0,20	0,18	-	-	-
aromadendreno	24,27	0,52	0,66	0,33	0,42	0,39
α-humuleno	24,66	0,32	0,37	0,15	0,29	0,25
viridifloreno	25,76	0,36	0,45	0,20	0,25	0,30
δ-cadineno	26,41	0,15	0,20	0,10	0,28	0,13
óxido de cariofileno	28,13	0,38	1,14	1,22	1,17	0,89

^a Índice de retenção calculado utilizando a equação de Van den Dool e Kratz 1963 em relação a uma série homóloga de *n*-alcanos (*n*C9-*n*C18).

^b Valores (± EPM) do conteúdo dos compostos obtido pela média de três diferentes determinações.

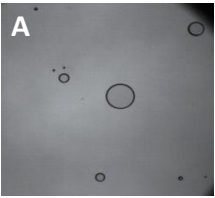

Imagem (aumento de 20.000 x)	Tamanho da partícula (nm)	Potencial zeta (mV)	Índice de Polispersão	pH
	58,0	-27,0	0,37	6,97
	78,0	-31,0	0,28	8,85

Fig. 2 Imagem obtida por microscopia de luz polarizada e propriedades físicas das nanoformulações de *Lippia sidoides* (A) e timol (B).

Tabela 2 Toxicidade por aplicação tópica do óleo essencial de *Lippia sidoides*, do timol e de suas nanoformulações sobre adultos de populações de *Sitophilus zeamais* após 72 horas de exposição.

População	N. de insetos	DL ₅₀ (IC 95%) ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	DL ₉₀ (IC 95%) ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	Inclinação	χ^2	<i>p</i>
<i>L. sidoides</i>						
Maracaju	360	7,10 (5,77–8,67)	43,63 (31,81–66,83)	1,62	0,56	0,75
Aracaju	360	14,28 (12,33–16,02)	44,72 (35,05–68,63)	2,58	1,06	0,59
Rio Branco	520	15,37 (13,01–18,36)	79,16 (54,70–142,65)	1,79	0,26	0,87
Sete Lagoas	520	17,77 (16,94–18,70)	26,88 (24,87–29,77)	7,12	0,09	0,95
Jacarezinho	520	19,93 (18,38–21,45)	41,15 (35,52–51,91)	4,06	1,93	0,61
Timol						
Maracaju	360	17,08 (15,26–18,79)	43,07 (36,28–56,03)	3,18	2,05	0,35
Aracaju	360	25,55 (21,95–34,51)	108,64 (61,90–335,00)	2,03	0,03	0,98
Rio Branco	440	24,71 (20,32–30,92)	172,78 (104,94–413,36)	1,51	0,80	0,67
Sete Lagoas	360	17,76 (14,41–23,33)	100,68 (62,71–214,75)	1,69	0,91	0,63
Jacarezinho	360	25,71 (20,39–38,47)	41,12 (36,74–48,75)	6,27	0,73	0,70
Nanoformulação com <i>L. sidoides</i> ^a						
Maracaju	440	26,44 (23,27–31,18)	81,72 (61,48–124,80)	2,61	0,31	0,95
Jacarezinho	480	35,96 (31,81–40,54)	114,23 (83,53–215,23)	2,55	0,27	0,87
Nanoformulação com timol ^a						
Maracaju	480	20,75 (19,13–22,32)	40,55 (37,01–45,42)	4,40	0,28	0,96
Jacarezinho	520	27,71 (24,86–30,51)	61,04 (54,12–71,14)	3,73	0,05	0,97

* As nanoformulações foram testadas nas populações mais e menos susceptíveis ao óleo essencial de *L. sidoides* e ao timol.

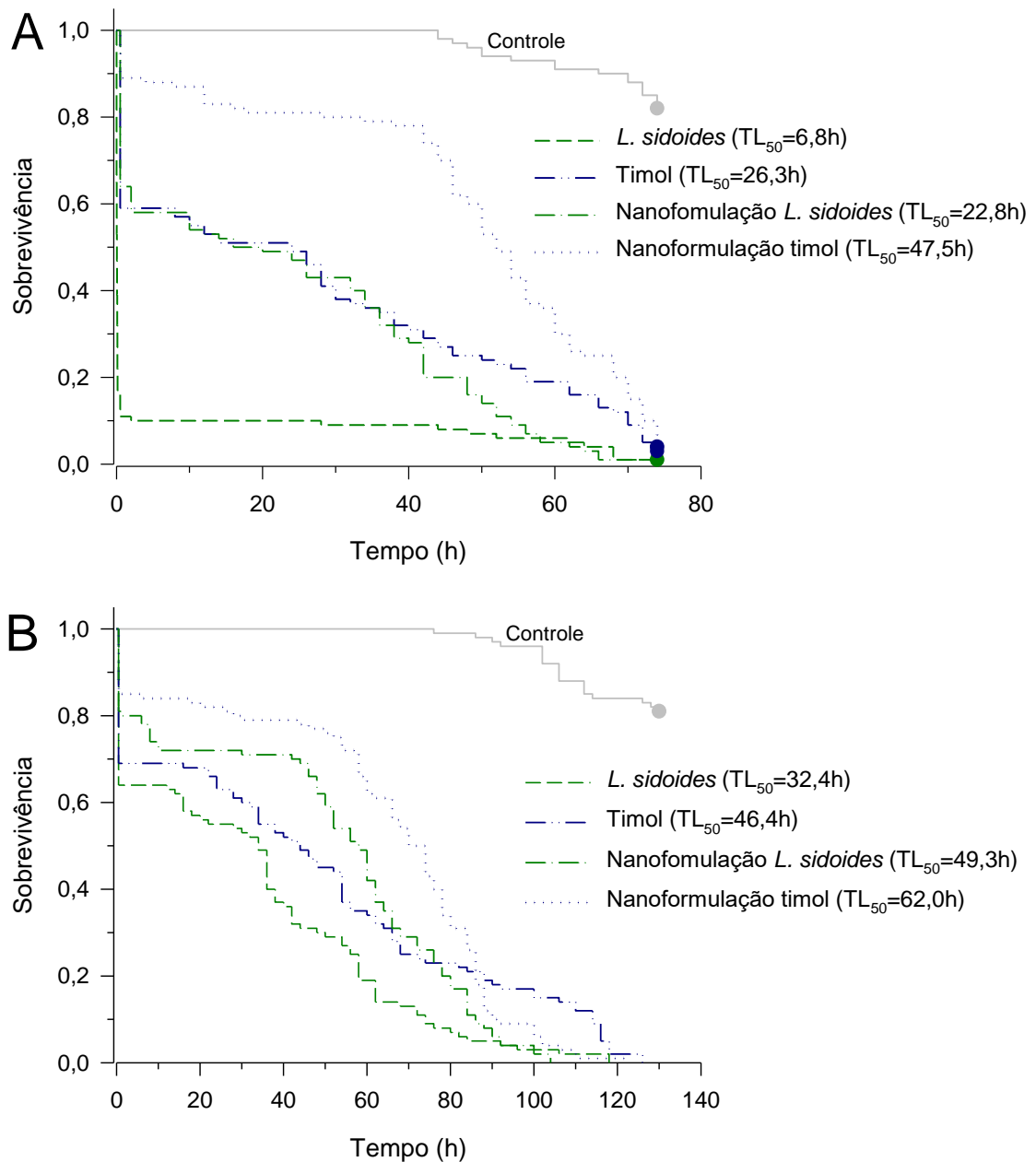


Fig. 3 Curvas de sobrevivência e tempo letal (TL₅₀) das populações de *Sitophilus zeamais* provenientes de Maracaju (A) e Jacarezinho (B) expostas por aplicação tópica (DL₉₅) ao óleo essencial de *Lippia sidoides*, timol e suas nanoformulações.

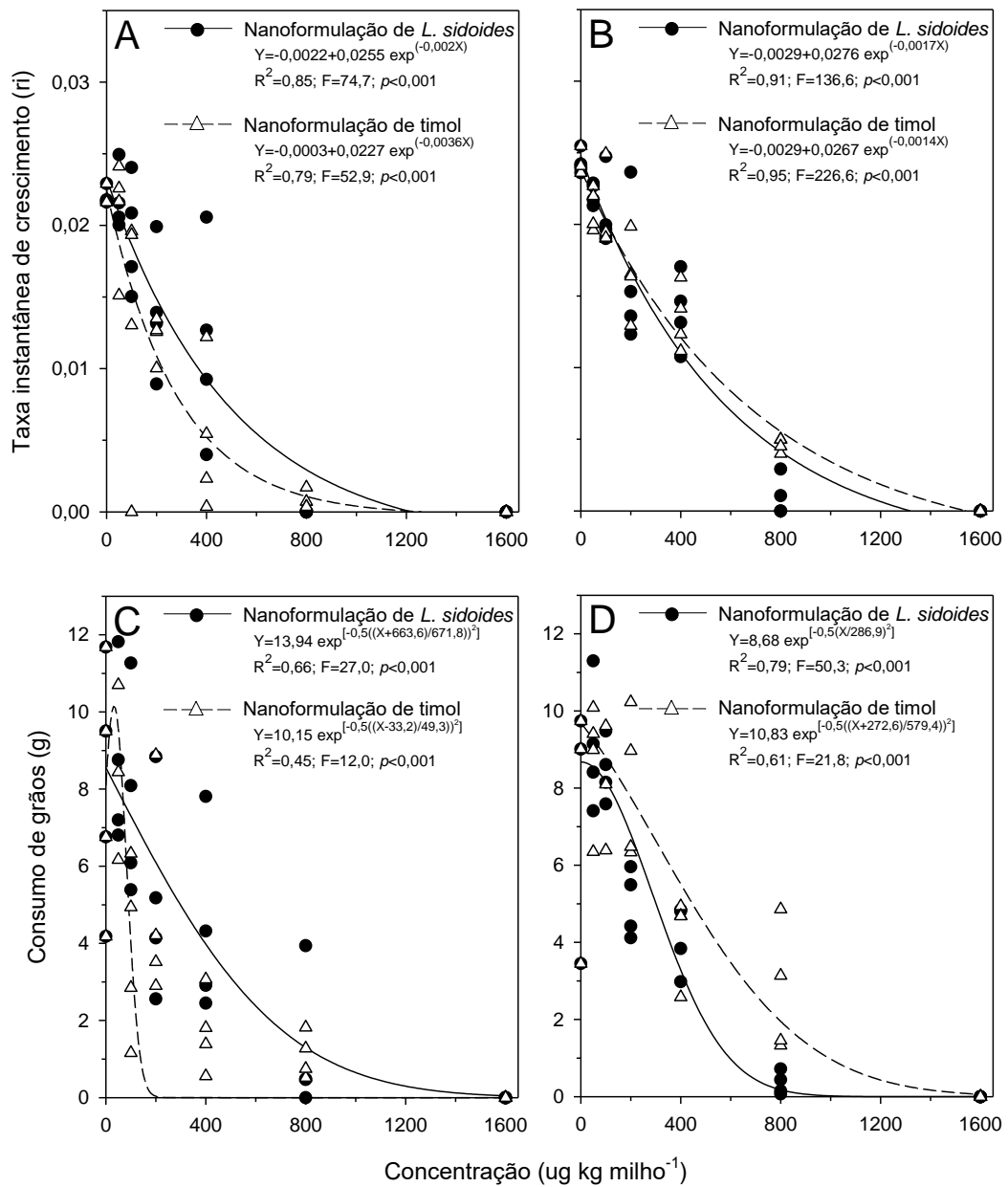


Fig. 4 Taxa instantânea de crescimento (ri) e consumo de grãos de milho (g) das populações de *Sitophilus zeamais* provenientes de Maracaju (A e C) e Jacarezinho (B e D) após 90 dias de exposição às nanoformulações contendo o óleo essencial de *Lippia sidoides* e timol em diferentes concentrações.

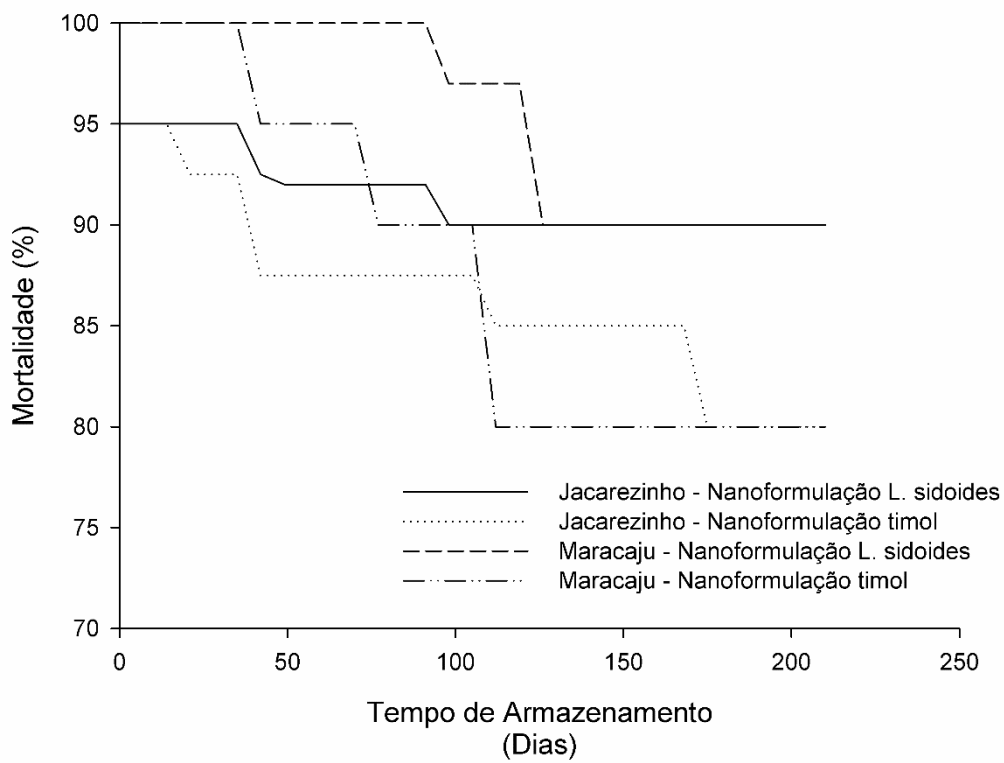


Fig. 5 Mortalidade das populações de *Sitophilus zeamais* provenientes de Maracaju e Jacarezinho expostas por aplicação tópica (DL_{90}) as nanoformulações contendo o óleo essencial de *Lippia sidoides* e timol armazenadas por 210 dias.