

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**NANO-MICROENCAPSULADOS DE EXTRATO DE
Azadirachta Indica USANDO LIGNINAS DO BAGAÇO DE
CANA-DE-AÇÚCAR: ESTABILIDADE E EFICÁCIA
CONTRA INSETOS PRAGAS**

EVELINE SOARES COSTA

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTORA EM CIÊNCIAS, área de
concentração: QUÍMICA ORGÂNICA

Orientador: Prof. Dr. Moacir Rossi Forim

***Bolsista FAPESP**

**São Carlos - SP
2014**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C837ne Costa, Eveline Soares.
Nano-microencapsulados de extrato de *Azadirachta indica* usando ligninas do bagaço de cana-de-açúcar : estabilidade e eficácia contra insetos pragas / Eveline Soares Costa. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
140 f.

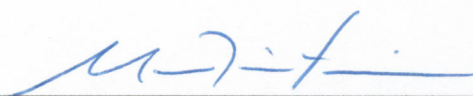
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Química orgânica. 2. Lignina. 3. Bagaço de cana. 4. Nim. 5. Microencapsulação. I. Título.

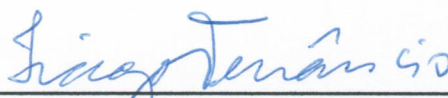
CDD: 547 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de Doutorado da candidata **Eveline Soares Costa**, realizada em 25 de julho de 2014:*



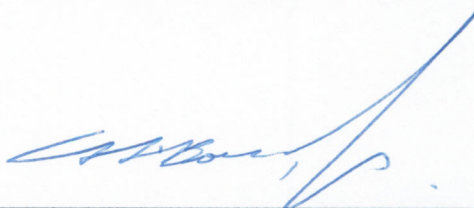
Prof. Dr. Moacir Rossi Forim



Prof. Dr. Tiago Venâncio



Dr. Adrian Martin Pohlit



Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Junior



Profa. Dra. Andréia Pereira Matos

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, aos meus familiares e a todos que estiveram presente em minha trajetória acadêmica.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Moacir Rossi Forim pelos ensinamentos, apoio e paciência;

Aos professores do Laboratório de produtos naturais da UFSCar, Dr. João Batista Fernandes e Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva pela contribuição para a conclusão deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Tiago Venâncio e seus alunos de doutorado Elenilson e Lorena, pelas análises no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UFSCar;

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho e a aluna de doutorado Marília pelos experimentos no Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microorganismos da UFSCar;

Ao Prof. Dr. Caio Márcio Paranhos pelos experimentos no Laboratório de Polímeros da UFSCar;

Ao Prof. Dr. Humberto M. S. Milagres pelos experimentos no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP – Araraquara;

Ao Prof. Dr. Antônio Aprígio da Silva Curvelo pelos experimentos desenvolvidos no Laboratório de Físico Química do Instituto de Química de São Carlos – USP;

À Prof. Dra. Andréia Matos e sua aluna Ana Carolina pelos ensaios biológicos no Laboratório de Bioensaios da UFSCar;

Ao Prof. Arlindo Leal Boiça Júnior e seu aluno de doutorado Eduardo pelos ensaios biológicos desenvolvidos no Laboratório de Resistência de Plantas a insetos, localizado no Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal – SP;

À Profa. Dra Vânia Maria Ramos e aos alunos de mestrado Viviane e Rafael pelos ensaios biológicos no Laboratório de Entomologia Agrícola da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Oeste Paulista – Presidente Prudente/SP;

À Dra. Inajá M. Wenzel, pela amizade, troca de conhecimento e pelos ensinamentos com entomologia;

À Doraí, pela ajuda laboratorial, pelos conselhos e pela grande amizade;

Aos amigos do Laboratório, principalmente ao Bruno Perlatti por sempre contribuir com seu vasto conhecimento;

Aos professores da banca, por toda contribuição para a finalização deste trabalho;

Aos meus pais Rosa Maria Soares e José Leonando Costa, pelo apoio e carinho que sempre dedicaram a mim;

Aos meus irmãos, Franciene, Lorraine e Istanlei, ao meu cunhado Fabian, aos meus sobrinhos Leonando Luiz e Henrique, pelas conversas e amizade;

Ao Lucio pelo companheirismo, amizade e compreensão;

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo – FAPESP- pelo apoio financeiro;

E a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APCI-MS	Ionização Química à Pressão Atmosférica acoplada à Espectrometria de massa
ACN	Acetonitrila
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Ultra Violeta
CLAE-EM/EM	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrômetria de massas
DHB	2,5-dihydroxybenzoic acid
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMSO-d6	Dimetil sulfóxido deuterado
DP	Potencial de desagrupamento
ESI	Eletrospray
EP	Potencial de Entrada
EDTA	Etilenodiaminotetraacetato de cálcio e dissódico
FP	Potencial de foco
GS1	Gás de Nebulização 1
GS2	Gás de Nebulização 2
GPC	Cromatografia de permeação em gel
IV-TF	Infravermelho com Transformada de Fourier
MALDI-TOF	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz – Tempo de voo
MEV	Microscopia Eletronica de Varredura
m/z	Razão massa/carga
ODS	Octadecil Silano
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno

RMN ¹³ C	Ressonância Magnética no Nuclear de Carbono
RMN ¹ H	Ressonância Magnética no Nuclear de Hidrogênio
RMN ³¹ P	Ressonância Magnética no Nuclear de Fosforo
rpm	Rotações por minuto
SPE	Extração em Fase Sólida
TMS	Tetrametilsilano
TGA	Análise Termogravimétrica
UVA/UVB	Radiação Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Alguns exemplos de biopesticidas pesquisados.....	5
TABELA 1.2 - Exemplos de ingredientes ativos utilizados na forma de formulações.....	8
TABELA 3.1 - Parâmetros de operação do <i>Spray-Dryer</i>	46
TABELA 3.3 - Denominações das formulações utilizando a Lig 3 e os aditivos de proteção para a preparação de formulações em pó da fração acetato de etila de nim.....	47
TABELA 3.3 - Denominação dos extratos brutos utilizado como controle negativo.....	50
TABELA 4.1 – Bandas de absorção na região do infravermelho típicos de ligninas.....	69
TABELA 4.2 – Bandas na região do IV das amostras de ligninas.....	72
TABELA 4.3 - Atribuição dos sinais de RMN ¹ H da Lig 3.....	73
TABELA 4.4 - Apresentação dos procedimentos de obtenção das amostras de ligninas.....	82
TABELA 4.5 - Médias da duração de fase larval, fase pupal e massa pupal de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com formulações de nim utilizando lignina como polímero.....	105
TABELA 4.7 - Mortalidade dos indivíduos de <i>D. speciosa</i> submetidos à aplicação das formulações de nim utilizando diferentes ligninas como polímero.....	109

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Médias da mortalidade da fase larval (%) de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta artificial tratadas com extratos de <i>A. indica</i> a 100,0 mg.kg ⁻¹ (FORIM et al., 2010a).....	6
FIGURA 1.2 - Monômeros de monolignol. (a) álcool p-coumaril (4-hidroxifenil, H), (b) álcool coniferil (guaiacil, G), (c) álcool sinapil (siringil, S).....	14
FIGURA 1.3 – Processo de polpação Kraft.....	16
FIGURA 1.4 - Estrutura química da azadiractina	19
FIGURA 1.5 - Curva de degradação de azadiractina em óleos de <i>A. indica</i> (FORIM, 2009).....	21
FIGURA 3.1 - Esquema desenvolvido para a preparação das micropartículas em pó de nim.....	45
FIGURA 3.2 - Câmara de envelhecimento acelerado por ultravioleta.....	49
FIGURA 3.3 - Processo de preparação dos ensaios biológicos com <i>D. speciosa</i> : a) pedaços de cana-de-açúcar com larvas; b) pedaços de cana-de-açúcar envolvidos com as formulações; c) e d) monitoramento dos tratamentos.....	56
FIGURA 3.4 - Processo de preparação dos ensaios biológicos com <i>A. gemmatalis</i> : a) preparação da dieta artificial; b) preparação de 30 potes com pedaços de 2,0 x 2,0 de deita (10,0 g); c) inoculação da larva; d) monitoramento dos tratamentos.....	58
FIGURA 4.1 - Estrutura da lignina de abeto (<i>Picea abies</i>) proposta por Adler (RUZENE, 2005).....	64

FIGURA 4.2 - (a) Lig 3 obtida pelo processo alcalino; (b) lignina resultante da oxidação da lig 3 com 9% (v/v) de H ₂ O ₂ ; (c) lignina resultante da oxidação com 14% (v/v) de H ₂ O ₂	67
FIGURA 4.3 - Análise de MEV das ligninas: (a) Lig 3 obtida pelo processo alcalino; (b) lignina resultante da oxidação da Lig 3 com 9 % (v/v) de H ₂ O ₂ ; (c) lignina resultante da oxidação da Lig 3 com 14 % (v/v) de H ₂ O ₂ , nas aproximações de 1000 (1), 5.000 (2) e 10.000 (3) vezes.....	66
FIGURA 4.4 - Espectro de IV-TF da Lig 3.....	68
FIGURA 4.5 - Espectro de RMN de ¹ H da Lig 3. Solubilizada em DMSO-d ₆ , temperatura de 30 °C e operando a 400 MHz.....	71
FIGURA 4.6 - Análise quimiométrica RMN de ¹ H das amostras de ligninas extraídas, oxidadas e acetiladas. Solubilizada em DMSO-d ₆ , temperatura de 30°C e operando a 400 MHz.....	73
FIGURA 4.7 - Espectros de IV das ligninas: A) Lig 3_Ac e B) Lig 3.....	75
FIGURA 4.8 - Estruturas das unidades fenilpropanóides precursores da molécula de lignina.....	76
FIGURA 4.9 - Espectro de MALDI-TOF da Lig 3 obtida pelo processo alcalino. Os parâmetros de análise foram descritos no tópico 3.4.3.....	77
FIGURA 4.10 - Análise de quimiometria dos espectros de MALDI-TOF das amostras de ligninas. Os parâmetros de análise foram descritos no tópico 3.4.3.....	78
FIGURA 4.11 - (a) Lig 3; (b) Lig 3_Ac; (c) Lig 3 oxi; e (d) Lig 4.....	83
FIGURA 4.12 – Imagens de MEV das ligninas nas aproximações de 20,0 a 2,0 μm.....	86
FIGURA 4.13 - Análise de TGA das ligninas.....	88
FIGURA 4.14 - Cromatogramas das frações de nim obtidas pelo fracionamento do extrato etanólico: A) fração acetato de etila; B) fração	

aquosa e; C) fração hexano obtidos por CLAE-UV. As condições operacionais de análise foram: coluna de fase reversa Rexchrom ODS (100 × 4,6 mm, 3 μm) Regis Technologies acoplada a uma coluna de segurança C18 (Phemonemex[®] 4 × 3mm) aclimatada em forno a 30 °C, eluição isocrática de fase móvel binária de acetonitrila/água (35:65), vazão de 0,5 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 10,0 μL. Todos os experimentos foram realizados operando o detector em 217 nm.....91

FIGURA 4.15 – Curva de área versus concentração de azadiractina por CLAE-UV. Curva de calibração construída com as soluções padrões de azadiractina (*n* = 9).....91

FIGURA 4.18 - Curvas de recuperação de azadiractina presente no extrato bruto de nim. Legenda: EXB = extrato bruto; EXB cont = extrato bruto protegido da luz; ExT = extrato bruto com Tinogard[®]; ExS = extrato bruto com Styleze[®]; ExST = extrato bruto com Tinogard[®]e Styleze[®]; ExSi = extrato bruto com silicone.....95

FIGURA 4.17 - Valores normalizados de degradação sob o *t*_{1/2} das amostras dos extratos de nim com os aditivos.....96

FIGURA 4.18 - Curvas de degradação de azadiractina presentes nas formulações da partição acetato de etila do nim utilizando diferentes ligninas.....97

FIGURA 4.19 - Valores normalizados de degradação sob o *t*_{1/2} das formulações utilizando as diferentes ligninas como envoltório.....96

FIGURA 4.20 - Comparação da formulação utilizando a Lig 3 com as formulações com aditivos. Legenda: Lig 3 = lignina extraída pelo processo alcalino; Lig 3E = lignina com EDTA; Lig 3S = lignina com Styleze[®]; Lig 3Si = lignina com silicone; Lig 3T = lignina com Tinogard[®]; Lig 3ST = lignina com Styleze[®] e Tinogard[®]; EXB = Extrato bruto de nim.....99

FIGURA 4.23 - Curvas de degradação por temperatura de azadiractina presente nas formulações da partição acetato de etila do nim utilizando diferentes ligninas.....	101
FIGURA 4.22 – Imagens de MEV das ligninas: (a) Lig 4 e (b) Lig 3, nas escalas de 5 e 3 μm , respectivamente.....	102
FIGURA 4.23 – Imagens das larvas de <i>S. frugiperda</i> : a) larvas mortas após ingerir a dieta com as formulações de nim e; b) lagarta com 12 dias.....	106
FIGURA 4.24 - Curva de mortalidade da <i>D. saccharalis</i> alimentadas com as formulações de nim.....	109
FIGURA 4.25 - Larvas de <i>D. saccharalis</i> : a) Indivíduos alimentado com formulação de nim na dieta; b) indivíduo controle.....	110
FIGURA 4.26 - Curva de mortalidade da <i>D. saccharalis</i> alimentada com cana-de-açúcar e as formulações de nim.....	111
FIGURA 4.27 - Indivíduos de <i>D. saccharalis</i> alimentados com pedaços de cana-de-açúcar: a) alimentados com a cana-de-açúcar e formulação; b) alimentados apenas com cana-de-açúcar.....	112
FIGURA 4.28 - Curva de mortalidade da espécie <i>A. gemmatalis</i>	113
FIGURA 4.29 - Lagartas de <i>A. gemmatalis</i> : a) lagarta alimentada com dieta artificial e formulações; b) lagarta alimentada apenas com a dieta artificial.....	114

RESUMO

NANO E MICRO ENCAPSULAMENTO DO EXTRATO VEGETAL DE *Azadirachta indica* USANDO LIGNINAS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um bioinseticida modelo para controle de insetos-pragas formulado com extrato vegetal de *Azadirachta indica* (nim), microencapsulado, utilizando como polímero natural ligninas extraídas do bagaço da cana-de-açúcar. Foram realizados diferentes métodos de extração e modificação química da lignina no intuito de comparação de rendimento, custo, vantagens ambientais e eficácia biológica. Entre as modificações químicas propostas as principais foram reações de oxidação e acetilação. As técnicas utilizadas para a caracterização do biopolímero foram o IV-TF, RMN de ^1H , MALDI-TOF e MEV. Técnicas de quimiometria foram empregadas na análise de RMN, auxiliando na diferenciação dos biopolímeros segundo seu grupo: oxidadas, acetiladas e naturais. As ligninas foram utilizadas em processos de microencapsulação de extratos e frações do inseticida natural, *Azadirachta indica* L. Juss, por *Spray-Drying*. Os produtos obtidos foram submetidos a ensaios de degradação térmica e fotoquímica. A formulação promoveu ganhos de estabilidade em aproximadamente 40% para o extrato vegetal formulado. O uso de protetores térmicos e UV comerciais também foram investigados onde verificou-se que

a lignina foi mais eficiente que protetores fotoestabilizantes tradicionalmente comercializados, mostrando assim, a não necessidade de inserir aditivos sintéticos no processo de microencapsulamento e, conseqüentemente, no produto final. O microencapsulamento foi realizado utilizando o processo nomeado Nanoemulsão/Deslocamento Solvente desenvolvido no grupo de trabalho. Neste processo, o material vegetal foi nanoemulsionado, revestido por um filme biopolimérico formando as nanocápsulas e secas pela técnica de *Spray-Drying* gerando um *cluster* em escala micrométrica. Todo material formulado foi submetido a ensaios biológicos para os insetos *Spodoptera frugiperda*, *Diabrotica speciosa*, *Diatraea saccharalis* e *Anticarsia gemmatalis* que foram usados como modelos. Os dados obtidos nos ensaios biológicos demonstraram que as formulações preparadas com nim e ligninas como envoltórios foram ativas contra os insetos-pragas tanto quanto o extrato vegetal não formulado.

ABSTRACT

NANO AND MICRO ENCAPSULATION OF BOTANICAL EXTRACTS OF *Azadirachta indica* USING SUGARCANE BAGASSE LIGNINS. The present work aimed the development of a model bioinsecticide for pest insect control using microencapsulated botanical extracts of *Azadirachta indica* (neem), and natural polymer of lignins, which were extracted from sugarcane bagasse. Several different extraction methods and chemical modifications were carried out on lignin in order to evaluate yield, cost, environmental advantages and biological efficacy. Among the proposed chemical modifications the main reactions were oxidation and acetylation. Techniques used for biopolymer characterization were FITR, ¹H NMR, MALDI-TOF and SEM. Chemometric tools on NMR analyses aided on lignin differentiation according to their groups: oxidized, acetylated and naturals. Lignins were used in microencapsulation processes of extracts and fractions of the natural insecticide, *A. indica* L. Juss, by using Spray-Drying methods. The obtained products were subjected to thermal and photochemical degradation assays. The formulation promoted stability gains of approximately 40% for the formulated botanical extract. Use of commercial thermal and photochemical protectors were also investigated where it was observed that lignin was more efficient than traditional commercial photostabilizers protectors, showing that

there is no need for adding synthetic protectors on microencapsulation process, and consequently, they are not needed on the final product. Microencapsulation was done through process known as Nanoemulsion/Solvent Displacement developed by the workgroup. In this process, botanical material was firstly nanoemulsioned, coated by a biopolymeric film in order to promote nanocapsules, and dried using Spray-Dryer generating micrometric clusters. All formulated material was subjected to biological assays to *Spodoptera frugiperda*, *Diabrotica speciosa*, *Diatraea saccharalis* e *Anticarsia gemmatalis*. Data obtained on biological testes shows that formulations that were prepared with neem and lignin were as active as non-formulated botanical extract on pest insects.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Desenvolvimento de biopesticidas.....	3
1.2 – Formulação.....	7
1.3 – Nanotecnologia.....	9
1.4 - A Cana-de-açúcar e as Ligninas.....	11
1.5 – Métodos de polpação e isolamento de ligninas.....	16
1.6 – Métodos de análises de ligninas.....	18
1.7 – <i>Azadirachta indica</i> (nim).....	18
1.8 - Insetos pragas.....	23
1.8.1 - <i>Spodoptera frugiperda</i>	23
1.8.2 – <i>Diabrotica speciosa</i>	24
1.8.3 – <i>Anticarsia gemmatalis</i>	25
1.8.4 – <i>Diatraea saccharalis</i>	26
2 – OBJETIVO GERAL	29
2.1 - Objetivos específicos.....	29
3 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	31
3.1 - Equipamentos.....	31
3.2 – Materiais utilizados.....	32
3.3 - Extração das ligninas.....	33
3.3.1 - Teor de umidade.....	34
3.3.2 - Polpação pelo Processo Formacell.....	34
3.3.3 - Polpação alcalina.....	35
3.3.3.1 - Polpação alcalina do Bagaço em reator com banho de glicerina.....	37
3.3.4 - Oxidação das ligninas.....	38
3.3.5 - Acetilação das ligninas.....	38

3.4 - Caracterização estrutural da lignina.....	39
3.4.1 - Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF).....	39
3.4.2 - Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	39
3.4.3 – Espectrometria de massas por MALDI-TOF.....	40
3.4.4 - Ressonância magnética nuclear (RMN).....	40
3.4.5 - Análise termogravimétrica (TGA)	41
3.5 - Preparo e análise de extratos de <i>Azadirachta indica</i>	41
3.5.1 - Preparo do extrato das sementes de <i>Azadirachta indica</i> (nim).....	42
3.5.2 - Preparo de amostras para análise quantitativa por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	43
3.5.3 - Quantificação da azadiractina presente nas frações por CLAE- UV.....	44
3.6 - Preparo das micropartículas carregadas com extratos de nim.....	45
3.6.1 - Preparo das micropartículas carregadas com extratos de nim e aditivos.....	46
3.6.2 - Degradação fotoquímica assistida das formulações e do extrato bruto etanólico de nim.....;	47
3.6.3 - Degradação assistida por temperatura das formulações e da fração acetato de etila de nim.....	51
3.7 - Ensaio biológicos com insetos pragas.....	52
3.7.1 - Ensaio com a <i>Spodoptera frugiperda</i>	52
3.7.2 - Ensaio com a <i>Diabrotica speciosa</i>	54
3.7.3 - Ensaio com a <i>Diatraea saccharalis</i>	55
3.7.4 - Ensaio com a <i>Anticarsia gemmatalis</i>	56
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1 - Bagaço de cana-de-açúcar e as ligninas.....	59

4.1.1 - Extração das ligninas.....	61
4.1.2 - Processo de oxidação das ligninas.....	63
4.1.3 - Processo de acetilação das ligninas.....	67
4.2 - Caracterização das ligninas.....	67
4.2.1 - Caracterização das ligninas por espectrometria de massas.....	75
4.2.3 - Análise conjunta dos dados de caracterização.....	80
4.3 - Preparo de microcápsulas bioinseticidas carregadas com extrato de <i>Azadirachta indica</i>	82
4.3.1 - Caracterização das ligninas selecionadas para o processo de microencapsulamento.....	85
4.4 - Controle de qualidade de produtos naturais.....	89
4.4.1 - Quantificação da azadiractina presente nas frações obtidas do extrato vegetal de nim.....	90
4.5 - Análise de degradação das formulações.....	93
4.5.1 – Degradação fotodinâmica.....	93
4.5.2 - Degradação térmica.....	99
4.6 - Ensaio biológico.....	102
4.6.1 - <i>Spodoptera frugiperda</i>	103
4.6.2 - <i>Diabrotica speciosa</i>	106
4.6.3 - <i>Diatraea saccharalis</i>	108
4.6.4 - <i>Anticarsia gemmatilis</i>	112
5 - CONCLUSÃO.....	115
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117

1– INTRODUÇÃO

Desde os primórdios a humanidade tem nos insetos um dos principais fatores limitantes do desenvolvimento e produtividade. As primeiras técnicas de gerenciamento de insetos são descritas desde a antiguidade (século 16 a.C.), onde são relatadas várias substâncias químicas e orgânicas usadas para controlar pulgas, mosquitos e moscas (PANAGIOTAKOPULU et al., 1995). Durante as décadas de 30, 40 e no início de 1950, compostos químicos tóxicos, como arsênio, mercúrio, chumbo e organoclorados, foram amplamente utilizados como agrotóxicos (DALY et al., 1998; MILLER, 2002). Somente a partir da Segunda Guerra Mundial, visando aumentar a provisão de alimentos para atender uma explosão demográfica mundial, é que houve necessidade de se buscar produtos mais eficientes (VEIGA et al., 2006). Com o aumento na produção agrícola de países não industrializados, países como o Brasil e a Índia foram alguns dos principais beneficiados, mas juntamente com esses benefícios, alguns problemas começaram a surgir, sendo estes observados a partir do crescimento acelerado e desordenado do setor agrícola (PAULUS, 1999)

Na década de 90 a preocupação sobre o meio ambiente aumentou, pois umas das maiores consequências do crescimento da produção agrícola foi o consumo elevado e descontrolado de agrotóxicos, destacando-se o composto dicloro-difenil-tricloroetano (DDT). (ALVAREZ et al., 2003; SHABBIR et al., 2005).

Entre os países da América Latina, o Brasil se destaca como o maior consumidor de inseticidas (SPADOTTO, 2006) e em 2008, o Brasil se tornou o maior consumidor mundial, quando utilizado mais de 700.000 toneladas que geraram receita de 7,1 bilhões de dólares para a indústria química. Agrotóxicos no Brasil estão disponíveis através de 1.079 produtos de 470 ingredientes ativos, os quais são divididos em herbicidas (45%), inseticidas (27%) e fungicidas (28%) (PEDLOWSKI et al., 2012).

Os agroquímicos são usados de diferentes maneiras, em função das suas características físico-químicas. No entanto, devido a vários processos de degradação, tais como lixiviação ou destruição por luz, temperatura, microorganismo ou mesmo a água (hidrólise), apenas uma pequena quantidade destes produtos químicos chegam ao local de destino. Neste caso, as concentrações aplicadas destes compostos têm sido muito maiores do que o necessário. Por outro lado, a concentração que alcança o seu alvo pode ser mais baixa do que o mínimo necessário para a eficácia (MOGUL et al., 1996). Em geral, dependendo do tempo e do método de aplicação, a quantidade de agroquímicos aplicados, de até 90%, pode não atingir a meta e por isso não produzir a resposta biológica desejada. Por esta razão, a aplicação repetida dos agroquímicos se torna necessária, portanto, para um eficiente controle das pragas alvo, o aumento do custo e consequências indesejáveis para o ecossistema podem ser observados (MOGUL et al., 1996).

A produção agrícola tem na ocorrência de pragas e doenças um dos principais fatores limitantes ao seu desenvolvimento. É inevitável o uso de defensivos agrícolas para reduzir a perda da produção agrícola. Devido à urgência de novos defensivos agrícolas, a introdução dos mesmos aconteceu de tal forma que não foram estudados seus efeitos toxicológicos (SAIL et al., 1993). Devido à falta de seletividade, o seu uso sem restrições também podem levar à eliminação de inimigos naturais, o que implica no crescimento rápido da população praga. Além disso, muitas vezes faz com que os insetos criem resistência para os agroquímicos (MOGUL et al., 1996)

1.1 - Desenvolvimento de biopesticidas

Além dos produtos sintéticos convencionais formulados, hoje, os “bio” pesticidas (nome tradicional utilizado para os pesticidas de origem natural) constituem-se como uma opção e/ou complemento ao desenvolvimento de novas formulações para o controle de pragas, reduzindo ou eliminando o uso de agrotóxicos. Os biopesticidas são geralmente classificados como: i) produtos vegetais ou microbianas ou ii) microorganismos vivos que são capazes de controlar patógenos de plantas e pragas (ROUSIDOU et al., 2013).

Recentemente, o Spinosad (*Tracer*[®]), composto principalmente por espinosina A e espinosina D, obtidas da fermentação aeróbia pela bactéria de solo *Saccharopolyspora spinosa*. Esse produto natural foi registrado para o uso como um protetor em produtos armazenados, tais como trigo, arroz, sorgo,

aveia, cevada e milho nos EUA. O Spinosad, por sua característica natural foi aprovado para uso na agricultura orgânica por numerosos órgãos de certificação nacional e internacional (EISSA et al., 2014).

Diversos produtos naturais são relatados na literatura como biopesticidas e alguns exemplos foram citados na TABELA 1.1.

Os biopesticidas podem resultar em redução de custos de produção, prevenir danos provocados por insetos às culturas, ao meio ambiente e aos consumidores que, neste caso, não correm o risco de adquirir grãos, hortaliças e frutas com resíduos tóxicos (UCR-NE, 2010).

Apesar da viabilidade técnica de desenvolvimento de novos pesticidas a partir do uso dos produtos naturais, devem ser primeiramente solucionados, problemas de aplicação em campo, produção, regulamentação, armazenamento e reprodutibilidade da eficácia biológica, permitindo que tais produtos possam ser adquiridos com confiabilidade pelo mercado consumidor (CAPALBO et al., 2001). Diversos fatores podem alterar a estabilidade de um composto ativo de origem natural. Cada componente presente quer seja ele ativo ou inativo, dependendo da quantidade, pode afetar a estabilidade. Outros fatores, chamados de extrínsecos, como a temperatura, radiação, luz, ar (especificamente o oxigênio, dióxido de carbono e vapores de água), umidade, local e hora da coleta e de acondicionamento, também alteram a estabilidade e o conteúdo de compostos ativos (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Há também os fatores intrínsecos como: pH, hidrólise, racemização e oxidação.

TABELA 1.1 – Alguns exemplos de biopesticidas pesquisados.

Gênero	Biopesticidas	Referências
Bactérias e fungos	<i>Beauveria bassiana</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Bacillus sphaericus</i> <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>	EISSA et al., 2014; EISSA et al., 2014; PANNEERSELVAM et al., 2003; LUNA-FINKLER e FINKLERB, 2008; CHENG et al., 1992; YULE e SRINIVASAN, 2003;
Plantas	<i>Spinosad</i> <i>Azadiracta indica</i> <i>Rhodojaponin III</i> <i>Melia volkensii</i> <i>Melia azedarach</i> <i>Trichilia americana</i>	PINERA e ÜNER, 2013; EISSA et al., 2014; YULE e SRINIVASAN, 2003; WANDSCHEER et al., 2004; VENZON et al., 2005; MORGAN, 2009; HANIFAH et al., 2011; AHMAD, 2012; DONG, 2013; WANDSCHEER et al., 2004; AKHTAR e ISMAN. 2014ab; WHEELER et al., 2001.
Óleos essenciais	Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i> L.) Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>) Menta (<i>Mentha</i> spp.) Eugenol Monoterpeno 1,8-cineolo	VENSKUTONIS, 1997; ISMAN, 1999; KEDIA et al., 2014; ABBASZADEH et al., 2014; CHOI et al., 2004.

Na ausência de protocolos de produção e métodos de controle de qualidade torna-se impossível garantir a reprodutibilidade da ação biológica esperada para um determinado produto entre diferentes lotes. Avaliando a

reprodutibilidade biológica entre diferentes extratos de *Azadirachta indica*, Forim e colaboradores (2010a), destacam a importância do uso de método de controle de qualidade. Neste trabalho, diferentes extratos de *A. indica* obtidos por várias técnicas de extração foram aplicados contra a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae; J. E. Smith, 1797). A FIGURA 1.1 ilustra a mortalidade de larvas de *S. frugiperda* em função do teor de azadiractina (principal componente dos extratos de *A. indica*) nos extratos vegetais. Ficou evidente que as técnicas de extração mais eficiente proporcionaram extratos com melhores conteúdos do princípio ativo e melhores resultados de ação inseticida. Os extratos com maiores conteúdo do composto ativo azadiractina foram ativos mesmo em menores dosagens (FORIM et al., 2010a).

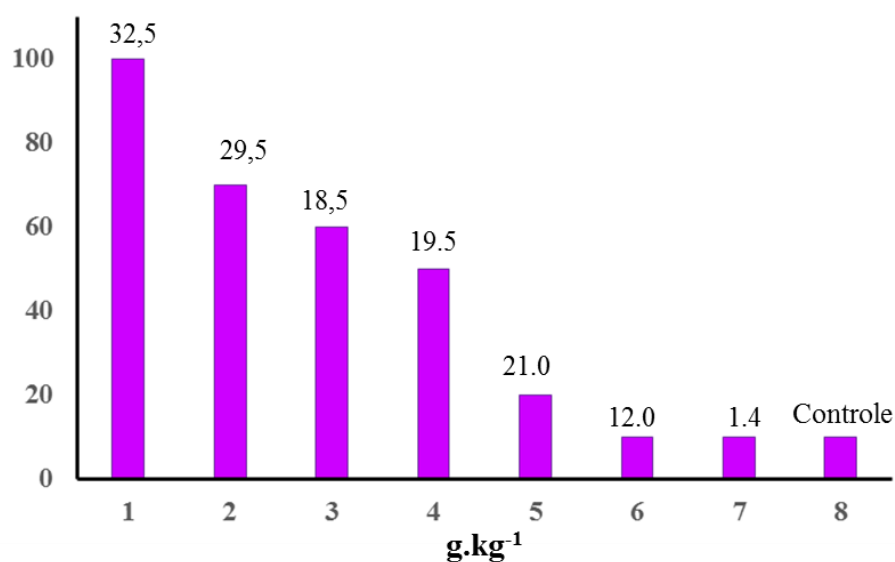


FIGURA 1.1 - Médias da mortalidade da fase larval (%) de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial tratadas com extratos de *A. indica* a 100,0 mg.kg⁻¹ (FORIM et al., 2010a).

1.2 - Formulação

Juntamente ao descobrimento, desenvolvimento de novos extratos, moléculas ativas e com a identificação de novos alvos/modo de ação, também houve a necessidade de se criar novas formulações e modos de aplicação em campo. Neste sentido, uma ampla variedade de tipos de formulações, aditivos e processos tecnológicos vêm capacitando o desenvolvimento de novos pesticidas contendo ingredientes ativos com diferentes propriedades físicas e/ou químicas. Como exemplo, pode-se citar ingredientes ativos solúveis em água que são preparados em soluções aquosas ou como pós molháveis, enquanto que ingredientes ativos oleosos, solúveis em hidrocarbonetos, são normalmente formulados como concentrados emulsionáveis (VALKENBURG, 1973).

Compostos ativos que possuem baixa solubilidade em água ou hidrocarbonetos oleosos podem ser formulados como suspensões, pós ou granulados dispersos em água (VALKENBURG, 1973). Outros tipos de formulações de aplicação especial são granulados com aplicação direta no solo, no tratamento de sementes ou durante a semeadura (DELANEY et al., 2006).

As formulações têm como objetivo promover o uso conveniente e seguro de um produto que não seja deteriorado num período de tempo e obter a máxima atividade inerente a um composto ativo. Desde a década de 80, tem ocorrido um rápido desenvolvimento de formulações mais sofisticadas, isso se deve à disponibilidade de poderosos surfactantes e outros aditivos, e um melhor entendimento dos princípios da química de colóides e de superfície que

permitem aumentar a estabilidade da formulação e sua atividade biológica. Nos últimos anos tem havido um grande aumento nos tipos de formulações indo de encontro com as necessidades do operador, segurança ambiental ou para melhorar a atividade e persistência dos compostos ativos (KNOWLES, 2008).

Atualmente a GCPF – Global Crop Protection Federation (*CropLife International*) lista cerca de 80 diferentes tipos de formulações. As mais comuns são: granulados (GR), soluções concentradas (SL), concentrados emulsionáveis (EC), pós molháveis (WP), suspensões concentradas (SC), emulsões óleo/água (EW), nanoemulsões (NE), granulados dispersos em água (WG), nanopartículas (NC), etc (FARIA e WRAIGHT, 2007). Na tabela abaixo alguns exemplos de ingredientes ativos são apresentados (TABELA 1.2).

TABELA 1.2 – Exemplos de ingredientes ativos utilizados na forma de formulações.

Ingredientes ativos	Tipo de formulação	Referências
β -Caroteno	Nanoemulsão	QIAN et al., 2012a , 2012b;
<i>Azadiracta indica</i>	Nanopartículas	DA COSTA et al., 2014;
Benomil	Pó molhável	SINGH, 1993;
Piretróide ciflutrina	Concentração emulsionáveis e Pó molhável	ARTHUR, 1994;
Lambda-cialotrina	Concentração emulsionáveis e Pó molhável	PAN et al., 2009;
Carboxilato de nicotina	Nano emulsão	CASANOVA, 2005;
Diazone	Microcapsulas	GREENE et al., 1992;

1.3 - Nanotecnologia

Uma abordagem mais sofisticada para a formulação de agroquímicos envolve a nano e microencapsulação. Entre as principais vantagens ao setor agroquímico se pode destacar sua capacidade de controlar e liberar em que condições específicas o ingrediente ativo é liberado, aumentar a solubilidade e reduzir o contato dos ingredientes ativos com os trabalhadores rurais. Um grande número de diferentes estratégias tem sido proposto para modificar as características físico-químicas das nano e micro partículas e, assim, sua interação com o meio biológico.

GREENE et al. (1992), utilizaram poliacrilatos de n-álquilo (Intelimer[®]) para produzir microcápsulas do inseticida organofosforado diazone que liberassem controladamente esse composto ativo através do aumento da temperatura, acima de 30°C, que é a temperatura de fusão do polímero. As experiências foram realizadas com as pragas *Diabrotica balteata* e *Diabrotica virgifera* à 20 °C e 32 °C, abaixo e acima do ponto de fusão do polímero, respectivamente. A mortalidade foi comparada à formulação granular comercial. Em temperaturas mais baixas, a formulação comercial apresentou melhor mortalidade. Em temperaturas mais elevadas a atividade da formulação encapsulada foi melhor, apresentando cerca de 90% de mortalidade, ao final de um período acima de 8 semanas. Sendo que a formulação comercial de fato havia perdido um pouco sua atividade, presumivelmente devido à degradação pelo calor (GREENE et al., 1992).

Através do uso das técnicas de nanoencapsulamento de substâncias orgânicas já é possível modificar a natureza química da matriz polimérica das partículas alterando certas características como biorrecognition, biodistribuição, bioadesão, biocompatibilidade, mobilidade e biodegradação. Uma segunda melhora para modificar a resposta biológica é baseada na incorporação de adjuvantes nas partículas. Nesse caso, proteínas (por exemplo, albumina, invasina e lectina) e polímeros (polietilenoglicol, poloxaminas) são algumas das moléculas comumente investigadas. Finalmente, diferentes processos de produção de nano/micropartículas estão disponíveis e podem desenvolver e/ou melhorar características físico-químicas como tamanho, estrutura, morfologia, textura de superfície e composição (SOPPIMATH et al., 2001; COUVREUR et al., 2002; TICE e GILLEY, 1985; IBRAHIM et al., 1992; CALICETI et al., 2004; ASLANI e KENNEDY, 1996; FESSI et al., 1989; BARICHELLO et al., 1999; GALINDO-RODRIGUEZ et al., 2004; GANACHAUD e KATZ, 2005; QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998; PATIL, 2003; BOCANEGRA et al., 2005; CIACH, 2006; TSE et al., 1999; COOMBES et al., 1997).

Enquanto que as nanopartículas precisam ser preparadas em meios líquidos, suspensões coloidais, as micropartículas podem ser obtidas com a remoção da água dos sistemas coloidais contendo nanopartículas utilizando um suporte de secagem pelas técnicas de liofilização ou Spray-Drying (TEWATAGNE et al., 2006; TSE et al., 1999; GARCIA-DIEGO e CUELLAR, 2005 e 2008) ou diretamente pela eliminação de solventes de produtos formulados sem

a necessidade de se obter primeiramente nanopartículas (BOCANEGRA et al., 2005; TSE et al., 1999; COOMBES et al., 1997).

1.4 - A cana-de-açúcar e as ligninas

Devido à vasta biodiversidade encontrada em seu território, o Brasil dispõe de uma grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais cujo bioprocessamento pode ser de grande interesse econômico e social (BRINGHENTIL et al., 2007). Também, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. As áreas em 2013/14 cultivadas com cana-de-açúcar, destinados à atividade sucroalcooleira estão estimadas em 8.799 milhões de hectares, sendo o estado de São Paulo o maior produtor com uma participação de 51,3% (4.515 milhões de hectares). A indústria brasileira de açúcar e álcool (sucroenergética) produziu aproximadamente 41 milhões de toneladas de açúcar e outros 27 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2013).

A cana-de-açúcar além de fornecer álcool e açúcar, fornece também matéria-prima para muitas indústrias como a do papel e bebidas, possuindo aplicações em potencial em diversos outros setores da indústria (GAMBARATO, 2010; CORDEIRO et al., 2009). Nesses processos, após sua moagem, o principal subproduto é o bagaço. Outro importante subproduto é a palha, que foi proibida gradualmente de ser queimada no campo pela Lei nº 11.241, de 19 de setembro de 2002 (LINS e SAAVEDRA, 2007).

Grande parte desse bagaço é utilizada como combustível na geração de calor e energia elétrica (VASQUÉZ et al., 2007). O bagaço e a palha são materiais lignocelulósicos compostos de celulose, hemicelulose e lignina que podem ser explorados por outros setores na produção de produtos de maior valor agregado. Como exemplo, celulosas podem ser aplicadas nas indústrias farmacêuticas, tanto na sua forma nativa quanto na forma de derivados fisicamente e quimicamente modificados. Sua gama de aplicação varia dos materiais de acondicionamento e embalagens até suportes para *soft-drugs* (NETO e PETROVIK, 1997). Em outros setores da indústria, produtos derivados de celulose são encontrados em fibras, filmes, filmes fotográficos, substitutos de vidro e ligas para tintas ou pastas de papel, adesivos, sabonetes e resinas sintéticas. Um grande consumidor é a indústria da construção civil, que emprega gesso, cimento, pasta para papel de parede ou adesivos especiais com espessantes à base de celulose. As substâncias preferidas são os chamados éteres de celulose, que incluem principalmente o setor de construção, metilcelulose, hidroxietil celulose, carboximetil celulose e metilhidroxido propila celulose. A indústria alimentícia também depende do efeito espessante do éter celulose, que desacelera o descongelamento do sorvete, por exemplo. Neste campo há altos padrões de materiais brutos que são usados (NETZSCH, 2014). As ligninas foram utilizadas na síntese de resinas fenólicas em meio alcalino (resol) para fabricação de colas de madeira na confecção das placas de compensados e aglomerados (DOS SANTOS e CURVELO, 1999).

A lignina é um componente não-carboidrato da parede celular dos vegetais, normalmente considerada indigestível e também inibidora da digestibilidade da parede celular das plantas forrageiras, acentuando a sua ação, à medida que o vegetal amadurece (FUKUSHIMA et al., 2000). Do ponto de vista funcional, ligninas facilitam o transporte de água, conferem resistência às paredes celulares e impedem degradação dos polissacarídeos da parede, atuando como uma importante linha de defesa contra patógenos, insetos e outros herbívoros (HATFIELD e VERMERRIS, 2001).

Pesquisas têm sido realizadas com o intuito de permitir aplicações mais nobres em termos tecnológicos das ligninas a partir de um maior conhecimento das propriedades desta complexa e abundante matéria-prima (ALESSIO et al., 2008). As ligninas são biossintetizadas via polimerização de três monômeros fenilpropanóides (C6-C3) (FIGURA 1.2). Estes monômeros apresentam estruturas que variam entre si apenas no grau de metoxilação dos carbonos 3 e 5. São eles os alcoóis *p*-coumarílico (ausência de grupamentos metoxílicos), coniferílico (metoxilação no C3) e sinapílico (metoxilação nos C3 e C5) (FUKUSHIMA e HATFIELD, 2003) e esses monolignóis variam de acordo com a planta (SUHAS et al., 2007; DEWICK, 2009; MANN, 2005; DONALDSON, 2001).

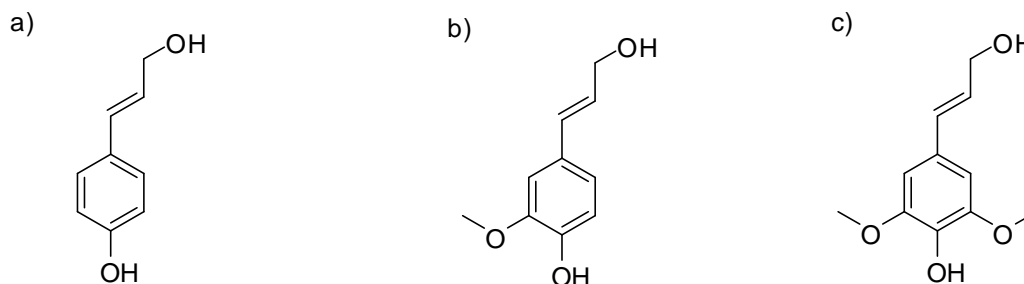


FIGURA 1.2 - Monômeros de monolignol. (a) álcool *p*-coumaril (4-hidroxifenil, H), (b) álcool coniferil (guaiacil, G), (c) álcool sinapil (siringil, S).

O acoplamento oxidativo entre monolignóis pode resultar na formação de várias ligações diferentes interunidades. Em ligninas nativas, as unidades de fenilpropano estão ligadas uma à outra por uma série de ligações características do tipo β -O-4, β -5, β - β , etc. (RUGGIERO et al., 2005).

Atualmente, há dois modelos para os radicais de acoplamento para produzir uma molécula de lignina funcional. Um deles é o modelo de acoplamento aleatório, que surgiu durante os primeiros estudos sobre a estrutura da lignina e, o segundo se baseia na definição de proteínas dirigentes de DAVIN e LEWIS (2000), onde a lignificação deve ocorrer sob regulação estrita de proteínas especializadas que controlam a formação de ligações individuais. As proteínas dirigentes irão dirigir o acoplamento de dois radicais monolignóis, produzindo um dímero com um único regio- ou estereoisômero de configuração. Estes dímeros são conhecidos como lignanas (BURANOV e MAZZA, 2008) e está comumente presente em diversas plantas. A lógica para este novo modelo é a crença de que a natureza não deixaria a formação de importantes moléculas

como lignina "ao acaso" (HATFIELD e VERMERRIS, 2001). Os monolignóis também podem formar ligações com outros polímeros da parede celular além da lignina, através de ligações polissacarídeos e protéicas cruzadas com a lignina, formando uma rede tridimensional muito complexa (BURANOV e MAZZA, 2008; WHETTEN et al., 1998).

1.5 – Métodos de polpação e isolamento de ligninas

O processo de polpação Kraft é o método dominante de produção de celulose em todo mundo, empregando uma combinação de hidróxido de sódio e sulfeto de sódio a temperaturas altas (~170 °C) onde a lignina é degradada efetivamente em fragmentos solúveis em água e fibras de polpa predominantemente compostas de celulose e hemicelulose (FIGURA 1.3). No entanto, o processo de polpação Kraft convencional remove até 95% da lignina na fibra, e a lignina restante deve ser removida empregando substâncias químicas oxidativas. Recentemente, órgãos do governo e entidades ambientalistas vêm questionando a poluição causada pelo efluente oriundo do processo de branqueamento da polpa celulósica (PERISSOTTO e RAMOS, 2002; GUERRA et al., 2007)

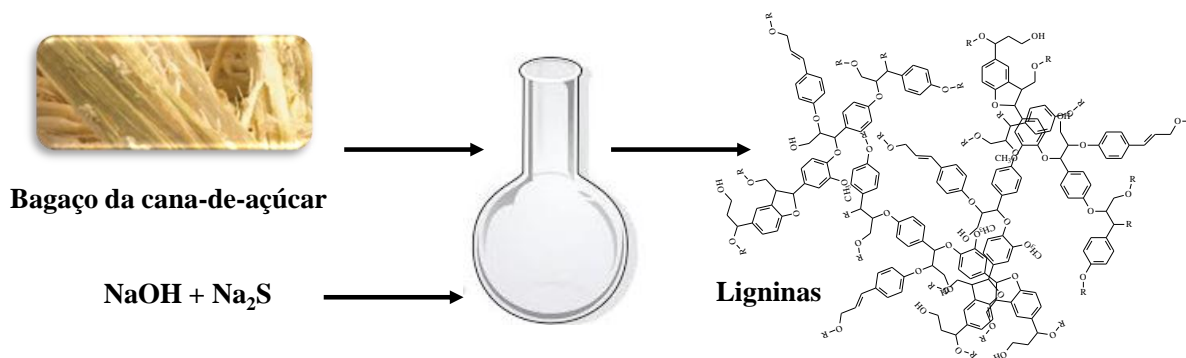


FIGURA 1.3 – Processo de polpação Kraft.

Outros métodos que podem ser citados são: a) método de Klason (VITAL et al., 1989; FUZETO, 2003; FIRMINO et al., 2006); b) processo organossolv (acetosolv e formacell) (BENAR et al., 1999); c) processo do ácido tioglicólico; d) lignina nativa ou de Brauns (ZAKZESKI et al., 2009); e) lignina liberada enzimaticamente; f) lignina de madeira moída; (SALIBA et al., 2001), g) polpação aceto; e h) deslignificação alcalina ou processo soda (SUN et al., 2003; SANTOS et al., 2010; DOHERTY et al., 2011).

As espécies vegetais possuem diferentes quantidades de ligninas e razão entre os monômeros utilizados. Em madeiras de coníferas a quantidade de ligninas é cerca de 30%. Já em madeiras de folhosas, ela pode variar entre 15% e 24%, enquanto, no bagaço de cana-de-açúcar o teor de lignina é aproximadamente 21% (ALESSIO et al., 2008).

Apesar da extensa investigação, a estrutura complexa e irregular da lignina não é completamente compreendida e isso se deve principalmente a grande diversidade da estrutura das ligninas quando se estuda diferentes

vegetais, ou até mesmo quando são analisadas partes diferentes de uma mesma planta, transformando assim a lignina em um composto de estrutura difícil de ser caracterizada (SILVEIRA e MILAGRES, 2009). Em parte, essa dificuldade se dá especialmente porque o protocolo de extração é direcionado para modificar e degradar o polímero de lignina. Embora muitos métodos químicos e enzimáticos tenham sido desenvolvidos para o isolamento de lignina a partir de fibras de matéria vegetal, nenhum deles é incapaz de causar alterações estruturais durante o isolamento. Determinar os constituintes de lignina por degradação química é uma tarefa extremamente trabalhosa, que infelizmente, não dá respostas claras como a sua composição molecular (WHETTEN et al., 1998; BANOUB, 2003; SUN et al., 2003).

1.6 – Métodos de análises de ligninas

As técnicas mais utilizadas para a análise das ligninas são a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (BILBA e OUENSANGA, 1996; COTRIM et al., 1999), ultravioleta (MANCERA et al., 2010), análise termogravimétrica (OUNAS et al., 2011), cromatografia de exclusão por tamanho (GUERRA et al., 2007; MATTINEN et al., 2008), ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C e ^{31}P (SUN et al., 2003; CAPANEMA et al., 2004; GUERRA et al., 2007) e espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF e APCI-MS (BANOUB, 2003; MATTINEN et al., 2008; YOSHIOKA et al., 2011).

1.7- *Azadirachta indica* (nim)

Azadirachta indica (Meliaceae), sin. *Antelaea azadirachta*, *Melia azadirachta*, conhecida popularmente como nim, tem sido usada por séculos no Oriente como planta medicinal aplicada no tratamento de inflamações, infecções virais, hipertensão e febre, planta sombreadora, repelente, material para construção, combustível, lubrificante, adubo e mais recentemente como inseticida (MOSSINI e EMMELMEIER, 2002). O nim, originário de Burma (Mianmar) e da Índia, pode ser encontrado em diversos países de clima tropical, da Austrália ao sul dos Estados Unidos. No Brasil, o nim foi introduzido em 1986 sendo, com sucesso, cultivado nas regiões norte, nordeste e centro oeste (MARTINEZ, 2002).

O grande interesse atual nas pesquisas envolvendo o nim, principalmente nos países ocidentais (Europa e Américas), são suas propriedades inseticidas (BOEKE et al., 2004). Atualmente o nim tem ação comprovada sobre mais de 400 espécies de insetos e ácaros, causando os mais diversos efeitos como, por exemplo, repelência, efeito antifágico, repelência de postura, interrupção do desenvolvimento e da ecdise, atraso no desenvolvimento, redução da fertilidade e fecundidade e diversas outras alterações no comportamento e na fisiologia dos insetos, que podem levar a um controle populacional ou mesmo à morte dos insetos (MARTINEZ, 2002; MORDUE e BLACKWELL, 1993; DHAR et al., 1998).

O principal composto ativo do nim é um limonóide tetranortriterpeno C-*seco* conhecido como azadiractina (FIGURA 1.4) A azadiractina é um limonóide que se concentra principalmente nos frutos, contudo, pode ser encontrado em menores teores em toda a planta (FORIM, et. al., 2010b)

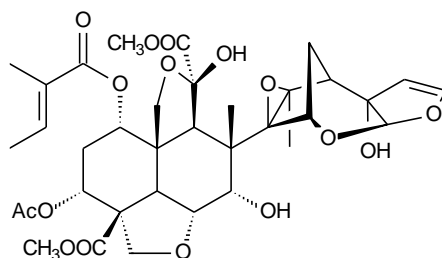


FIGURA 1.4 - Estrutura química da azadiractina.

Do ponto de vista prático, o nim apresenta diversas características que o tornam muito promissor para o uso no controle de pragas: (i) a planta não precisa ser destruída para se produzir os extratos e possui uma multiplicidade de compostos, o que torna mais difícil aos insetos adquirirem resistência, (ii) a concentração dos compostos ativos é alta, (iii) os compostos são parcialmente solúveis em água e são fáceis de extrair e com baixo custo, (iv) pela sua forma de ação os compostos são mais tóxicos às pragas que aos inimigos naturais, (v) os produtos são praticamente inócuos ao ambiente e ao homem, (vi) são totalmente biodegradáveis, com baixa persistência no ambiente, etc. (CHARLETON et al., 2005).

Apesar das diversas características favoráveis no uso do nim, sua aplicação agrícola ainda enfrenta algumas dificuldades tecnológicas que precisam ser superadas. Os produtos tradicionais de nim comercializados hoje,

não oferecem nenhuma proteção aos compostos ativos. Estudos demonstraram que a atividade atribuída à molécula da azadiractina presente no óleo de nim pode ser reduzida a quase 60% após 4 h de exposição deste produto ao sol, podendo chegar próximo a 50% em 15 h (MARTINEZ, 2002; FÖRSTER e MOSER, 2000). Resultados obtidos no campo indicaram que o extrato da *A. indica* aplicado sobre as culturas podem permanecer ativos por cerca de três dias apenas (BARREK et al., 2004). Mesmo quando os produtos comerciais de nim são armazenados sob condições ideais, como ao abrigo da umidade, luz e temperatura, o teor de azadiractina decai em função do tempo. A FIGURA 1.5 ilustra uma curva de decaimento do teor de azadiractina, em um óleo comercial de nim, ao longo do período de 4 meses (FORIM, 2009). Neste estudo, ficou evidente que o teor de azadiractina, inicialmente próximo aos 1400 ppm, reduziu a aproximadamente zero em um produto armazenado. Esta degradação acelerada praticamente inviabiliza o armazenamento do produto, gerando uma diversidade de problemas técnicos para sua comercialização.

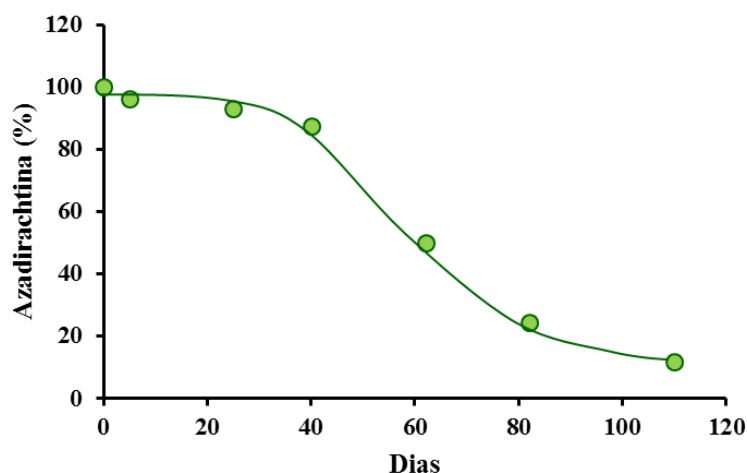


FIGURA 1.5 - Curva de degradação de azadiractina em óleos de *A. indica* (FORIM, 2009).

Referente à degradação fotoquímica que a azadiractina sofre quando aplicada em campos de cultivo, em amostras de óleo de nim submetidas ao processo de envelhecimento acelerado por radiação UV se observou uma degradação constante da azadiractina. Em um sistema fechado a velocidade de degradação em amostras de óleo/água foi aproximadamente 108 vezes maior que amostras de óleo isento de água. Estes resultados demonstram a ação degradativa da umidade sobre o produto natural num mecanismo de hidrólise catalisado por radiação ultravioleta.



Os problemas descritos anteriormente demonstram algumas barreiras para o uso comercial de bioinseticidas formulados com o nim na

agricultura orgânica, no que se referente à sua produção e comercialização em escala industrial. Primeiramente, há a necessidade de pesquisa e desenvolvimento de produtos estáveis independente de características climáticas locais, prolongando o tempo de ação em campo possibilitando um controle efetivo sobre os insetos pragas. Em segundo plano, há a necessidade de se formular o produto sem que ele perca suas características de “amigo do meio ambiente” e baixa toxicidade. Por último, há a necessidade de técnicas de enriquecimento e controle de qualidade nos produtos a serem disponibilizados no comércio assegurando a reprodutibilidade de sua eficácia inseticida independente do lote ou período de aplicação.

1.6 - Insetos pragas

O método tradicional utilizado nos últimos anos para o controle de pragas tem sido através da utilização de pesticidas químicos e os impactos gerados da aplicação desses pesticidas tem sido motivo de preocupação, pois seus efeitos têm provocado varias mudanças no meio ambiente, como por exemplo, resistência de pragas, morte dos inimigos naturais e doenças aos produtos aplicados (PIERZYNSKI et al., 1994). Além disso, tem se observado que a eficácia de pesticidas químicos está diminuindo, esse fato está ocorrendo devido a adaptação das pragas à estes pesticidas, o que tem levado à um aumento exponencial da quantidade de produto utilizado na pulverização (XIE et al.,

2014). Assim, há uma grande busca em novos controles químicos que não gere resistência das pragas e que não cause mal ao meio ambiente.

1.6.1 – *Spodoptera frugiperda*

As espécies do gênero *Spodoptera* são amplamente distribuídas no mundo e das 30 espécies descritas, metade é considerada praga de variadas culturas de importância econômica. Dentre elas, *Spodoptera frugiperda* destaca-se por se alimentar em mais de 80 espécies de plantas, incluindo o algodoeiro, milho e soja (BARROS et al., 2010). A *S. frugiperda* conhecida na fase larval como lagarta-do-cartucho, é a principal praga da cultura do milho no Brasil e, nos últimos anos, vem aumentando de severidade em várias áreas cultivadas. Entre os motivos apontados para esse aumento de importância da praga, pode ser citado o desequilíbrio biológico, pela eliminação de seus inimigos naturais, e também da exploração da cultura, que é cultivada em várias regiões brasileiras, em duas safras anuais (CRUZ e MONTEIRO, 2004; GIOLO et al., 2002).

Muitas são as pesquisas visando o controle deste inseto praga (TOSCANO et al., 2012; BARROS et al., 2010; FARINELLI e FORNASIERI FILHO, 2006; POLANCZYK, 2004; SARMENTO et al., 2002)

FORIM e colaboradores (2010a) relataram que extratos de nim com teor de azadiractina superior a $3,0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ de dieta causaram 100% de mortalidade. Os ensaios biológicos visaram verificar se a atividade inseticida já conhecida do nim sobre a *S. frugiperda* (FORIM et al., 2010a) se manteria após o processo de

encapsulação utilizando o polímero natural extraído do bagaço de cana-de-açúcar, a lignina.

1.6.2 - *Diabrotica speciosa*

A espécie *Diabrotica speciosa* (GERMAR, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae), é um inseto fitófago conhecido entre os agricultores como “vaquinha”, “brasileirinho” ou “patriota”, que pode causar severos danos, principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento das culturas (STÜPP et al., 2012; MARQUES et al., 1999). Na fase adulta, *D. speciosa* causa o desfolhamento das plantas e na fase larval (conhecida popularmente como larva alfinete) danifica sementes e raízes de várias espécies de plantas cultivadas (ÁVILA e PARRA, 2002). O consumo de raízes reduz a capacidade de a planta absorver água e nutrientes, tornando-a menos produtiva como também mais suscetível às doenças radiculares e ao tombamento, o que acarreta aumento de perdas da produção (MARQUES et al., 1999).

A aplicação de inseticidas organossintéticos tem sido o método de controle predominante para a redução da população das pragas, entretanto, apesar da grande quantidade de produtos anualmente utilizada nas lavouras, o nível de redução das perdas não é satisfatório (CARVALHO e FERREIRA, 1990). Pesquisas estão sendo desenvolvidas em busca de controles químicos e biológicos contra a *D. speciosa* (EDUARDO et al., 2014; FALCO e SILVA-FILHO, 2003).

1.6.3 – *Anticarsia gemmatalis*

A *A. gemmatalis*, conhecida com a lagarta-da-soja, é dentre os insetos pragas, a principal desfolhadora no Hemisfério Ocidental e no Brasil, ocorre principalmente do sul de Goiás até o Rio Grande do Sul (CASTIGLIONI e VENDRAMIM, 1996; BOTELHO et al., 1999). Por atacar principalmente a soja e dada a sua importância econômica, os problemas ocasionados pelo ataque dessa praga são consideráveis e importantes em vista dos prejuízos que causam à produção e a qualidade dos grãos ou sementes (MAGRINI et al., 1999).

O controle da *A. gemmatalis* tem sido feito através do uso de grandes quantidades de inseticidas e com isso tem se observado danos econômicos e também quanto à capacidade de recuperação da planta (MACHADO et al., 1999). Diferentes genótipos de soja têm sido desenvolvidos em busca de resistência contra a *A. gemmatalis*. Machado et al., (1999) testaram quatro tipos de cultivares já conhecidas, Emgopa 316, FT-Estrela, IAC 100 e IAC 17, e verificaram entre os quatro genótipos, a IAC 100 apresentou evidências de antibiose, pois essa cultivare aumentou o período larval e diminuiu o peso de lagartas e de pupas (MACHADO et al., 1999).

Outros meios que tem sido estudado para o controle dessa praga é o uso de parasitóides (CAÑETE e FOERSTER, 2003) ou de entomopatógenos (SAVIO, 2008; MOSCARDI e SOUZA, 2002). ZACHRISSON e PARRA (1998), verificaram que para se obter o controle da *A. gemmatalis*, o parasitóide da espécie *Trichogramma minutum* Riley, 1879 deveria ser liberado em 130

pontos/ha e com isso o ataque do parasitóide aos ovos da *A. gemmatalis* atingiria um raio de ação de 8 m equivalendo uma área de 77 m² (ZACHRISSON e PARRA, 1998).

1.6.4 - *Diatraea saccharalis*

A *Diatraea saccharalis* Fabr. (Lepidoptera: Crambidae), conhecida como broca da cana-de-açúcar, é uma das mais importantes pragas da cana-de-açúcar no Brasil, e está amplamente distribuída em todas as regiões canavieiras do país (DINARDO-MIRANDA et al., 2011).

A *D. saccharalis* ocorre durante todo o desenvolvimento da cultura, entretanto, sua incidência é menor quando a planta é jovem e não possui entrenós formados (SANDOVAL e SENÔ, 2010). O ciclo completo do inseto varia de 53 a 60 dias, dependendo das condições climáticas e eles podem ter ao longo do ano de 4 a 5 gerações (NAKANO et al., 2002).

Os prejuízos decorrentes do ataque são a perda de peso devido ao mau desenvolvimento das plantas atacadas, secamento dos ponteiros, enraizamento aéreo, brotação lateral, morte de algumas plantas atacadas, quebra do colmo na região da galeria e redução da quantidade de caldo. Além desses, o principal prejuízo é causado pela ação de agentes patológicos, como o *Fusarium moniliforme* e *Colletotrichum falcatum*, que penetram pelo orifício ou são arrastados juntamente com a lagartinha, ocasionando, respectivamente, a

podridão-de-fusarium e a podridão-vermelha, responsáveis pela inversão e perda de sacarose no colmo (SANDOVAL e SENÔ, 2010)

Atualmente, a principal tentativa de se controlar a *D. saccharalis* é uso do controle biológico, que tem por intuito manter as espécies de pragas em níveis aceitáveis através da introdução de um predador natural, parasitóide ou microrganismo que lhe cause doença ou morte (SANDOVAL e SENÔ, 2010). Entretanto, tendo em vista ser a cana-de-açúcar (principal cultura atacada pela *D. saccharalis*) uma cultura de ciclo longo, permitindo o desenvolvimento de várias gerações de *D. saccharalis* considera-se necessária a realização de liberações sucessivas, por períodos variáveis (BOTELHO et al., 1995), pois o ciclo completo do inseto varia de 50 a 63 dias, dependendo das condições climáticas (MENDONÇA, 1996) e com isso, muitas vezes o controle não é alcançado.

2 - OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um biopesticida a base de *Azadirachta indica* para uso na agricultura orgânica, com teores constantes e reprodutíveis do composto ativo azadiractina, através do uso de técnicas de preparação de nano e micropartículas biopoliméricas de ligninas derivadas do bagaço de cana-de-açúcar.

2.1 - Objetivos específicos

- a. Desenvolver protocolos de extração de ligninas do bagaço de cana-de-açúcar;
- b. Promover a hidrólise química das ligninas reduzindo o tamanho das cadeias biopoliméricas;
- c. Caracterizar as ligninas extraídas e modificadas;
- d. Preparar micropartículas em pó por *Spray-Dryer*, carregado com extratos de nim, usando suspensões coloidais de nano/micro capsuladas ou apenas formuladas;
- e. Caracterizar as propriedades físico-químicas e morfológicas das nano e/ou micropartículas nos sistemas coloidais de liberação controlada;
- f. Desenvolver e validar técnicas analíticas de controle de qualidade do nim através do uso da CLAE-UV e CLAE-EM/EM;
- g. Avaliar a cinética de liberação da azadiractina;

h. Investigar o rendimento do processo de formulação em escala de bancada;

i. Estudar a estabilidade térmica e fotoquímica dos produtos de nim formulados em suspensões coloidais ou em pós;

j. Estudar a eficiência inseticida dos produtos nano/microencapsulados em pó sobre as pragas agrícolas lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), brasileirinha (*Diabrotica speciosa*), lagarta da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) e lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*).

3 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os equipamentos, reagentes e procedimentos adotados para a execução do trabalho estão relacionados a seguir:

3.1 - Equipamentos

1. Autoclave vertical, Primatec, modelo CS;
2. Chapa de aquecimento com sistema de agitação magnética da Marconi, modelo MA 471;
3. Reatores com tampa de rosca de aço 304 inoxidável, volume de 195cm³ (5,0×4,0×15,5cm), contendo anel de vedação de politetrafluoroetileno (PTFE);
4. Agitador de tubos do tipo vortex da Phoenix AP56;
5. Balanças analítica, semi-analítica e térmica, Bel Engineering;
6. Ducha de água quente, Lorenzetti, modelo 3T;
7. Purificador de água por osmose reversa, modelo PRO 4000, Kemflo;
8. Medidor de pH Metrohm, modelo 827, eletrodo Pt 1000;
9. Estufa de ar circulante, Tecnal, modelo TE 394/3;
10. Moinho IKAA11 basic;
11. Ultra-turrax IKA, T10 basic;
12. Moinho multi-uso TE 631/2 Tecnal;
13. Centrífuga Eppendorf, modelo 5810;
14. Mini Spray Dryer, Büchi Labortechnik AG, B-290;

15. Cromatógrafo à líquido Agilent Technologies série 1200 modulado com um degaseificador G1322A, bomba quaternária G1311A, auto-injetor ALS G1329A, forno da coluna G1316A e detector UV-Vis G1314B;
16. Espectrofotômetro Bomem MB-102 *Fourier Transform Infrared*;
17. Ressonância magnética nuclear, Brüker DRX 400MHz (9,4 T) usando TMS como padrão interno;
18. Ionização e dessorção a laser assistida por matriz, MALDI-TOF MS *Brüker Autoflex Speed*, equipado com Laser Smartbeam, Nd:YAG modified;
19. Termobalança Shimadzu TGA-50;
20. Câmara de envelhecimento acelerado com quatro Actinica Philips - 450mm, 15W (380-280nm);
21. Microscópio eletrônico de varredura marca Philips XL-30 FEG;
22. Estufa de fotoperíodo, Eletrolab, modelo 122FC.

3.2–Materiais utilizados

Os solventes e reagentes utilizados neste trabalho foram acetonitrila, metanol, dimetilfóximo (DMSO) e acetona todo grau HPLC, da marca J.T. Baker; hexano e etanol grau P.A. Água destilada e deionizada em sistema de purificação Milli-Q. Peróxido de hidrogênio 30%, DMSO-d₆ (Cambridge Isotope Laboratories, Inc);

- Ácido clorídrico (HCl), hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de anômio (NH₄OH), piridina e anidrido acético;

- Padrão de azadiractina fornecido pelo Grupo de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSCar;
- Monoleato de polioxietilenosorbitano (Tween[®]80);
- Etilenodiaminotetraacetato de cálcio e dissódico (EDTA);
- Tinogard TL[®], Styleze[®] e silicone;
- Seringa descartável;
- Filtro com membrana de PVDF com 0,22 μ m e 0,15mm de diâmetro;
- Cartuchos de SPE, marca Chromabond[®], empacotados com 10mg de sílica derivatizada com grupos cianopropil.

3.3 - Extração das ligninas

Para a extração das ligninas foram utilizadas amostras de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), provenientes de coleta no município de Catanduva-SP. O bagaço de cana-de-açúcar foi coletado na forma moída. Posteriormente, o mesmo foi seco em estufa a 40°C por 4 dias e armazenado em recipiente plástico, para manter o teor de umidade constante e evitar a ação de fungos. Na sequência o bagaço foi submetido a dois processos distintos de extração, o primeiro por polpação pelo processo formacell (BENAR et al., 1996) e o segundo, polpação pelo processo alcalino (MAZIERO et al., 2012).

3.3.1 - Teor de umidade

O teor de umidade do bagaço de cana-de-açúcar foi determinado em balança térmica (Bel Engineering) a partir de 1,0 g de material. O material é inserido em um suporte de alumínio que recebe calor proveniente da irradiação do forno de aquecimento. A massa final representa a perda de umidade presente no material analisado.

3.3.2 - Polpação pelo Processo Formacell

O bagaço da cana-de-açúcar (10,0 g) sofreu polpação em autoclave. O processo de polpação foi realizado com algumas adaptações de BENAR et al. (1996). O procedimento se baseia na mistura de ácido acético/ácido fórmico/água 75:10:15 (m/m/m) com relação solvente/bagaço 7:1 (m/m), com o período de cozimento em autoclave (Prismatec, modelo CS) de 2 h a $120 \pm 2^\circ\text{C}$. Após um período de cozimento, a polpa foi removida da autoclave, filtrada em funil de Buchner com uma fina tela de náilon (100,0 μm) e lavada exaustivamente com ácido acético 85% (m/v) a $75 \pm 5^\circ\text{C}$, até que o licor de lavagem não mais apresentasse coloração escura. Em seguida, a polpa foi lavada exaustivamente com água a 80°C , filtrada em funil de Buchner, seca sob vácuo e armazenada.

O licor em ácido acético foi concentrado em evaporador rotativo (Buchi, R-215) a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ sob pressão reduzida, até que cerca de 90% do solvente fosse evaporado. O licor concentrado foi então gotejado em água a 80°C (quantidade

correspondente a aproximadamente 20 vezes o volume do licor) sob agitação, para precipitação da lignina e dissolução de polioses residuais.

A lignina precipitada foi filtrada em papel de filtro, sob vácuo e lavada exaustivamente com água a 60 °C, até que o pH da água de lavagem se tornasse neutro. Finalmente, a lignina foi seca em estufa a $60 \pm 2^\circ\text{C}$, por 3 dias e denominada **Lig 1**.

3.3.3 - Polpação alcalina

Para o processo de polpação alcalina, foram utilizados 20,0 g de bagaço de cana-de-açúcar. Preparou-se uma solução de 200,0 mL de água com 2,0 g de NaOH ($0,25 \text{ mol.L}^{-1}$). A solução foi inserida ao bagaço e submetida à extração em autoclave por 1 h à temperatura de 120°C . Após este período, a polpa foi removida da autoclave e filtrada em funil de Buchner com uma fina tela de náilon ($100,0 \mu\text{m}$). O pH do licor preto foi determinado através de um pHmetro (Metrohm, modelo 827) utilizando um eletrodo (Unitrode Pt1000). Em seguida o pH foi reduzido para um valor de 5,5, através da adição de HCl concentrado (3,0 mL) e o licor foi concentrado em evaporador rotativo para um volume final de 60,0 mL. Depois, foi adicionado 3 vezes o volume ($3 \times 60,0 \text{ mL}$) de etanol 95%, permanecendo em repouso por 12 h para a precipitação da hemicelulose. O precipitado obtido foi filtrado a vácuo em papel de filtro e lavado com etanol 70% (v/v) até a coloração se tornar um bege claro. O volume da solução resultante foi reduzido para a eliminação total do etanol e posteriormente o pH

foi ajustado para 1,5 para a precipitação da lignina. A lignina foi separada por filtração a vácuo. O sólido lavado com uma solução aquosa de HCl ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$) e seca em estufa à $60 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 4 dias, denominada **Lig 2**.

Em um procedimento posterior, utilizou-se uma percentagem maior de NaOH, visando a comparação de rendimento de extração da lignina. A solução alcalina utilizada para o processo de polpação foi preparada com 200,0 mL de água e 4,0 g de NaOH ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$) para extração de 20,0 g de bagaço. Todos os demais procedimentos até chegar à lignina seca foram às mesmas citadas acima. A lignina obtida foi denominada **Lig 3**.

Em um terceiro procedimento por polpação alcalina, foi utilizada a concentração de $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ da solução alcalina para extrair 20,0 g de bagaço. Nesse procedimento, a hemicelulose não foi precipitada e após o bagaço sofrer a polpação na autoclave, a mesma foi filtrada em funil de Buchner com uma fina tela de náilon ($100,0 \text{ }\mu\text{m}$). O licor preto foi acidificado com HCl concentrado (7,0 mL) até pH 1,5, precipitando a lignina. A lignina foi separada por centrifugação à 9000 rpm por 10 min e o sólido foi lavado com uma solução aquosa de HCl ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$), seca em estufa a $60 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 4 dias e denominada **Lig 4**.

3.3.3.1 - Polpação alcalina do bagaço em reator com banho de glicerina

A extração utilizando reatores com tampa de rosca de aço 304 inoxidável e volume de 195 cm³ foi realizada no departamento de Físico Química da Universidade de São Paulos – USP/São Carlos, sob a supervisão do professor Dr. Antônio Aprigio da Silva Curvelo. Nesse processo de extração, o bagaço da cana-de-açúcar foi submetido a diferentes temperaturas utilizando uma solução de NaOH 0,5 mol.L⁻¹. Foram utilizados 10,0 g de bagaço e submetidas à extração em reator com banho de glicerina. O reator foi mantido em banho sob temperatura controlada de 120, 140 e 160°C. Cada experimento foi realizado durante um período de 1 h. Após este período, a polpa foi removida do reator, filtrada em funil de Buchner com uma fina tela de náilon (100,0 µm) e determinado o pH do licor preto para a temperatura de 120, 140 e 160°C. Os licores pretos de cada temperatura foram acidificados com HCl concentrado (6,0, 7,0, e 9,0 mL, respectivamente) até pH 1,5, precipitando a lignina. A lignina foi separada por centrifugação a 9000 rpm por 10 min. O sólido foi separado do sobrenadante, lavado com uma solução de HCl 0,01 mol.L⁻¹ e seca em estufa a 60 ± 2°C por 4 dias e denominada **Lig 5**, **Lig 6** e **Lig 7**, para a temperatura de 120, 140 e 160°C, respectivamente.

3.3.4 - Oxidação das ligninas

Ligninas extraídas pelo processo de polpação formacell e alcalino foram submetidas ao processo de oxidação utilizando a metodologia de oxidação descrita por Maziero e colaboradores (2012). Os licores pretos (200,0 mL) obtidos pelos processos de polpação formacell e alcalino foram transferidos para balões de vidro de fundo redondo (1,0 L), os quais se adicionou 9% (v/v) de H_2O_2 e colocou-se em refluxo por 2 h a $98^\circ C$ em banho de glicerina.

Após este período, o líquido de uma coloração marrom claro foi submetido ao processo de precipitação da hemicelulose e posteriormente a obtenção da lignina seguindo o mesmo procedimento de obtenção pelo processo alcalino (citado no item 3.3.3).

Para o processo de oxidação, foi necessário elevar o pH do licor preto obtido do processo formacell, pois o mesmo encontrava-se em meio ácido e o procedimento de oxidação requeria um pH básico. O pH foi elevado com solução concentrada de NaOH $4,0 \text{ mol.L}^{-1}$ para se igualar ao pH do licor preto do processo alcalino (pH 12,6). Foi testada a oxidação da lignina com diferentes volumes de oxidante, sendo 12, 14, 16 e 18% (v/v) de H_2O_2 os volumes escolhidos.

3.3.5 - Acetilação das ligninas

Para a reação de acetilação as ligninas (1,0 g) foram dissolvidas em 10,0 mL de piridina anidra (Sigma-Aldrich) e 20,0 mL de anidrido acético anidro

(Merck), permanecendo sob agitação magnética a 28°C e meio reacional inerte. Após 48 h, o balão foi transferido para um banho de gelo e adicionou-se 20,0 mL de metanol/diclorometano 1:1 (v/v) refrigerado a 0°C. A solução foi transferida para um funil de separação e lavada com HCl 2,0 mol.L⁻¹ até eliminação total da piridina. Posteriormente, a solução foi lavada com 10,0 mL de água e seco em estufa a 60°C por 4 dias.

3.4 - Caracterização estrutural da lignina

Diversos métodos espectroscópicos, espectrométricos e gravimétricos foram empregados com o propósito de caracterizar as ligninas extraídas do bagaço da cana-de-açúcar. Os métodos utilizados estão apresentados a seguir.

3.4.1. Infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF)

As ligninas extraídas, oxidadas e acetiladas foram analisadas utilizando um espectrofotômetro Bomem MB-102-*Fourier Transform Infrared*. As amostras foram preparadas misturando em um almofariz 10,0 mg de cada amostra a 100,0 mg do suporte KBr. Os espectros foram registrados da região entre 400 e 4000 cm⁻¹.

3.4.2. Análise por microscopia eletrônica por varredura (MEV)

As análises por MEV das ligninas foram realizadas no Laboratório de Caracterização Estrutural Dema/UFSCar, utilizando-se um microscópio

eletrônico de varredura Philips XL-30 FEG. As amostras foram previamente secas sobre suportes metálicos de alumínio e posteriormente, recobertas com uma fina camada de ouro. Sua morfologia foi examinada a 5 kV com ampliações entre 500 e 50.000 vezes.

3.4.3 – Espectrometria de massas por MALDI-TOF

As amostras de ligninas foram analisadas pela técnica de espectrometria de massas com ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF) em um equipamento da Brüker *Autoflex Speed*, equipado com *Laser Smartbeam*, Nd:YAG modified, ionização em modo negativo, varredura de 200 scan, frequência de 500 Hz e análise no modo linear. As matrizes utilizadas foram o DHB (ácido 2,5-diidroxibenzóico) e o ácido sinapínico, dissolvidos em acetonitrila: água ultrapura (Milli-Q, 0,1 % THF) 1:1 (v/v) na concentração de 20,0 mg.mL⁻¹. As amostras foram solubilizadas em uma solução de 5 % de DMSO com a concentração de 0,3 % (m/v) e misturadas na razão 1:1 com as respectivas matrizes.

3.4.4 - Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) foram adquiridos num equipamento Bruker Avance III *Ultrashield Plus* operando a 600 MHz. As amostras foram preparadas dissolvendo 10,0 mg de

ligninas em DMSO-d₆ (*Cambridge Isotope Laboratories*) sendo condicionadas numa sonda de quartzo, temperatura de 30°C e pulsos de 8,52 usec.

3.4.5 - Análise termogravimétrica (TGA)

As análises de TGA foram realizadas utilizando um analisador termogravimétrico (TGA) Q50, da TA Instruments. As varreduras de temperatura foram realizadas entre 25 e 800°C a uma taxa de aquecimento de 20°C.min⁻¹. Foi utilizado fluxo de N₂ para purga da amostra e para a proteção (fluxo que passa pela balança) de 90,0 e 10,0 mL.min⁻¹, respectivamente. Foram utilizadas 10,0 mg de cada amostra, as quais foram preparadas em um suporte de platina (diâmetro 6,0 × 2,5 mm) e analisadas em atmosfera dinâmica de nitrogênio com uma vazão de 50,0 mL.min⁻¹.

Através do uso dessa técnica, foi investigando o mecanismo fundamental de degradação térmica das ligninas obtidas por diferentes processos químicos. (WEI et al., 2009)

3.5 - Preparo e análise de extratos de *Azadirachta indica*

O extrato bruto de nim e suas frações resultantes da partição líquido-líquido foram submetidos ao processo de limpeza de amostra para posterior análise por CLAE.

3.5.1 - Preparo do extrato das sementes de *Azadiracta indica* (nim)

O extrato vegetal de nim foi obtido macerando 800,0 g de sementes em solvente orgânico. As sementes foram fornecidas pela empresa Baraúna Com. Ind. Ltda. Inicialmente, as sementes foram secas em estufa de ar circulante a 40°C (Tecnal, TE 394/3) por um período de 96 h e moídas um moinho Tecnal TE 631/2. A maceração foi realizada primeiramente com *n*-hexano por 4 semanas, sendo filtrado o solvente da semente moída de 3 em 3 dias. Posteriormente, a maceração foi promovida com etanol P.A. O *n*-hexano foi empregado para a remoção do óleo vegetal e outros componentes apolares. Posteriormente, o etanol foi empregado para extração dos principais limonóides da espécie vegetal como, por exemplo, a azadiractina. Após filtração, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, obtendo-se 88,0 g de extrato bruto alcoólico.

Com o propósito de se obter um extrato com maiores teores de azadiractina, o extrato alcoólico (76,0 g), foi submetido a processos de extração líquido-líquido, sendo o extrato solubilizado em 400,0 mL de água: metanol (3:1), submetidos à extração com *n*-hexano (6 × 200,0 mL) e acetato de etila (6 × 200,0 mL). Sendo obtidas as frações *n*-hexano (46,4 g), acetato de etila (6,2 g) e aquosa (23,3 g).

3.5.2 - Preparo de amostras para análise quantitativa por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As frações obtidas foram submetidas à SPE para a eliminação das impurezas. Um cartucho Chromabond® Cyano de 100,0 mg e leito de 1,0 mL foi condicionado em 5,0 mL de *n*-hexano sem deixá-lo secar. Dissolveu-se 25,0 mg de cada amostra em 500,0 µL de *n*-hexano, aplicando-o ao cartucho. O tubo que continha a amostra, foi lavada com mais 500,0 µL de *n*-hexano, o qual também foi aplicado ao cartucho. Após aplicar a amostra no cartucho, elui-se o cartucho completamente retirando os interferentes mais apolares (lavagem). Após a lavagem do cartucho com *n*-hexano, lavou-se o tubo da amostra com outros 500,0 µL de MeOH o qual foi transferido para o cartucho. Elui-se o cartucho com o MeOH sendo, em seguida, novamente eluído com mais 500,0 µL de MeOH. O MeOH foi usado para a remoção dos analitos de interesse do cartucho. Foi usada a câmara a vácuo (Manifold-Varian) acoplada a uma bomba de vácuo, trabalhando a uma pressão próxima a 70 mmHg onde os cartuchos eram embutidos e o fluxo de lavagem e eluição mantidos constantes. As frações metanólicas foram secas em *Speed Vac* Labconco (Bomba de vácuo, Centrífuga, e “Cold Trap”) a 48°C durante 60 min sendo, então, reconstituídas em 1,0 mL de MeOH.

Estando as amostras prontas, foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) configurado com degaseificador

G1322A, bomba quaternária G1311A, autoinjeter G1329A, forno de coluna G1316A e detector de ultravioleta G1314B. Foi utilizada uma coluna de fase reversa Rexchrom ODS (100,0 × 4,6 mm, 3,0 µm) Regis Technologies, acoplada a uma coluna de segurança C18 (Phemonemex[®] 4,0 × 3,0 mm).

As análises cromatográficas foram realizadas no modo isocrático. A fase móvel consistiu de uma mistura de água: acetonitrila (35:65, v/v) com uma vazão de 0,5 mL.min⁻¹ e tempo de eluição de 12 min. A temperatura da coluna mantida em 30 °C e o volume de injeção de 10,0 µL e comprimento de onda de detecção fixo de 217 nm ($\lambda_{\text{máx}}$ absorção). O controle do equipamento CLAE, aquisição e processamento dos dados foram realizados pelo *software* Agilent Technologies EZCrom SI (G6702AA, s.n.08021502300).

3.5.3 - Quantificação da azadiractina presente nas frações por CLAE-UV

Para a quantificação da azadiractina foi preparado uma solução estoque, onde 10,0 mg do padrão de azadiractina foi precisamente pesada e transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL. O padrão foi solubilizado em MeOH (J.T. Baker, grau CLAE) e armazenado a -5°C. A solução estoque preparada apresentou concentração nominal de 1 mg.mL⁻¹.

A partir da solução padrão foram preparadas soluções para a construção da curva de calibração externa. As soluções padrão de calibração foram

preparadas nas seguintes concentrações: 2,0, 5,0, 10,0, 20,0, 40,0, 60,0, 80,0 e 100,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A curva de calibração foi obtida através da regressão linear, considerando a área das bandas cromatográficas relativas à concentração dos analitos. A linearidade foi obtida através do valor do coeficiente de correlação.

As soluções padrão de calibração foram preparadas em triplicata e analisadas seguindo as mesmas condições cromatográficas citadas no item 3.5.2.

3.6 - Preparo das micropartículas carregadas com extratos de nim

Extratos de nim foram submetidos a processos de formulação utilizando 0,3 g das frações acetato de etila obtidas pelo fracionamento do extrato bruto etanólico do nim, 0,67 g de Tween[®] 80, 3,5 g de óleo de nim comercial, fornecido pela Baraúna Com. Ind. Ltda., 2,0 g de aerosil e 70,0 mL de água. A dispersão foi homogeneizada por Ultra-Turrax[®] (IKA T10) até formação de uma emulsão. Posteriormente, foram adicionados 1,5 g da lignina micronizada e novamente homogeneizado (FIGURA 3.1).

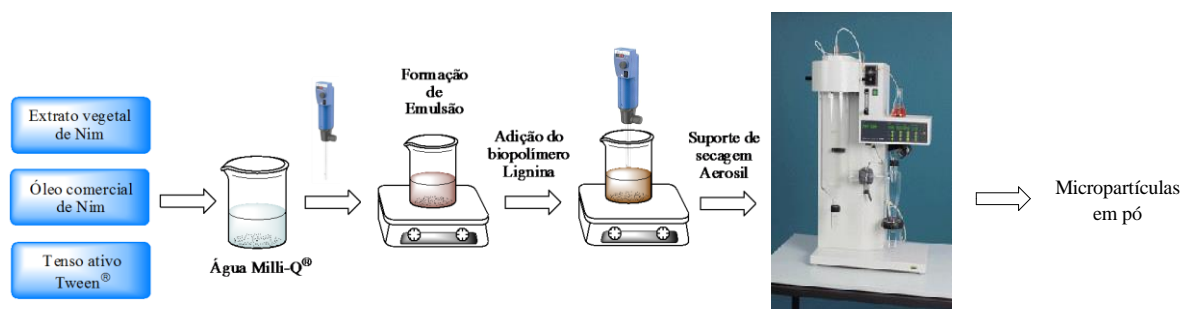


FIGURA 3.1 – Esquema desenvolvido para a preparação das micropartículas em pó de nim.

As suspensões coloidais de micropartículas foram secas em um *Spray-Dryer* (Büchi B-290, Büchi Labortechnik AG, Postfach, Switzerland). O *Spray-Dryer* foi operado no modo contra-corrente equipado com duas agulhas de fluídos. Uma agulha atomizadora com orifício de 0,7 mm foi utilizada juntamente com ar comprimido como gás atomizador. Os parâmetros operacionais aplicados encontram-se descritos na TABELA 3.1. O volume da suspensão coloidal permite determinar a quantidade de massa dos materiais da formulação presente.

TABELA 3.1 - Parâmetros de operação do *Spray-Dryer*.

Parâmetros	Nível
Taxa de alimentação	0,75 mL.min ⁻¹
Vazão do ar atomizador	530 L.h ⁻¹
Capacidade do aspirador	90% (~ 38 m ³ .h ⁻¹)
Temperatura de entrada	120°C ± 4°C
Temperatura de saída *	75 ± 5°C

* Temperatura de saída medida entre a câmara de secagem e o ciclone de coleta da amostra.

3.6.1 - Preparo das micropartículas carregadas com extratos de nim e aditivos

Com o propósito de se obter formulações resistentes a processos de degradação fotoquímica, em algumas formulações foram adicionados aditivos para melhorar a estabilidade térmica e fotoquímica. Assim, foi avaliado o uso de alguns aditivos como, por exemplo, sequestrante de íons, térmico e/ou

ultravioleta, juntamente com as ligninas. O biopolímero lignina denominada como Lig 3 foi selecionado para a adição de protetores térmicos (Silicone e Styleze[®]), estabilizador de radiação UVA/UVB (Tinogard TL[®]) e um sequestrante de íons (EDTA), no intuito de verificar maior proteção da azadiractina dentro das formulações. Foi adicionada a massa de 0,08 g (1% - m/m) de cada protetor testado. O procedimento de preparo das micropartículas foi executado como descrito no item anterior 3.6. Os protetores foram adicionados juntamente com o óleo de nim, extrato vegetal e tensoativo Tween[®] e posterior dispersão por homogeneização por Ultra-Turrax[®]. As denominações das formulações podem ser visualizadas na TABELA 3.2.

TABELA 3.2- Denominações das formulações utilizando a Lig 3 e os aditivos de proteção para a preparação de formulações em pó da fração acetato de etila de nim.

Aditivos	Denominação da formulação
Lig 3 - Silicone	Lig 3Si
Lig 3 - Styleze	Lig 3S
Lig 3 - Tinogard	Lig 3T
Lig 3 – Tinogard+Styleze	Lig 3TS
Lig 3 – EDTA	Lig 3E

3.6.2 - Degradação fotoquímica assistida das formulações e do extrato bruto etanólico de nim

Os estudos de degradação fotoquímica da azadiractina quando exposta a radiações ultravioletas foi realizado numa câmara construída com conjunto de

lâmpadas especiais que simulam a radiação no espectro do UV-A e UV-B com comprimentos de onda entre 380-320 e 320-280 nm, respectivamente. A câmara foi toda revestida com espelhos para maior aproveitamento da radiação. Os espelhos apresentam uma superfície altamente refletora com perdas mínimas de luminosidade. O sistema foi mantido com temperatura controlada a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por um sistema de circulação de ar termostatizado.

A câmara de degradação fotoquímica (FIGURA 3.2) foi construída em uma caixa em fórmica, sendo que na parte superior abriga uma luminária para quatro lâmpadas fluorescentes Philips- 450 mm, 15 W (380-280 nm) cada. A luminária também era revestida por um material espelhado que não absorve radiação. Cada lâmpada possui um reator bi-volt e sistema de acionamento individual com chave liga/desliga. A parte inferior da parte interna na caixa possui uma área de 250 mm de altura para condicionamento das amostras. Na lateral direita possui uma grade perfurada de 300×150 mm e na lateral esquerda dois mini-ventiladores “coolers” que quando acionados permite a passagem de ar pelo sistema possibilitando sua refrigeração (FIGURA 3.2).

Um termostato monitorou a temperatura interna controlando o acionamento automático dos mini-ventiladores. A parte frontal possui uma porta para movimentação das amostras, o termostato e os botões de acionamento das lâmpadas.



FIGURA 3.2 - Câmara de envelhecimento acelerado por luz ultravioleta.

Todas as formulações e o extrato bruto etanólico de nim foram submetidas à degradação acelerada. As formulações e o extrato bruto etanólico de nim foram dispostos em placas de Petri. Dois controles foram empregados nestes experimentos sendo: (1) controle negativo, uma placa contendo o extrato etanólico de nim protegida com papel alumínio, submetendo o extrato as mesmas condições térmicas, porém, protegido da radiação UV e, outro (2) contendo apenas o extrato não formulado (controle positivo). Cada experimento foi realizado com 3 replicatas.

As formulações contendo os aditivos de proteção foram submetidas à degradação acelerada. As formulações contendo 1% (m/m) dos protetores térmicos, o protetor UVA/UVB e o EDTA (TABELA 3.3) foram dispostos em placas de Petri.

TABELA 3.3 - Denominação dos extratos brutos utilizado como controle negativo.

Extrato bruto	Denominação
Exposto à radiação	ExB
Protegido da radiação	ExB cont
Exposto à radiação - Silicone	ExSi
Exposto à radiação - Styleze	ExS
Exposto à radiação - Tinogard	ExT
Exposto à radiação – Tinogard+Styleze	ExTS

Os experimentos foram conduzidos expondo as amostras (250,0 mg) à radiação fotodinâmica durante 6 dias. Alíquotas de 25,0 mg foram periodicamente retiradas nos tempos pré-definidos de 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 h para controle da degradação.

As amostras das formulações após a exposição à degradação foram tratadas para a recuperação da azadiractina e posterior análise cromatográfica por CLAE-UV. As formulações foram tratadas e analisadas seguindo os seguintes procedimentos: 25,0 mg da amostra foi extraída com 0,5 mL de MeOH em vortax por 1 min, mantido em repouso por 60 min, em seguida, centrifugado à 10.000 rpm por 10 min e o sobrenadante recuperado. Esse procedimento foi executado novamente com MeOH e posteriormente 2 vezes com ACN. O sobrenadante foi seco e ressuspendido em 1,0 mL de MeOH, depois a solução resultante foi filtrado e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência do produto oriundo da extração dos compostos presentes nas

formulações, principalmente a azadiractina, foram executados conforme descrito na seção 3.5.2.

As amostras do extrato bruto etanólico foram submetidas à extração por SPE conforme descrito na seção 3.5.2 e posteriormente ressuspendidas em 1,0 mL de MeOH e analisadas por CLAE seguindo a metodologia descrita na seção 3.5.2. O padrão de referência para o acompanhamento da degradação foi o composto azadiractina presente nas amostras.

3.6.3 - Degradação assistida por temperatura das formulações e da fração acetato de etila de nim

Todas as formulações e a fração acetato de etila de nim foram submetidas à degradação acelerada por temperatura em estufa de secagem (Gehaka, G4023D) e as amostras foram dispostas em placas de Preti. Como controle positivo, uma placa contendo o extrato etanólico de nim foi protegida com papel alumínio e mantida à temperatura de -5°C . As amostras foram expostas a temperatura de 60°C durante 24 h. Alíquotas de 25,0 mg de cada amostra foram retiradas em intervalos de tempos de 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 h para controle da degradação. Posteriormente, as amostras submetidas a análises quantitativas por CLAE, sendo preparadas e analisadas conforme descrito previamente na seção 3.5.2. Novamente, o composto de referência utilizado foi a azadiractina. Os ensaios foram realizados em 3 replicatas.

3.7 - Ensaios biológicos com insetos pragas

Com o propósito de avaliar a eficiência dos extratos e frações de *A. indica* nano e microencapsulado, diversos ensaios biológicos foram realizados. As espécies alvo escolhidas foram a *Spodoptera frugiperda* (Lagarta do cartucho), *Diabrotica speciosa* (Vaquinha), *Diatraea saccharalis* (Broca da cana-de-açúcar) e *Anticarsia gemmatalis* (Lagarta da soja).

3.7.1 - Ensaio com a *Spodoptera frugiperda*

Os ensaios biológicos com a *S. frugiperda* foram desenvolvidos no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Campus de São Carlos – SP, à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12 h, coordenados pela Profa. Dra. Andréia Pereira Matos. Para a realização dos ensaios foi utilizada uma dieta artificial desenvolvida por KASTEN et al., (1978), sendo preparada utilizando água destilada (600,0 mL), ágar (10,3 g), extrato de levedura (25,3 g), gérmen de trigo (39,6 g), ácido sórbico (0,8 g), ácido ascórbico (2,6 g), formaldeído 40% (6,3 mL) tetraciclina (50,0 mL), nipagin (1,1 g) e feijão carioquinha cozido (82,5 g).

A dieta artificial recebeu os extratos de nim ou os produtos formulados, quando esta atingiu uma temperatura de 50°C , sendo devidamente homogeneizado (MATOS et al., 2006; MATOS et al., 2009). Em cada tratamento, foi incorporado uma quantidade de produto formulado à dieta

artificial para *S. frugiperda*, na proporção de 30,0 mg para cada 300,0 g de dieta (100,0 mg.Kg⁻¹), que corresponde à massa de 3,0 µg de azadiractina, substância utilizada para monitoramento entre a atividade dos extratos formulados e não formulados. O extrato de nim não formulado foi analisado para comparação com os extratos formulados com os diferentes tipos de lignina. Além das dietas correspondentes a cada formulação, também foi preparado um experimento controle, isento de extratos de nim ou produtos formulados (testemunha).

Depois de preparadas, as dietas foram vertidas em tubos de vidro (8,5 × 2,5 cm), previamente esterilizados em estufa a 170°C, por 1 h, e em seguida tampados com algodão hidrófugo. Após inserir a dieta, os tubos foram mantidos em temperatura controlada de 25°C por 24 h, para eliminação do excesso de umidade. A seguir, foi feita a inoculação das lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda*, utilizando-se uma lagarta por tubo. Foram utilizadas trinta lagartas para cada tratamento. Durante o período de análise, os tubos inoculados foram mantidos em estufa com fotoperíodo (Eletrolab, 122FC) a 25°C.

As pupas obtidas foram pesadas um dia após a pupação, e transferidas para copos plásticos de 50,0 mL, onde permaneceram até a emergência dos adultos. Os parâmetros avaliados neste experimento foram duração das fases larval e pupal, massa das pupas e percentagem de insetos mortos (mortalidade) ao final de cada fase. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). A comparação entre médias dos tratamentos foi feita através do Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

3.7.2 - Ensaio com a *Diabrotica speciosa*

Os ensaios com a *D. speciosa* foram desenvolvidos no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos, localizado no Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal - SP, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h, coordenados pelo Professor Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior.

As formulações foram avaliadas com a finalidade de investigar o efeito do extrato de nim formulado com os biopolímeros ligninas e o extrato não formulado sobre larvas de *D. speciosa*. Dois tratamentos controles foram realizados com o propósito de comparação com as amostras de extrato de nim formulado e não formulado. Os tratamentos controles foram (1) experimento isento de adição de quaisquer produtos (testemunha) e (2) fipronil aplicado na dosagem comercial de $80 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$, diluídos em 250,0 L. Para a realização do experimento, foram utilizados recipientes plásticos de 100,0 mL no qual foram acondicionados 25,0 g de solo, previamente peneirado e esterilizado em estufa a 110°C , por 48 h. Em cada recipiente foram adicionados à formulação em pó e, posteriormente, transplantados uma muda de milho com 10 cm de altura, variedade AL-Piratininga. Em seguida, foram inoculadas cinco larvas de *D. speciosa* com nove dias de idade, sendo estas, também criadas com plantas de milho variedade AL-Piratininga. A mortalidade foi analisada em cada experimento, após a emergência dos adultos no tratamento testemunha.

3.7.3 - Ensaio com a *Diatraea saccharalis*

Os experimentos com *D. saccharalis* foram conduzidos com insetos fornecidos pela Usina Bonfim (Guariba-SP) do grupo Raízen. Os insetos foram criados em dieta artificial no laboratório de entomologia da Usina Bonfim e fornecidos com aproximadamente 0,5 cm de comprimento e no 2º instar. Com o propósito de avaliar a eficiência das formulações com nim, dois diferentes experimentos foram realizados com a *D. saccharalis*. Um experimento foi conduzido pela alimentação por dieta artificial e o segundo por alimentação por rizomas de cana-de-açúcar.

Foi utilizada a dieta artificial desenvolvida por Hensley e Hammond (1968), com algumas modificações. A dieta foi preparada misturando-se ácido ascórbico (4,0 g), açúcar (270,0 g), complexo vitamínico (2,0 g), metilparahidroxibenzoato (16,0 g), gérmen de trigo (80,0 g), cloreto de colina (2,0 g), farelo de soja (400,0 g), estreptomicina (6,0 g), solução vitamínica (40,0 mL), formaldeído 37% (10,0 mL), ágar (70,0 g), ácido acético (50,0 mL), água deionizada (4,0 L).

Os demais passos realizados após a preparação da dieta equivalem aos executados para o ensaio com a *S. frugiperda*.

O segundo experimento (FIGURA 3.3) com lagartas de 2º instar foi conduzido em potes plásticos de 200,0 mL, utilizando como dieta pedaços de cana-de-açúcar (10,0 × 3,0 cm) pulverizados com as formulações em investigação ou o extrato bruto de nim. Em cada pote foi utilizado um pedaço de

cana-de-açúcar e 5 lagartas de 2º ínstar de *D. saccharalis*. Cada tratamento foi realizado em quintuplicata, totalizando 30 insetos por experimento. Para o controle foi disposta a cana-de-açúcar como alimento sem a presença de qualquer tipo de produto. Os experimentos foram avaliados diariamente.

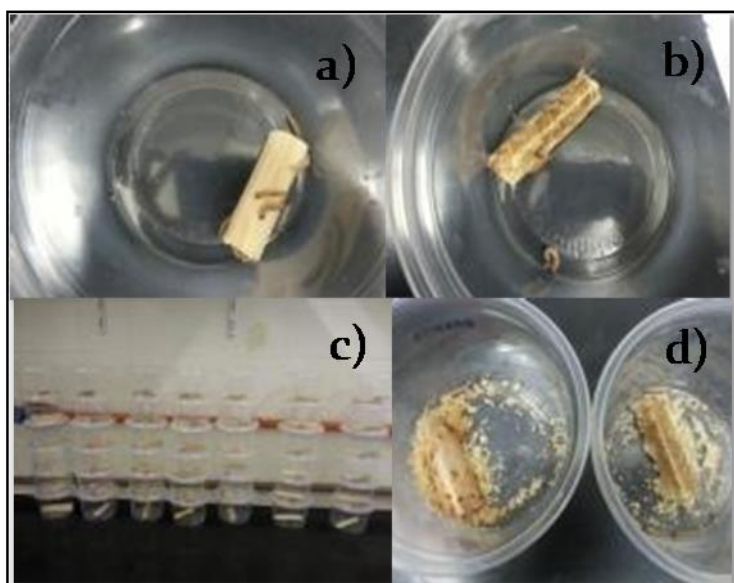


FIGURA 3.5 - Processo de preparação dos ensaios biológicos com *D. saccharalis*: a) pedaços de cana-de-açúcar com larvas; b) pedaços de cana-de-açúcar envolvidos com as formulações; c) e d) monitoramento dos tratamentos.

3.7.4 - Ensaio com a *Anticarsia gemmatalis*

Os ensaios foram realizados do Laboratório de Entomologia Agrícola da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Oeste Paulista – Presidente Prudente/SP, à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h, coordenados pela Profa. Dra Vânia Maria Ramos. As lagartas de *A. gemmatalis* foram criadas no laboratório utilizando-se dieta artificial. A

dieta artificial (GREENE et al., 1976) foi preparada utilizando água destilada (3,4 L), feijão carioquinha (250,0 g), proteína de soja (100,0 g), levedo de cerveja (125,0 g), gérmen de trigo (200,0 g), caseína (75,0 g), complexo vitamínico (20,0 g), ácido sórbico (6,0 g), ácido ascórbico (12,0 g), formaldeído 40% (12,0 mL), nipagin (10,0 mL) e ágar (46,0 mL).

As amostras foram inseridas na dieta, quando a mesma alcançou a temperatura de 50°C e a dieta foi vertida em placas de gerbox, após esfriar completamente, a dieta foi dividida em pedaços de 2,0 × 2,0 cm. A dieta pedaços foi utilizada para alimentar as lagartas durante o ensaio. Foram utilizados 30 potes de plásticos para cada tratamento, sendo que em cada pote foi colocado um pedaço de dieta e uma lagarta. O experimento foi analisado diariamente durante 15 dias para o acompanhamento da mortalidade das lagartas (FIGURA 3.4).

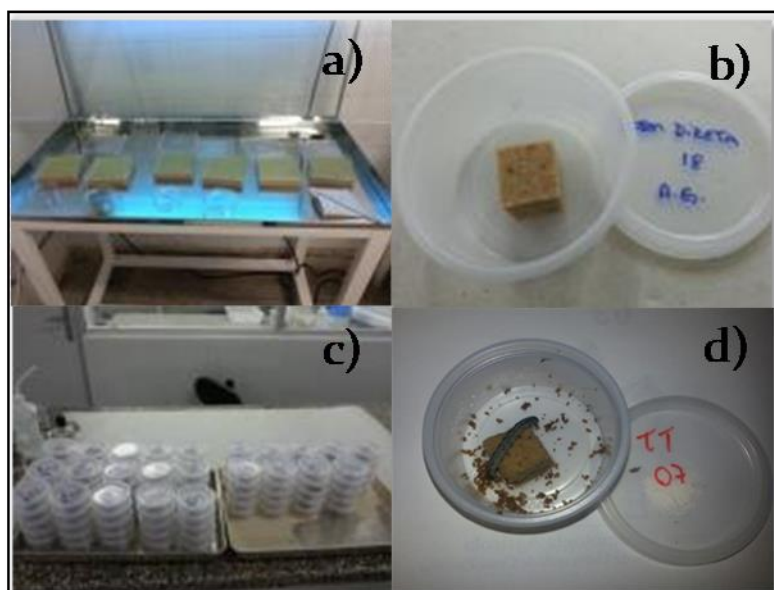


FIGURA 3.4 - Processo de preparação dos ensaios biológicos com *A. gemmatalis*: a) preparação da dieta artificial; b) preparação dos potes com pedaços de $2,0 \times 2,0$ de dieta (10,0 g); c) inoculação da larva; d) monitoramento dos tratamentos.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Bagaço de cana-de-açúcar e as ligninas

Este trabalho visou promover a deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e como o próprio nome indica, a deslignificação é o processo que visa à remoção da lignina, através da solubilização dos fragmentos produzidos pelo rompimento de ligações químicas da protolignina (lignina "*in situ*").

A extração da lignina do bagaço de cana-de-açúcar foi promovida utilizando o processo de polpação formacell e alcalino (RUZENE, 2005). Essas duas modalidades estão compreendidas dentro de uma tecnologia alternativa de deslignificação, o processo organosolv que utiliza solvente orgânico/água como agente deslignificante, sob catálise ácida ou básica (SARKANEN, 1990). Devido ao alto custo e à poluição ambiental causada pelos processos químicos convencionais de polpação como processos kraft e sulfito, o processo organosolv de polpação tem sido foco de interesse desde a década de 30 (SARKANEN, 1990). O processo organosolv possibilita o uso integral dos componentes dos materiais lignocelulósicos como insumos químicos e apresenta vantagens quanto ao baixo capital de investimento, a possibilidade de instalação de plantas para a produção em pequena escala (MCDONOUGH, 1993), facilidade para recuperação de polioses e principalmente, as ligninas que se apresentam menos degradadas (CURVELO et al., 1994).

No processo de polpação formacell, o agente de deslignificação é uma mistura de ácidos e água (ácido acético/ácido fórmico/água 75:10:15). Esse processo é conhecido por apresentar uma lignina mais pura, pois durante o processo de precipitação da lignina, os carboidratos não são precipitados (BENAR, 1996)

Na polpação pelo processo alcalino, o agente de deslignificação é o NaOH. Inicialmente, se promove a extração das ligninas em conjunto com a hemicelulose. Posteriormente, se utiliza o álcool etílico para promover a precipitação da hemicelulose mantendo a lignina em solução. A hemicelulose, também chamada de poliose, é composta por diferentes unidades de açúcares formando cadeias ramificadas, assim, ela apresenta alta solubilidade em solução alcalina e sofre o processo de precipitação em excesso de álcool etílico.

O desenvolvimento de diferentes métodos de extração e polpação alcalina foi realizado com o propósito de avaliar o rendimento de lignina obtido em cada processo, o que impacta em custos e, ao mesmo tempo, investiga o tipo de lignina extraída. Os diferentes processos podem fornecer, por exemplo, ligninas com diferentes tamanhos de cadeia polimérica. Como resultado, diferentes ligninas podem impactar na necessidade de desenvolver diferentes formulações bem como gerar produtos formulados com diferentes propriedades como, por exemplo, eficiência de encapsulamento, estabilidade, cinética de liberação em campo e atividade biológica.

4.1.1 - Extração das ligninas

O bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), proveniente de coleta no município de Catanduva-SP, já moído e seco apresentou teor de umidade com valor aceitável (aproximadamente 9%) para evitar a ação de microorganismos durante o período de armazenamento (PEREIRA NETO, 1987). Assim, o bagaço de cana-de-açúcar foi armazenado em local seco e protegido da luz.

No processo de polpação formacell, o ácido acético e o ácido fórmico promovem a hidrólise dos grupos acetilas presentes nas polioses e durante o processo de polpação produz a acidez necessária para a deslignificação. No entanto, durante esse procedimento foi observado características desfavoráveis sendo: a) um forte odor de ácido acético, b) dificuldade de descarte dos resíduos e/ou c) grande quantidade de produtos para a neutralização da solução resultante da precipitação da lignina. Nesse processo, a extração da lignina apresentou um rendimento de 8,0 % (m/m) em relação à massa de bagaço utilizado, mostrando-se um bom resultado, porém, o procedimento quando comparado com a polpação alcalina em relação à quantidade de reagentes utilizados, se mostrou inviável.

Para o processo de polpação alcalina, a concentração do agente de deslignificação NaOH aplicado no processo alcalino, foi investigado nas concentrações de 0,25 e 0,5 mol.L⁻¹. O melhor resultado de deslignificação foi obtido para a concentração de 0,5 mol.L⁻¹ quando comparado com a

concentração de $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$ na temperatura de 120°C . O rendimento de lignina precipitada foi de 7,2% (m/m) para a concentração de $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e de 4,4% (m/m) para a concentração de $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$. Devido ao rendimento apresentado, a concentração de $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ foi firmada para o desenvolvimento dos demais procedimentos.

O processo de deslignificação foi promovido por autoclave em temperatura e pressão fixas 120°C e 1 atm, respectivamente. Deste modo, a segunda variável a ser investigada foi o tempo de polpação. Os tempos de extração investigados foram 1; 1,5 e 2 h e o parâmetro avaliado foi o rendimento. Analisando os rendimentos obtidos, observou que a eficiência de extração foi constante, independente do tempo. Assim, que o uso de 1 h para a polpação do bagaço de cana-de-açúcar foi adotado para todos os experimentos.

Diferentes temperaturas foram verificadas para avaliar a capacidade de deslignificação do NaOH. Para se alcançar temperaturas acima de 120°C (temperatura máxima da autoclave), reatores com tampa de rosca de aço 304 inoxidável, volume de 195 cm^3 , contendo anel de vedação de politetrafluoroetileno e aquecimento por banho de glicerina foram utilizados, sendo possível utilizar a temperatura de 140 e 160°C , e usou-se a temperatura de 120°C para comparação com o material obtido pela autoclave.

Os licores pretos obtidos após o processo de polpação alcalina por reator, não sofreram o processo de extração da hemicelulose (procedimento descrito no item 3.3.3.1). O procedimento onde se precipita a lignina diretamente do licor

preto sem a retirada da hemicelulose, se mostrou um procedimento rápido e observou-se uma coloração mais escura quando comparado com a lignina que sofre a retirada da hemicelulose anteriormente à precipitação da lignina. O rendimento do material seco proveniente da precipitação da lignina direta é superior, no entanto, possivelmente há a presença de polioses precipitadas juntamente com a lignina.

O material obtido nas temperaturas superiores a 120°C apresentaram rendimento de 16,1 e 17,7% (m/m) para as temperaturas de 140 e 160°C, respectivamente. O material obtido no reator a 120°C apresentou um rendimento muito próximo ao obtido utilizando a mesma metodologia de polpação em autoclave, concluindo assim, que a temperatura aumenta a deslignificação das fibras do bagaço de cana-de-açúcar.

No entanto, para extrações posteriores, a temperatura de 120°C em autoclave foi escolhida devido à facilidade de execução e possibilidade do uso de maior quantidade de material extraído por hora, sendo que nos reatores a massa de bagaço utilizado para extração foi de 40,0 g.h⁻¹ e na autoclave foi de 80,0 g.h⁻¹.

4.1.2 - Processo de oxidação das ligninas

Todas as amostras de ligninas obtidas sofreram o processo de oxidação, com o intuito de promover a hidrólise de ligações do tipo éter, como as ligações α -O-4 e β -O-4 da macromolécula de lignina (FIGURA 4.1), entre os

carboidratos e entre átomos de carbono α das cadeias laterais de lignina, diminuindo assim, o tamanho da cadeia polimérica da lignina.

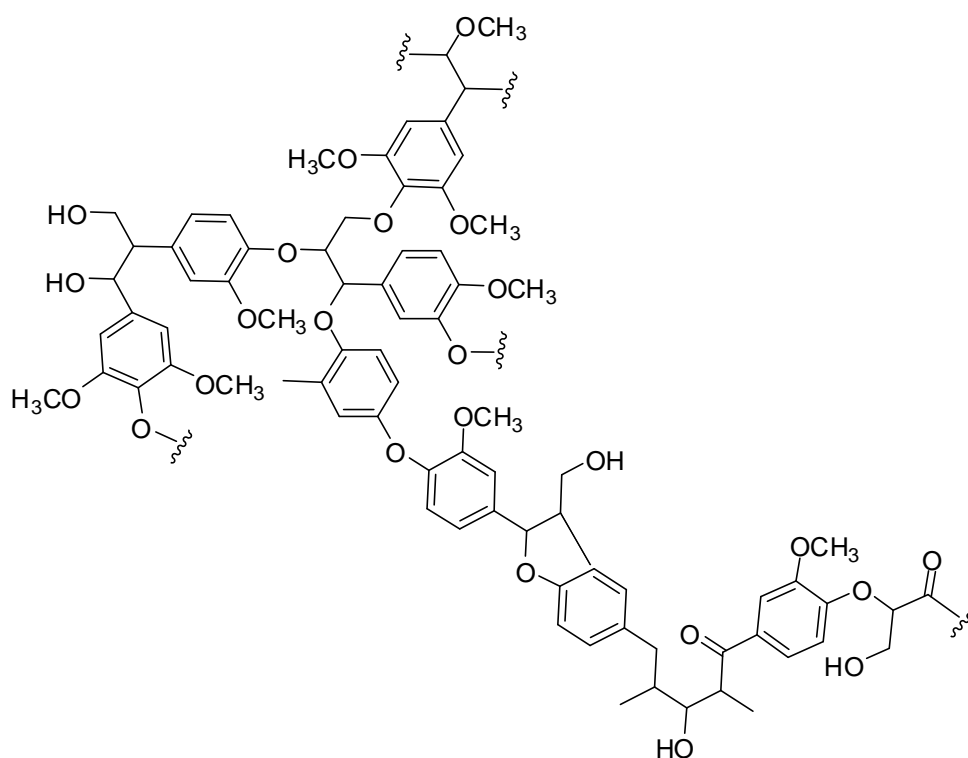


FIGURA 4.1 – Estrutura da lignina de abeto (*Picea abies*) proposta por Adler (RUZENE, 2005).

O método de oxidação foi baseado no trabalho publicado por Maziero, et. al. (2012) com algumas modificações. Com o propósito de se obter ligninas com diferentes graus de oxidação, o que implica em diferentes solubilidades, tamanhos de cadeia e, possivelmente, diferentes produtos e resultados biológicos, foi avaliada a quantidade do agente oxidante empregado no processo e seu impacto sobre as ligninas. Neste trabalho foram aplicadas as quantidades de H₂O₂ equivalentes a 9, 12, 14, 16 e 18% (v/v).

Inicialmente, utilizou-se a Lig 3 (vide seção 3.3.3), obtida através do processo alcalino, sendo avaliada para todas as quantidades de H_2O_2 . Visualmente foi observado que as ligninas após sofrerem a etapa de oxidação em proporções de H_2O_2 superiores a 14% (v/v), apresentaram mudanças de cor, pois sua tonalidade passou de marrom para o bege (FIGURA 4.2).



FIGURA 4.2 - (a) Lig 3 obtida pelo processo alcalino; (b) lignina resultante da oxidação da lig 3 com 9% (v/v) de H_2O_2 ; (c) lignina resultante da oxidação com 14% (v/v) de H_2O_2 .

Mudanças morfológicas foram observadas após o processo de oxidação através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) conforme ilustrado na FIGURA 4.3.

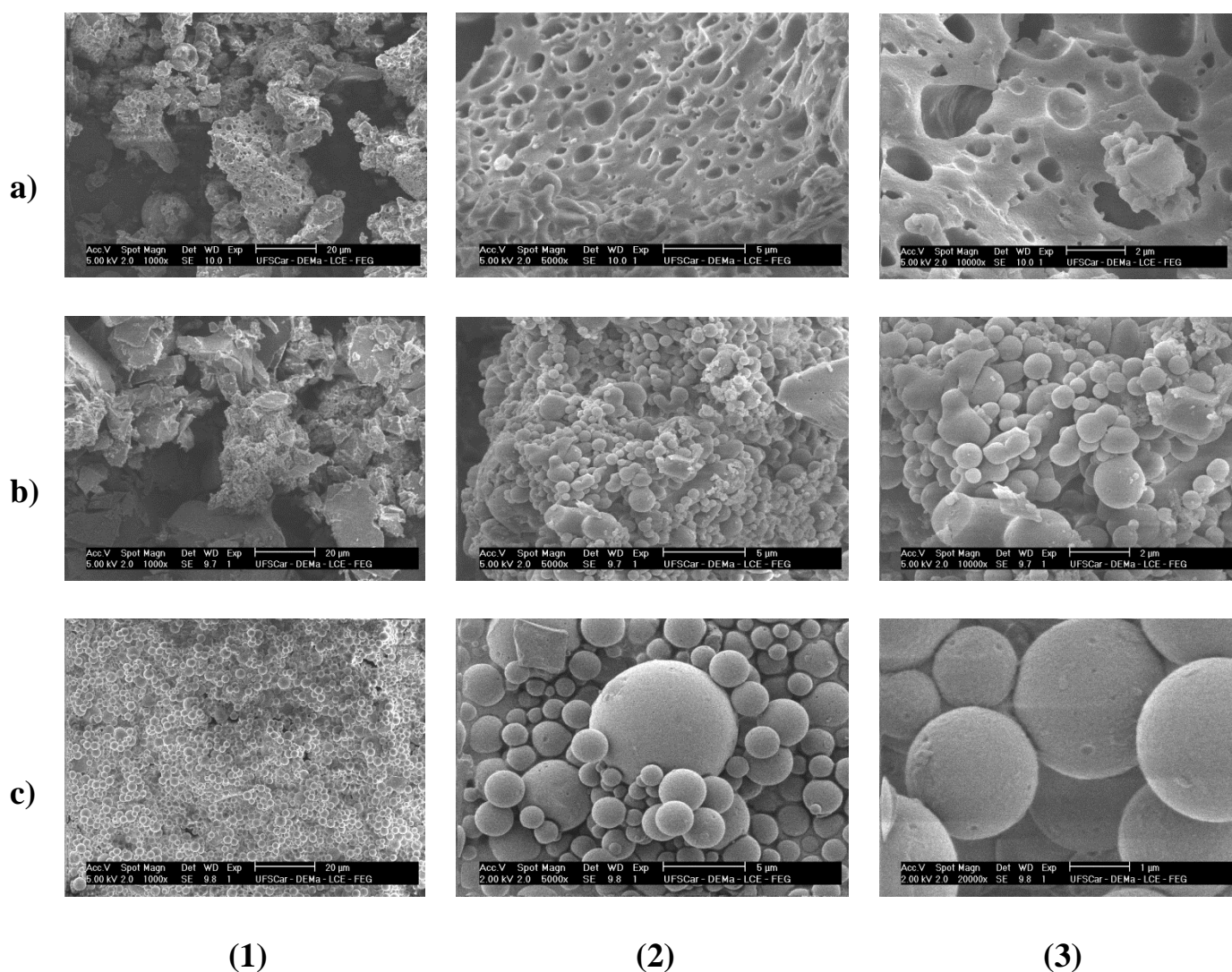


FIGURA 4. 3 - Análise de MEV das ligninas: (a) Lig 3 obtida pelo processo alcalino; (b) lignina resultante da oxidação da Lig 3 com 9% (v/v) de H₂O₂; (c) lignina resultante da oxidação da Lig 3 com 14% (v/v) de H₂O₂, nas aproximações de 1.000 (1), 5.000 (2) e 10.000 (3) vezes.

Os processos de extração e oxidação das ligninas foram realizados em duplicata e as análises por MEV foram executadas para a confirmação de repetibilidade do processo. Na lignina não oxidada (Lig 3) foi observado apenas à presença de uma estrutura esponjosa (cavidades). Na lignina oxidada com 9%

(v/v) de H_2O_2 foi possível observar a estrutura esponjosa, contudo, também foi possível observar um início na formação de microesferas. Por sua vez, as amostras da lignina oxidada com 14% (v/v) de H_2O_2 não mais apresentou a estrutura esponjosa mostrando apenas a presença de microesferas. Devido à característica de microesferas da lignina oxidada com 14% (v/v) de H_2O_2 , este volume foi o estabelecido para os demais processos de oxidação futuros, pois essa morfologia pode apresentar características diferenciadas durante o processo de encapsulação do extrato vegetal de nim.

4.1.3 - Processo de acetilação das ligninas

O processo de acetilação se caracteriza por introduzir um grupo acetil em oxigênios das hidroxilas (MORAIS, 1992). A reação de acetilação promove maior solubilidade da lignina em solventes orgânicos, permitindo assim, um maior número de técnicas de caracterização. A técnica utilizada para confirmar a acetilação da lignina é a verificação do desaparecimento da banda correspondente ao estiramento de ligações O-H (região de 3200 cm^{-1}) do espectro na região do infravermelho (BENAR, 1996). As ligninas não oxidadas, oxidadas e acetiladas foram analisadas por IV, RMN e MALDI-TOF.

4.2 – Caracterização das ligninas

Todas as amostras de ligninas foram analisadas por IV-TF para a caracterização das diferenças estruturais após sofrerem o processo de oxidação e

acetilação. As bandas observadas por IV-TF são características de ligninas (Hoareau et al., 2004), como observadas abaixo no espectro da Lig 3 (FIGURA 4.4). A TABELA 4.1 apresenta os valores das bandas mais importantes para a caracterização da lignina em geral.

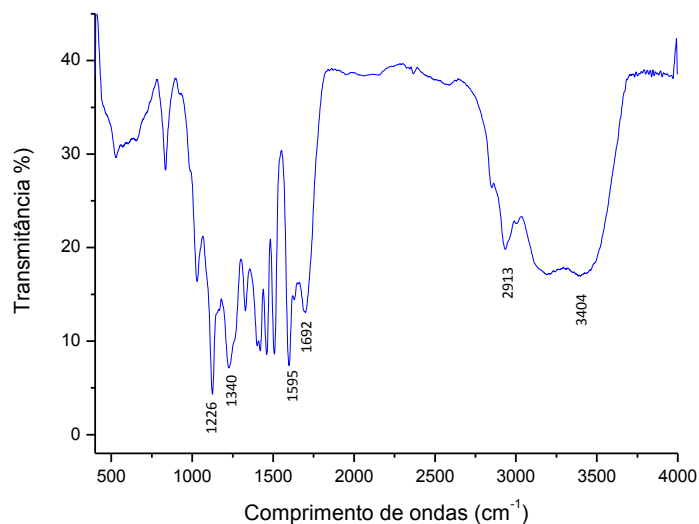


FIGURA 4.4 - Espectro de IV-TF da Lig 3.

TABELA 4.1 – Bandas de absorção na região do infravermelho típicos de ligninas.

Bandas (cm ⁻¹)	Atribuição
3450 – 3400	O-H estiramento
3050 – 2840	C-H estiramento (alifáticos e aromáticos)
1675 – 1660	C=O estiramento da carbonila
1605 – 1600	Vibrações nos anéis aromáticos
1515 – 1505	Vibrações nos anéis aromáticos
1330 - 1325	Respiração do anel siringil
1230 – 1220	C-C, C-O estirado

As bandas espectrais observadas nas ligninas extraídas e nas ligninas que sofreram oxidação se diferenciaram apenas na intensidade de algumas bandas. Por IV-TF não foram observados mudanças significativas que pudesse constatar a hidrólise de ligações do tipo éter nas ligninas oxidadas. Entretanto, nos espectros das ligninas acetiladas, foi possível observar uma diminuição da banda referente ao estiramento O-H ($3450-3400\text{ cm}^{-1}$) e surgimento de uma banda intensa em 1744 cm^{-1} referente à absorção de grupos C=O de ésteres ($1750 - 1740\text{ cm}^{-1}$). A técnica de IV-TF forneceu a confirmação que ocorreu a acetilação nas ligninas (valores em negrito) (BENAR, 1996).

Os dados obtidos por IV para as outras ligninas obtidas estão apresentados na TABELA 4.2.

TABELA 4.2 – Bandas na região do IV das amostras de ligninas.

Demoninação das Ligninas	Bandas (cm ⁻¹)
Lig 1	3431 (F); 2922; 1709 (F);1604; 1323; 1235
Lig 2	3417 (F); 2933; 1699; 1597; 1324; 1222
Lig 2 oxi	3417 (F); 2933; 1699; 1605 (F); 1331; 1226;
Lig 2 oxi_Ac	3431 (f); 2931; 1744 (F) ; 1586 (m); 1323 (f); 1226 (F)
Lig 2_Ac	3440 (f); 2931; 1735 (F) ; 1595; 1331 (f); 1226 (F)
Lig 3	3404 (F); 2913; 1692; 1595; 1340; 1226;
Lig 3 oxi	3404 (m); 2922; 1700 (f); 1595; 1595; 1226
Lig 3_Ac	3141 (f); 2939; 1735 (F) ; 1604; 1323; 1235 (F)
Lig 4	3404 (m); 2913; 1700 (f); 1613; 1323; 1226
Lig 4_Ac	3413 (f); 2922; 1744 (F) ; 1604; 1331; 1226 (F)
Lig 5	3413 (F); 2913; 1692 (f), 1700 (f); 1217 (m); 1120
Lig 5 oxi	3396 (m); 2922; 1700 (f); 1638; 1235 (F), 1129
Lig 5_Ac	3413 (m); 2931; 1744 (F) ; 1630 (f); 1331; 1226 (m)
Lig 6	3396 (F); 2922; 1700 (f); 1630 (f); 1226 (F); 1120
Lig 6 oxi	3388 (f); 2913; 1700 (m); 1700 (F); 1226 (F); 1129
Lig 6_Ac	3413 (f); 2913; 1744 (F) ; 1630 (f); 1331 (f); 1226 (F)
Lig 7	3379 (F); 2922; 1700 (m); 1604; 1331 (f); 1226 (m)
Lig 7 oxi	3379 (f); 2913; 1709; 1638; 1235 (F), 1120
Lig 7_Ac	3413 (f); 2913; 1744 (F) ; 1630 (f);); 1331 (f); 1226 (F)

Referente à intensidade de absorção: F=forte; m=médio; f=fraco

As amostras de ligninas foram analisadas por RMN de ¹H observando-se os sinais presentes na região de aromáticos, grupos metoxílicos, alifáticos e acetil característicos de ligninas (TEJADO et al., 2007). As ligninas possuem alto peso molecular e assim como os polímeros apresentam dificuldades na análise de RMN, pois em soluções, suas moléculas possuem pouca mobilidade, não permitindo a obtenção de sinais bem resolvidos. Os espectros das ligninas apresentam bandas bastante largas e de difícil identificação (SALIBA et al.,

2001). A FIGURA 4.5 ilustra como exemplo, um espectro de RMN de ^1H obtido para a amostra de Lig 3.

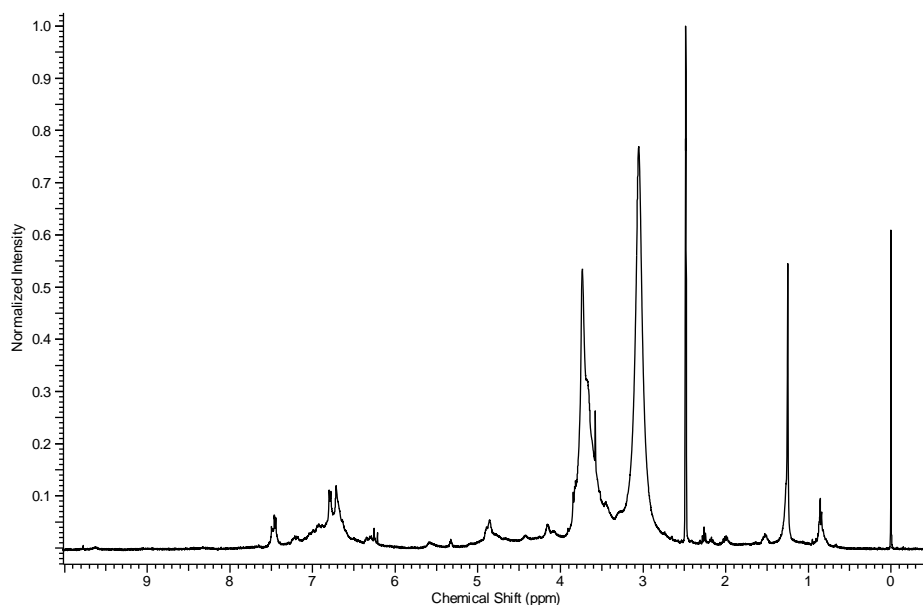


FIGURA 4.5 - Espectro de RMN de ^1H da Lig 3. Solubilizada em DMSO-d_6 , temperatura de $30\text{ }^\circ\text{C}$ e operando a 400 MHz.

Foi observado deslocamentos químicos na região 7,5 a 6,0 ppm referentes aos hidrogênios aromáticos dos três monômeros precursores da lignina, o álcool coniferil, o álcool sinapil e o álcool *p*-coumaril que são chamados, respectivamente, guaiacil (G), siringil (S) e *p*-hidroxipenil propano (*p*-H). Os sinais observados na região de 4,0 a 3,4 ppm corresponde aos hidrogênios metoxílicos e de hidrogênios ligados à carbonos carbonílicos presente na molécula, os observados entre 2,2 a 1,9 ppm e 1,6 a 1,4 ppm refere-se aos hidrogênios α dos grupos acetis ligados aos anéis aromáticos e aos alifáticos, respectivamente. Os sinais na região 1,3 a 0,8 ppm são atribuídos aos

hidrogênios alifáticos saturados. O sinal observado em 2,5 ppm refere-se ao DMSO-d₆, solvente utilizado para a solubilização da lignina. Estes mesmos sinais de lignina foram observados e descritos por Tejado et al. (2007) e auxiliaram com a identificação das ligninas. A Tabela 4.3 resume as atribuições dos sinais de RMN ¹H da Lig 3.

TABELA 4.3 - Atribuição dos sinais de RMN ¹H da Lig 3.

Sinal (ppm)	Atribuição
8,0 – 6,0	H aromáticos de unidades S, G e <i>p</i> -H
4,0 – 3,4	H metoxílicos e ligados à carbono carbonílico
2,2 – 1,9	H acetil ligados à aromáticos
1,6 – 1,4	H acetil ligados à alifáticos
1,3 – 0,8	H alifáticos saturados

Devido à complexidade dos espectros de RMN de ¹H das amostras de ligninas, a inspeção visual pode revelar pouca informação. Por isso, métodos estatísticos computadorizados, chamados de análises quimiométricas pode ser um grande aliado na obtenção de informações mais relevantes. Assim, todas as amostras foram analisadas em quintuplicata, nesse processo foi otimizado os parâmetros de temperatura e pulsos, em busca de sinais com maior resolução. Os dados obtidos foram analisados quimiometricamente, mostrando a correlação entre as amostras (FIGURA 4.6).

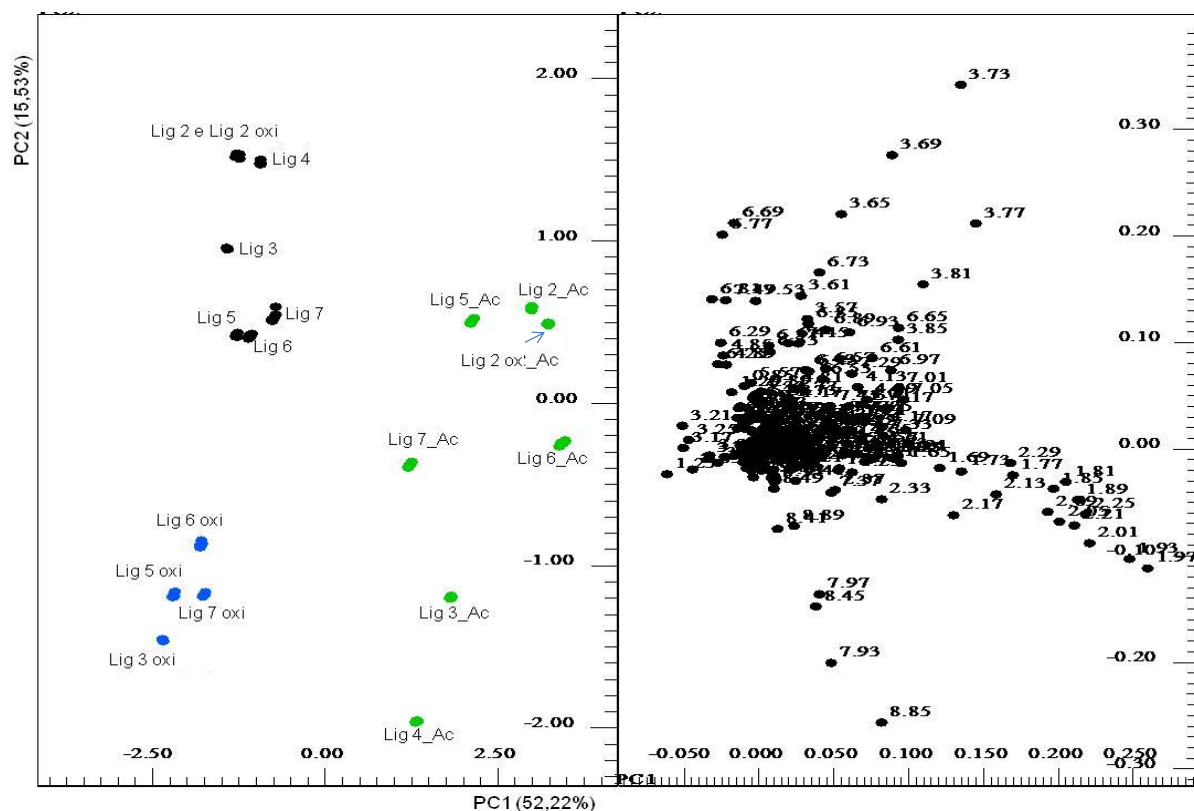


FIGURA 4.6 - Análise quimiométrica RMN de ^1H das amostras de ligninas extraídas, oxidadas e acetiladas. Solvente DMSO-d_6 , temperatura de 30°C e operando a 400 MHz.

Analisando os espectros das ligninas não oxidadas, oxidada e acetilada, as informações não foram suficientes para identificar a mudança sofrida em cada processo, isso ocorreu principalmente devido ao alargamento dos sinais obtidos.

A análise quimiométrica auxiliou na visualização das diferenças em cada lignina. Através da análise das componentes principais dos espectros de RMN de ^1H , foi possível observar que as ligninas não apresentaram diferenças significativas entre si, independente da temperatura (120 , 140 ou 160°C) utilizada no processo de extração por autoclave ou reator. Na FIGURA 4.6 se

pode observar o agrupamento das ligninas obtidas pelo processo formacell e alcalino que não sofreram nenhum processo químico sobressalente numa mesma região (círculo de coloração preto). A região do espectro que os diferencia dos demais grupos é a região dos hidrogênios metoxílicos. Possivelmente essa região sofreu modificações relevantes nas ligninas que sofreram reações químicas (oxidação e acetilação).

Nas ligninas oxidadas (círculo de coloração azul) observou-se o agrupamento entre si independente da temperatura de extração. Com isso, é possível afirmar que o processo de oxidação promove características iguais a todas as formas de obtenção, como por exemplo, as ligninas obtidas por deslignificação em temperatura de 120 ou 160°C. Esta técnica foi importante para fortalecer a existência de diferenças na estrutura da lignina oxidada quanto comparada com a lignina sem oxidação, pois os dados de IV não contribuíram para observar essa diferença.

Os deslocamentos químicos das ligninas acetiladas observados após a análise quimiométrica (círculo de coloração verde, FIGURA 4.6) corroborou com os dados obtidos pelo IV (FIGURA 4.7), demonstrando a formação dos grupos acetilados que substituiu os grupos hidroxilas, como pode ser visto na região de campo baixo de 2,2 a 1,4 ppm. No espectro de IV é possível observar o surgimento da banda na região de 1740 cm^{-1} e a diminuição da banda na região de 3000 a 3500 cm^{-1} , referentes aos grupos hidroxilas.

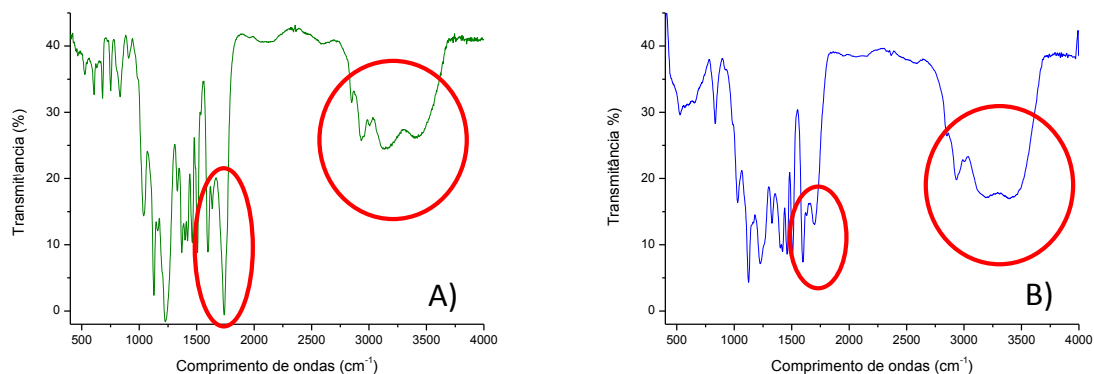


FIGURA 4.7 – Espectros de IV das ligninas: A) Lig 3_Ac B) Lig 3.

4.2.1- Caracterização das ligninas por espectrometria de massas

Com o propósito de definir o tamanho da cadeia polimérica e a massa molecular dos polímeros de lignina, foi utilizada a técnica de espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. O MALDI-TOF é uma técnica que tem como principais características a alta sensibilidade, capacidade de análises de macromoléculas e compostos não-voláteis, onde a ionização ocorre com o analito adsorvido em uma substância (matriz) por um feixe de laser (BAYERBACH et al., 2006).

Várias faixas de massas foram analisadas em busca de informações. Na faixa de massa de m/z 1.000 a 3.000 Da observou-se um pico em m/z 1896.992. Esse perfil foi obtido no modo negativo de ionização e utilizando a amostra e a matriz misturadas antes da aplicação na placa de MALDI. Os demais modos de aplicação foram necessários para verificar se ocorreria alguma alteração nos sinais obtidos.

A matriz utilizada foi o DHB (ácido 2,5-diidroxibenzóico), pois este auxiliou melhor na visualização dos sinais do que a matriz do ácido sinapínico. O DHB é conhecido por ser uma boa matriz para promover a ionização de moléculas com alto peso molecular, como por exemplo, proteínas, carboidratos, oligossacarídeos e glicopeptídeos (ZENOBÍ et al., 1998; HARVEY, 2006).

Ao analisar o espectro pode-se observar sinais referentes à perda de massas de m/z 208 à 212 Da. Os monômeros fenilpropanóides presentes na estrutura possuem massas de m/z 210, 180 e 150 Da, referentes às unidades do álcool sinapil, álcool coniferil e álcool *p*-coumaril, respectivamente (FIGURA 4.8). Possivelmente, as perdas de massa observados no espectro de MALDI-TOF sejam fragmentos que tem as unidades fenilpropanóides como precursores.

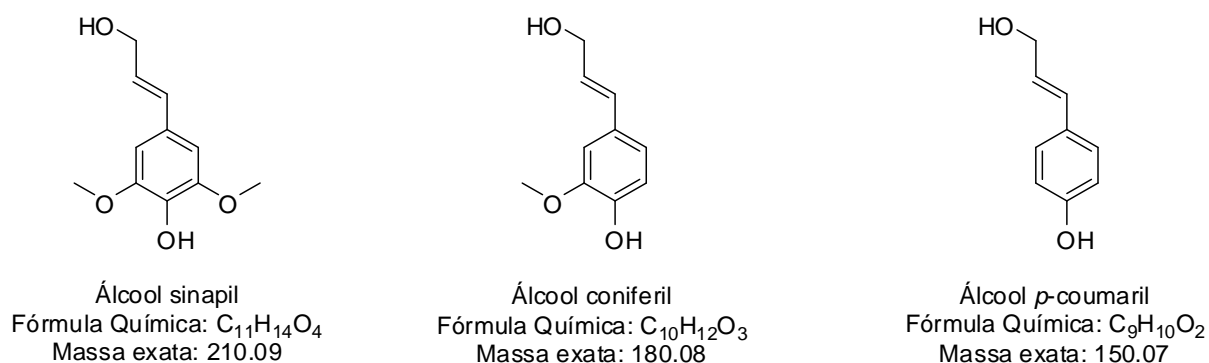


FIGURA 4.8 – Estruturas das unidades fenilpropanóides precursores da molécula de lignina.

Ghaffar e Fan, 2013 descrevem que o biopolímero de lignina extraído do bagaço de cana-de-açúcar pode variar em tamanho, podendo chegar a massas moleculares ao redor de m/z 2.160 Da. Na análise realizada, se observou íons

moleculares na faixa de m/z 1.896 Da. Este resultado pode ser resultado de dois processos. Primeiro, possivelmente, a percentagem de NaOH utilizada para a extração da lignina tenha gerado moléculas de menor massa molecular quando comparado com extrações mais severas, como por exemplo, uso de maior percentagem de NaOH e maior temperatura, ou os parâmetros de operação aplicados no MALDI somente foram capazes de ionizar os oligômeros de menor massa molecular (FIGURA 4.9).

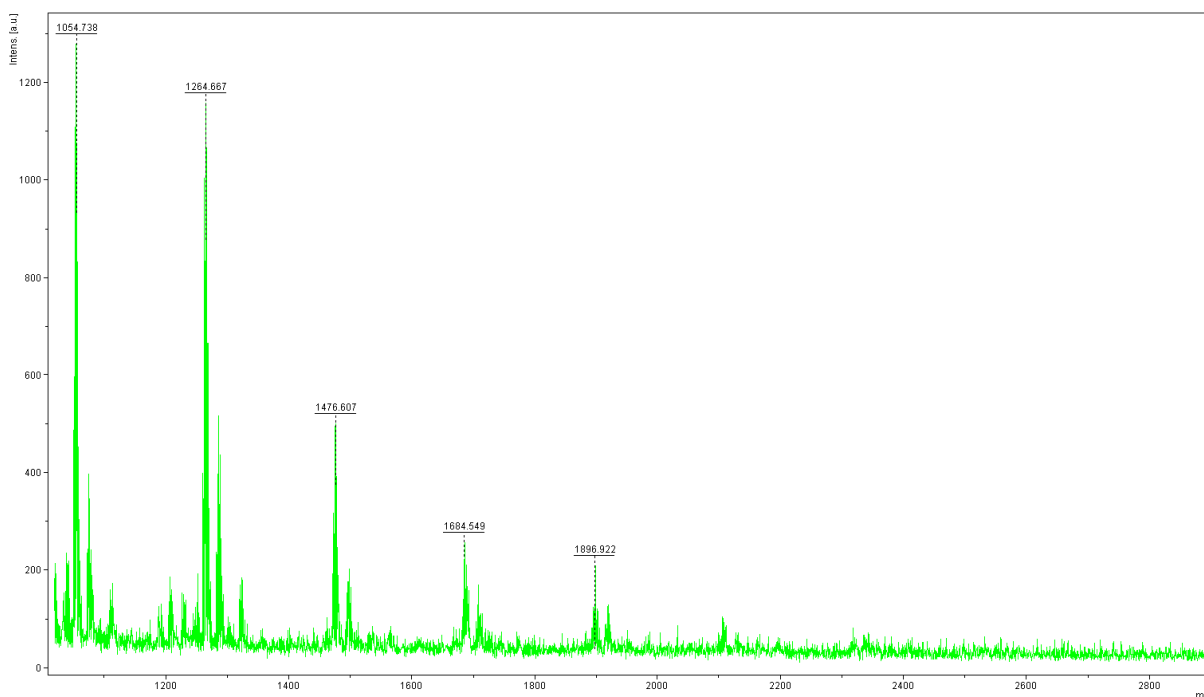


FIGURA 4.9 - Espectro de MALDI-TOF da Lig 3 obtida pelo processo alcalino. Os parâmetros de análise foram descritos no tópico 3.4.3.

Vastas faixas de massas foram analisadas para se assegurar que não haveria nenhuma massa superior ao observado. Com o propósito de avaliar possíveis modificações estruturais entre as ligninas obtidas entre todos os

métodos de extração, oxidação e acetilação, todas as amostras de ligninas foram submetidas à análise por MALDI-TOF MS e posteriormente analisadas por quimiometria. Assim, os dados foram processados e ilustrados através da análise dos componentes principais (FIGURA 4.10). A análise das componentes principais é diferenciada conforme o perfil de massas que cada amostra apresenta, ou seja, as amostras de ligninas foram agrupadas devido à presença ou ausência de sinais ou mesmo a intensidade dos mesmos. Não houve um grupamento referente ao tipo de tratamento que sofreram, tampouco com o modo de extração que foram obtidos.

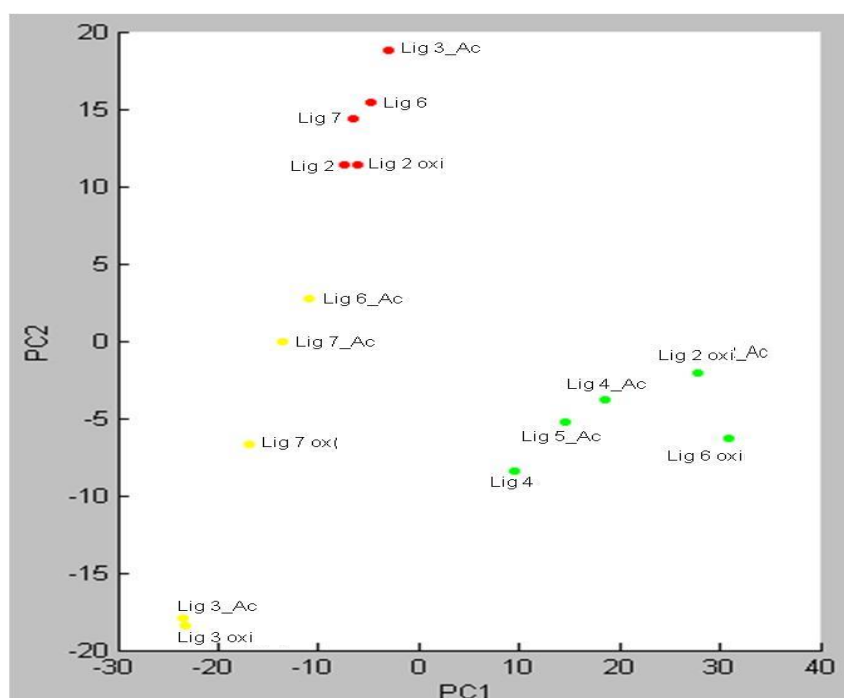


FIGURA 4.10 - Análise quimiométrica dos espectros de MALDI-TOF das amostras de ligninas. Os parâmetros de análise foram descritos no tópico 3.4.3.

Diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o propósito de finalizar a determinação estrutural das ligninas (PILO-VELOSO et al., 1993; PASQUALI e HERRERA, 1997; SALIBA et al.; 2001; FUKUSHIMA e HATFRELD, 2003; CAPANEMA et al., 2004; DAVIN e LEWIS, 2005; SILVEIRA e MILAGRES, 2009). Estes trabalhos, em sua grande maioria utilizam métodos químicos, cromatográficos e espectroscópicos como, por exemplo, infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C). Também há o estudo através de reações de degradação e oxidação com permanganato de potássio e nitrobenzeno, assim como de degradação por pirólise. Esses produtos a partir da degradação e oxidação são, então, analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Outra técnica é a cromatografia de permeação em gel, para determinar a distribuição dos pesos moleculares de fragmentos que compõem a lignina (SALIBA et al., 2001).

O primeiro relato do uso da espectrometria do tipo MALDI-TOF para a determinação estrutural das ligninas foi no início dos anos 90 (METZGER et al., 1992).

4.2.3 - Análise conjunta dos dados de caracterização

Diferentes processos foram desenvolvidos para a obtenção da lignina. Dois processos foram executados, a polpação alcalina e a formacell, além do teste na alteração da temperatura e concentração do reagente extrator, o NaOH. Reações químicas foram feitas em busca de mudanças estruturais nas ligninas

obtidas, os processos foram de oxidação e acetilação. Os diferentes tipos de ligninas, reações sofridas e seus rendimentos estão resumidos na tabela abaixo (TABELA 4.4).

As ligninas extraídas pelo reator apresentam rendimento superior quando comparado com a extração em autoclave. O aumento está relacionado às temperaturas maiores alcançadas pelo reator. O método de extração por reator foi executado no intuito de verificar se ocorreriam diferenças na estrutura das ligninas com o aumento da temperatura. Pela técnica de análise quimiométrica de RMN (vide página 73) se observou que tanto a lignina obtida por autoclave quanto por reator apresentam as mesmas características estruturais, pois as mesmas apresentaram sinais no espectro de RMN referentes aos hidrogênios metoxílicos e aos ligados ao carbono carbonílico, também dos hidrogênios ligados aos grupos aromáticos e alifáticos, além dos hidrogênios alifáticos saturados e dos hidrogênios aromáticos das unidades siringil, guaiacil e 4-hidroxifenil (Tejado et al., 2007).

TABELA 4.4 - Apresentação dos procedimentos de obtenção das amostras de ligninas.

Denominação	Polpação	Temperatura (°C)	Deslignificação	Reação adicional	Concentração de NaOH	Precipitação	Rendimento (%)
Lig 1	Formacell	120	Auto-clave	-	1%	2 etapas	8,02
Lig 2	Alcalina	120	Auto-clave	-	1%	2 etapas	4,36
Lig 2 oxi	Alcalina	120	Auto-clave	Oxidação	1%	2 etapas	2,30
Lig 2 oxi_Ac	Alcalina	120	Auto-clave	Acetilação	1%	2 etapas	2,29
Lig 2_Ac	Alcalina	120	Auto-clave	Acetilação	1%	2 etapas	2,30
Lig 3	Alcalina	120	Auto-clave	-	2%	2 etapas	7,20
Lig 3 oxi	Alcalina	120	Auto-clave	Oxidação	2%	2 etapas	5,45
Lig 3_Ac	Alcalina	120	Auto-clave	Acetilação	2%	2 etapas	6,18
Lig 4	Alcalina	120	Auto-clave	-	2%	1 etapa	8,02
Lig 4_Ac	Alcalina	120	Auto-clave	Acetilação	2%	1 etapa	9,62
Lig 5	Alcalina	120	Reator	-	2%	1 etapa	13,81
Lig 5 oxi	Alcalina	120	Reator	Oxidação	2%	1 etapa	7,62
Lig 5_Ac	Alcalina	120	Reator	Acetilação	2%	1 etapa	7,14
Lig 6	Alcalina	140	Reator	-	2%	1 etapa	16,04
Lig 6 oxi	Alcalina	140	Reator	Oxidação	2%	1 etapa	10,23
Lig 6_Ac	Alcalina	140	Reator	Acetilação	2%	1 etapa	7,09
Lig 7	Alcalina	160	Reator	-	2%	1 etapa	17,67
Lig 7 oxi	Alcalina	160	Reator	Oxidação	2%	1 etapa	8,43
Lig 7_Ac	Alcalina	160	Reator	Acetilação	2%	1 etapa	5,72

4.3 - Preparo de microcápsulas bioinseticidas carregadas com extrato de *Azadirachta indica*

Os produtos agroquímicos são convencionalmente aplicados em campo por pulverização sendo a água utilizada como veículo. Todavia, apenas uma pequena parte dos produtos agroquímicos, realmente atinge o alvo esperado. Não raramente, isso ocorre numa concentração menor que a concentração mínima efetiva requerida devido a problemas como lixiviação, fotodegradação, hidrólises e degradação microbiana (NAIR et al., 2010). Conseqüentemente, repetidas aplicações se tornam necessárias causando impactos ambientais diretos ao solo e à água.

As microcápsulas para uso agrícola devem ser projetadas de modo que satisfaçam propriedades físicas e químicas que tenham como resultado uma melhora no controle de pragas agrícolas e redução de riscos ambientais.

Entre os benefícios se podem destacar o ajuste na capacidade de dispersão em meio aquoso de compostos orgânicos com redução do uso de surfactantes, aumento na estabilidade contra degradações provocadas por fotólise, termólise ou hidrólise e controle na liberação de compostos ativos melhorando a atividade biológica desejada. Conseqüentemente, com o ganho de estabilidade e ajuste da atividade biológica, há uma redução nas dosagens e na necessidade de reaplicações havendo um impacto direto positivo sobre o meio ambiente (BOEHM et al., 2003; TSUJI, 2001)

Assim, para o preparo de microcápsulas bioinseticidas carregadas com extrato de *Azadirachta indica* foram escolhidas quatro formas de ligninas diferentes, sendo a Lig 3, Lig 3 oxi, Lig 3_Ac e a Lig 4. A Lig 3 foi escolhida por apresentar um processo rápido, fácil e por não conter a presença da hemicelulose, pois a mesma é precipitada em fase anterior à precipitação da lignina. A Lig 4 foi selecionada para representar as ligninas que foram precipitadas sem a retirada a hemicelulose anteriormente (FIGURA 4.11).

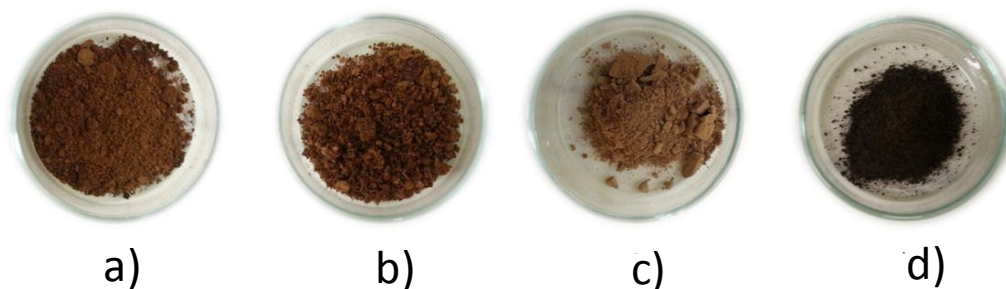


FIGURA 4.11 - (a) Lig 3; (b) Lig 3_Ac; (c) Lig 3 oxi; e (d) Lig 4.

O método desenvolvido para o preparo de microcápsulas do extrato de nim enriquecido de azadiractina através de um processo de partição líquido-líquido consiste do preparo de três diferentes fases: a) emulsão em fase aquosa do extrato vegetal, b) adição do polímero e c) secagem por *Spray-Drying*.

Inicialmente, o extrato de nim etanólico foi particionado (vide seção 3.5.1) através da separação líquido-líquido, obtendo a fração acetato de etila enriquecida de azadiractina. A quantidade de material vegetal necessária para o preparo das microcápsulas foi determinada após análises cromatográficas do

teor de azadiractina. Na sequência, a fração acetato de etila de nim é dispersa juntamente com o óleo de nim comercial sob vigorosa agitação em fase aquosa. Este sistema possibilita a formação de micelas com o óleo do nim criando uma emulsão. Em função da diferença de solubilidade entre a fase aquosa e as micelas, os constituintes do extrato de nim permanecem na fase micelar não sendo disperso para a fase aquosa. O uso do tensoativo Tween[®]80 foi necessário para auxiliar na dispersão do extrato vegetal e o óleo comercial de nim, pois ele se adsorve sobre as microcápsulas atuando como dispersante, melhorando o processo de formulação.

Em uma segunda fase, a lignina é inserida à emulsão aquosa agitada vigorosamente com o Ultra-Turrax IKA (T10 basic) e a adição do aerosil (SiO₂), utilizado como suporte secante foi necessário para auxiliar na secagem do material, pois a temperatura de secagem da solução contendo a formulação do extrato vegetal foi estudada com cuidado para evitar a degradação dos produtos naturais presentes.

O teor de azadiractina foi acompanhado antes e depois do processo de encapsulação do extrato vegetal e a quantidade utilizada da fração acetato de etila foi adicionada visando uma concentração final de azadiractina de 5000 ppm. Essa concentração foi determinada para posteriormente ser necessário o uso de pouco material em pó para os testes químicos e biológicos, sendo que o teor de azadiractina ficaria dentro dos parâmetros determinados na curva de calibração (seção 3.5.3).

O processo escolhido de preparação e secagem, o *Spray-Drying*, teve seus parâmetros de operação otimizados (taxa de alimentação, vazão, aspiração e temperaturas), visando à secagem total e menor perda do material em pó. O parâmetro temperatura é muito importante, pois este parâmetro dita se o material será totalmente seco, no entanto, por se tratar de um produto natural, a temperatura não pode ser elevada, pois poderia degradar os princípios ativos presente no extrato, como por exemplo, a azadiractina. Assim, a temperatura de 120 °C foi determinada, pois o processo de secagem foi rápido e nessa temperatura não se observou a degradação do nosso padrão de comparação, a azadiractina, além de fornecer um produto com estabilidade.

O processo de formulação utilizando as 4 diferentes ligninas - Lig 3, Lig 3 oxi, Lig 3_Ac e Lig 4 - foram feito com o mesmo procedimento e nenhum parâmetro necessitou de alteração na preparação individual de cada.

4.3.1 - Caracterização das ligninas selecionadas para o processo de microencapsulamento

Avaliar as diferentes formas de ligninas foi importante para conhecer a estabilidade de cada uma após o processo de encapsulamento e sua eficiência nos ensaios biológicos e testes químicos. As técnicas de MEV e TGA foram usadas para complementar o conhecimento das características de cada lignina e auxiliar no desenvolvimento dos experimentos posteriores.

As amostras de ligninas quando analisadas morfologicamente através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), apresentaram diferenças em sua morfologia como pode ser visto nas imagens abaixo, proporcionando possivelmente, características distintas no processo de liberação do extrato bruto de nim formulado com as mesmas (FIGURA 4.12).

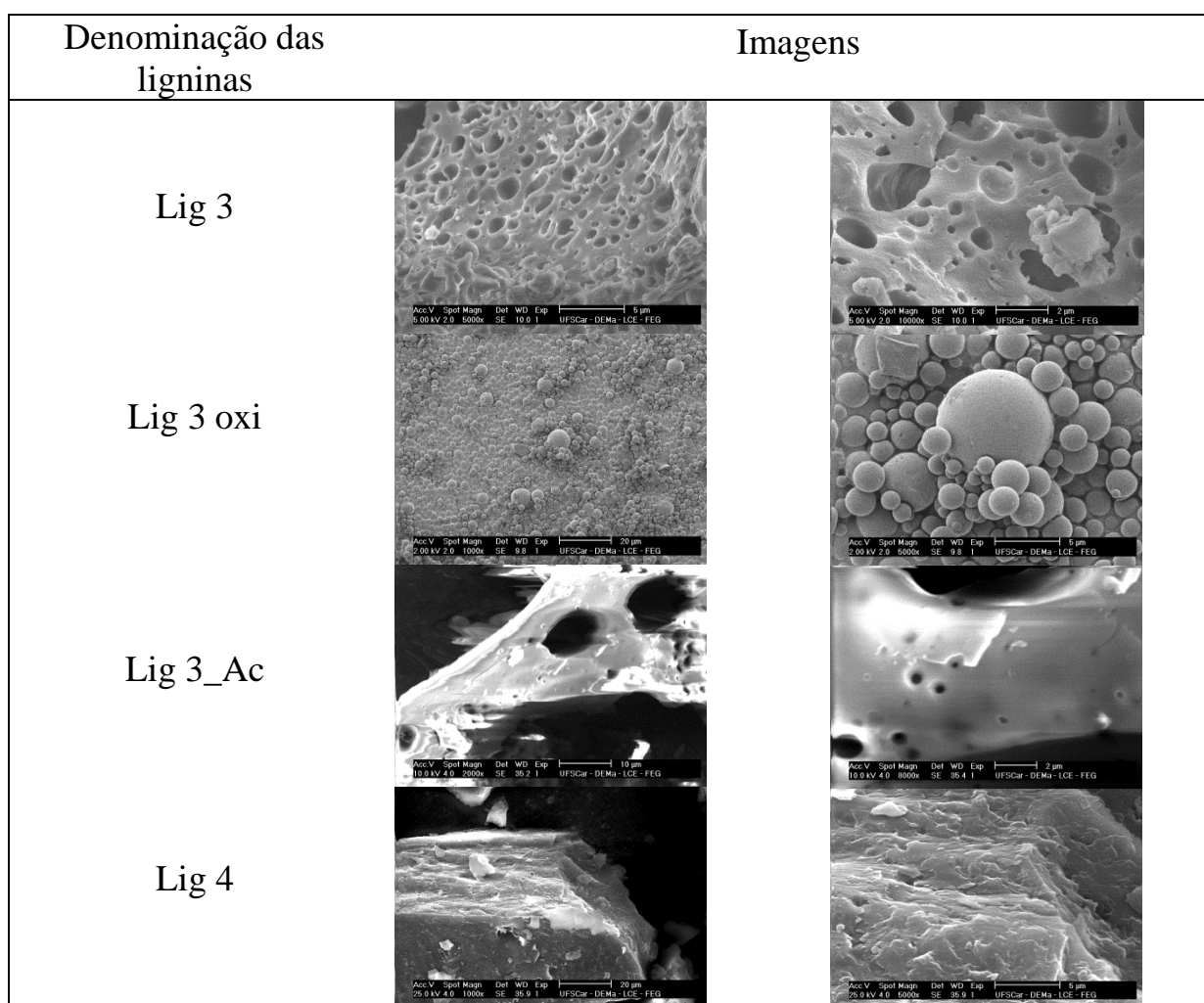


FIGURA 4.12 - Imagens de MEV das ligninas nas aproximações de 20,0 a 2,0 μm .

As imagens obtidas por MEV mostraram em sua grande maioria um perfil reprodutível, sendo que as ligninas extraídas sem sofrer modificações, apresentam o perfil morfológico de um material compacto de estrutura esponjosa (cavidades), já as ligninas que sofreram o processo de oxidação, apresentam um perfil de formação de microesferas uniforme em todo o material e as ligninas que foram acetiladas, apresentaram morfologia muito parecida com a lignina sem sofrer nenhum processo de modificação. Essas diferenças na morfologia são atribuídas ao alinhamento das partículas (polímeros), pois esta é afetada pelo tipo de processamento (PAUL e ROBESON, 2008), ou nesse caso, a reação sofrida durante o processo.

Outra técnica utilizada para observar as diferenças entre as ligninas foi a análise termogravimétrica (TGA) que é uma técnica na qual se pode acompanhar as mudanças na massa de uma amostra durante um período de tempo, enquanto varia sua temperatura. Durante o processo, a temperatura é aumentada, mas a taxa de aquecimento da amostra permanece constante. Na prática, alguns eventos como a evaporação, a sublimação, a decomposição, a oxidação, a redução podem ser medidos (FIGURA 4.13)

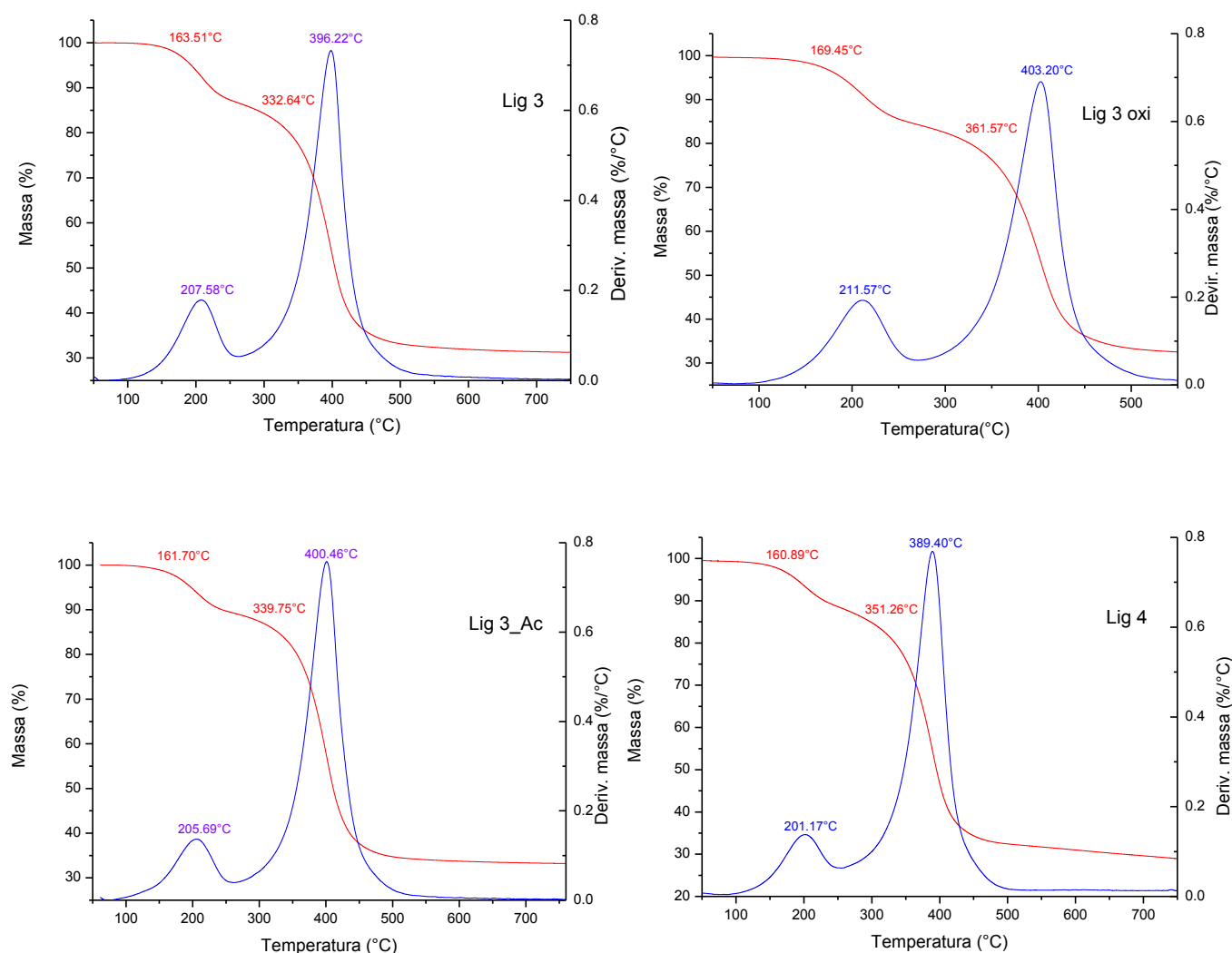


FIGURA 4.13 - Análise de TGA das ligninas.

A lignina é considerada um componente termicamente estável, sua decomposição ocorre entre 200-550 °C, ou mesmo em temperaturas superiores (SHEN et al., 2013). Na primeira fase as principais perdas são de 166-274 °C e estas perdas são atribuídas aos grupos de CO₂, H₂O, CO, formaldeído, álcoois e fenóis (LIU et al., 2008). No segundo estágio ocorre uma liberação intensa que pode variar de 351-481 °C que é atribuído a perda de CH₄. As amostras de

ligninas apresentaram suas principais perdas em temperaturas distintas entre si. A Lig 3 oxi foi a amostra que necessitou de maior energia para alcançar o pico de liberação mais intensa, essa temperatura foi de 403,2°C. Para as Lig 3, Lig 3_Ac e Lig 4 as temperaturas foram de 398,2°C, 400,5°C e 399,4°C, respectivamente. O perfil de degradação de cada amostra está ligado ao seu tipo de estrutura e ligações presente na estrutura, demonstrando assim, que cada lignina apresenta diferenças estruturais entre si.

4.4 - Controle de qualidade de produtos naturais

Com o propósito de garantir a segurança e a eficácia dos produtos naturais utilizados durante os experimentos, a técnica cromatográfica é uma ferramenta essencial. O emprego de técnicas cromatográficas e analíticas que permitam a separação e o isolamento de substâncias de um extrato vegetal mostra-se necessário tanto para o conhecimento da composição química e/ou do princípio ativo do composto, como também para a análise de uma substância, ou grupo de substâncias, que sirva como marcadora daquela espécie, propiciando a padronização qualitativa e quantitativa do material vegetal e produtos relacionados

Alguns desafios para o desenvolvimento de um método analítico a ser utilizado no estudo de materiais vegetais são: 1) extração dos constituintes, principalmente compostos ativos, a partir de uma matriz complexa; 2)

estabilidade térmica e sob luz; 3) falta de substâncias de referência; 4) variação da composição química entre lote coletado, localidade e época do ano (SOUZA-MOREIRA et al., 2010).

Os desafios encontrados para o desenvolvimento de um método analítico e posterior controle de qualidade tornaram-se outro fator limitante ao desenvolvimento e uso confiável dos produtos naturais (ISMAN, 1997). A ausência de protocolos de produção e métodos de controle de qualidade torna-se impossível garantir a reprodutibilidade da ação esperada para um determinado produto.

4.4.1 - Quantificação da azadiractina presente nas frações obtidas do extrato vegetal de nim

O extrato vegetal bruto do nim sofreu partição líquido-líquido no intuito de concentrar compostos bioativos, como, por exemplo, a azadiractina, enriquecendo uma fração de trabalho com o principal princípio ativo. Para a quantificação da azadiractina, o método utilizado foi o desenvolvido por FORIM et al., 2010a).

Nos cromatogramas obtidos por CLAE-UV (FIGURA 4.14) da fração acetato de etila obtida após a extração líquido-líquido do extrato bruto etanólico de nim, apresentou uma alta concentração de 54,8 g.kg⁻¹ de azadiractina. A fração aquosa apresentou a concentração de 1,84 g.kg⁻¹, sendo esta muito

inferior quando comparada à fração acetato de etila e a fração *n*-hexano não apresentou o princípio ativo. A partição líquido-líquido do extrato etanólico se mostrou eficiente, principalmente quando se compara a concentração da azadiractina no extrato bruto etanólico e a posterior concentração na fração acetato de etila. O uso do solvente *n*-hexano auxiliou na retirada de óleos e graxos residuais, promovendo uma fração acetato de etila mais rica em princípios ativos.

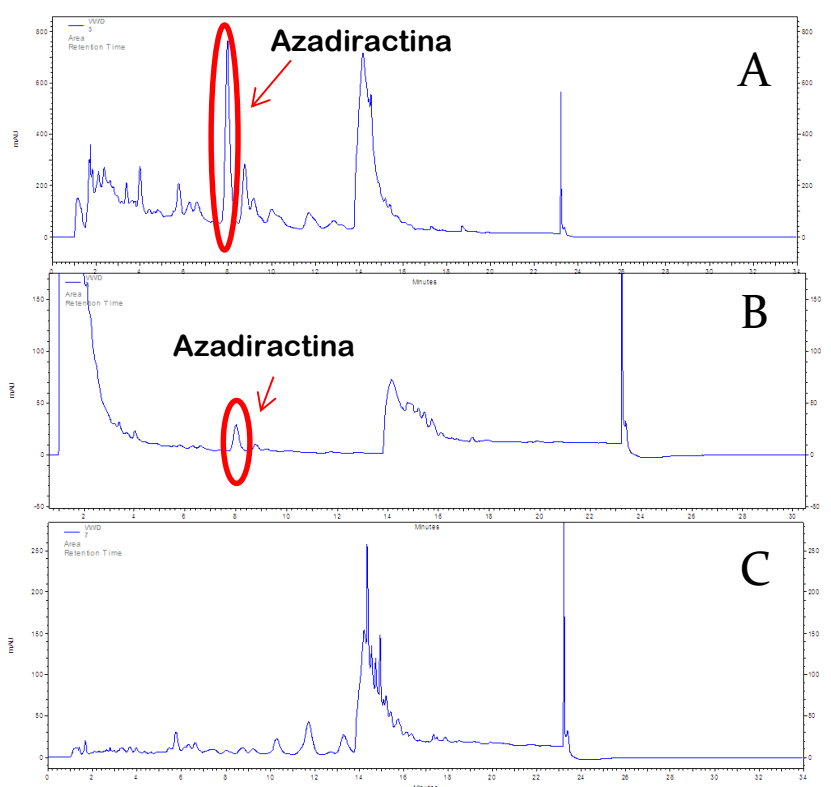


FIGURA 4.14 - Cromatogramas das frações de nim obtidas pelo fracionamento do extrato etanólico: A) fração acetato de etila; B) fração aquosa e; C) fração hexano obtidos por CLAE-UV. As condições operacionais de análise foram: coluna de fase reversa Rexchrom ODS (100 × 4,6 mm, 3 μm) Regis Technologies acoplada a uma coluna de segurança C18 (Phemonemex® 4 × 3

mm) aclimatada em forno a 30 °C, eluição isocrática de fase móvel binária de acetonitrila/água (35:65), vazão de 0,5 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 10,0 µL. Todos os experimentos foram realizados operando o detector em 217 nm.

Uma fração com elevados teores de um princípio ativo possibilita o uso de uma menor quantidade de material vegetal para o processo de nano e micro encapsulamento. O uso de menor quantidade de material vegetal diminui o custo de produção, facilita a formulação, reduz os riscos de incompatibilidade do material vegetal com os demais produtos, como por exemplo, o polímero e favorece na reprodutibilidade da ação biológica. Deste modo, a fração acetato de etila foi escolhida para o processo de formulação e de micro encapsulamento usando a lignina como polímero.

As concentrações de azadiractina foram determinadas dentro das frações a partir da curva de calibração do padrão de azadiractina (vide seção 3.5.3). As curvas de calibração apresentaram linearidade em toda extensão investigada de 1,2 a 98,9 µg.mL⁻¹ mostrando serem diretamente proporcionais à concentração. A linearidade foi determinada em triplicata pela avaliação visual da curva de calibração externa (FIGURA 4.15) e pelos cálculos da equação de regressão ($y = ax \pm b$) e do coeficiente de correlação (r^2) pelo método dos mínimos múltiplos quadrados. O valor do coeficiente de correlação (r^2) observado foi de 0,999, indicando uma boa linearidade para a faixa de trabalho proposta.

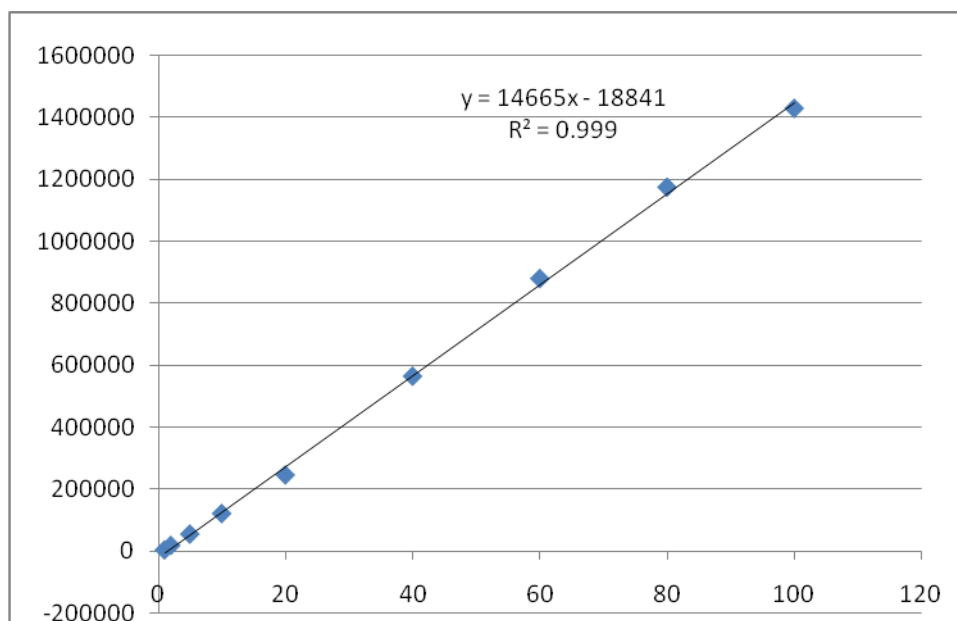


FIGURA 4.15 – Curva de área versus concentração de azadiractina por CLAE-UV. Curva de calibração construída com as soluções padrões de azadiractina ($n = 9$).

4.5 - Análise de degradação das formulações

As formulações foram expostas à duas formas de degradação, a fotoquímica e a térmica, visando obter a resposta quanto à proteção fornecida ao extrato de nim mediante a microencapsulação do mesmo.

4.5.1 – Degradação fotoquímica

O processo de microencapsulamento visa diminuir a degradação sofrida pela azadiractina e os demais componentes do extrato vegetal de nim. Nos últimos anos, tentativas para se alcançar essa estabilidade e diminuição da degradação do extrato de nim tem sido descritos. Damarla et al. (2002)

desenvolveram *pellets* de sacarídeos impregnados com extratos de nim livre de solventes orgânicos e completamente solúvel em água, conferindo estabilidade e controle sobre a cinética de liberação. Murali (2001) descreveu o preparo de microemulsões utilizando surfactantes não-iônicos para o preparo da emulsão contendo também ácido *p*-aminobenzóico com protetor solar. Como resultado foi obtido uma composição aquosa estável onde dependendo da quantidade de óleo de nim e diluições, pode haver diferentes teores de azadiractina (MURALI, 2001).

Todavia, nenhuma técnica, processo ou componentes de formulação descritos na literatura foram similares aos propostos neste trabalho. Assim, as formulações foram expostas a luz ultravioleta por 6 dias, utilizando como controle a partição acetato de etila utilizada para o microencapsulamento e o mesmo protegido da luz.

Aliquotas foram retiradas em duplicatas nos tempos de 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 h e armazenadas. Em seguida, as amostras foram analisadas por CLAE e quantificadas pela curva de calibração (vide seção 3.5.3 e 6.1). Como controle negativo, utilizou-se o extrato bruto exposto à radiação UV e para efeito de comparação, inseriu-se individualmente no extrato bruto os protetores utilizados nas formulações (Stylize[®], Tinogard[®], EDTA e silicone). O intuito foi verificar se os protetores promoviam proteção adicional ao extrato bruto e a função das ligninas entre veículo e protetor. Primeiramente foram testados

extratos de nim na presença dos aditivos. A FIGURA 4.16 ilustra a curva de recuperação de azadiractina em função do tempo entre extratos e aditivos.

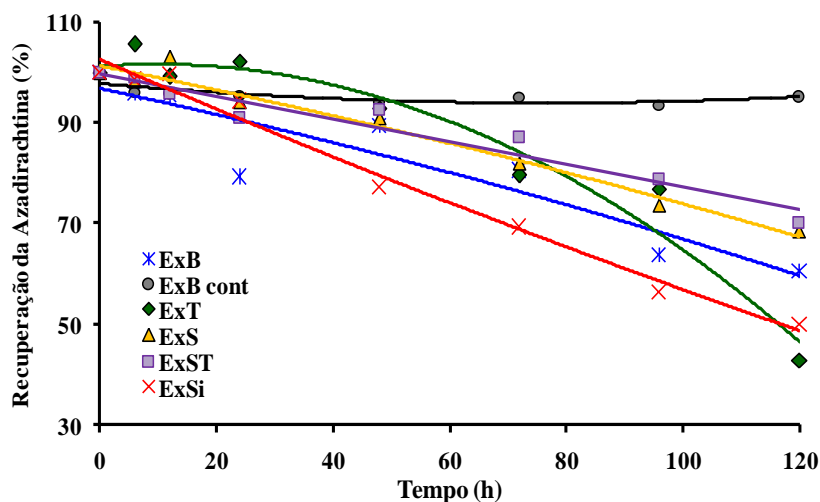


FIGURA 4.16 - Curvas de recuperação de azadiractina presente no extrato bruto de nim. Legenda: EXB = extrato bruto; EXB cont = extrato bruto protegido da luz; ExT = extrato bruto com Tinogard[®]; ExS = extrato bruto com Styleze[®]; ExST = extrato bruto com Tinogard[®] e Styleze[®]; ExSi = extrato bruto com silicone.

Como apresentado na FIGURA 1.6 (seção 1.7), a curva de degradação da azadiractina decai em todos os extratos que foram expostos à radiação UV exceto o controle ExB (protegido da luz). Tanto o aditivo contra a radiação UV quanto os demais aditivos não tiveram efeito quando inserido no extrato bruto em relação ao controle (escuro). O extrato bruto na presença do protetor térmico Styleze[®] e o protetor UV Tinogard[®] juntos e apenas com a presença do Styleze[®]

(ExST e ExS) apresentou uma degradação inferior as demais amostras. Em dados relativos comparados ao extrato bruto não protegido, estes protetores apresentaram uma proteção 49 e 18%, respectivamente (FIGURA 4.16).

Por outro lado, pode ser observado na FIGURA 4.17 que nas amostras contendo os protetores térmicos, silicone e Tinogard® (ExSi e ExT), os mesmos prejudicaram a estabilidade da azadiractina. O uso destes aditivos possibilitou apenas uma recuperação de azadiractina de 64 e 67 %, respectivamente, em relação ao extrato bruto não protegido.

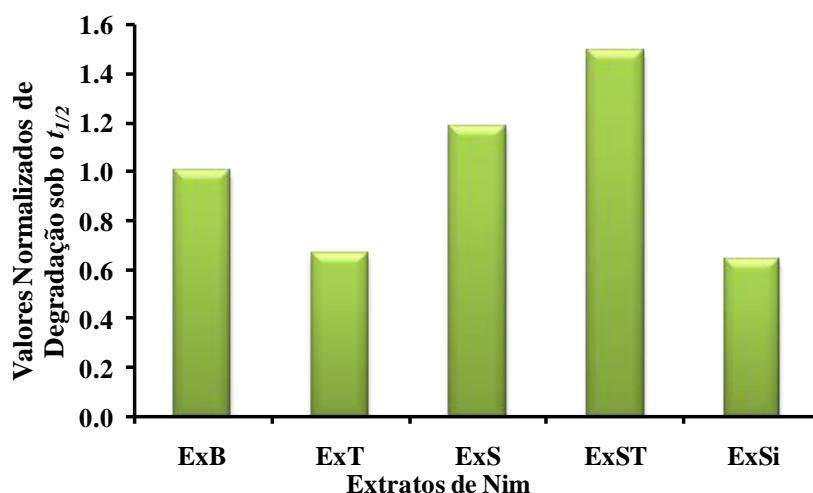


FIGURA 4.17 - Valores normalizados de degradação sob o $t_{1/2}$ das amostras dos extratos de nim com os aditivos.

A recuperação da degradação da azadiractina presente nas formulações utilizando as diferentes ligninas como envoltório foi comparado com a degradação do extrato bruto de nim. Observamos um ganho de estabilidade da

azadiractina formulada utilizando as ligninas. Este ganho de estabilidade foi independente do tipo de lignina utilizada. Neste caso, as Lig 3, Lig 3 oxi, Lig 3_Ac e a Lig 4 se mostraram eficientes, tanto para estabilizar a azadiractina quanto como suporte de aplicação (FIGURA 4.18). Neste experimento não houve diferença significativa entre as formulações. No entanto, foi possível observar grande diferença na recuperação da azadiractina quando comparado com o extrato bruto de nim não protegido da luz (ExB), sendo superior à 43 % (na média) após 120 h (FIGURA 4.19). As formulações comprovam a eficiência de proteção contra a degradação da azadiractina molécula que é extremamente sensível à presença de radiação solar.

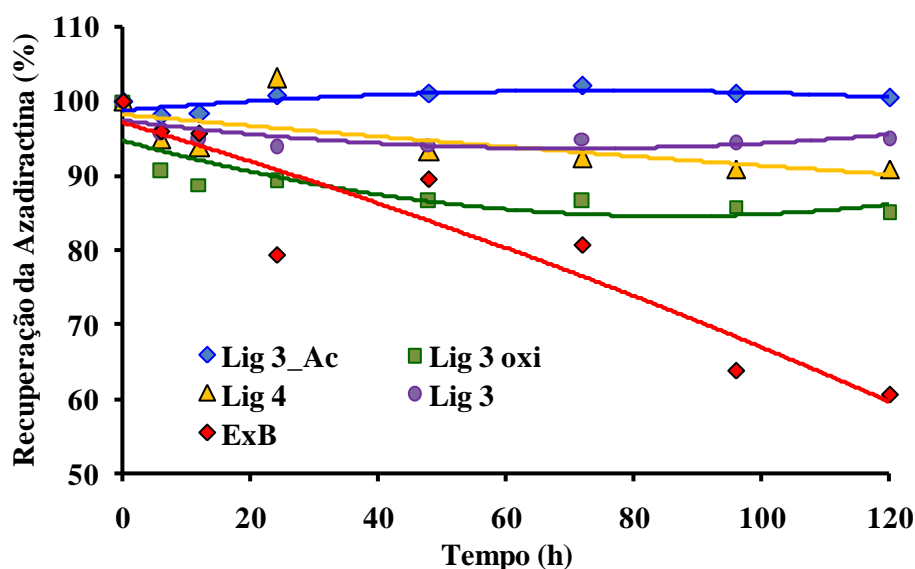


FIGURA 4.18 - Curvas de degradação de azadiractina presentes nas formulações da partição acetato de etila do nim utilizando diferentes ligninas.

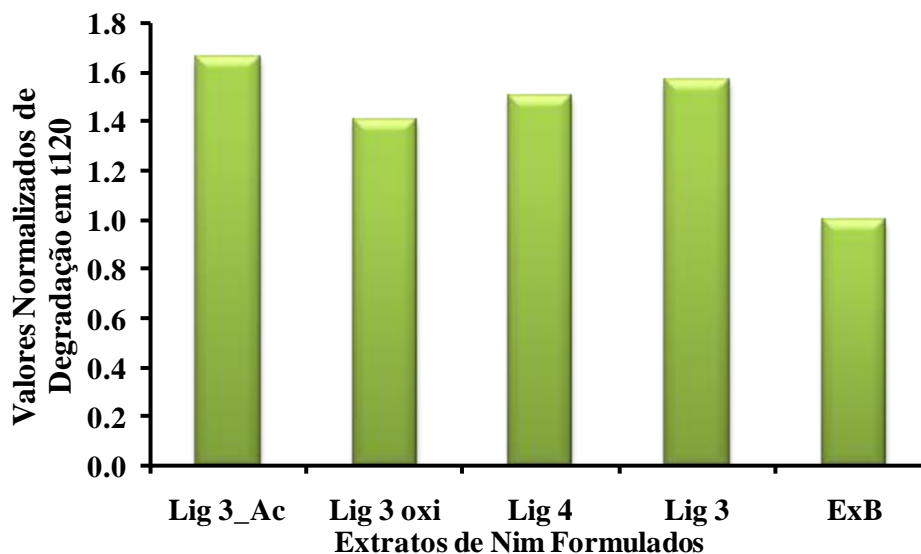


FIGURA 4.19 - Valores normalizados de degradação da azadiractina sob o $t_{1/2}$ das formulações utilizando as diferentes ligninas como envoltório.

A Lig 3 foi escolhida para a verificação dos efeitos dos aditivos quando formulados juntamente com a partição acetato de etila de nim. É possível observar na FIGURA 4.20 que os aditivos não promoveram nenhuma proteção extra ao marcador azadiractina quando comparados com a formulação de lignina sem aditivos. Neste experimento, ficou evidente que a lignina é o principal aditivo para proteger a azadiractina.

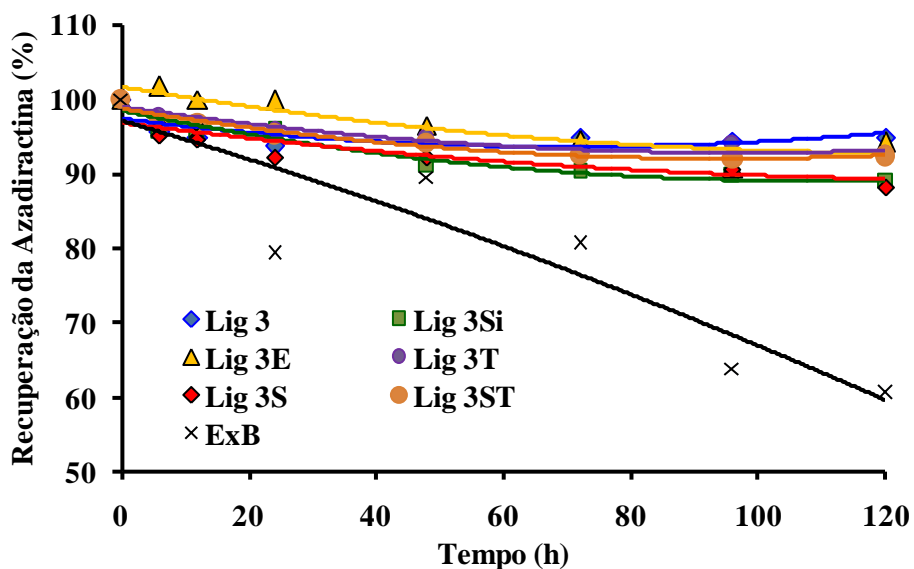


FIGURA 4.20 - Comparação da formulação utilizando a Lig 3 com as formulações com aditivos. Legenda: Lig 3 = lignina extraída pelo processo alcalino; Lig 3E = lignina com EDTA; Lig 3S = lignina com Styleze®; Lig 3Si = lignina com silicone; Lig 3T = lignina com Tinogard®; Lig 3ST = lignina com Styleze® e Tinogard®; EXB = Extrato bruto de nim.

Assim foi possível afirmar que não há a necessidade do uso de ativos para proteger a azadiractina da degradação por radiação solar, evitando assim, o uso de produtos que podem prejudicar o meio ambiente – especialmente leitos fluviais – e elevar o custo final do produto.

As ligninas apresentam boas características como envoltórias, auxiliando na conservação da atividade da azadiractina e que qualquer uma das ligninas utilizadas tem promovido a proteção necessária para a conservação da atividade

da azadiractina por um longo período de tempo. O teste de degradação por radiação utilizando a lâmpada UV como fonte de emissão da energia, responsável pelo envelhecimento acelerado das amostras estudadas, é comprovadamente eficiente na reprodução das condições do envelhecimento natural. De acordo com estudos realizados no Departamento de Engenharia de Materiais/Universidade Federal de São Carlos, a correlação estimada nestas condições de envelhecimento acelerado, em relação ao envelhecimento natural, é de 7,3 vezes, este fator de aceleração significa que 1.200 h de envelhecimento correspondem aproximadamente a 1 ano de envelhecimento natural. Assim, o experimento realizado em 120 h corresponde aproximadamente 1 mês de campo.

4.5.2 - Degradação térmica

O teste de degradação por temperatura apresentou resultados semelhantes ao teste de degradação por UV. Durante o período de 24 h e temperatura de 60 °C, alíquotas foram retiradas para acompanhar o processo de degradação das formulações de nim e o extrato bruto foi exposto ao mesmo ambiente para servir de controle de degradação. Uma amostra de extrato bruto foi mantida em condições específicas sob proteção da radiação UV-visível e temperatura de 25 °C para efeito de comparação (FIGURA 4.21).

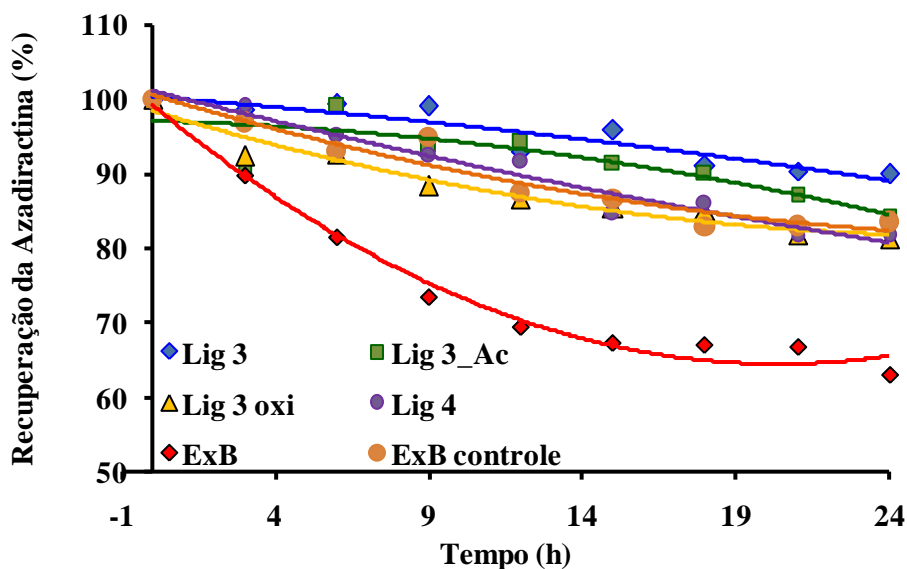


FIGURA 4.21 - Curvas de degradação por temperatura de azadiractina presente nas formulações da partição acetato de etila do nim utilizando diferentes ligninas.

Forim e colaboradores (2009) observaram que mesmo sob condições ideais de armazenamento (temperatura e umidade), a azadiractina sofre processos de degradação em função do tempo. Como pode ser observado na FIGURA 4.21, o extrato armazenado sob a proteção da luz e temperatura ambiente de 25°C apresentou uma degradação de 16,5% (m/m) em um período de 24 h. A formulação utilizando a Lig 3 gerou uma maior proteção, sofrendo uma degradação média de apenas 10% (m/m). As formulações em geral tiveram uma degradação de 10 a 15% (m/m), mostrando um ótimo resultado quando comparado com o extrato bruto de nim que teve nesse período de tempo 37% (m/m) da azadiractina degradada.

Com base nos resultados atuais, as ligninas mais promissoras foram as ligninas 3 e 4. A Lig 4 apresentou um menor tempo e maior facilidade de obtenção, menor consumo de reagentes e maiores rendimentos que as demais.

Outra característica que tem chamado a atenção da formulação preparado com a Lig 3 obtido através do processo de polpação alcalino é sua morfologia. Este formato de cavidades, como pode ser visto pelas imagens de MEV (FIGURA 4.22b). Estas cavidades permitem a inclusão de moléculas melhorando características de proteção, vetorização, liberação, umidade, etc.

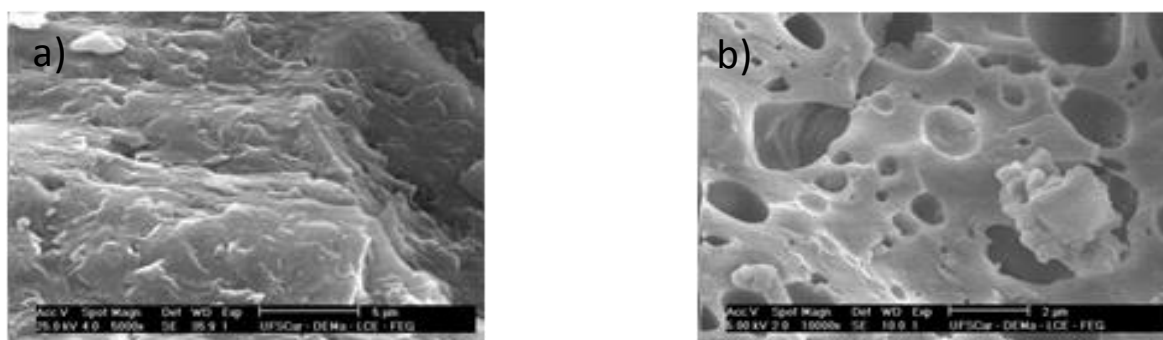


FIGURA 4.22 – Imagens de MEV das ligninas: (a) Lig 4 e (b) Lig 3, nas escalas de 5 e 3 μm , respectivamente.

4.6 - Ensaio biológicos

Os ensaios biológicos visaram certificar se a atividade inseticida já conhecida do nim se manteria após sofrer o processo de microencapsulamento utilizando a lignina como polímero. Foram escolhidos quatro insetos pragas, *Spodoptera frugiperda*, *Diabrotica speciosa*, *Diatraea saccharalis* e *Anticarsia*

gemmatalis, por suas conhecidas ações maléficas em diversos cultivos, principalmente milho e cana-de-açúcar (BARROS et al., 2010; TIGANOMILANI et al., 1995; EDUARDO et al., 2013; ZHANG et al., 2004; FALCO e SILVA-FILHO, 2003; ARCAS et al., 1999; FERREIRA et al., 2014)

4.6.1 - *Spodoptera frugiperda*

Foram testadas as formulações com as quatro ligninas (Lig 3, Lig 3 oxi, Lig 3_Ac e a Lig 4). A concentração do teor de azadiractina conhecida, sendo as concentrações de 2,0 e 5,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, foi testada, mantendo sempre o controle de qualidade.

As ligninas utilizadas como polímeros também foram testadas para verificar se as mesmas teriam alguma atividade frente à *S. frugiperda*. A massa de lignina pura utilizada para os ensaios foi de 1,2 g de lignina para cada 300,0 g de dieta artificial. A massa de 1,2 g de lignina foi utilizada para o ensaio, pois para que o teor de azadiractina presente na dieta artificial fosse de 2 μg , a massa de 1,2 g de formulação contendo o extrato vegetal de nim, óleo comercial de nim, a lignina e os demais componentes da formulação para preparar a formulação foi utilizado. A quantidade de lignina pura utilizada foi muito superior quando comparado com à lignina presente na formulação, no entanto, essa massa foi escolhida para que a massa inserida na dieta, tanto da formulação quanto da lignina pura fossem iguais. Para a concentração de 5 μg de azadiractina, a massa de 3,0 g de formulação foi inserida na dieta artificial. O

extrato bruto de nim na concentração de 2,0 e 5,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de azadiractina foi testada como controle. Os resultados deste ensaio são apresentados a seguir (TABELA 4.5).

TABELA 4.5 - Médias da duração de fase larval, fase pupal e massa pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com formulações de nim utilizando lignina como polímero.

Tratamento (μg de azadiractina)	Duração da fase larval (dias) (\pm EP) ¹	Duração da fase pupal (dias) (\pm EP) ¹	Massa pupal (mg) (\pm EP) ¹
Lig 3 (5)	26,9 \pm 9,75 cd	0	0
Lig 3 (2)	31,1 \pm 5,81 c	0	0
Lig 3 pura	13,2 \pm 2,86 d	9,65 \pm 1,38 a	92,6 \pm 54,1 a
Lig 3_Ac (5)	26,5 \pm 11,39 c	0	0
Lig 3_Ac (2)	29,3 \pm 8,69 c	0	0
Lig 3_Ac pura	34,1 \pm 8,77 bc	9,00 \pm 2,09 a	67,3 \pm 19,8 b
Lig 3 oxi (5)	28,9 \pm 8,24 cd	0	0
Lig 3 oxi (2)	33,4 \pm 10,0 c	0	0
Lig 3 oxi pura	16,1 \pm 5,33 d	8,95 \pm 1,56 a	127,8 \pm 31,4 a
Lig 4 (5)	28,9 \pm 10,2 cd	0	0
Lig 4 (2)	30,70 \pm 7,657 c	0	0
Lig 4 pura	15,27 \pm 3,027 d	8,13 \pm 1,217 a	156,58 \pm 37,526 a
ExB (5)	33,6 \pm 8,56 c	0	0
ExB (2)	39,4 \pm 12,6 bc	0	0
Controle	12,6 \pm 3,67 d	9,80 \pm 1,29 a	139,3 \pm 40,2 a

100 mg/kg, Temp.: 25 \pm 1°C; UR: 70 \pm 5% e fotofase: 12h.

Como observado na tabela 4.6, as ligninas puras utilizadas para o processo de encapsulamento do extrato bruto de nim não apresentaram atividade, pois os indivíduos que se alimentaram da dieta com as ligninas puras

chegaram à fase adulta como no grupo controle, podendo assim afirmar que o polímero natural não exerce nenhuma atividade sobre a *S. frugiperda*.

A alimentação das larvas com a dieta artificial contendo o extrato bruto de nim sem a proteção que o microencapsulamento apresentou atividade assim como as formulações utilizando as ligninas como polímeros, no entanto, o ensaio foi mantido sobre temperatura controlada de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e como confirmado no teste de degradação fotodiquímica e térmica (vide seção 4.5.1 e 4.5.2), o extrato bruto se mostra muito sensível aos dois fenômenos, sendo que, quando este se encontra encapsulado por lignina, a degradação do principal principio ativo, a azadiractina, decai visivelmente.

Todas as formulações tiveram mortalidade de 100% e pode-se observar um prolongamento no tempo larval quando comparado ao controle de água. As larvas permaneceram vivas por aproximadamente 15 dias a mais que o controle, no entanto, não foi observada alimentação da dieta nesse período, acarretando assim, baixo desenvolvimento da fase larval (FIGURA 4.23a).



FIGURA 4.23 - Imagens das larvas de *S. frugiperda*: a) larvas mortas após ingerir a dieta com as formulações de nim e; b) lagarta com 12 dias.

O aumento na duração da fase larval das formulações testadas não foram prejudiciais ao experimento, pois comprovou-se que as mesmas não se alimentavam, possivelmente devido ao efeito antialimentar atribuídas aos terpenóides presentes no extrato e que foram enriquecidos com a particionamento do extrato bruto de nim (MOSSINI e KEMMELMEIER, 2005; MIKAMI e VENTURA, 2008). Dimensionando esses dados para o campo, o retardamento no ciclo biológico das lagartas devido a falta de alimentação, irá desestruturar sua procriação e proliferação e não irá prejudicar o ecossistema como ocorre com os inseticidas sintéticos com seus efeitos ‘*knock-down*’ (SODERLUND e KNIPPLE, 2003)

4.6.2 - *Diabrotica speciosa*

As formulações de nim com conhecida concentração de azadiractina foram fornecidas ao Professor Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior do Departamento

de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal – SP para serem ensaiadas contra a praga de solo *D. speciosa*. Foram testadas as quatro formulações de nim na concentração de 3,0 µg de azadiractina em cada formulação.

A TABELA 4.6 apresenta os resultados referentes aos efeitos das diferentes formulações de nim sobre indivíduos de *D. speciosa*. Não foi possível fazer análise estatística, pois se observou mortalidade total dos indivíduos que foram tratados com as formulações. O tratamento com fipronil, no qual não houve presença de larvas e pupas vivas, porém, este tratamento não diferiu dos tratamentos com a dosagem de 3,0 µg de azadiractina das formulações de nim.

Verificou-se que houve emergência de insetos apenas na testemunha. Consequentemente, somente no tratamento testemunha foi registrado valores de período larva-adulta, peso de adultos, razão sexual e longevidade, sendo estes: 23,89 dias, 10,51 mg, 0,47 e 5,26 dias, respectivamente.

TABELA 4.6 - Mortalidade dos indivíduos de *D. speciosa* submetidos à aplicação das formulações de nim utilizando diferentes ligninas como polímero.

Tratamentos	Insetos emergidos	Sobrevivência (%)
Lig 3	0	0
Lig 3_Ac	0	0
Lig 3oxi	0	0
Lig 4	0	0
Extrato Bruto nim	0	0
Fipronil	0	0
Controle	17,00 ± 2,76	56,67 ± 9,20

Dados insuficientes para realização da análise estatística.

Os resultados encontrados no presente estudo evidenciam a eficácia das formulações utilizando os extratos vegetais sobre a mortalidade da *D. speciosa*, alcançando resultados semelhantes ao inseticida fipronil, sob condições controladas de laboratório.

4.5.3 - *Diatraea saccharalis*

Em busca de verificar se as formulações do extrato de nim teriam atividade contra a *D. saccharalis*, os ensaios biológicos foram desenvolvidos em nosso laboratório e os insetos foram cedidos pela Usina Bonfim-Guariba/SP (grupo Raízen) com 0,5cm de comprimento e 2º instar. Foram desenvolvidos dois experimentos distintos. No primeiro foi utilizado dieta artificial e as

formulações foram testadas nas concentrações de 2,0 e 5,0 μg azadiractina e no segundo experimento as formulações na concentração de 5,0 μg azadiractina, foram dispersas na superfície de um pedaço de cana-de-açúcar, sendo os insetos exposto à essa alimentação.

No primeiro experimento, utilizando a dieta artificial, foi possível observar mortalidade total dos insetos alimentados com a dieta composta pela formulação usando a Lig 3_Ac, tanto na concentração de 2,0 μg , quanto na de 5,0 μg de azadiractina. No entanto, as outras formulações utilizando as demais ligninas tiveram eficácia total em apenas 12 dias, nas duas concentrações testadas. O extrato bruto apresentou uma mortalidade mais lenta quando comparada às formulações (FIGURA 4.24). As lagartas pertencentes ao controle alcançaram a fase adulta.

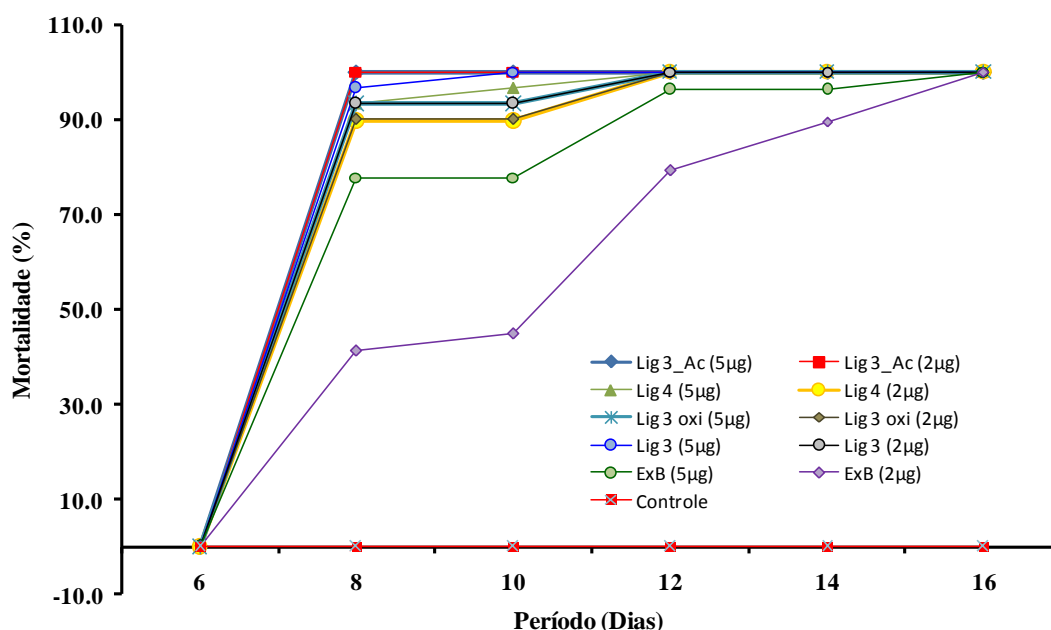


FIGURA 4.24 - Curva de mortalidade da *D. saccharalis* alimentadas com as formulações de nim.

Com esse experimento é possível afirmar que o extrato de nim apresenta atividade superior ao extrato sem proteção, possivelmente devido a baixa degradação da azadiractina durante os primeiros dias de contato do indivíduo com os princípios ativos. Observou-se o pequeno crescimento dos indivíduos que se alimentaram da dieta artificial com a presença dos princípios ativos e nos indivíduos que se alimentaram apenas da dieta, apresentaram desenvolvimento normal (FIGURA 4.25).



FIGURA 4.25 - Larvas de *D. saccharalis*: a) Indivíduos alimentado com formulação de nim na dieta; b) indivíduo controle.

No segundo experimento, onde os insetos foram alimentados com pedaços de cana-de-açúcar com a presença das formulações, foi possível observar uma longevidade maior no seu ciclo biológico. O grupo controle se alimentando apenas com a cana-de-açúcar não completou seu ciclo em 60 dias, possivelmente por interferência dos fungos proveniente dos pedaços de cana-de-açúcar, no entanto, não ocorreu a morte de nenhum indivíduo.

As lagartas alimentadas com o extrato bruto de nim (ExB) apresentaram baixa mortalidade nos primeiros 15 dias do experimento, onde no mesmo período se observava grande atividade das formulações. Após 25 dias, apenas 20% dos insetos apresentaram mortalidade, por outro lado, as formulações apresentaram mortalidade total no intervalo de 23 dias (FIGURA 4.26).

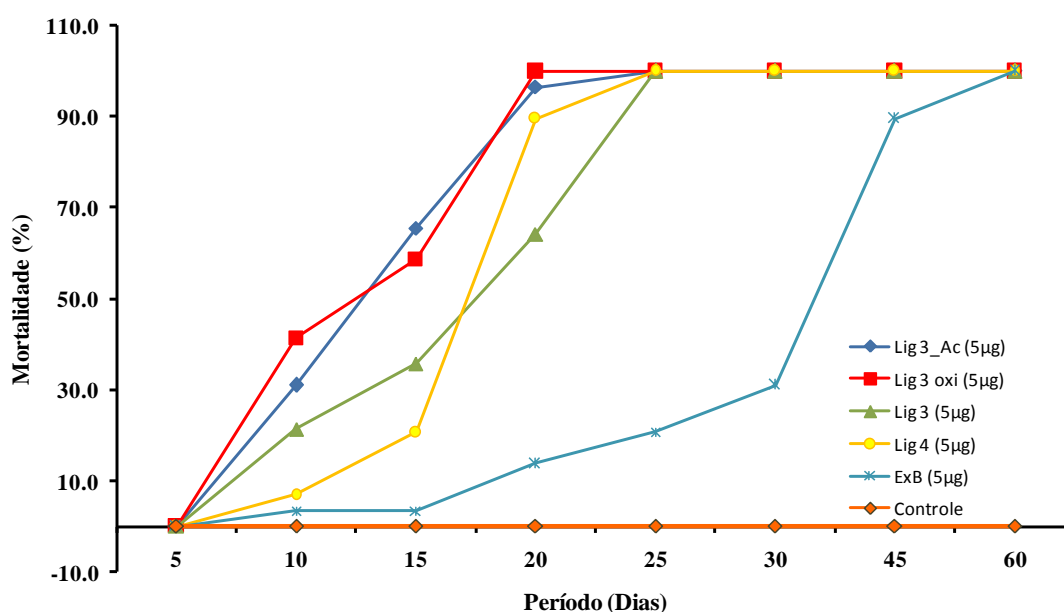


FIGURA 4.26 - Curva de mortalidade da *D. saccharalis* alimentada com cana-de-açúcar e as formulações de nim.

A FIGURA 4.27 mostra a diferença de desenvolvimento dos insetos que se alimentaram com o pedaço de cana-de-açúcar com as formulações e os insetos que se alimentaram apenas da cana-de-açúcar. Os insetos da FIGURA 4.27a apresentaram coloração escura devido a sua mortalidade e tamanho 3 vezes menores que os insetos usados como controle.



FIGURA 4.27 - Indivíduos de *D. saccharalis* alimentados com pedaços de cana-de-açúcar: a) alimentados com a cana-de-açúcar e formulação; b) alimentados apenas com cana-de-açúcar.

4.6.4 - *Anticarsia gemmatalis*

Os ensaios contra a *A. gemmatalis* foram desenvolvidos no Laboratório de Entomologia Agrícola da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Oeste Paulista – Presidente Prudente/SP, coordenados pela professora Dra Vânia Maria Ramos. As lagartas foram inoculadas à dieta no 1º instar. Nesse experimento utilizou-se apenas as formulações utilizando a Lignina 3 e 4, com a concentração de 3,0 µg de azadiractina. As lagartas apresentaram alta sensibilidade ao produto, assim, avaliou-se a atividade da lignina pura, para confirmar se havia influência do polímero para essa espécie (FIGURA 4.28).

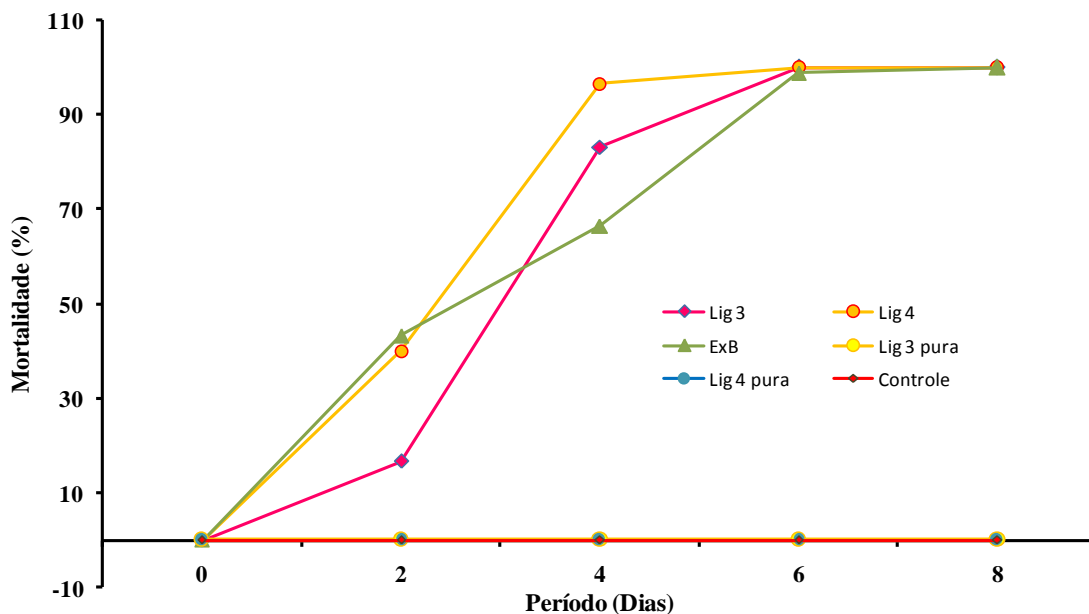


FIGURA 4.28 - Curva de mortalidade da espécie *A. gemmatalis*.

As lagartas alimentadas com as ligninas puras e o controle (apenas dieta artificial) não apresentaram mortalidade, alcançando assim, os indivíduos a vida adulta. A formulação utilizando a Lig 4 apresentou uma mortalidade mais acentuada nos primeiros dias, no entanto, tanto ela, quanto a formulação utilizando a Lig 3 e o extrato bruto sem proteção apresentaram mortalidade de 100% em 6 dias de avaliação. Na FIGURA 4.29 é possível observar efeito das formulações sobre a lagarta.

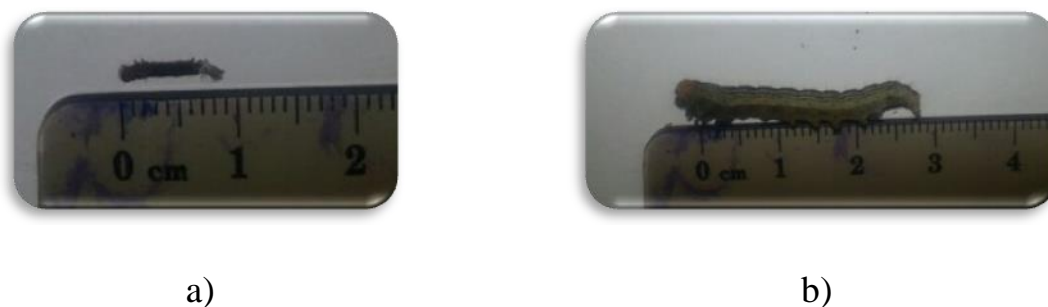


FIGURA 4.29- Lagartas de *A. gemmatalis*: a) lagarta alimentada com dieta artificial e formulações; b) lagarta alimentada apenas com a dieta artificial.

Em trabalho desenvolvido por Jakoby (2008), o potencial inseticida do óleo de nim foi avaliado contra a *A. gemmatalis* através do consumo foliar pulverizada com o óleo em três concentrações (0,5; 1,5 e 2,5%). Verificou-se que o óleo de nim reduziu o consumo foliar, provocou deformações nos insetos e causou índice de mortalidade superior a 98% nas duas maiores concentrações e observou-se que os efeitos provocados nas lagartas de *A. gemmatalis* foram mais evidentes, quanto menor o intervalo entre a aplicação e o início da alimentação das lagartas (JAKOBY, 2008).

Os resultados obtidos com as formulações de nim foram significativas, principalmente pelo pouco tempo de dias que observou-se a mortalidade total. A *A. gemmatalis* se mostrou altamente sensível à alimentação com a presença do nim.

5 – CONCLUSÃO

O método escolhido para a extração de ligninas, a polpação alcalina, se mostrou uma técnica rápida, fácil e mais limpa ambientalmente, além de reprodutível. A oxidação utilizando o H_2O_2 foi escolhida primeiramente por sua característica ambientalmente correta, pois este não gera resíduo, no entanto, este método foi muito brando para produzir a hidrólise na macromolécula da lignina. Porém, o mesmo ocasionou mudanças morfológicas na estrutura da lignina e a acetilação das ligninas teve como intuito obter amostras de ligninas mais solúveis, tornando maiores às possibilidades de caracterização.

As ligninas extraídas pelo reator apresentaram rendimento superior à lignina obtida por autoclave e as mesmas foram produzidas para verificar se haveria diferenças físicas e químicas com o aumento da temperatura. Através da análise quimiometria de RMN de 1H , observou-se que não havia diferenças químicas, assim, foram as ligninas obtidas por autoclave as escolhidas para a continuidade do trabalho.

O desenvolvimento de metodologia de preparação das micropartículas do extrato vegetal de nim foi eficaz, pois as micropartículas apresentaram proteção ao extrato vegetal. Os estudos de estabilidade, promovidos na câmara de degradação (UVA-UVC) e de temperatura, monitorados pelo conteúdo de

azadiractina via CLAE-UV, comprovaram a eficiência do uso de ligninas na proteção da azadiractina quando utilizadas como envoltório.

Os ensaios biológicos sobre a *S. frugiperda*, *D. speciosa*, *D. saccharalis* e *A. gemmatalis* corroboraram com os dados de proteção gerado pelo uso da lignina como envoltório do extrato vegetal.

Foi possível concluir que entre as ligninas utilizadas, que a lignina obtida diretamente (método direto) do licor preto (Lig 4) foi a mais promissora apresentando menor tempo de obtenção, menor custo e maior rendimento. Adicionalmente, foi observado que os aditivos de proteção ultravioleta e térmicos inseridos nas formulações não tiveram efeitos mediante o teste de degradação à radiação UV da azadiractina.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASZADEH, S.; SHARIFZADEH, A.; SHOKRI, H.; KHOSRAVI, A. R. & ABBASZADEH, A. “Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi”. *J. Mycol. Med.*, **24** (2), 51–56, 2014.
- ABBOTT, W. S. “A method of computing the effectiveness of insecticide”. *J. Econ. Entomol.*, **18** (2), 265-267, 1925.
- AHMAD, N.; ANSARI, M. S. & HASAN, F. “Effects of neem based insecticides on *Plutella xylostella* (Linn.)”. *Crop. Prot.*, **34**, 18-24, 2012.
- ALESSIO, P.; CAVALHERI, A. S.; PASQUINI, D.; CURVELO, A. A. S. & CONSTANTINO, C. J. L. “Fabricação de filmes ultrafinos de ligninas de bagaço de cana-de-açúcar via evaporação térmica a vácuo”. *Rev. Bras. Aplic. Vac.*, **27** (4), 169-174, 2008.
- ALVAREZ, M.; CALLE, A.; TAMAYO, J.; LECHUGA, L. M.; ABAD, A. & MONTOYA, A. “Development of nanomechanical biosensors for detection of the pesticide DDT”. *Biosens. Bioelectron.*, **18**, 649- 653, 2003.
- ARCAS, J. A.; DÍAZ, B. M. & LECUONA, R. E. “Bioinsecticidal activity of conidia and dry mycelium preparations of two isolates of *Beauveria bassiana* against the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*”. *J. Biotechnol.*, **67** (2–3), 151-158, 1999.
- ARTHUR, F. H. “Residual efficacy of cyfluthrin emulsifiable concentrate and wettable powder formulations on porous concrete and on concrete sealed with commercial products prior to insecticide application”. *J. Stored. Prod. Res.*, **30** (1), 79-86, 1994.
- AKHTAR, Y. & ISMAN, M. B. “Comparative growth inhibitory and antifeedant effects of plant extracts and pure allelochemicals on four phytophagous insect species”. *J. Appl. Ent.*, **128**, 32-38, 2004a.

- AKHTAR, Y. & ISMAN, M. B. “Generalization of a habituated feeding deterrent response to unrelated antifeedants following prolonged exposure in a generalist herbivore, *Trichoplusia ni*”. J. Chem. Ecol., **30**, 1333-1346, 2004b.
- ASLANI, P. & KENNEDY, R.A. “Studies on diffusion in alginate gels. I. Effect of cross-linking with calcium or zinc ions on diffusion of acetaminophen”. J. Control. Release., **42**, 75- 82, 1996.
- ÁVILA, C. J. & PARRA, J. R. P. “Desenvolvimento de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em diferentes hospedeiros”. Cienc. Rural, Santa Maria, **32**, 739-743, 2002.
- BANOUB, J. H. “Structural elucidation of the wheat straw lignin polymer by atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry”. J. Mass Spectrom., **38**, 900–903, 2003.
- BARICHELLO, J. M.; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K. & NAGAI, T. “Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method”. Drug Dev. Ind. Pharm., **25**, 471- 476, 1999.
- BARROS, E. M.; TORRES, J. B. & BUENO, A. F. “Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica”. Neotrop. Entomol., **39** (6), 996-1001, 2010.
- BARREK, S.; PAISSE, O. & GRENIER-LOUSTALOT, M-F. “Analysis of neem oils by LC-MS and degradation kinetics of azadirachtin-A in a controlled environment. Characterization of degradation products by HPLC-MS-MS”. Anal. Bioanal. Chem., **378** (3), 753-763, 2004.
- BAYERBACH, R.; NGUYEN, V. D.; SCHURR, U. & MEIER, D. “Characterization of the waterinsoluble fraction from fast pyrolysis liquids (pyrolytic lignin) - Part III. Molar mass characteristics by SEC, MALDI-

- TOF-MS, LDI-TOF-MS, and Py-FIMS”. J. Anal. Appl. Pyrol., **77**, 95-101, 2006.
- BEALL, F. C. & EICKNER, H. W. “Thermal degradation of wood components: A review of the literature”. Research Paper, 1-29, 1970.
- BENAR, P. “Ligninas acetosolv e formacell de eucalipto e de bagaço de cana: isolamento, fracionamento, caracterização e uso como componente de resinas fenólicas do tipo resol”. Tese de doutorado apresentado na Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas/SP, 1996.
- BENAR, P.; GONÇALVES, A. R.; MANDELLI, D. & SCHUCHARDT, U. F. “Eucalyptus organosolv lignins: study of the hydroxymethylation and use in resols”. Bioresource Technol., **68**, 11-16, 1999.
- BILBA, K. & OUENSANGA, A. “Fourier transform infraed spectroscopic study of thermal degradation of sugar cane bagasse”. J. Anal. App. Pyrol., **38**, 61-73, 1996.
- BOCANEGRA, R.; GAONKAR, A. G.; BARRERO, A.; LOSCERTALES, I. G.; PECHACK, D. & MARQUEZ, M. “Production of cocoa butter microcapsules using an electrospray process”. J. Food. Sci., **70**, 492–497, 2005.
- BOEHM, A. L.; MARTINON, I.; ZERROUK, R.; RUMP, E. & FESSI, H. “Nanoprecipitation technique for the encapsulation of agrochemical active ingredients”. J. Microencapsul., **20**, 433–441, 2003.
- BOEKE, S. J.; BOERSMA, M. G.; ALINK, G. M.; VAN LOON, J. J. A.; VAN HUIS, A.; DICKE, M. & RIETJENS, I. M. C. M. “Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides”. J. Ethnopharmacol., **94**, 25–41, 2004.
- BOTELHO, P. S. M.; PARRA, J. R. P.; MAGRINI, E. A.; HADDAD, M. L. & RESENDE, L. C. M. “Efeito do número de liberações de *Trichogramma*

- galloi* (Zucchi, 1988) no parasitismo de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794)". *Sci. Agric.*, **52** (1), 65-69, 1995.
- BOTELHO, P. S. M.; SILVEIRA NETO, S. & MAGRINI, E. A. "Fator chave para *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (*Lepidoptera: Noctuidae*) em cultura de soja, para o estado de São Paulo". *Sci. Agric.*, **56** (4), 867-873, 1999.
- BRINGHENTIL, L.; CABELLO, C. & URBANO, L. H. "Fermentação alcoólica de substrato amiláceo hidrolisado enriquecido com melão de cana". *Ciênc. Agrotec.*, **31** (2), 429-432, 2007.
- BURANOV, A. U. & MAZZA, G. "Lignin in straw of herbaceous crops". *Ind. Crop. Prod.*, **28**, 237-259, 2008.
- CARVALHO, S. M. & FERREIRA, D. T. "Santa Bárbara contra vaquinha". *Cien. Hoje, São Paulo*, **11**, 65-67, 1990.
- CALICETI, P.; SALMASO, S.; ELVASSORE, N. & BERTUCCO, A. "Effective protein release from PEG/PLA nanoparticles produced by compressed gas anti-solvent precipitation techniques". *J. Control. Release*, **94**, 195-205, 2004.
- CAÑETE, C. L. & FOERSTER, L. A. "Incidência natural e biologia de *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner, 1983 (Hymenoptera, Trichogrammatidae) em ovos de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (*Lepidoptera, Noctuidae*)". *Rev. Bras. Entomol.*, **47** (2), 201-204, 2003.
- CAPANEMA, E. A.; BALAKSHIN, M. Y. & KADLA, J. F. "A comprehensive approach for quantitative lignin characterization by NMR spectroscopy". *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 1850-1860, 2004.
- CAPALBO, D. M. F.; MORAES, I. O.; ARRUDA, R. O. M. & MORAES, R. O. "Aplicação da engenharia a processos biotecnológicos: O caso dos biopesticidas". *Cobenge*, 34-38, 2001.
- CARSON, R.; *Silent spring*. Mariner Books – Houghton Mifflin Company, 2002.

- CASANOVA, H.; ARAQUE, P. & ORTIZ, C. “Nicotine carboxylate insecticide emulsions: Effect of the fatty acid chain length”. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 9949-9953, 2005.
- CASTIGLIONI, E. A. & VENDRAMIM, J. D. “Desenvolvimento da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner) em cultivares de soja com diferentes densidades larvais de criação”. *Sci. Agric.*; **53** (1), 146-151, 1996.
- CHARLETON, D. S.; KFIR, R.; DICKE, M. & Vet, L. E. M. “Impact of botanical pesticides derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on the biology of two parasitoid species of the diamondback moth” *Biol. Control.*, **33**, 131-142, 2005.
- CHENG, J.; BOLYARD, M. G.; SAXENA, R. C. & STICKLEN, M. B. “Production of insect resistant potato by genetic transformation with a 5-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*”. *Plant Sci.*, **81**, 83-91, 1992.
- CHOI, W. I.; LEE, S. G.; PARK, H. M. & AHN, Y. J. “Toxicity of plant essential oils to *Tetranychus urticae* (Acari:Tetranychidae) and *Phytoseiulus persimilis* (Acari:Phytoseiidae)”. *J. Econ. Entomol.*, **97**, 553-558, 2004.
- CIACH, T. “Microencapsulation of drugs by electro-hydro-dynamic atomization”. *Int. J. Pharm.*, **324**, 51–55, 2006.
- COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS – Guia Prático de Produtos Fitossanitários para uso agrícola. 7 ed. Andrei, 2005.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira : cana-de-açúcar, segundo levantamento. Brasília, 1-19, 2013.
- COOMBES, A. G. A.; TASKER, S.; LINDBLAD, M.; HOLMGREN, J.; HOSTE, K.; TONCHEVA, V.; SCHACHT, E.; DAVIES, M. C.; ILLUM, L. & DAVIS, S. S. “Biodegradable polymeric microparticles for drug delivery and vaccine formulation: the surfade attachment of hydrophilic

- species using the concept of poly (ethyleneglycol) anchoring segments” *Biomaterials*, **18**, 1153-1161, 1997.
- CORDEIRO, G. C.; TOLEDO FILHO, R. D.; TAVARES, L. M. & FAIRBAIRN, E. M. R. “Ultrafine grinding of sugar cane bagasse ash for application as pozzolanic admixture in concrete”. *Cem. Concr. Res.*, **39**, 110–115, 2009.
- CORREIA, A. A.; WANDERLEY-TEIXEIRA. V.; TEIXEIRA, A. A. C.; DE OLIVEIRA, J. V. & TORRES, J. B. “Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera:Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com nim”. *Neotrop. Entomol.*, **38** (1), 83-91, 2009.
- COTRIM, A. R.; FERRAZ, A.; GONQALVES, A. R.; SILVA, F. T. & BRUNS, R. E. “Identifying the origin of lignins and monitoring their structural changes by means of FTIR-PCA and –SIMCA”. *Bioresource Technol.*, **68**, 29-34, 1999.
- COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P. & VAUTHIER, C. “Nanocapsule technology: a review”. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **9**, 99-134, 2002.
- COX, S. “Information technology: the global key to precision agriculture and sustainability”. *Comp. Elect. Agric.*, **36**, 93- 111, 2002.
- CRUZ, I. & MONTEIRO, M. A. R. “Controle biológico da lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma Pretiosum*”. Comunicado técnico. Ministério da agricultura pecuária e abastecimento. *Embrapa*, 1-4, 2004.
- CURVELO, A. A. D. S. Processo de deslignificação organossolve. Tese (Livre Docência) - Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.
- CURVELO, A. A. S.; DE GROOTE, R. A. M. C.; BALOGH, D. T.; MONTANARI, S. & BOTARO, V. R. “Seletividade em processos

- organosolv de deslignificação”. In: *I Congresso Latino-Americano de Deslignificação*, Vitória, 67-71, 1994.
- DA COSTA, J. T.; FORIM, M. R.; COSTA, E. S.; DE SOUZA, J. R.; MONDEGO, J. M. & BOIÇA JUNIOR, A. L. “Effects of different formulations of neem oil-based products on control *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (Coleoptera:Bruchidae) on beans”. *J. Stored Prod. Res.*, **56**, 49-53, 2014.
- DALY, H.; DOYEN, J. T. & PURCELL, A. H. “Introduction to insect biology and diversity, 2nd ed., Oxford University Press: New York, Chapter 14, 279-300, 1998.
- DAVIN, L. B. & LEWIS, N. G. “Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis”. *Plant Physiol.*, **123**, 453-462, 2000.
- DAVIN, L. B. & LEWIS, N. G. “Lignin primary structures and dirigent sites”. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **16**, 407–415, 2005.
- DELANEY, J.; CLARKE, E.; HUGHES, D. & Rice, M. “Modern agrochemical research: a missed opportunity for drug discovery?” *Drug Discov. Today*, **11**, 839-845, 2006.
- DEWICK, P. M. “Medicinal natural products: A biosynthetic approach”. 3^a Ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009.
- DHAR, R.; ZHANG, K.; TALWAR, G. P.; GARG, S. & KUMAR, N. “Inhibition of the growth and development of asexual and sexual stages of drug-sensitive and resistant strains of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by Neem (*Azadirachta indica*) fractions”. *J. Ethnopharmacol.*, **61**, 31–39, 1998.
- DINARDO-MIRANDA, L. L.; FRACASSO, J. V. & PERECIN, D. “Variabilidade espacial de populações de *Diatraea saccharalis* em canaviais e sugestão de método de amostragem”. *Bragantia*, Campinas, **70** (3), 577-585, 2011.

- DOHERTY, W. O. S.; MOUSAVIOUN, P. & FELLOWS, C. M. “Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers”. *Ind. Crops Prod.*, **33**, 259–276, 2011.
- DONALDSON, L. A. “Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view”. *Phytochemistry*, **57**, 859-873, 2001.
- DONG, X.; ZHONG, G.; HU, M.; YI, X.; ZHAO, H. & WANG, H. “Molecular cloning and functional identification of an insect odorant receptor gene in *Spodoptera litura* (F.) for the botanical insecticide rhodojaponin III”. *J. Insect Physiol.*, **59**, 26-32, 2013.
- DOS SANTOS, F. & CURVELO, A. A. S. “Utilização de ligninas em resinas fenólicas. Preparação de novolacas a partir de lignossulfonatos”. *Polímeros*, **9** (1), 49-58, 1999.
- EDUARDO, W. I. ; BOICA JUNIOR, A. L.; RIBEIRO, Z. A. ; COSTA, E. N. & MORAES, R. F. O. “Effect on injury and fecal droppings on the feeding behavior of *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae), on common bean”. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.*, **56**, 101-102, 2013.
- EISSA, F. I.; ZIDAN, N. EL-H. A.; HASHEM, M. Y. & AHMED, S. S. “Insecticidal efficacy of certain bio-insecticides, diatomaceous earth and modified atmospheres against *Rhyzopertha dominica*(F.) (Coleoptera: Bostrichidae) on stored wheat”. *J. Stored Prod. Res.*, **57**, 30-35, 2014.
- FALCO, M. C. & SILVA-FILHO, M. C. “Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*”. *Plant. Physiol. Biochem.*, **41** (8), 761-766, 2003.
- FARIA, M. R. & WRAIGHT, S. P. “Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types”. *Bio. Control.*, **43**, 237–256, 2007.

- FARINELLI, R. & FORNASIERI FILHO, D. “Avaliação de dano de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em cultivares de milho”. *Científica*, Jaboticabal, **34** (2), 197-202, 2006.
- FENGEL, D. & WEGENER, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: W. de Gruyter, 613, 1984.
- FERREIRA, B. C.; MELO, F. L.; SOUZA, M. L.; MOSCARDI, F.; BÁO, S. N. & RIBEIRO, B. M. “High genetic stability of peroral infection factors from *anticrosia gemmatalis* MNPV over 20 years of sampling”. *J. Invertebr. Pathol.*, **118**, 66-70, 2014.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-P.; AMMOURY, N. & BENITA, S. “Nanocapsule formation by interfacial deposition following solvent displacement”. *Int. J. Pharm.*, **55**, R1- R4, 1989.
- FIRMINO, A.; ABREU, H. S.; PORTUGAL. A. C. P.; NASCIMENTO, A. M.; SOUZA, E. L.; PEREIRA, R. P. W.; MONTEIRO, M. B. O. & MAÊDA, J. M. “Alterações ligno-anatômicas em *Solanum gilo* Raddi por aplicação de cálcio e boro como estratégia de defesa”. *Ciênc. Agrotec.*, **30** (3), 394-401, 2006.
- FORIM, M. R. Estudo fitoquímico do enxerto de *Azadirachta indica* sobre *Melia azedarach*: Quantificação de substâncias inseticidas. Tese de doutorado apresentado ao programa de pós-graduação em química orgânica na Universidade Federal de São Carlos, 1996.
- FORIM, M. R.; Relatório 03 encaminhado a Fapesp em 10 de agosto 2009 – Processo no. 05/60040-0, 2009.
- FORIM, M. R.; MATOS, A. P.; SILVA, M. F. G. F.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. & FERNANDES, J. B. “Uso de CLAE no controle de qualidade em produtos comerciais de nim: Reprodutibilidade da ação inseticida. *Quím. Nova*, **33**, 1082-1087, 2010a.
- FORIM, M. R.; DA SILVA, M. F. G. F.; CASS, Q. B.; FERNANDES, J. B. & VIEIRA, P. C. “Simultaneous quantification of azadirachtin and 3-

- tigloylazadirachtol in Brazilian seeds and oil of *Azadirachta indica*: application to quality control and marketing”. *Anal Methods*, **2**, 860, 2010b.
- FÖRSTER, P. & MOSER, G. “Status report on global Neem usage”. *Deutsche Gesellschaft (GTZ) GmbH*. Eschborn: 2000.
- FUKUSHIMA, R. S.; GARIPPO, G.; HABITANTE, A. M. Q. B. & LACERDA, R. S. “Extração da lignina e emprego da mesma em curvas de calibração para a mensuração da lignina em produtos vegetais”. *Rev. Bras. Zootec.*, **29** (5), 1302-1311, 2000.
- FUKUSHIMA, R. S. & HATFIELD, R. D. “Espectros de duas formas de lignin obtidos por ressonância magnética nuclear”. *Pesq. Agropec. Bras.*, **38** (4), 505-511, 2003.
- FUZETO, A. P.; Determinação do teor de lignina em amostras vegetais através de três métodos analíticos e correlação com digestibilidade *in vitro*. Dissertação de mestrado em ciências apresentado ao programa de pós-graduação em nutrição animal na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2003.
- GALINDO-RODRIGUEZ, S.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H. & DOELKER, E. “Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods”. *Pharm. Res.*, **21**, 1428-1439, 2004.
- GAMBARATO, B. C. Estabelecimento e validação de modelos de oxidação de ligninas. Dissertação de mestrado em ciências apresentado ao programa de pós-graduação em biotecnologia industrial na Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2010.
- GANACHAUD, F. & KATZ, J. L. “Nanoparticles and nanocapsules created using the ouzo effect: Spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices”. *Chem. Phys. Chem.*, **6**, 209-216, 2005.

- GARCIA-DIEGO, C. & CUELLAR, J. “Synthesis of macroporous poly (styrene-co-divinylbenzene) microparticles using n-heptane as the porogen: quantitative effects of the DVB concentration and the monomeric fraction on their structural characteristics”. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **44**, 8237–8247, 2005.
- GARCIA-DIEGO, C. & CUELLAR, J. “Design of polymeric microparticles with improved structural properties: Influence of ethylstyrene monomer and of high proportions of crosslinker”. *Eur. Polym. J.*, **44**, 1487–1500, 2008.
- GHAFFAR, S. H. & FAN, M. “Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw”. *Biomass Bioener.*, **57**, 264-279, 2013.
- GIOLO, F. P.; GRÜTZMACHER, A. D.; GARCIA, M. S. & BUSATO, G. R. “Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lep.: Noctuidae) oriundas de diferentes localidades e hospedeiros”. *Rev. Bras. Agrociên.*, **8** (3), 219-224, 2002.
- GOBBO-NETO, L. & LOPES, N. P. “Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários”. *Quim. Nova*, **30**, 374-381, 2007.
- GREENE, L. C.; MEYERS, P. A.; SPRINGER, J. T. & BANKS, P. A. “Biological evaluation of pesticides released from temperature-responsive microcapsules”. *J. Agr. Food Chem.*, **40**, 2274-2270, 1992.
- GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C. & DICKERSON, W. A. “Velvetbean caterpillar: a rearing produce and artificial medium”. *J. Econ. Entomol.*, College Park, **69** (4), 487-488, 1976.
- GRUPO ETC (Action Group on Erosion Technology and Concentration). Tradução: Pedrozo, J. F.; Borghetti, F.; Nanotecnologia: os riscos da tecnologia do futuro. Porto Alegre: L&PM, 2005.
- GUERRA, A.; GASPAR, A. R.; CONTRERAS, S.; LUCIA, L. A.; CRESTINI, C. & ARGYROPOULOS, D. S. “On the propensity of lignin to associate:

- A size exclusion chromatography study with lignin derivatives isolated from different plant species”. *Phytochemistry*, **68**, 2570–2583, 2007.
- HANIFAH, A. L.; AWANG, S. H.; MING, H. T.; ABIDIN, S. Z. & OMAR, M. H. “Acaricidal activity of *Cymbopogon citratus* and *Azadirachta indica* against house dust mites”. *Asian Pac. J. Trop Biomed.*, **1** (5) 365-369, 2011.
- HATFIELD, R. & VERMERRIS, W. “Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity”. *Plant Physiol.*, **126**, 1351–1357, 2001.
- HENSLEY, S. D. & HAMMOND, A. H. “Laboratory techniques for rearing the sugar cane borer on an artificial diet”. *J. Econom. Entomol.*, **61** (6), 1742-1743, 1968.
- HOAREAU, W.; TRINDADE, W. G.; SIEGMUND, B.; CASTELLAN, A. & FROLLINI, E. “Sugar cane bagasse and curaua lignins oxidized by chlorine dioxide and reacted with furfuryl alcohol: characterization and stability”. *Polym. Degrad. Stab.*, **86**, 567-576, 2004.
- KASTEN, P. JR.; PRECETTI, A. A. C. M. & PARRA, J. R. P. “Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural”. *Rev. Agric.*, **53**, 68-78, 1978.
- KEDIA, A.; PRAKASH, B.; MISHRA, P. K.; CHANOTIYA, C. S. & DUBEY, N. K. “Antifungal, antiaflatoxic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil”. *Int. Biodeter. Biodegr.*, **89**, 29-36, 2004.
- KNOWLES, A. “Recent development of safer formulations of agrochemicals”. *Environmentalist*, **28**, 35-44, 2008.
- IBRAHIM, H.; BINDSCHAEDLER, C.; DOELKER, E.; BURI, P. & GURNY, R. “Aqueous nanodispersions prepared by a salting-out process”. *Int. J. Pharm.*, **87**, 239-246, 1992.
- ISMAN, M. B. Tropical forests as sources of natural insecticides. Chapter Six, 145-161, 2005.

- ISMAN, M. B. “Pesticides based on plant essential oils”. *Pestic Outlook.*, **10**, 68-72, 1999.
- ISMAN, M. B. “Neem and other botanical insecticides: barriers to commercialization”. *Phytoparasitica*, **25**, 339-334, 1997.
- JAKOBY, G. L.; Avaliação do óleo de nim, compostos homeopáticos e biológicos sobre *Anticarsia gemmatalis* e *Epinotia aporema* em soja e em *Trichogramma pretiosum*. Dissertação de mestrado em agronomia apresentada ao programa de pós-graduação em produção vegetal na Universidade Estadual de Santa Catarina, 2008.
- LIMA NETO, S. A. & PETROVICK, P. R. “A celulose na farmácia”. *Cad. Farm.*, **13** (1), 19-23, 1997.
- LINS, C. & SAAVEDRA, R. “Sustentabilidade corporativa no setor sucroalcooleiro brasileiro”. Fundação brasileira para o desenvolvimento sustentável, 8-18, 2007.
- LIU, Q.; WANG, S. R.; ZHEN, Y.; LUO, Z. Y. & CEN, K. F. “Mechanism study of wood lignin pyrolysis by using TG-FTIR analysis”. *J. Anal. Appl. Pyrol.*, **82**, 170–177, 2008.
- LUNA-FINKLER, C. L. & FINKLERB, L. “Production of concentrates of bacterial bio-insecticide *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* by flocculation/sedimentation”. *Acta Tropica*, **107**, 134-138, 2008.
- MACHADO, V. O. F.; FERREIRA, G. A.; ROSA, S. R. A.; GARCIA, A. H.; PINHEIRO, J. B. & VELOSO, V. R. C. “Aspectos biológicos de *Anticarsia gemmatalis* HÜEBNER (Lepidoptera: Noctuidae) em cultivares de soja (*Glycine max* MERRIL)”. *Pesq. Agrop. Trop.*, **29** (1), 39-41, 1999.
- MAGRINI, E. A.; BOTELHO, P. S. M. & SILVEIRA NETO, S. “Biologia de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura da soja”. *Sci. Agric.*, **56** (3), 547-555, 1999.
- MANCERA, A.; FIERRO, V.; PIZZI, A.; DUMARÇAY, S.; GÉRARDIN, P.; VELÁSQUEZ, J.; QUINTANA, G. & CELZARD, A. “Physicochemical

- characterisation of sugar cane bagasse lignin oxidized by hydrogen peroxide”. *Poly. Degrad. Stab.*, **95**, 470-476, 2010.
- MANN, J. *Secondary metabolism*. 2^a Ed. New York: Oxford University Press, 2005.
- MARQUES, G. B. C.; ÁVILA, C. J. & PARRA, J. R. P. “Danos causados por larvas e adultos de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) em milho”. *Pesq. Agropec. Bras.*, **34** (11), 1983-1986, 1999.
- MARTINEZ, S. S.; *O Nim – Azadirachta indica*. Natureza, Usos Múltiplos, Produção. Instituto Agronômico do Paraná. Londrina: IAPAR, 142, 2002.
- MATOS, A. P.; NEBO, L.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F. & RODRIGUES, R. R. *Quim. Nova*, **32**, 1553-1556, 2009.
- MATOS, A. P.; NEBO, L.; CALEGARI, E. R.; BATISTA-PEREIRA, L. G.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; FERREIRA-FILHO, P. & RODRIGUES, R. R. “Atividade biológica de extratos orgânicos de *Trichilia spp.* (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em dieta artificial”. *Bioassay*, **1**, 1-6, 2006
- MATTINEN, M-L.; SUORTTI, T.; GOSSELINK, R.; ARGYROPOULOS, D. S.; EVTUGUIM.D.; SUURNAKKI, A.; JONG, E. & TAMMINEN, T. “Polymerization of different lignins by laccase”. *BioResources*, **3** (2), 549-565, 2008.
- MAZIERO, P.; OLIVEIRA NETO, M.; MACHADO, D.; BATISTA, T.; CAVALHEIRO, C. C. S.; NEUMANN, M. G.; CRAIEVICH. A. F.; ROCHA, G. J. M.; POLIKARPOV, I. & GONÇALVES, A. R. “Structural features of lignin obtained at different alkaline oxidation conditions from sugarcane bagasse”. *Ind. Crops Prod.*, **35**, 61– 69, 2012.
- MCDONOUGH, T. J. “The chemistry of organosolv delignification”. *Tappi J.*, **76**, 186-193, 1993.

- MENDONÇA, A. F. Guia das principais pragas da cana-de-açúcar. 3-48. In Mendonça, A. F.:(ed.). Pragas da cana-de-açúcar. Maceió-AL. Insetos & Cia. 239, 1996.
- METZGER, J. O.; BICKE, C.; FAIX, O.; TUSZYNSKI, W.; ANGERMANN, R.; KARAS, M. & STRUPAT, K. “Matrix-Assisted laser desorption mass spectrometry of lignins” Chem. Int. Ed. Engl., **31**, 762, 1992.
- MILLER, G. T. Living in the Environment. 12th ed., Wadsworth/Thomson Learning: Belmont, 2002.
- MIKAMI, A. Y. & VENTURA, M. U. “Repellent, antifeedant and insecticidal effects of neem oil on *Microtheca punctigera*”. Braz. Arch. Boil. Technol., **51** (6), 1121-1126, 2008.
- MOGUL, M. G.; AKIN, H.; HASIRCI, N.; TRANTOLO, D. J.; GRESSER, J. D. & WISE, D. L. “Controlled release of biologically active agents for purposes of agricultural crop management”. Resour. Conserv. Recy., **16**, 289-320, 1996.
- MORAIS, S. A. L. Contribuição ao estudo químico e espectroscópico da lignina de madeira moída do *Eucalyptus grandis*: isolamento, quantificação e análise estrutural. Programa de pós graduação em Química Orgânica da Universidade Federal de Minas Gerais, 1992. Tese de Doutorado.
- MORDUE, A. J. & BLACKEWELL, A. “Azadirachtin: an update”. J. Insect Physiol., **39** (11), 903-924, 1993.
- MORGAN, E. D. “Azadirachtin, a scientific gold mine”. Bioorgan. Med. Chem., **17**, 4096- 4105, 2009.
- MOSCARDI, F. & SOUZA, M. L. “Baculovírus para o controle de pragas: panacéia ou realidade?” Biotecnol. Ciên. Desenvol., **24**, 22-29, 2002.
- MOSSINI, S. A. G. & EMMELMEIER, C. “A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos”. Acta Farm. Bonaerense, **24** (1), 139-48, 2005.

- MURALI, P. M. Process of preparing purified azadirachtin in powder form from *neem* seeds and storage stable aqueous composition containing azadirachtin. U.S.Pat.No. 6,193,974, 2001.
- NAIR, S.; VARGHESE, S. H.; NAIR, B. G.; MAEKAMA, T.; YOSHIDA, Y. & KUMAR, D. S. “Nanoparticles material delivery to plants”. *Plant Sci.*, **179**, 154-163, 2010.
- NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. & GALLO, D. *Entomologia Agrícola*. Piracicaba: *FEALQ*, 10, 920, 2002.
- NETZSCH – Derivados de celulose, visualizado no dia 29/05/2014 em: <http://www.netzsch-grinding.com/pt/industrias-aplicacoes/celulose-polpa/derivados-de-celulose.html#>
- OLIVEIRA-SILVA, J. J.; ALVES, S. R.; MEYER, A.; PEREZ, F.; SARCINELLI, P. N.; MATTOS, R. C. O. C. & MOREIRA, J. C. “Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil”. *Rev. Saud. Pub.*, **35** (2), 130-135, 2001.
- OUNAS, A.; ABOULKAS, A.; EL HARFI, K.; BACAOUI, A. & YAACOUBI, A. “Pyrolysis of olive residue and sugar cane bagasse: Non-isothermal thermogravimetric kinetic analysis”. *Bioresource Technol.*, **102**, 11234–11238, 2011.
- PAN, B.; LIANG, D.; ZHANG, Y.; WANG, H. & WANG, M. “Comparative efficacy of oil solution and wettable powder of lambda-cyhalothrin to naturally occurring *Ornithonyssus sylviarum* infestation of chickens”. *Vet. Parasitol.*, **164**, 353-356, 2009.
- PANAGIOTAKOPULU, E.; BUCKLAND, P. C.; DAY, P. M.; SARPAKI, A. A. & DOUMAS, C. “Natural insecticides and insect repellents in antiquity: a review of the evidence”. *J. Archaeol. Sci.*, **22**, 705-710, 1995.

- PANNEERSELVAM, C.; MURUGAN, C.; KOVENDAN, C.; KUMAR, P. M. & SUBRAMANIAM, J. “Mosquito larvicidal and pupicidal activity of *Euphorbia hirta* Linn. (Family: Euphorbiaceae) and *Bacillus sphaericus* against *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae)”. Asian Pac. J. Trop. Med., **6** (2), 102-109, 2003
- PASQUALI, C. E. L. & HERRERA, H. “Pyrolysis of lignin and IR analysis of residues”. Thermochim. Acta, **293**, 39-46, 1997.
- PASQUINI, D.; PIMENTA, M. T. B.; FERREIRA, L. H. & CURVELO, A. A. S. “Extraction of lignin from sugar cane bagasse and *Pinus taeda* wood chips using ethanol–water mixtures and carbon dioxide at high pressures”. J. Supercrit. Fluids, **36** (1), 31-39, 2005.
- PATIL, G.V. “Biopolymer albumin for diagnosis and in drug delivery”. Drug Dev. Res., **58**, 219-247, 2003.
- PAULUS, G. Do padrão moderno a agricultura alternativa: possibilidades de transição. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1999.
- PAUL, D. R. & ROBESON, L. M. “Polymer nanotechnology: Nanocomposites”. Polymer., **49**, 3187–3204, 2008.
- PEDLOWSKI, M. A.; CANELA, M. C.; TERRA, M. A. C. & DE FARIA, R. M. R. “Modes of pesticides utilization by Brazilian smallholders and their implications for human health and the environment”. Crop. Prot., **31**, 113-118, 2012.
- PEREIRA NETO, J. T.; On the treatment of municipal refuse and sewage sludge using aerated static pile composting—A low cost technology approach. University of Leeds, Inglaterra, 839-845, 1987.
- PÉREZ-PERTEJO, Y.; REGUERA, R. M.; ORDÓÑEZ, D. & BALAÑA-FOUCE, R. “Alterations in the glutathione-redox balance induced by the bio-insecticide Spinosad in CHO-K1 and Vero cells”. Ecotox. Environ. Safe, **70**, 251-258, 2008.

- PERISSOTTO, D. & RAMOS, L. P. “Estudo das ligninas de polpas kraft e kraft MCC obtidas pelo método de Bjorkman e por acidolise com dioxano:HCl”. *Congreso iberoamericano de investigación em celulosa y papel*, 2002.
- PERLATTI, B.; BERGO, P. L. S.; DA SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B. & FORIM, M. R. “Polymeric nanoparticle-based insecticides: A controlled release purpose for agrochemicals. Insecticides-Development of safer and more effective technologies. 1^{ed.}:*InTech*, 523-550, 2013.
- PERRIN, R. M. “Crop protection: taking stock for the new millennium”. *Crop. Prot.*, **16**, 449-456, 1997.
- PIERZYNSKI, G. M.; SIMS, J. T. & VANCE, G. F. “Soils and environmental quality”. Boca Raton. Lewis Publishers, 313, 1994.
- PILÓ-VELOSO, D.; NASCIMENTO, E. A. & MORAIS, S. A. L. “Isolamento e análise estrutural de ligninas”. *Quim. Nova*, **16** (5), 435-448, 1993.
- PINERA, P. & ÜNER, N. “Oxidative stress and apoptosis was induced by bio-insecticide spinosad in the liver of *Oreochromis niloticus*”. *Environ. Toxicol. Phar.*, **36**, 956-963, 2013.
- POLANCZYK, R. A.; Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, programa de Ciências, área de concentração entomologia, 2004.
- QIAN, C.; DECKER, E. A.; XIAO, H. & MCCLEMENTS, D. J. “Physical and chemical stability of β -carotene-enriched nanoemulsions: influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type”. *Food Chem.*, **132**, 1221-1229, 2012a.
- QIAN, C.; DECKER, E. A.; XIAO, H. & MCCLEMENTS, D. J. “Nanoemulsion delivery systems: influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility”. *Food Chem.*, **135**, 1440-1447, 2012b.
- QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLEMANN, E.; FESSI, H. & DOELKER, E. “Preparation techniques and mechanism of formation of biodegradable

- nanoparticles from preformed polymers”. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **24**, 1113-1128, 1998.
- RAMOS, L. P.; Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agroindustriais. Apresentado em: Seminário nacional sobre reuso/reciclagem de resíduos sólidos industriais, São Paulo, 28-31, 2000.
- ROSELL, G.; QUERO, C.; COLL, J. & GUERRERO, A. “Biorational insecticides in pest management”. *J. Pest. Sci.*, **33**, 103–121, 2008.
- ROUSIDOU, C.; PAPADOPOULOU, E. S.; KORTSINIDOU, M.; GIANNAKOU, I. O.; SINGH, B. Q.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. & KARPOUZAS, D. G. “Bio-pesticides: Harmful or harmless to ammonia oxidizing microorganisms? The case of a *Paecilomyces lilacinus*-based nematicide”. *Soil Biol. Biochem.*, **67**, 98-105, 2013.
- RUGGIERO, R.; MACHADO, A. E. H.; GARDRAT, C.; HOAREAU, W.; GRELIER, S.; SIEGMUND, B. & CASTELLAN, A. “Photodegradation of sugar cane bagasse acidolysis lignins”. *J. Photoch. Photobio A*, **173**, 150–155, 2005.
- RUZENE, D. S.; Obtenção de polpas de dissolução por processos organosolv a partir da palha ou do bagaço de cana-de-açúcar. Tese de doutorado da Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2005.
- SAIL, J. M.; EL-NAHHAL, Y. Z.; SOLIMAN, S. A. & EL-SEBAE, A. H. “Mutagenie and carcinogenic pesticides used in the agricultural environment of Gaza Strip”. *Sci. Total Environ.*, **132**, 371-380, 1993.
- SAITO, K.; KATO, T.; TSUJI, Y. & FUKUSHIMA, K. “Identifying the characteristic secondary ions of lignin polymer using ToF-SIMS”. *Biomacromolecules*, **6**, 678-683, 2005.
- SALIBA, E. O. S.; RODRIGUEZ, N. M.; MORAIS, S. A. L. & PILÓ-VELOSO, D. “Ligninas – Métodos de obtenção e caracterização química”. *Cien. Rural*, **31** (5), 917-928, 2001.

- SANDOVAL, S. S. & SENÔ, K. C. A. “Comportamento e controle da *Diatraea saccharalis* na cultura da cana-de-açúcar”. *Nucleus*, **7** (1), 243-258, 2010
- SANTOS, J. R. A.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R. & MARTÍN, C. “Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*”. *Quim. Nova*, **33** (4), 904-908, 2010.
- SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M. & REZENDE, S. T. “Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol”. *Quim. Nova*, **35** (5), 1004-1010, 2012.
- SARMENTO, R. A.; AGUIAR, R. W. S.; AGUIAR, R. A. S. S.; VIEIRA, S. M. J.; OLIVEIRA, H. G. & HOLTZ, A. M. “Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE) em milho no Brasil”. *Biosci. J.*, **18** (2), 41-48, 2002.
- SARKANEN, K.V. “Chemistry of solvent pulping”. *Tappi J.*, **73**, 215-219, 1990.
- SAVIO, G. M. “Controle biológico da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) por *Baculovirus anticarsia*”. *Rev. Cien. Elet. Agro.*, **13**, 1-7, 2008. Disponível em <http://faef.revista.inf.br>
- SILVEIRA, M. A. L. & MILAGRES, A. M. F. “Obtenção e caracterização de ligninas de madeiras”. VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2009.
- SINGH, R. P. “Determination of benomyl and its degradation products by chromatographic methods in water, wettable powder formulations, and crops”. *J. Chrom.*, **643**, 249-260, 1993.
- SHABBIR, A.; DISTASIO, S.; ZHAO, J.; CARDOZO, C. P.; WOLFF, M. S. & CAPLAN, A. J. “Differential effects of the organochlorine pesticide DDT and its metabolite *p,p'*-DDE on p-glycoprotein activity and expression”. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **203**, 91-98, 2005.

- SHEN, D.; HU, J.; XIAO, R.; ZHANG, H.; LI, S. & GU, S. “Online evolved gas analysis by Thermogravimetric-mass spectroscopy for thermal decomposition of biomass and its components under different atmospheres: Part I. Lignin”. *Bioresource Technol.*, **130**, 449–456, 2013.
- SODERLUND, D. M. & KNIPPLE, D. C. “The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides”. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **33**, 563-577, 2003.
- SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N. & PIETRO, R. C. L. R. “O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais”. *Braz. J. Pharm.*, **20** (3), 435-440, 2010.
- SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R. & RUDZINSKI, W. E. “Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices”. *J. Control. Release*, **70**, 1-20, 2001.
- SPADOTTO, C. A. “Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxico”. *Rev.Núcleo Pesq Interdisci.*, 1-9, 2006.
- STÜPP, J. J.; GONÇALVES, P. A. S. & BOFF, M. I. C. “Efeito da calda bordalesa e extrato de adultos de *Diabrotica speciosa* no manejo fitossanitário de feijoeiro cultivado sob o sistema orgânico”. *Rev. Cien. Agrovet.*, **11** (3), 222-229, 2012.
- SUCAHYOA, D.; VAN STRAALLENB, N. M.; KRAVEA, A. & VAN GESTELB, C. A. M. “Acute toxicity of pesticides to the tropical freshwater shrimp *Caridina laevis*”. *Ecotox. Environ. Safe*, **69**, 421–427, 2008.
- SUHAS, P. J. M. C. & CARROTT, M. M. L. R. “Lignin – from natural adsorbent to activated carbon: A review”. *Bioresource Technol.*, **98**, 2301–2312, 2007.
- SUN, J-X.; SUN, X-F.; SUN, R-C.; FOWLER, P. & BAIRD, M. S. “Inhomogeneities in the chemical structure of sugarcane bagasse lignin”. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 6719-6725, 2003.

- SZEWCZYK, B.; HOYOS-CARVAJAL, L.; PALUSZEK, M.; SKRZECZ, I. & LOBO DE SOUZA, M. “Baculoviruses – re-emerging biopesticides”. *Biotechn. Adv.*, **24**, 143–160, 2006.
- TEJADO, A.; PEÑA, C.; LABIDI, J.; ECHEVERRIA, J. M. & MONDRAGON, I. “Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol-formaldehyde resin synthesis”. *Bioresource Technol.*, **98** (8), 1655-1663, 2007.
- TEWA-TAGNE, P.; BRIANÇON, S. & FESSI, H. “Spray-dried microparticles containing polymeric anocapsules: Formulation aspects, liquid phase interactions and particles characteristics”. *Int. J. Pharm.*, **325**, 63–74, 2006.
- TICE, T. R. & GILLEY, R. M. “Preparation of injectable controlled-release microcapsules by solvent-evaporation process”. *J. Control. Release*, **2**, 343-352, 1985.
- TIGANOMILANI, M. S.; CARNEIRO, R. G.; DEFARIA, M. R.; FRAZAO, H. S. & MCCOY, C. W. “Isozyme characterization and pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* and *P. lilacinus* to *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) and *Meloidogyne javanica* (Nematoda: Tylenchidae)”. *Biol. Control*, **5** (3), 378-382, 1995.
- TOSCANO, L. C.; CALADO FILHO, G. C.; CARDOSO, A. M.; MARUYAMA, W. I. & TOMQUELSKI, G. V. “Impacto de inseticidas sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) e seus inimigos naturais em milho safrinha cultivado em Cassilândia e Chapadão do Sul, MS”. *Arq. Inst. Biol.*, **79** (2), 223-231, 2012.
- TRIANA, O.; LEONARD, M.; SAAVEDRA, F.; FERNÁNDEZ, N.; GÁLVEZ, G. & PEÑA, E. Atlas del bagazo de la caña de azúcar. México: GEPLACEA/PNUD/ICIDCA, 143, 1990.
- TSE, G.; BLANKSCHTEIN, D.; SHEFER, A. & SHEFER, S. “Thermodynamic prediction of active ingredient loading in polymeric microparticles”. *J. Control. Release*, **60**, 77–100, 1999.

- TSUJI, K. “Microencapsulation of pesticides and their improved handling safety”. *J. Microencapsul.*, **18**, 137–147, 2001.
- UCR-NE, Biopesticidas pesquisados na Embrapa são boas oportunidades de negócio para investidores privados, disponível em: <http://hotsites.sct.embrapa.br/proeta/author/genesio>
- VALKENBURG, W. VAN (ed.), *Pesticide formulations*. New York, Marcel Dekker, 1973.
- VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N. C.; SOUZA JR., M. B. & PEREIRA JR., N. “Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation”. *Appl. Bioch. Biotech.*, **141**, 136–140, 2007.
- VEIGA, M. M.; SILVA, D. M.; VEIGA, L. B. E. & FARIA, M. V. C. “Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil”. *Cad. Saúde Pub.*, **22** (11), 2391-2399, 2006.
- VENSKUTONIS, P. R. “Effect of drying on the volatile constituents of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.)” *Food Chem.*, **59** (2), 219-227, 1997.
- VENZON, M.; ROSADO, M. C.; FADINI, M. A. M.; CIOCIOLA JR, A. I. & PALLINI, A. “The potential of NeemAzal for the control of coffee leaf pests”. *Crop Prot.*, **24**, 213–219, 2005.
- VITAL, B. R.; ANDRADE, A. M.; VALENTE, O. F. & CAMPOS, J. C. C. Influência da casca no rendimento e na qualidade do carvão vegetal de *Eucalyptus grandis*. *IPEF*, 41/42, 44-49, 1989.
- XIE, Y.; YUAN, Z. & WANG, L. “Dynamic analysis of pest control model with population dispersalin two patches and impulsive effect”. *J. Comp. Sci.*, **5**, 685–695, 2014.
- ZACHRISSON, B & PARRA, J. T. P. “Capacidade de dispersão de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 para o controle de *Anticarsia*

- gemmatalis* Hübner, 1818 em soja”. *Sci. Agric.*, **55** (1), 133-137, 1998.
Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php>
- ZHANG, L.; LEONARD, B. R.; CHEN, M.; CLARK, T.; ANILKUMAR, K. & HUANG, F. “Fitness costs and stability of Cry1Ab resistance in sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (F.)”. *J. Invertebr. Pathol.*, **117**, 26-32, 2004.
- YULE, S. & SRINIVASAN, R. “Evaluation of bio-pesticides against legume pod borer, *Maruca vitrata* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae), in laboratory and field conditions in Thailand”. *J. Asia Pacific Entomol.*, **16**, 357-360, 2003.
- WANDSCHEER, C. B.; DUQUE, J. E.; DA SILVA, M. A. N.; FUKUYAMA, Y.; WOHLKE, J. L.; ADELMANN, J. & FONTANA, J. D. “Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*”. *Toxicon*, **44**, 829–835, 2004.
- WHEELER, D. A.; ISMAN, M. B.; SANCHEZ-VINDAS, P. & ARNASON, J. T. “Screening of Costa Rican *Trichilia* species for biological activity against the larvae of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)”. *Biochem. Syst. Ecol.*, **29**, 347-358, 2001.
- WHETTEN, R. W.; MACKAY, J. J. & SEDEROFF, R. R. “Recent advances in understanding lignin biosynthesis”. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **49**, 585–609, 1998.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION/UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. Agrochemicals: Health and environment linkages, disponível em:
<http://www.who.int/heli/risks/toxics/chemicals/en/index.html>