

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

**“ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS
VOLÁTEIS EM MATRIZES BIOPOLIMÉRICAS PARA O
CONTROLE DE INSETOS PRAGAS”**

Maria Clara Santana Aguiar*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRA EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador: Moacir Rossi Forim

***bolsista CNPq**

São Carlos - SP
2017

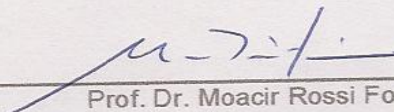


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

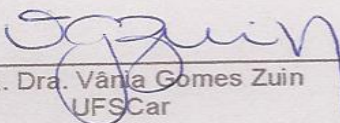
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

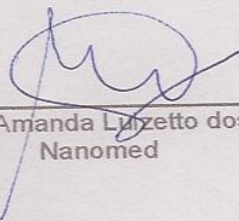
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Maria Clara Santana Aguiar, realizada em 06/07/2017:



Prof. Dr. Moacir Rossi Forim
UFSCar



Profa. Dra. Vânia Gomes Zuin
UFSCar



Profa. Dra. Amanda Luzetto dos Santos
Nanomed

“Há sempre, por trás de uma amostra, a figura humana do solicitante e a capacidade dele em buscar a melhor das soluções”.

Flávio Leite

As pessoas mais especiais
em minha vida...
meus pais e a minha irmã.
Nesta vida... o meu universo...

AGRADECIMENTOS

A todos que me ensinaram um encantamento inexplicável pela vida, atiçaram uma curiosidade inesgotável, o desejo de querer sentir o que o outro sente e a vontade de construir um futuro sereno e alegre. Tudo isso, de alguma forma, tem estimulado a minha jornada acadêmica e colaborou imensamente para a realização deste trabalho e o que fica... é o amor!

Em especial agradeço:

Aos meus pais, Fátima e Lúcio, e a minha irmã Maíra por me incentivarem com muito amor e por sempre terem acreditado e cuidado de mim.

Ao professor Moacir Rossi Forim, que generosamente me acolheu em seu grupo de pesquisa, me oferecendo a oportunidade de realização deste estudo e acreditando em mim, com sua orientação, atenção, confiança e paciência. Sempre disponível e disposto a ajudar, querendo que eu aproveitasse cada segundo dentro do mestrado para absorver algum tipo de conhecimento.

Aos colegas do laboratório de Produtos Naturais pela ajuda, paciência e agradável convívio nos últimos anos. Em especial aos meus queridos companheiros de pesquisa Bárbara (“Drama Queen”), Luis (“Golden Boy”), Luize (“LuiZola”) e Marília (“Mary”) pela rica convivência, amizade, confiança e pela paciência nos momentos de “sexta-feira”. Juntos formamos uma pequena grande equipe!

À amiga Ana Luisa que tem me protegido na imensidão deste mundo colocando os meus pés no chão.

Ao professor Edenir Rodrigues Pereira Filho por todo auxílio, paciência e disponibilidade no desenvolvimento dos experimentos utilizando planejamentos fatoriais.

Aos professores Pedro Sérgio Fadini e Vânia Gomes Zuin por comporem a banca de qualificação e contribuírem nesta etapa da pesquisa.

À Universidade Federal de São Carlos, ao Departamento de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela estrutura oferecida e oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de estudos.

À vida e à natureza, gratidão, compaixão, carinho e amor!

Namastê! Evoé!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CA	Coeficiente Angular
CG	Cromatografia Gasosa
COV	Compostos Orgânicos Voláteis
CV	Coeficiente de Variação
D	Desejabilidade Global
Di	Desejabilidade Individual
$di_{(EE)}$	Desejabilidade individual obtida a partir dos dados de eficiência de encapsulamento;
$di_{(RS)}$	Desejabilidade individual obtida a partir dos dados de rendimento sólido
DCE	Detector por Captura de Elétrons
DIC	Detector de Ionização em Chama
DL ₅₀	Toxicidade Letal aguda
EE	Eficiência de Encapsulamento
EM	Espectrometria de Massas
FDA	Food and Drug Administration
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IR	Índice de Retenção
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
m/z	Razão massa/carga
MEFS	Microextração em Fase Sólida
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
N.I.	Não identificado
PI	Padrão Interno
PTFE/SIL	Politetrafluoretileno/Silicone
R^2	Coeficiente de Regressão Linear

RS

Rendimento Sólido

t_R

Tempo de Retenção

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Biopesticidas obtidos de variadas fontes microbiológicas e materiais vegetais disponibilizados comercialmente.....	7
Tabela 1.2 - Toxicidade de diferentes óleos essenciais e defensivos tradicionais baseada na dose letal aguda.	11
Tabela 1.3 - Principais técnicas utilizadas para o microencapsulamento de óleos essenciais utilizando diferentes materiais de núcleo e de parede.	17
Tabela 3.1 - Variáveis otimizadas na extração do óleo essencial de <i>d</i> -limoneno por <i>headspace</i>	36
Tabela 3.2 - Níveis codificados das variáveis independentes empregadas na obtenção de micropartículas contendo óleo essencial de citros por secagem por atomização.....	43
Tabela 4.1 - Áreas relativas dos compostos voláteis de óleo essencial de laranja. ..	55
Tabela 4.2 - Eficiência de secagem e rendimento sólido obtidos para micropartículas contendo óleo essencial de citros encapsulado nos biopolímeros: nanofibra de lignina, lignina, maltodextrina, gelatina e carboximetilcelulose.....	64
Tabela 4.3 - Representação da matriz do planejamento fatorial com os níveis codificados e as respostas obtidas em função da eficiência de secagem e de encapsulamento.	66
Tabela 4.4 - Padrões de estimativa na escala de desejabilidade.....	68
Tabela 4.5 - Valores de desejabilidade individual e global obtidos ao se utilizar gelatina e lignina como material de parede.....	69
Tabela 4.6 - Equações da reta e relação entre os coeficientes lineares e angulares das curvas obtidas em extratos da matriz e em solvente (acetona).....	84
Tabela 4.7 - Concentrações de <i>d</i> -limoneno, razão do sinal do analito e do padrão interno, coeficientes de variação (CV) e exatidão para as curvas de calibração preparadas em acetona, gelatina e lignina.	87
Tabela 4.8 - Equações das retas e os respectivos coeficientes de correlação obtidos para as curvas preparadas em acetona, gelatina e lignina. Relação entre os coeficientes angulares das curvas.....	88

Tabela 4.9 -	LD, LQ, porcentagem de recuperação (%R) e coeficiente de variação (CV) obtidos após extração da amostra de gelatina e lignina, contendo <i>d</i> -limoneno em três concentrações diferentes.	89
Tabela 4.10 -	Equações das retas e os respectivos coeficientes de correlação (R^2) obtidos para as curvas preparadas em acetona, gelatina e lignina.	94
Tabela 4.11 -	Coeficientes de partição (K) para extração do <i>d</i> -limoneno por <i>headspace</i> utilizando diferentes solventes para solubilização.	95
Tabela 4.12 -	Coeficientes de partição (K) para extração do <i>d</i> -limoneno por <i>headspace</i> utilizando micropartículas de gelatina (8 e 14), lignina (5 e 10) e <i>d</i> -limoneno puro (não encapsulado) em pó. Sendo os experimentos 5 e 8 com menor teor de biopolímero e os experimentos 10 e 14 com maior teor de biopolímero em sua composição.	98
Tabela 4.13 -	Modelos matemáticos propostos para a cinética de liberação do óleo essencial encapsulado em formulações de gelatina e lignina em pó e do óleo essencial livre submetidas à 40°C.	99
Tabela 4.14 -	Constantes de velocidades e tempos de meia vida para formulações de gelatina, lignina e óleo essencial livre com cinética de ordem zero. ...	100
Tabela 4.15 -	Coeficientes de partição (K) para extração do <i>d</i> -limoneno por <i>headspace</i> utilizando micropartículas de gelatina (8 e 14), lignina (5 e 10) e <i>d</i> -limoneno puro (não encapsulado) em meio aquoso. Sendo os experimentos 5 e 8 com menor teor de biopolímero e os experimentos 10 e 14 com maior teor de biopolímero em sua composição.	103
Tabela 4.16 -	Modelos matemáticos propostos para a cinética de liberação do óleo essencial encapsulado em formulações de gelatina e lignina dispersas em meio aquoso e do óleo essencial livre submetidas à 40°C.	104
Tabela 4.17 -	Constantes de velocidades e tempos de meia vida para formulações em meio aquoso de gelatina, lignina e óleo essencial livre com cinética de ordem zero.	105
Tabela 4.18 -	Quantidade de pupas, médias da massa pupal, número de adultos e de ovos produzidos de insetos de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com formulação de óleo essencial de citros utilizando gelatina e lignina como biopolímeros.	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Ciclo de vida dos defensivos agrícolas no ambiente.	4
Figura 1.2 -	Estruturas químicas de alguns dos componentes encontrados nos óleos essenciais.	9
Figura 1.3 -	Representação da estrutura química do <i>d</i> -limoneno.	13
Figura 1.4 -	Representação das diferentes estruturas que compõem as micropartículas.....	15
Figura 1.5 -	Esquema representativo de possíveis modos de ação dos óleos essenciais encapsulados no interior de células do organismo alvo.	18
Figura 1.6 -	Representação do funcionamento de um <i>Spray Dryer</i> e suas principais etapas: (1) preparo da amostra, (2) atomização, (3) secagem e (4), (5) separação.	20
Figura 1.7 -	Representação da trajetória de uma partícula dentro da câmara de secagem relacionando-se temperatura e umidade da partícula em função do tempo de permanência na câmara.	21
Figura 1.8 -	Representação das ligações de hidrogênio (traços vermelhos) em (A) cadeias de gelatina e (B) entre cadeias de gelatina e a água. (Gly = resíduo de glicina; Pro = resíduo de prolina; Hyp = resíduo de hidroxiprolina).....	24
Figura 1.9 -	Representação das estruturas químicas dos álcoois cumarílico, coniferílico e sináptico.	25
Figura 1.10 -	As fases do ciclo de vida da <i>Spodoptera frugiperda</i>	26
Figura 1.11 -	Representação do movimento das moléculas voláteis em um <i>vial</i> fechado e submetido a aquecimento.	30
Figura 3.1 -	Representação de sistema de <i>headspace</i> estático (1) autoamostrador, (2) forno e processo de evaporação e equilíbrio que ocorre dentro do <i>vial</i> , (3) injetor e (4) coluna cromatográfica.....	37
Figura 3.2 -	Fluxograma dos processos de preparo de amostra e secagem em <i>Spray Dryer</i> para obtenção de micropartículas contendo óleo essencial de citros.	42

Figura 4.1 -	Comatograma de íons totais de compostos voláteis do óleo essencial de citros. Os números dos picos referem-se aos compostos da Tabela 4.1.	54
Figura 4.2 -	Representação do cromatograma da solução padrão de 10 e 2 mg L ⁻¹ do <i>d</i> -limoneno em acetona com: (A) temperatura do injetor de 170 e 220°C, (B) taxa de aquecimento de 5 e 15°C min ⁻¹ , (C) fluxo do gás de arraste de 1,00 e 1,40 mL min ⁻¹ e (D) vazão <i>split</i> 15:1 e 30:1.	57
Figura 4.3 -	Representação do (A) cromatograma da solução padrão de 1 mg L ⁻¹ do <i>d</i> -limoneno em acetona, (B) cromatograma da amostra de óleo essencial de laranja contendo <i>d</i> -limoneno ($t_R = 9,73$ min: <i>d</i> -limoneno, $t_R = 21,1$ min: padrão interno).	59
Figura 4.4 -	Variações na área do <i>d</i> -limoneno analisado por CG-DIC A) utilizando 0, 15, 30, 45 e 60 min. de extração por <i>headspace</i> e temperatura de 75°C e B) sem e com agitação (500 rpm) como homogeneização na extração por <i>headspace</i> á 75°C e 15 min de extração. As condições cromatográficas utilizadas podem ser encontradas no subitem 3.2.2. ...	62
Figura 4.5 -	Representação dos efeitos das variáveis investigadas sobre o encapsulamento do óleo essencial de citros utilizando gelatina (Figura 4.4 A) e lignina (Figura 4.4 B) como materiais de parede. Porcentagem de cada efeito das variáveis investigadas ao utilizar gelatina (Figura 4.4 C) e lignina (Figura 4.4 D) como materiais de parede. Sendo as variáveis avaliadas: A = temperatura do ar de secagem; B = vazão de alimentação; C = vazão do ar de secagem; D = vazão de injeção; E = concentração do polímero no solvente; F = relação polímero adjuvante; G = relação óleo essencial:polímero; H = surfactante.	71
Figura 4.6 -	Diferenças observadas na textura do pó obtido após a secagem em <i>Spray Dryer</i> . Sendo representadas as micropartículas de (A) gelatina, (B) gelatina e aerosil, (C) lignina e (D) lignina e aerosil.	72
Figura 4.7 -	Representação da influência do biopolímero utilizado (gelatina e lignina) nas respostas: rendimento sólido (A) e eficiência de encapsulamento (B). Os experimentos de 1 a 16 referem-se ao planejamento fatorial e estão descritos na Tabela 4.3.	74

Figura 4.8 - Porcentagem de recuperação do <i>d</i> -limoneno, considerando-se a quantidade inicial adicionada (mg) e a quantidade final recuperada ao final do processo de secagem em <i>Spray Dryer</i> . Os experimentos de 1 a 16 referem-se ao planejamento fatorial e estão descritos na Tabela 4.3.	76
Figura 4.9 - Representação das micrografias obtidas pela análise das micropartículas obtidas nos experimentos 2 (A), 8 (B), 10 (C),14 (D) e 15 (E) utilizando gelatina como biopolímero. Os experimentos de 2, 8, 10, 14 e 15 estão descritos na Tabela 4.3.	77
Figura 4.10 - Representação das micrografias obtidas pela análise das micropartículas obtidas nos experimentos 2 (A), 5 (B), 10 (C),14 (D) e 16 (E) utilizando lignina como biopolímero. Os experimentos de 2, 5, 10, 14 e 16 estão descritos na Tabela 4.3.	78
Figura 4.11 - Representação do cromatograma do extrato da matriz de (A) gelatina e (C) lignina isentas de <i>d</i> -limoneno e fortificadas com 1 mg L ⁻¹ de <i>d</i> -limoneno para (B) matriz de gelatina e (D) matriz de lignina ($t_R = 9,73$ min: <i>d</i> -limoneno, $t_R = 21,1$ min: padrão interno).	81
Figura 4.12 - Curvas analíticas preparadas em solvente puro (acetona) e em extratos da matriz sendo (A) matrizes acetona, gelatina e gelatina:aerosil e (B) acetona, matrizes lignina e lignina:aerosil.	83
Figura 4.13 - Representação da porcentagem de variação da resposta cromatográfica do <i>d</i> -limoneno em soluções padrão preparadas em extratos da matriz (gelatina, gelatina:aerosil, lignina e lignina:aerosil) em relação às preparadas em solvente puro (acetona).	85
Figura 4.14 - Curvas analíticas preparadas em solvente puro (acetona) (A) e em extratos da matriz sendo (B) gelatina e (C) lignina.	86
Figura 4.15 - Curvas analíticas preparadas em solvente puro, óleo mineral e em óleo essencial (<i>p</i> -cimeno) de <i>d</i> -limoneno e em amostras de gelatina (A) e lignina (B) como matrizes sólidas.	93
Figura 4.16 - Curvas do monitoramento da concentração de <i>d</i> -limoneno presente nas microcápsulas de gelatina (8 e 14) e de lignina (5 e 10) e do <i>d</i> -limoneno puro (não encapsulado) utilizando o produto formulado em pó	

submetido à 40°C. Sendo os experimentos 5 e 8 com menor teor de biopolímero e os experimentos 10 e 14 com maior teor de biopolímero em sua composição.97

Figura 4.17 - Curvas analíticas de *d*-limoneno em gelatina (A) e lignina (B) como matrizes dispersão em água. Equações das retas e os respectivos coeficientes de correlação (R^2) obtidos.101

Figura 4.18 - Curvas do monitoramento da concentração do *d*-limoneno presente nas microcápsulas obtidas no experimento (8 e 14) e de lignina (5 e 10) e do *d*-limoneno puro (não encapsulado) utilizando o produto formulado em solução. Sendo os experimentos 5 e 8 com menor teor de biopolímero e os experimentos 10 e 14 com maior teor de biopolímero em sua composição.102

Figura 4.19 - Representação de lagartas defeituosas, com alterações na morfologia (A); tentativa de fuga das lagartas (B); má formação de pupas e retenção de exúvia ao final da fase larval (C) e ausência de escamas nos ovos (D).....109

RESUMO

ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EM MATRIZES BIOPOLIMÉRICAS PARA O CONTROLE DE INSETOS PRAGAS

Os tradicionais defensivos agrícolas foram introduzidos para controlar as principais pragas causadoras de perdas de produção. No entanto, seu uso indiscriminado resultou em problemas ambientais e estimulou o desenvolvimento de produtos alternativos, como, p. ex., os óleos essenciais. Todavia, estes são compostos por moléculas geralmente instáveis e facilmente degradáveis, ou perdidos, resultando na demanda de desenvolvimento de veículos específicos de aplicação e uso em campo. Assim, uma alternativa para seu uso eficiente pode ser através da formulação em cápsulas em escala nano/micrométrica aumentando a sua eficiência e período residual. Neste contexto, o objetivo geral com este projeto foi desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade biológica de nano/micropartículas em pó carregadas com óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*). O processo para obtenção das micropartículas foi desenvolvido usando secagem por *Spray Dryer* para encapsular o material de núcleo volátil. Gelatina e lignina foram usadas como biopolímeros. A quantificação do teor de óleo essencial interno (encapsulado) e superficial (adsorvido) foi realizada por extração por *headspace* com análise simultânea em cromatógrafo gasoso (CG) acoplado a detector de ionização em chama (DIC). O método foi validado seguindo as principais figuras de mérito (seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação) para a faixa linear de trabalho e avaliou-se o efeito de matriz também. Os resultados mostraram que a velocidade de transferência da amostra no *Spray Dryer* foi o fator mais importante para a eficiência de encapsulamento para os dois biopolímeros. As melhores condições apresentaram eficiência de secagem entre 44 e 75% para gelatina e lignina, respectivamente, de massa do produto final. A eficiência de encapsulamento final variou entre 320 e 900 mg g⁻¹ para gelatina e 200 e 309 mg g⁻¹ para lignina, considerando-se a relação óleo essencial:polímero. Todas as amostras foram submetidas a diversos parâmetros de caracterização físico-química. Por microscopia eletrônica de varredura avaliou-se a morfologia e a superfície dos produtos. As micropartículas apresentaram uma formação microesférica, rugosa, com distribuição heterogênea de tamanho, superfície lisa (gelatina) e com fissuras (lignina). Estudos de

liberação controlada em meio aquoso foram realizados através de extração por *headspace*/CG. As micropartículas contendo maior proporção do polímero em relação ao óleo essencial apresentaram retenção da fração volátil 10,9 e 1,87 vezes superior para os produtos de gelatina e de lignina, respectivamente. Resultados similares foram obtidos na análise de degradação térmica. Nesta etapa, os produtos foram mantidos a 40°C num intervalo de até 90 min com posterior extração por *headspace*. Observou-se que as micropartículas de gelatina e lignina mostraram-se eficientes quanto à proteção contra perdas por volatilização com consequente aumento do tempo de vida do óleo essencial. Por fim, os produtos formulados foram submetidos a ensaios biológicos com insetos de *Spodoptera frugiperda*, principal praga da cultura de milho. A presença dos produtos na dieta das lagartas produziu um aumento no consumo e na taxa de crescimento inicial. No entanto, mortalidade larval e pupal, malformação da pupa, tentativas de fugas do sistema e ausência de escamas nos ovos (proteção contra a ação de inimigos naturais) foram observados. Os resultados deste projeto permitiram concluir que os produtos formulados ganharam estabilidade, capacidade de dispersão em meio aquoso e mantiveram-se ativos no controle da *Spodoptera frugiperda*.

ABSTRACT

ENCAPSULATION OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS IN MATRICES BIOPOLYMERIC FOR INSECT PESTS CONTROL

Traditional pesticides were introduced to the agriculture in order to control pests, which are harmful to the crops. However, this indiscriminate use of synthetic pesticides has been causing environmental disorders, and promoting the development of alternative products such as essential oils. Nevertheless, these compounds are made of usually unstable molecules, which are easily degradable, or lost. In this sense, there is necessity to develop specific alternatives to their use in the field. The formulation of capsules in nano- or micrometric scale is an alternative for efficient use of essential oil, what may increase its stability, and residual period. In this context, this project aimed to develop, characterize and evaluate the biological activity of nano/micro particles in powder loaded with orange essential oil. The process to obtain microparticles was developed by Spray Dryer to encapsulate the volatile in a core material. Gelatin and Lignin were used as biopolymers. The quantification of the essential oil content (encapsulated and absorbed) was done by headspace extraction with a simultaneous analysis in a gas chromatograph coupled to a flame ionization detector. The method was validated according to the main figures of merit (selectivity, linearity, precision, accuracy, detection and quantity limit). The calibration curves also were evaluated investigation possible matrix effect. The results showed that the transfer velocity of the sample in Spray Dryer was the main factor for encapsulament efficiency for both biopolymers. The best conditions presented drying efficiency of 44% and 72% for gelatin and lignin, respectively, of mass from the final product. The encapsulement efficiency ranged between 320 and 900 mg g⁻¹ for gelatin, and from 200 to 309 mg g⁻¹ for lignin, considering the essential oil/polymer ratio. All the samples were submitted to several physicochemical characterization parameters. Scanning electron microscopy was used to evaluated the morphology and surface of the products. The microparticles showed a micro spherical rough formation, with a heterogeneous distribution of size, smooth surface (gelatin), or with fissures (lignin). Studies of controlled release in aqueous media were performed by headspace extraction. The micro particles with wider rate of polymer related to essential oil showed a retention of the volatile fraction 10.9 and 1.87 times

higher for the gelatin products and lignin, respectively. Similar results were obtained in the thermal degradation analysis. In this step, the products were kept at 40°C in range of to 90 min followed by headspace extraction. It was observed that gelatin and lignin micro particles are efficient to protect against lost by volatilization, and consequent, to increase of life time for the essential oil. Finally, the formulated products were submitted to bioassays against *Spodoptera frugiperda*, which is the main pest of the corn crop. The presence of such products in the larval diet produced an increase in consumption and the initial growth rate. However larval and pupal mortality, pupal malformation, leakage attempts from the system and absence of egg scales (protection against natural enemies) were observed. The results of this project showed gains in stability, that they were able to be dispersed in aqueous medium, and remained active to the control of *Spodoptera frugiperda*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
Uma breve história do desenvolvimento agrícola e novas ferramentas de pesquisa	1
1.1 - Defensivos agrícolas e o meio ambiente	1
1.2 - Produtos Naturais: uma alternativa?	5
1.3 - Óleos essenciais	8
1.4 - Óleo essencial de citros.....	12
1.5 - Novas estratégias de aplicação	14
1.6 - <i>Spray Drying</i>	19
1.7 - Biopolímeros	22
1.8 - Uma praga de impacto	25
1.9 - Desafios analíticos	28
2 - Objetivos	33
2.1 - Objetivo geral	33
2.2 - Objetivos específicos.....	33
PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	35
Desenvolvimento de metodologias para encapsulamento e quantificação de óleo essencial de citros.....	35
3 - Materiais e Métodos	35
3.1 - Reagentes	35
3.2 - Desenvolvimentos Analíticos	36
3.2.1 - Extração por <i>headspace</i>	36
3.2.2 - Separação por cromatografia gasosa.....	38
3.3 - Amostra de óleo essencial.....	39
3.4 - Preparação das micropartículas de óleo essencial de citros por <i>Spray Drying</i>	39
3.4.1 - Caracterização da matriz.....	39
3.4.2 - Seleção dos biopolímeros	40
3.4.3 - Preparo da emulsão e secagem por nebulização	41
3.4.4 - Planejamento experimental	42
3.5 - Análise das micropartículas	44

3.5.1 - Rendimento sólido.....	44
3.5.2 - Eficiência de encapsulamento	44
3.5.3 - Características microestruturais	45
3.6 - Validação do método desenvolvido	45
3.6.1 - Seletividade.....	45
3.6.2 - Avaliação do efeito de matriz.....	46
3.6.3 - Curva analítica	46
3.6.4 - Limite de detecção e de quantificação.....	47
3.6.5 - Linearidade da resposta do detector	47
3.6.6 - Precisão	47
3.6.7 - Exatidão	48
3.7 - Caracterização das micropartículas.....	48
3.7.1 - Cinética de liberação	48
3.7.2 - Construção de curvas analíticas para quantificação dos produtos da cinética de liberação	49
3.8 - Ensaio biológico contra <i>Spodoptera frugiperda</i>	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1 - Caracterização da Matriz.....	53
4.2 - Análises qualitativas por cromatografia gasosa e detector de ionização em chama: desenvolvimento do método cromatográfico.....	57
4.3 - Desenvolvimento da metodologia de extração por <i>headspace</i>	60
4.3.1 - Efeito do tempo na extração por <i>headspace</i>	62
4.3.2 - Efeito da agitação na extração por <i>headspace</i>	63
4.4 - Desenvolvimento da metodologia de encapsulamento do óleo essencial de citros	64
4.5 - Caracterizações microestruturais	75
4.6 - Validação.....	79
4.6.1 - Seletividade.....	79
4.6.2 - Estudos de calibração	82
4.6.2.1 - Avaliação do efeito de matriz na porcentagem de recuperação do <i>d</i> -limoneno encapsulado.....	82
4.6.2.2 - Linearidade da resposta do detector	85

4.6.2.3 - Limite de detecção e limite de quantificação	89
4.6.3 - Precisão	90
4.6.4 - Exatidão	90
4.7 - Cinética de liberação	91
4.7.1 - Microcápsulas em pó.....	91
4.7.2 - Microcápsulas em meio aquoso	100
4.8 - Ensaio biológico contra <i>Spodoptera frugiperda</i>	106
CONCLUSÕES	111
Referências	115
APÊNDICE A.....	129
APÊNDICE B.....	141
APÊNDICE C.....	143
APÊNDICE D.....	145
APÊNDICE E.....	147
APÊNDICE F.....	149

INTRODUÇÃO

Uma breve história do desenvolvimento agrícola e
novas ferramentas de pesquisa

1.1 - Defensivos agrícolas e o meio ambiente

Ao longo da história da civilização, uma constante competição entre as espécies tem sido perpetuada. A competição ocorre pela obtenção dos recursos naturais fornecidos pela Terra e essenciais para o desenvolvimento das espécies tais como: abrigo, alimentos, água, dentre outros (CARVALHO, 2006; FRANK VAN VEEN *et al.*, 2006).

Rotineiramente, a natureza busca manter o equilíbrio do ambiente permitindo a coexistência de um grande número de espécies.

No entanto, determinadas situações podem acarretar em desequilíbrios. Por exemplo, nós humanos, desde o início da civilização estamos em busca de melhorar as condições de vida, com aumento da expectativa de vida e, conseqüentemente, aumento da população (TILMAN *et al.*, 2002). Dessa forma, o homem que anteriormente retirava seu alimento para consumo imediato da natureza através da caça, pesca e colheita de frutos e vegetais, passou a criar seus animais e a cultivar determinadas espécies vegetais para alimentar a população (TILMAN *et al.*, 2002).

Considerando que vivemos em um complexo ecossistema, os campos cultivados e os alimentos armazenados também serviram (e ainda servem!) de alimento para um variado grupo de espécies, como insetos, roedores, fungos e bactérias, além de serem alvo do ataque de ervas daninhas (OERKE, 2006; GUPTA e DIKSHIT, 2010; MNIF e GHRIBI, 2015). Em geral, essas espécies multiplicam-se em grande escala, interferindo na produção e no bem estar dos seres humanos, sendo assim, consideradas pragas (EVERGETIS *et al.*, 2013). Desde então, tem se travado uma verdadeira guerra entre elas e nós, os humanos.

Registros indicam que, de modo geral, os métodos utilizados para controlar as pragas eram baseados em rituais religiosos e magia, já que as pragas eram consideradas castigos dos deuses pelo mau comportamento dos homens (RUSSELL, 2005). Entretanto, com o passar do tempo e por meio de observações e experimentos, começou-se a reconhecer que muitos compostos apresentavam efeito no combate as pragas e, assim, surgem os compostos para o controle inseticida (RUSSELL, 2005).

Há registros de que a utilização de produtos químicos no controle de pragas teve início em 2500 a.C. (OERKE, 2006). Os primeiros produtos utilizados eram de origem inorgânica, tais como cobre, enxofre e mercúrio (OERKE, 2006; RUSSELL, 2005). O uso inicial destas substâncias foi muito eficaz na diminuição das infestações de pragas e no aumento da produtividade (WILSON e TISDELL, 2001).

Desde então, o mundo tem testemunhado um extraordinário período de crescimento e desenvolvimento de novos produtos. O Brasil, por exemplo, é um dos principais produtores de alimentos que utiliza grandes quantidades de defensivos no seu

cultivo, tornando-se um dos maiores consumidores de defensivos agrícolas do mundo (GERAGE *et al.*, 2017).

Esta prática resulta na redução da biodiversidade local pelo uso intenso de defensivos para o controle de pragas e doenças. Sua aplicação crescente e muitas vezes indiscriminada desenvolveu resistência em algumas pragas (MNIF e GHRIBI, 2015) e iniciou o ciclo dos defensivos agrícolas no ambiente, conforme se observa na Figura 1.1. Além disso, apesar do intenso uso de defensivos agrícolas, cerca de 35% do rendimento potencial da produção ainda é perdido (OERKE, 2006). Ao mesmo tempo em que há escassez e aumento do valor das terras cultiváveis (CARVALHO, 2006; PINGALI, 2012) observa-se que a agricultura precisa atender a uma demanda global por alimentos cada vez maior, para produzir alimentos de consumo humano e animal, fibras, biocombustíveis, dentre outros (POPP *et al.*, 2013).

Todos estes fatores estimularam um aumento na aplicação dos defensivos agrícolas e, embora esta prática tenha obtido sucesso em curto prazo no aumento da produção de alimentos, em longo prazo tem gerado diversos problemas ambientais (CARVALHO, 2006). Seu uso quando imprudente e frequente tem resultado em contaminação da água, ar e solo, mudanças nos equilíbrios biológicos naturais, com impacto negativo sobre organismos não visados e redução de organismos benéficos, incluindo predadores e parasitas de pragas e abelhas (MNIF e GHRIBI, 2015) como também ilustrado na Figura 1.1.

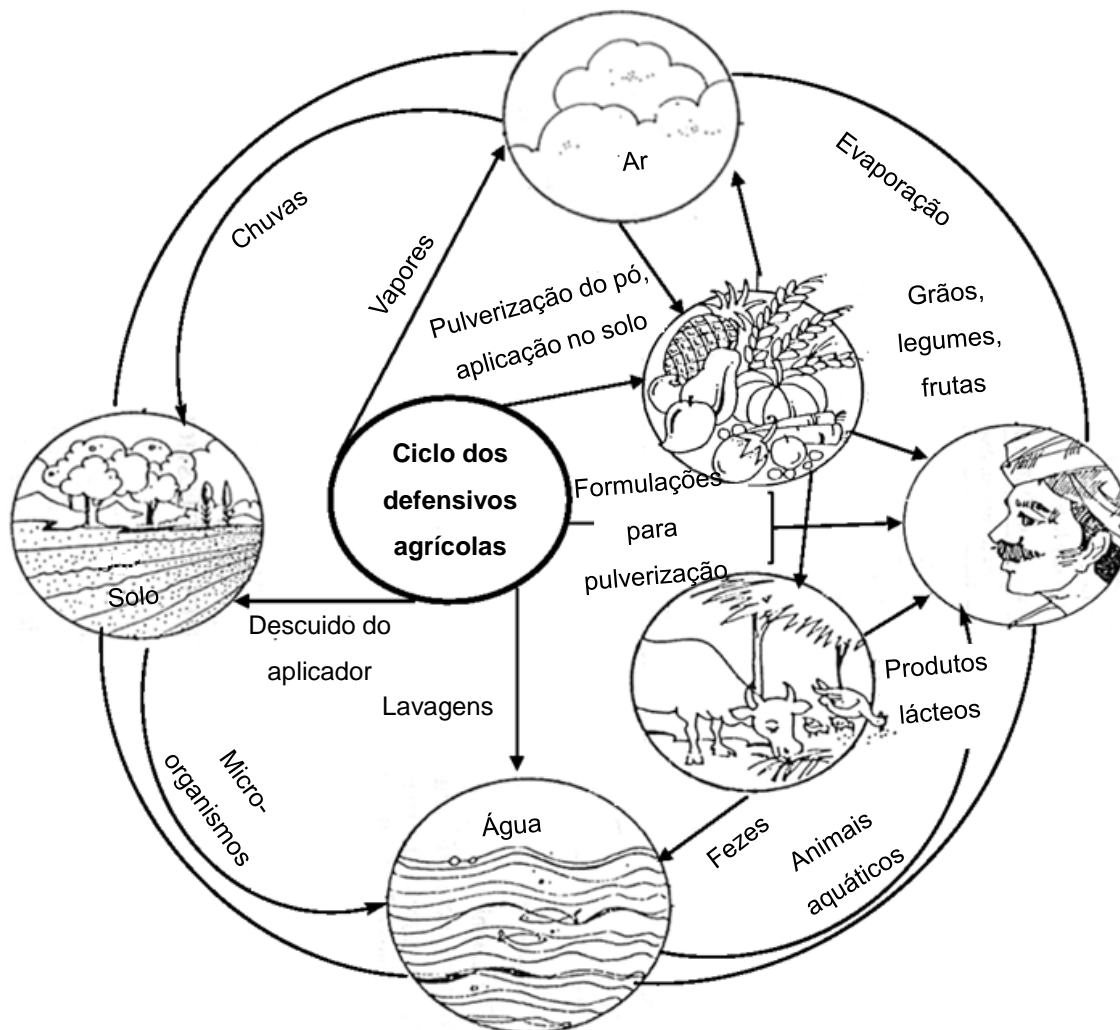


FIGURA 1.1 - Ciclo de vida dos defensivos agrícolas no ambiente.
Adaptado de KAILASA *et al.*, 2013.

Verifica-se na Figura 1.1 que ao serem aplicados, os defensivos podem ser lançados para o ambiente pela evaporação, adsorção, limpeza dos materiais utilizados em sua aplicação (ZHOU *et al.*, 2008), absorção e translocados para os tecidos das plantas, transportados para solos e lixiviados para as águas, contaminando alimentos, fauna e flora (KOOKANA, 2010).

Assim, um grande número de produtos sintéticos e seus produtos de degradação afetam organismos não alvos ao entrarem nos ecossistemas, devido a reações, interações com outros produtos químicos, transformações por organismos, exposição à luz natural, ingestão de alimentos e água contaminados, dentre outros

(BERNHARDT *et al.*, 2017). Tais fatores podem resultar em perda de espécies locais (como pássaros e peixes), alterações indiretas no ecossistema, como produção primária, retenção de nutrientes, sequestro de carbono, além de serem disseminados pela cadeia alimentar pela biomagnificação (LAZARTIGUES *et al.*, 2013). Além disso, muitos dos defensivos são persistentes ou “pseudo-persistentes”, pois eles possuem uma degradação muito lenta e seu uso constante leva à liberação contínua no ambiente em taxas maiores que as de degradação (BERNHARDT *et al.*, 2017).

Dessa forma, há a necessidade de desenvolver novas ferramentas para controlar uma variedade de insetos, ervas daninhas e doenças que reduzem o rendimento das culturas (GERWICK e SPARKS, 2014). Nesse contexto, tem se desenvolvido modelos baseados na manutenção e recuperação da biodiversidade considerando as interações biológicas dentro de sistemas agrícolas e, ao mesmo tempo em que a capacidade produtiva das plantas é estimulada (ALTIERI, 2002; REGNAULT-ROGER *et al.*, 2012).

Uma proposta é a utilização dos recursos disponíveis no meio ambiente, como por exemplo, as plantas e seus extratos (ALTIERI, 2002). Assim, a utilização de produtos com curta persistência, maior especificidade e menor impacto ambiental, têm sido considerados como uma alternativa viável (GLARE *et al.*, 2012).

1.2 - Produtos Naturais: uma alternativa?

As plantas estão em constante evolução para desenvolverem uma série de adaptações para melhorar a sobrevivência e reprodução, reduzindo o impacto da ação de predadores (ARIMURA *et al.*, 2005; DUDAREVA *et al.*, 2006). Assim, elas se defendem através da produção de metabólitos secundários para compensar a sua imobilidade (DUDAREVA *et al.*, 2006). Um exemplo é o lançamento de uma complexa mistura de compostos voláteis de suas folhas, flores e frutas para a atmosfera e para o solo (por meio de suas raízes) agindo como repelentes ou toxinas (DUDAREVA *et al.*, 2006).

Assim como as plantas, os micro-organismos também produzem uma série de compostos em condições ambientais adversas e interações antagônicas com outros organismos, que têm forte influência em seu crescimento e reprodução (ROHLFS e CHURCHILL, 2011). Muitos dos metabólitos secundários são considerados seguros para os

seres humanos, fauna e flora, pois produzem pouco ou nenhum resíduo tóxico (CHANDLER *et al.*, 2008), além de apresentarem ações específicas e ambientalmente amigáveis (KOUL, 2011).

Independente da origem, estes compostos secundários representam um grande reservatório de estruturas químicas com atividades biológicas que são muito mais propensos a ter algum tipo de atividade biológica em concentrações menores que os compostos derivados de sínteses orgânicas - xenobióticos (DUKE *et al.*, 2000). Isso se deve ao fato dos compostos secundários serem resultado da co-evolução entre as espécies que estimulou o desenvolvimento de adaptações defensivas (MIRESMALLI e ISMAN, 2014). Assim, estes compostos são produtos naturais biologicamente ativos que possuem ação em alvos específicos, o que diminui o risco de impactos ambientais (SEIBER *et al.*, 2014).

Dessa forma, produtos naturais com ação inseticida e/ou fungicida têm sido pesquisados como uma opção para substituição e/ou complemento aos defensivos tradicionais (GLARE *et al.*, 2012; MNIF e GHRIBI, 2015) e são denominados como biopesticidas.

Os biopesticidas são formados por compostos que podem ser obtidos a partir de micro-organismos vivos ou materiais vegetais ou serem o próprio organismo vivo (REGNAULT-ROGER *et al.*, 2012; MNIF e GHRIBI, 2015). São geralmente aplicados para o controle ao invés da destruição das pragas, com baixo resíduo, alto desempenho, curta persistência, menores efeitos colaterais tóxicos e boa compatibilidade com o ambiente, causando menor impacto ambiental (CZAJA *et al.*, 2015; MNIF e GHRIBI, 2015).

Dependendo da fonte pela qual o biopesticida é obtido, ele pode ser classificado como (1) microbiano, (2) semioquímico e (3) bioquímico (CHANDLER *et al.*, 2011; CZAJA *et al.*, 2015). Na Tabela 1.1, observam-se exemplos de alguns biopesticidas disponíveis comercialmente e que são derivados das mais variadas fontes.

TABELA 1.1 - Biopesticidas obtidos de variadas fontes microbiológicas e materiais vegetais disponibilizados comercialmente.

Origem	Ação	Ingrediente Ativo	Nome comercial	Algumas culturas	
Micro-organismo	Bactéria	Inseticida	<i>Bacillus thuringiensis var kurstaki</i>	Dipel DF	Algodão, soja, tomate, citros.
		Fungicida	<i>Bacillus subtilis</i> QST713	Serenade ASO	Algodão, soja, feijão, girassol.
	Fungo	Herbicida	<i>Chondrostereum purpureum</i>	Chontrol	Silvicultura
		Inseticida	<i>Beauveria bassiana</i>	Ballvéria	Algodão, soja, feijão e tomate.
		Nematicida	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	MeloCOOn WG	Legumes, citros, tabaco.
	Vírus	Inseticida	<i>Cydia pomonella</i> GV	Cyd-X	Maçãs, peras.
		Antiviral	Vírus do mosaico amarelo da abobrinha	Curbit	Abobrinha, melão, melancia.
Origem vegetal	Inseticida	Azadiractina	Azatin XL	Legumes, frutas, ervas e plantas ornamentais.	
		Rotenona	Rotenat	Fruteiras.	
	Fungicida	<i>Reynoutria sachalinensis</i>	Regalia	Culturas ornamentais.	
	Herbicida	Óleo de citronela	Barrier H	Vinhas, pomares, plantas ornamentais e grama.	
	Nematicida	<i>Quillaja saponária</i>	Nema-Q	Maçãs, abóboras, uva, lúpulo, pera.	
	Repelente	Citronelol	Biomite	Plantas ornamentais.	
	Semioquímico	Repelente	(E,E)-8,10-dodecadien-1-ol	Ecosex CM	Maçã e pera.

Adaptado de MICHEREFF FILHO *et al.* (2009), CHANDLER *et al.* (2011) e AZEVEDO *et al.* (2013).

Um importante benefício de defensivos agrícola baseados em produtos naturais é seu relativo curto tempo de meia-vida, já que eles não possuem estruturas “não naturais” ou muitas substituições químicas, sendo mais facilmente degradáveis pelos mecanismos desenvolvidos no meio ambiente (DAYAN *et al.*, 2009). A resistência à biopesticidas em organismos alvo também não ocorre facilmente, ao contrário dos defensivos tradicionais (CZAJA *et al.*, 2015). Todas essas características fizeram com que estas substâncias fossem se tornando uma nova tendência mundial na indústria de defensivos agrícolas (CZAJA *et al.*, 2015; MNIF e GHRIBI, 2015).

Dentre os produtos listados na Tabela 1.1, para a investigação de novos produtos para o controle de pragas, o uso de compostos com ação repelente ou atraente tem avançado rapidamente, já que sua ação não necessariamente ocasiona na morte dos indivíduos, mas sim um controle comportamental (SEIBER *et al.*, 2014). Em alguns casos, uma possibilidade para a obtenção com qualidade destes produtos, faz-se necessário combinar tecnologias para separação, elucidação estrutural e bioensaios (PINO *et al.*, 2013; TASCONE *et al.*, 29). Estas etapas são importantes para que o produto se torne atrativo e comercializável, pois além de comprovada a sua ação biológica, é necessário que haja disponibilidade e padronização da matéria prima (PINO *et al.*, 2013).

Alguns fatores como sazonalidade, ritmo circadiano, disponibilidade hídrica, temperatura, radiação ultravioleta, nutrientes, poluição, altitude, presença de patógenos, dentre outros, podem interferir na produção e concentração de metabólitos secundários pelas plantas (GOBBO-NETO e LOPES, 2007) e micro-organismos (KOUL, 2011). Esses fatores são um desafio para os pesquisadores, pois interferem na padronização dos produtos naturais, sendo necessário desenvolver novas formas de formulação, armazenamento, produção e aplicação para promover a manutenção da estabilidade dos princípios ativos (PINO *et al.*, 2013).

1.3 - Óleos essenciais

Óleos essenciais são compostos voláteis produzidos por complexas vias metabólicas das plantas em seu metabolismo secundário para promover comunicação

e/ou atuarem como moléculas de defesa (PAVELA e BENELLI, 2016). Podem ser extraídos de diferentes partes das plantas, principalmente folhas e flores (RAI *et al.*, 2017). Eles possuem diferentes e complexas composições químicas, sendo algumas das principais estruturas encontradas estão mostradas na Figura 1.2.

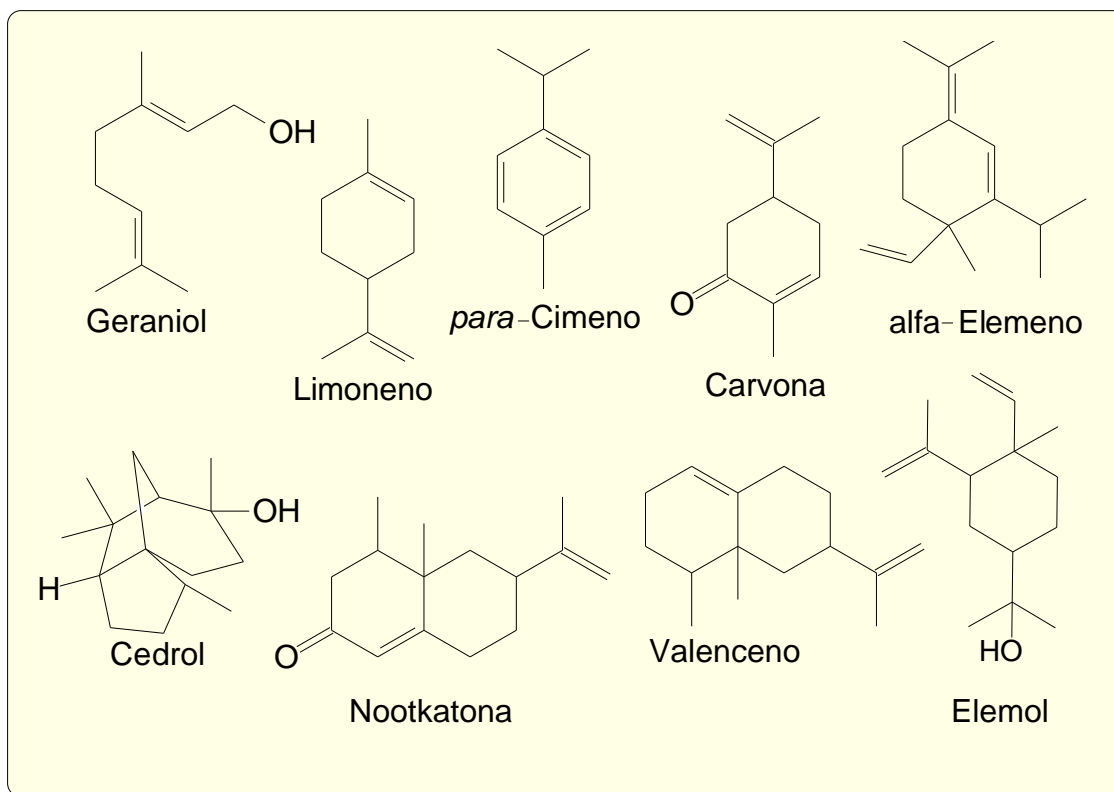


FIGURA 1.2 - Estruturas químicas de alguns dos componentes encontrados nos óleos essenciais.

Adaptado de PANELLA *et al.* (2005), MOHAREB *et al.* (2013) e RAI *et al.* (2017).

Além dos compostos listados na Figura 1.2 EZE (2016) observou que os óleos essenciais possuem ao menos um grupo funcional tal como aldeídos (citrinal, citronelal, cinamaldeído, benzaldeído, vanilina), álcoois (geraniol, citronelol, mentol, linalol, terlineol, borneol), ésteres (benzoatos, acetatos, salicilatos, cinamatos), cetonas (cânfora, carvona, mentona, pulegona, tujona), óxidos (cineol), éteres de fenol (anetol, safrol), fenóis (eugenol, timol, carvacrol) e ácidos (benzoico, cinâmico, mirístico, isovalérico).

A ampla variação no perfil químico dos óleos essenciais está relacionada ao número e propriedades estereoquímicas dos componentes (AKTHAR *et al.*, 2014). Estas variações também estão ligadas a metodologia de extração empregada para obtenção do óleo essencial (AKTHAR *et al.*, 2014), parte da planta utilizada, idade e estágio do ciclo vegetativo, clima, composição do solo, dentre outros (ANGIONI *et al.*, 2006; MASOTTI *et al.*, 2003).

Estes compostos têm sido utilizados desde a antiguidade no alívio de sintomas de doenças (ISMAN *et al.*, 2011). Alívio este, associado aos seus efeitos antimicrobianos, com ação bactericida, virucida e/ou fungicida (EL ASBAHANI *et al.*, 2015; MUTHAIYAN *et al.*, 2012). Além disso, dentre os produtos naturais, os óleos essenciais têm uma ampla aplicação para uso humano para obtenção de perfumes, cosméticos, detergentes, remédios, produção de alimentos e proteção contra a infestação de pragas em alimentos (REGNAULT-ROGER *et al.*, 2012; ISMAN *et al.*, 2011).

Considerando sua utilização na proteção de alimentos armazenados, não é surpreendente que os óleos essenciais tenham sido avaliados para o controle de insetos pragas. Segundo ISMAN *et al.* (2011) estes compostos possuem características cruciais no controle de insetos, como (1) produção em alta escala e baixo custo, (2) múltiplos modos de ação no sistema nervoso dos insetos, (3) ambientalmente não persistentes e (4) relativamente não tóxicos para mamíferos.

Testes de dose letal mediana que avaliam a dose do princípio ativo responsável pela morte de 50% da população avaliada (DL_{50}) têm demonstrado que os óleos essenciais, em sua maioria, podem ser utilizados com segurança considerando-se a quantidade de produto utilizada, o tipo de produto, sua aplicação e os organismos não-alvo (RAI *et al.*, 2017). Alguns dados de dose letal obtidos para alguns óleos essenciais podem ser observados na Tabela 1.2.

TABELA 1.2 - Toxicidade de diferentes óleos essenciais e defensivos tradicionais baseada na dose letal aguda.

Óleos essenciais	DL ₅₀ (mg kg ⁻¹)	Defensivos tradicionais	DL ₅₀ (mg kg ⁻¹)
Camomila		Metomil	1,18
Citronela	2000 a	Fenitrotiona	0,33
Lavanda	5000	Carbosulfan	1,19
Cravo			

DL₅₀ = Toxicidade oral aguda em roedores.

Adaptado de REGNAULT-ROGER *et al.* (2012) e MANSOUR *et al.* (2015).

Pela Tabela 1.2, observa-se que os constituintes dos óleos essenciais têm um valor de DL₅₀ entre 2000 e 5000 mg kg⁻¹, o que sugere muito baixa toxicidade ou possibilidade de gerar danos agudos (REGNAULT-ROGER *et al.*, 2012) em comparação com alguns dos defensivos tradicionais. Dessa forma, a toxicidade dos componentes dos óleos essenciais foi dividida em três classes: classe I, com os compostos com pouca funcionalidade (baixa toxicidade oral), classe II, com compostos de funcionalidades intermediária e classe III, compostos de alto potencial de toxicidade (REGNAULT-ROGER *et al.*, 2012).

Além da baixa toxicidade, uma característica dos óleos essenciais que merece destaque é o seu maior poder de penetração no organismo alvo, o que aumenta sua retenção, muito embora, sua eficácia limitada se deve ao fato deles volatilizarem muito rapidamente (DAYAN *et al.*, 2009). Os óleos essenciais e seus constituintes geralmente têm meias vidas inferiores a 24 horas em superfícies, solo e água (ISMAN *et al.*, 2011). Assim, muitas vezes essa sua baixa retenção compromete o uso dos compostos orgânicos voláteis como bioinseticidas comerciais, sendo necessária a utilização, por exemplo, de surfactantes para auxiliar na disseminação no ambiente (DAYAN *et al.*, 2009).

Nesse contexto, é necessário desenvolver tecnologias que protejam e fixem os óleos essenciais no meio ambiente devido à volatilidade e facilidade de oxidação na presença da luz, ar, umidade e temperaturas elevadas. Atualmente para

conferir esta proteção, usa-se a microencapsulação, dentre outras técnicas (VENKATESAN *et al.*, 2009; EL ASBAHANI *et al.*, 2015). A microencapsulação de sólidos, líquidos ou gases em corpos que liberam gradualmente os elementos imobilizados é empregada, sobretudo pelas indústrias farmacêuticas e químicas (VENKATESAN *et al.*, 2009).

1.4 - Óleo essencial de citros

O gênero *Citrus* compreende várias espécies de laranjas, limões, tangerinas e toranjas, os quais têm apresentado um rápido crescimento na produção industrial devido às condições econômicas, busca do consumidor e *flavor* distinto (AHMAD *et al.*, 2006). Neste grupo, a laranja é uma fruta cítrica muito consumida em todo o mundo na forma *in natura* e como suco (REZZADORI *et al.*, 2012; MARTÍN *et al.*, 2010). O Brasil é responsável por cerca de 60% da produção mundial de suco de laranja no mundo sendo 80% da sua produção destinada à indústria de bebidas (FRANCO, 2016).

Durante a produção do suco de laranja, aproximadamente metade do peso da fruta fresca é desprezado, gerando grandes quantidades de resíduos, como casca, albedo, polpa, sementes, folhas e as frutas que não atingiram os requisitos de qualidade (AHMAD *et al.*, 2006; LÓPEZ *et al.*, 2010; REZZADORI *et al.*, 2012). A maior parte desses resíduos se espalha pelos solos nos locais adjacentes aos centros de produção e, dessa forma, são geralmente utilizados na alimentação animal ou submetidos à queima (LÓPEZ *et al.*, 2010). Essas rotas levam a consequências ambientais, tais como a geração de gases do aquecimento global (LÓPEZ *et al.*, 2010).

Para eliminar os problemas ocasionados pelos resíduos da produção e comercialização de laranjas, uma alternativa é a implementação de processos para recuperação, como, por exemplo, produção de fertilizantes orgânicos, extração de pectina, óleos essenciais e compostos antioxidantes, ou como substrato para a produção de compostos com alto valor agregado, como proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas, materiais adsorventes, dentre outros (LÓPEZ *et al.*, 2010; REZZADORI *et al.*, 2012).

Neste grupo, um dos mais importantes coprodutos são os óleos essenciais geralmente utilizados como flavorizante em uma variedade de alimentos, além de aromatizantes de ambientes e perfumes (FERHAT *et al.*, 2006; REZZADORI *et al.*, 2012). Normalmente, o óleo é obtido por prensagem a frio do resíduo da casca (FERHAT *et al.*, 2006). O seu *flavor* característico é resultante de uma complexa combinação de compostos voláteis acumulados em glândulas de óleo localizadas no flavedo e nos gomos da laranja (RODRÍGUEZ *et al.*, 2017).

O *d*-limoneno é o principal constituinte do óleo essencial de citros (CHEMAT-DJENNI *et al.*, 2010). Sua estrutura química pode ser observada na Figura 1.3.

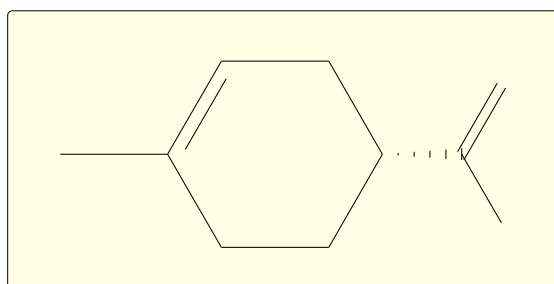


FIGURA 1.3 – Representação da estrutura química do *d*-limoneno.

Adaptado de CIRIMINNA *et al.* (2014).

O *d*-limoneno é um terpeno monocíclico com duas unidades isopreno abundantemente produzido como metabólito secundário e que desempenha um papel importante na comunicação das plantas, atraindo ou repelindo insetos e/ou ocasionando em danos nas funções vitais dos mesmos (CHEMAT-DJENNI *et al.*, 2010). O *d*-limoneno é um óleo incolor e pouco solúvel em água, cujo *flavor* característico de laranja doce estimulou sua utilização na indústria farmacêutica e de alimentos (CIRIMINNA *et al.*, 2014). Além disso, é utilizado na produção de tintas, usado como solvente (REZZADORI *et al.*, 2012) e tem sido considerado como matéria prima no desenvolvimento de agentes de limpeza, biocombustíveis (PAGGIOLA *et al.*, 2016) e uma molécula base para a produção de polímeros e outros monômeros (ZHANG *et al.*, 2017).

Além da ampla variedade de atuação do composto, também se tem verificado sua aplicação no controle de pragas. Estudos têm avaliado a ação do *d*-limoneno puro e emulsionado em cochonilhas (HOLLINGSWORTH, 2005), besouros como

o *Rhyzopertha dominica*, o *Sitophilus oryzae* (L.) e o *Tribolium castaneum* (Herbst) (TRIPATHI *et al.*, 2003) sugerindo que este tem potencial para ser utilizado no controle das mais variadas pragas ambientais.

Diante da ampla possibilidade de aplicação do *d*-limoneno, o uso potencial deste composto representa uma forma de recuperação e agregação de valor econômico à biomassa, pois este é um coproduto obtido a partir da biomassa de citros (ZHANG *et al.*, 2017; PAGGIOLA *et al.*, 2016). Além disso, por permitir a redução no descarte inadequado da biomassa em aterros, promove uma diminuição na emissão de gases e de riscos ambientais associados (PAGGIOLA *et al.*, 2016).

1.5 - Novas estratégias de aplicação

Os óleos essenciais são formados por moléculas instáveis, facilmente degradáveis por oxidação, aquecimento e luz, ou volatilizados caso não sejam protegidos contra fatores externos (EL ASBAHANI *et al.*, 2015). Portanto, tecnologias têm sido desenvolvidas para melhorar a estabilidade e a atividade biológica, como os sistemas de liberação controlada (KNOWLES, 2008). Estes sistemas podem aumentar a aplicabilidade e eficiência dos óleos essenciais como biopesticidas, pois estas substâncias podem ser inseridas em cápsulas de escala nanométrica ou micrométrica (nano ou micropartículas, respectivamente) (RAI, 2017).

Com o encapsulamento, amostras líquidas, sólidas ou gasosas são retidas, formando um núcleo cercado por um fino filme de espessura uniforme ou não ou aprisionadas em uma matriz heterogênea/homogênea com um agente encapsulante (BALASURBRAMANI *et al.*, 2015). As micropartículas podem ser recobertas por uma ou várias camadas do material de parede e apresentam diâmetros entre 1 e 1000 μm (SINGH *et al.*, 2010; BALASUBRAMANI *et al.*, 2015).

As micropartículas são, essencialmente, formadas por duas estruturas principais, como se pode observar na Figura 1.4. O material dentro da micropartícula (aquele que será encapsulado ou princípio ativo) é denominado como “núcleo”, “matriz” ou “fase interna” e o material encapsulante (revestimento polimérico) também é denominado “material de parede” ou “membrana externa” (JYOTHI *et al.*, 2010).

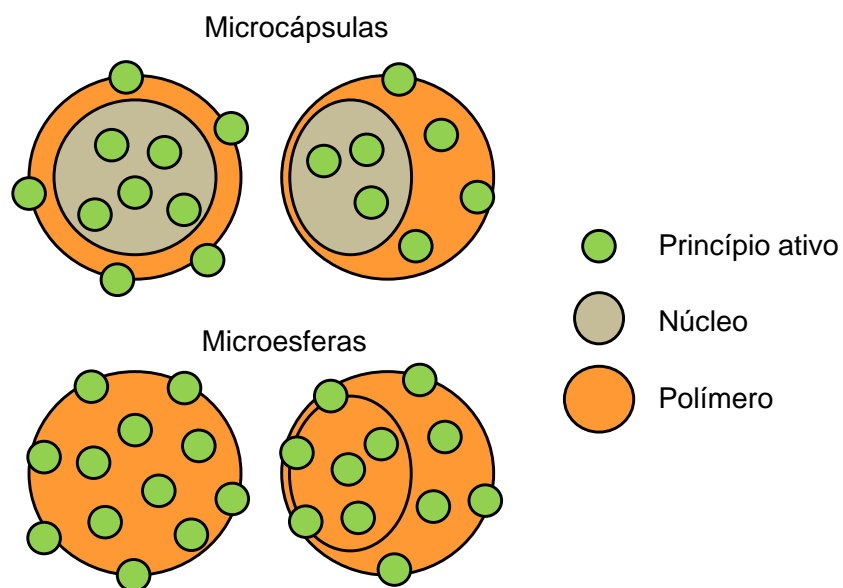


FIGURA 1.4 - Representação das diferentes estruturas que compõem as micropartículas.

Adaptado de SINGH *et al.*, 2010.

Pela Figura 1.4, verifica-se que as microcápsulas possuem um sistema vesicular, em que o princípio ativo é retido em um reservatório ou também denominado núcleo líquido (lipofílico ou hidrofílico) que pode ou não ser o composto ativo (ZORZI *et al.*, 2015). O princípio ativo pode estar retido dentro do núcleo líquido ou adsorvido na superfície polimérica (DAUDT *et al.*, 2013).

Nas microesferas, o polímero fixa o composto ativo em sua estrutura, formando uma matriz maciça (SOUSSAN *et al.*, 2009; DAUDT *et al.*, 2013). Em ambos os métodos, a liberação do princípio ativo no sistema ocorrerá através da difusão do princípio ativo ou pela degradação da matriz polimérica, formando um sistema de liberação contínuo (SOUSSAN *et al.*, 2009).

A retenção do material que será encapsulado dependerá de fatores relacionados a natureza química do material, como a massa molecular, a funcionalidade química, a polaridade e volatilidade, além das propriedades do material de parede e da tecnologia utilizada para o encapsulamento (MADENE *et al.*, 2006). Além disso, o material encapsulado pode ser composto de apenas um ou vários tipos

diferentes materiais, de diferentes funcionalidades químicas e origens (MADENE *et al.*, 2006).

Como matérias-primas de paredes tem-se utilizado proteínas, carboidratos, lipídios, e celulose (MADENE *et al.*, 2005). A escolha de materiais de parede depende de uma série de fatores, incluindo: natureza do material do núcleo, tecnologia utilizada para o encapsulamento, custo e adequação do material à aplicação final do produto encapsulado (MADENE *et al.*, 2005). Assim, cada grupo de materiais apresenta vantagens e desvantagens (MADENE *et al.*, 2006). Por esta razão, muitas microcápsulas são compostas por uma mistura de matérias de parede (MADENE *et al.*, 2006).

Vários métodos estão disponíveis para microencapsulação. Na Tabela 1.3, pode-se observar os principais métodos utilizados para o encapsulamento de óleos essenciais. Entre as técnicas, a secagem por aspersão (*Spray Drying*) tem se destacado devido ao baixo custo, boa retenção de compostos voláteis, boa estabilidade do produto final e produção em grande escala de modo contínuo (MADENE *et al.*, 2005).

TABELA 1.3 - Principais técnicas utilizadas para o microencapsulamento de óleos essenciais utilizando diferentes materiais de núcleo e de parede.

Técnica	Material de Núcleo	Material de Parede	Referências
Coacervação	Óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>	Quitosana e goma de caju	Abreu <i>et al.</i> , 2012
	Óleo essencial de Jasmine	Gelatin e goma arábica	Lv <i>et al.</i> , 2014
	Óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	Álcool polivinílico	Leimann <i>et al.</i> , 2009
	Óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> Linn	Gelatina	Sutaphanit e Chitprasert, 2014
Nanoprecipitação	Carvona e anetol	Poly(lactide-co-glycolide)	Esfandyari- Manesh <i>et al.</i> , 2013
	Benzoato de benzila	Polilactide acide (PLD)	Audrey Ladj-Minost, 2012
	Carvacrol	PLGA	Iannitelli <i>et al.</i> , 2011
Spray Drying	Óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>	Alginato e goma de caju	De Oliveira <i>et al.</i> , 2014
	Óleo essencial de Rosemary	Goma arábica, maltodextrina e amido modificado	Fernandes <i>et al.</i> , 2014
	Óleo essencial de <i>Schinus molle</i> Rev L.	Maltodextrina e goma arábica	López <i>et al.</i> , 2014
	Óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>	Amido, inulina, gelatina e sacarose	Beirão da Costa <i>et al.</i> , 2012

Nesta técnica, um produto líquido (solução, emulsão, suspensão) é constantemente nebulizado em uma corrente de gás inerte e aquecida até a obtenção de partículas que podem variar de nanômetros a milímetros, pela remoção de água (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

O processo de encapsulamento permitiu avanços uma vez que sistemas em nano/microescala fornecem produtos químicos de forma controlada e direcionada (NAIR *et al.*, 2010). Compostos adequadamente encapsulados proporcionam melhor penetração em áreas intra e extracelulares do organismo alvo que podem estar inacessíveis a outros tipos de sistemas contendo defensivos agrícolas (ESFANDYARI-MANESH *et al.*, 2013; NAIR *et al.*, 2010). Uma proposta do mecanismo de ação dos óleos essenciais microencapsulados pode ser observada na Figura 1.5.

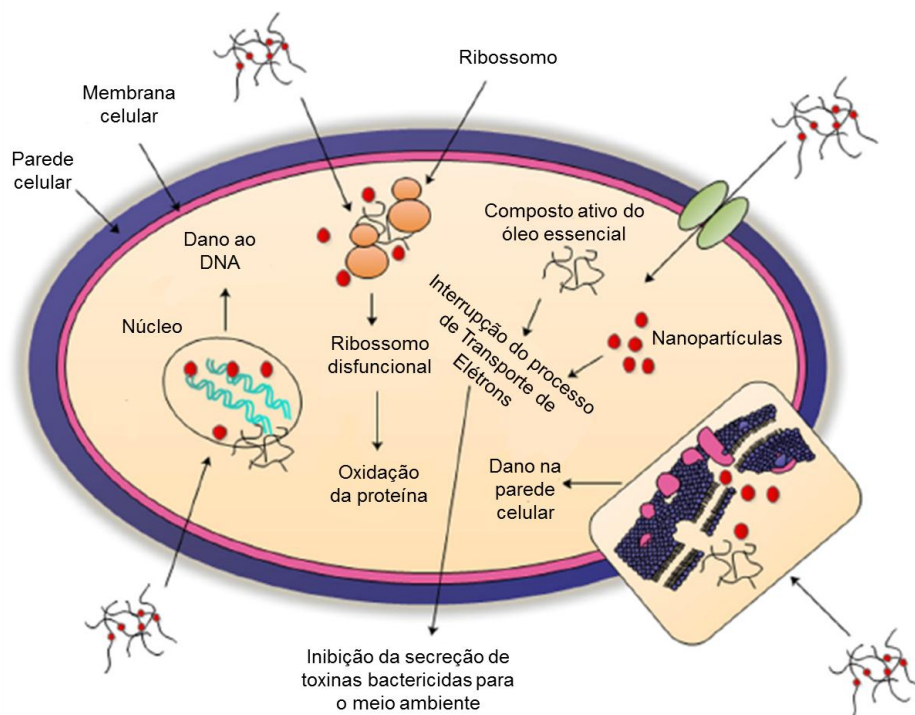


FIGURA 1.5 - Esquema representativo de possíveis modos de ação dos óleos essenciais encapsulados no interior de células do organismo alvo.

Adaptado de RAI, 2017.

Os óleos essenciais podem agir de variadas maneiras dentro da célula (Figura 1.5). Ao penetrar na parede celular, podem formar poços e alterar a permeabilidade da membrana. Dessa forma, pode ocorrer a liberação de radicais livres e aumento do afluxo do agente antibacteriano, o que resulta na morte celular (RAI, 2017). Os óleos essenciais encapsulados também podem inibir o sinal de transdução e a formação da parede celular, pelo ataque as bases de DNA e interação com enzimas do sistema respiratório, liberando espécie reativas de oxigênio, levando também a morte celular (RAI, 2017).

1.6 - Spray Drying

Dentre as técnicas de encapsulamento de compostos orgânicos voláteis, a secagem por nebulização tem recebido atenção pelo baixo custo operacional e compatibilidade com materiais lábeis (AGHBASHLO *et al.*, 2012). Nesta operação unitária, um produto líquido (solução, emulsão ou suspensão) contendo o material de interesse, após ser homogeneizado em um dispersor é instantaneamente convertido em pó ao ser nebulizado sob uma corrente de gás quente (PATIL *et al.*, 2014). As etapas do processo de secagem podem ser observadas na Figura 1.6.

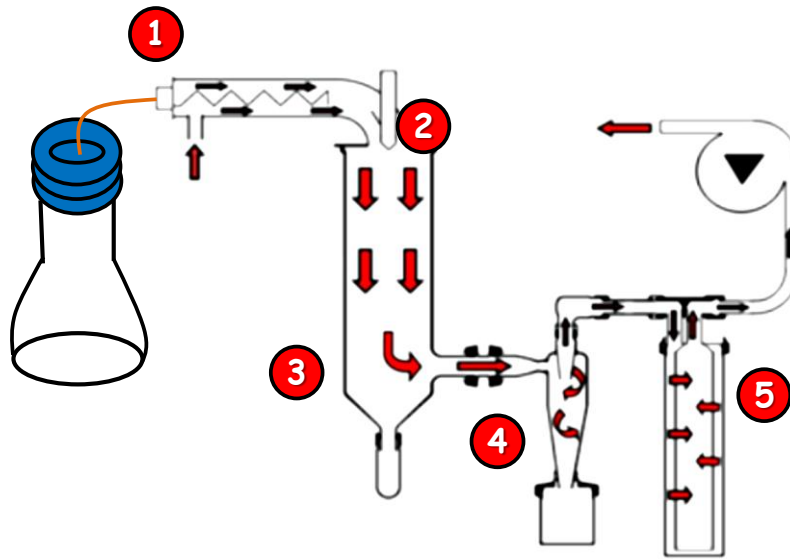


FIGURA 1.6 – Representação do funcionamento de um *Spray Dryer* e suas principais etapas: (1) preparo da amostra, (2) atomização, (3) secagem e (4), (5) separação.

Segundo PATEL *et al.* (2009) o processo de secagem no *Spray Dryer* envolve quatro etapas (Figura 2.1), sendo elas (1) preparo da amostra: transferência da amostra (emulsão/suspensão) através de uma bomba peristáltica; (2) nebulização: a amostra é aspergida para uma câmara de secagem com o auxílio de um bico de pulverização; (3) secagem: na câmara de secagem a amostra entra em contato instantaneamente com uma corrente controlada de ar inerte aquecido e então se inicia a evaporação da água presente nas gotículas e (4) separação por ciclones e (5) filtros. Nesta etapa, purifica-se o ar para que este possa ser liberado para a atmosfera.

Levando-se em consideração as partículas que serão submetidas à secagem em *Spray Dryer*, o processo de secagem pode ser separado em dois períodos conforme se observa na Figura 1.7.

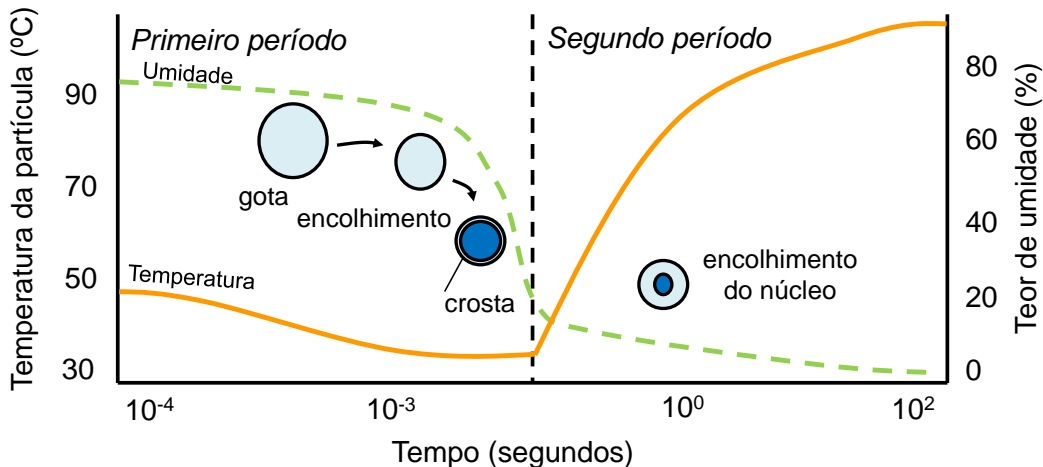


FIGURA 1.7 - Representação da trajetória de uma partícula dentro da câmara de secagem relacionando-se temperatura e umidade da partícula em função do tempo de permanência na câmara.

Adaptado de BIRCHAL *et al.* (2006) e KIM *et al.* (2009).

Segundo BIRCHAL *et al.* (2006) nos primeiros segundos as gotículas atomizadas entram em contato com o ar aquecido e um filme de vapor saturado imediatamente se forma perto da superfície da gotícula. Isto ocorre porque, em um primeiro momento, a temperatura das partículas entra em equilíbrio com a temperatura da camada de ar estagnado em sua superfície (BIRCHAL *et al.*, 2006).

Assim, promove-se a transferência de calor do ar para a partícula, resultado da diferença de temperatura e ao mesmo tempo há transferência de umidade da partícula para o ar aquecido devido a diferença de pressão de vapor, levando a evaporação da água livre da superfície das gotículas (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). Como a transferência de umidade do centro para a superfície é suficiente para manter as condições saturadas, a evaporação da água da superfície ocorre a uma taxa constante e a gotícula diminui o seu tamanho a medida que a água é evaporada (KIM *et al.*, 2009).

Em um segundo momento, a medida que a água evapora, ocorre um resfriamento que impede que a temperatura da partícula se torne superior à temperatura do ar de secagem, pela absorção do calor para a vaporização da água (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). Assim, após um período de secagem, o teor de umidade se torna baixo o suficiente para não promover as condições saturadas na superfície da

gotícula e uma crosta sólida é formada na superfície da gota e seu tamanho aumenta, aumentando sua resistência à difusão de vapor (KIM *et al.*, 2009). A taxa de secagem diminui, torna-se dependente da taxa de difusão da água através da crosta e a partícula começa a aquecer (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

Assim, obtém-se um produto final com baixa atividade de água e redução do peso, o qual facilita o transporte e armazenamento do mesmo (PATIL *et al.*, 2014). Entretanto, esta técnica pode apresentar uma baixa eficiência de encapsulamento, um problema desafiador que pode ser atenuado pelos pesquisadores através do planejamento de experimentos (AGHBASHLO *et al.*, 2012). Com o planejamento de experimentos, pode-se obter alta eficiência para o desenvolvimento de novos ou melhorados produtos ou processos, com redução do tempo e do custo (BALASUBRAMANI *et al.*, 2015). Estes fatores se tornam mais críticos ao se realizar o encapsulamento de substâncias voláteis, como os óleos essenciais.

As propriedades físico-químicas do produto final formulado dependem principalmente da temperatura de entrada, fluxo do ar de secagem, taxa de alimentação, velocidade do atomizador, tipos e concentração do material de parede, dentre outros (PATIL *et al.*, 2014). Dentre estes fatores, a temperatura do ar de secagem modifica a viscosidade da emulsão e sua fluidez, interferindo em todos os outros parâmetros avaliados no processo de secagem (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). Por exemplo, quando altas temperaturas são utilizadas diminui-se a viscosidade e o tamanho das partículas, promovendo uma secagem mais rápida e eficiente. Por outro lado, altas temperaturas podem ocasionar a volatilização ou degradação de compostos de interesse sensíveis ao calor (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). Assim, ao desenvolver um processo de encapsulamento em Spray Dryer, todos estes fatores devem ser minimamente analisados para permitir o encapsulamento de substâncias sensíveis ao calor, como os óleos essenciais.

1.7 - Biopolímeros

Numerosos materiais para o encapsulamento de compostos orgânicos voláteis têm sido utilizados. Para a obtenção de formulações contendo estes compostos

a partir da secagem por nebulização, a escolha do material encapsulante é um fator crítico que influenciará as propriedades da emulsão, retenção do óleo essencial antes e durante o processo de secagem, além de garantir a vida útil do óleo essencial encapsulado após o processo de secagem (JAFARI *et al.*, 2008).

Ao mesmo tempo, ao selecionar o material que será utilizado como polímero, é preciso avaliar sua compatibilidade com o meio ambiente, sendo este um desafio no desenvolvimento de biopesticidas (RAMÍREZ *et al.*, 2010). Considerando o conceito central dos biopesticidas, em que estes são compostos com alta capacidade inseticida intimamente relacionada ao baixo poder residual e não tóxico (Fernández-Pérez *et al.*, 2014), é coerente inferir que o material que será utilizado para reter estes composto também apresentará estas características. Assim, tem-se explorado a utilização de biopolímeros para a obtenção de produtos ambientalmente compatíveis.

Dentre os produtos mais utilizados no processo de encapsulamento de óleos essenciais por Spray Dryer, encontram-se os carboidratos e as proteínas (MADENE *et al.*, 2006; JAFARI *et al.*, 2008). Os carboidratos são considerados bons agentes encapsulantes devido ao custo de obtenção e apresentarem baixa viscosidade com alto teor de sólidos e boa solubilidade (MADENE *et al.*, 2006; GHARSALLAOUI *et al.*, 2007; JAFARI *et al.*, 2008). Entretanto, a maioria não possui as propriedades interfaciais necessárias para promover uma alta eficiência de encapsulamento sendo, em geral, utilizados em associação com outros materiais encapsulantes, como as proteínas (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

Dentre os carboidratos mais utilizados encontram-se a maltodextrina, pectina, amido modificado, goma acácia e ciclodextrinas (JAFARI *et al.*, 2008). Outros compostos como os amidos, sacarose e glicose são relatados como inadequados para a secagem por nebulização em Spray Dryer devido a sua caramelização e adesão a superfície da câmara de secagem (BAYRAM *et al.*, 2005).

Por outro lado, propriedades funcionais das proteínas tais como solubilidade, formação de filmes, interação com a água, emulsificação e estabilização de gotículas em emulsão, capacidade de auto associar-se e interagir com uma grande variedade de substâncias, cadeia molecular flexível as classificam como um interessante material que atua isoladamente no encapsulamento de óleos essenciais (MADENE *et al.*, 2006; GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). Neste grupo tem-se avaliado as

proteínas de soja, do soro do leite, leite em pó desnatado, caseínatos e a gelatina (JAFARI *et al.*, 2008).

A gelatina é obtida a partir da hidrólise do colágeno, principal constituinte da proteína fibrosa nos ossos, cartilagens e pele (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011). Durante o processo de obtenção, o colágeno é desnaturado perdendo a sua conformação e após rearranjo das ligações moleculares obtém-se a gelatina, cuja composição de aminoácidos não está claramente definida (DUSCONSEILLE *et al.*, 2015).

A gelatina tem-se destacado como um biopolímero, pois a sua superfície externa promove a formação de um filme contínuo ao redor das gotas do mais variados óleos essenciais, garantindo a eficiência do processo de encapsulamento (Moretti *et al.*, 2002). A formação do filme é promovida pelas interações hidrofóbicas, eletrostáticas e ligações de hidrogênio realizadas pela molécula (DUSCONSEILLE *et al.*, 2015). Pode-se verificar na Figura 1.8, por exemplo, que a estrutura da gelatina é estabilizada por ligações de hidrogênio formadas entre os resíduos de aminoácidos intra e intermoleculares e outros compostos presentes no meio, como a água (DUSCONSEILLE *et al.*, 2015).

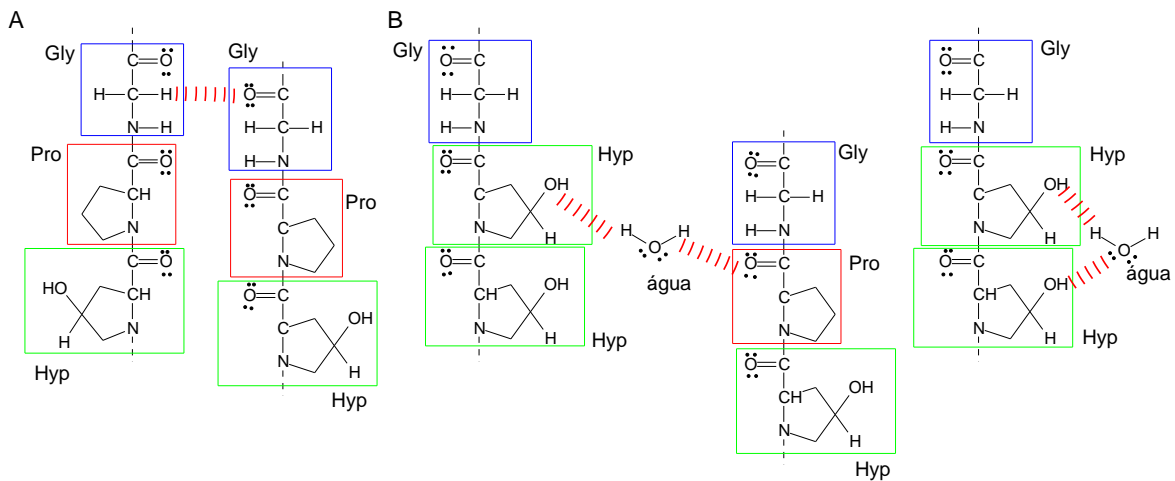


FIGURA 1.8 - Representação das ligações de hidrogênio (traços vermelhos) em (A) cadeias de gelatina e (B) entre cadeias de gelatina e a água. (Gly = resíduo de glicina; Pro = resíduo de prolina; Hyp = resíduo de hidroxiprolina).

Adaptado de DUSCONSEILLE *et al.* (2015).

Além dos biopolímeros mencionados, os materiais lignocelulósicos, abundantes na natureza e renováveis, têm sido utilizados como alternativas aos recursos fósseis (CHOWDHURY, 2014). Em sua composição encontra-se a lignina, um dos biopolímeros mais abundantes na natureza (MULDER *et al.*, 2011), cuja estrutura ramificada é composta pela polimerização das unidades derivadas dos três álcoois representados na Figura 1.9.

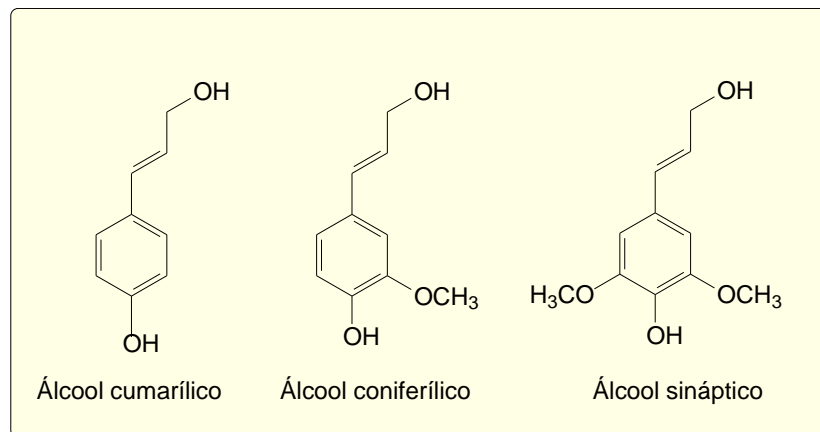


Figura 1.9 - Representação das estruturas químicas dos álcoois cumarílico, coniferílico e sináptico.

Adaptado de DAVIN e LEWIS (2005).

Devido à suas propriedades funcionais interessantes, tais como ser amorfa, formação de filmes, seu caráter hidrofóbico e fácil biodegradação no ambiente a lignina tem sido um interessante grupo de matérias utilizado no desenvolvimento de novos biopesticidas (TUOMELA *et al.*, 2000; MULDER *et al.*, 2011). No entanto, não encontramos trabalhos na literatura que tenham encapsulado óleos essenciais utilizando lignina como matriz polimérica para o controle de insetos pragas.

1.8 - Uma praga de impacto

A *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), pertence à ordem Lepidóptera e à família Noctuidae (SCHMIDT-DURÁN *et al.*, 2015). Devido ao seu comportamento polífago, alta voracidade, capacidade para formar grandes populações e a taxa de dispersão

elevada, esta espécie é considerada um “praga cosmopolitana” e está classificada no grupo das mais destrutivas na América (MURUA *et al.*, 2003).

É comumente conhecida como "lagarta do cartucho do milho" derivado a sua forma mais conhecida de dano ou "lagarta militar" porque quando a comida se torna escassa, as lagartas transferem-se para outras culturas, movendo-se em massa, como um "regimento" (CASMUZ *et al.*, 2010).

Alimenta-se de mais de 28 espécies de plantas, especialmente de milho, arroz, sorgo, capim, algodão, amendoim, alfafa, aveia, açúcar, cebola, feijão, batata, tomate, trigo, soja, mamona, gergelim, melão e girassol, dentre outras (ZENNER *et al.* 2007).

Ele ataca as culturas com diferentes níveis de densidade, mas sempre prejudicando a produtividade. Quando afeta as plantas jovens, o dano pode ser total, enquanto ao afetar plantas nos estados fenológicos avançados, ainda há a possibilidade de recuperação da cultura e pode-se atingir a produtividade normal (CASMUZ *et al.*, 2010).

De acordo com SCHMIDT-DURÁN *et al.* (2015) as *S. frugiperda* possuem um ciclo de vida com aproximadamente 38 dias, em condições ambientais controladas. Seu ciclo de vida está representado na Figura 1.10.

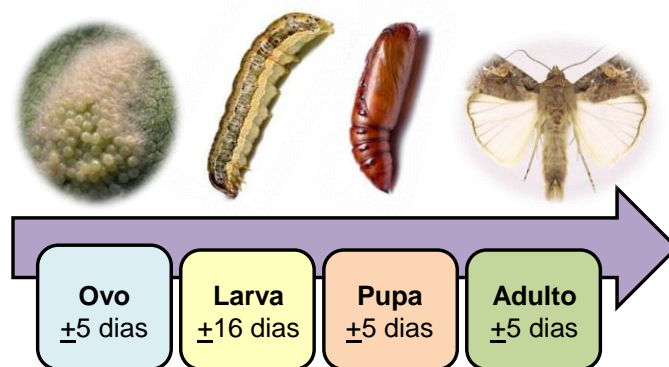


FIGURA 1.10 - As fases do ciclo de vida da *Spodoptera frugiperda*.

Adaptado de SCHMIDT-DURÁN *et al.*, 2015.

No Brasil, a *Spodoptera frugiperda* é a principal praga da cultura do milho (*Zea mays* L., Poaceae), causando perdas no rendimento de grãos que podem chegar a 54,5% (FIGUEIREDO *et al.*, 2006), dependendo das condições climáticas e do estágio de desenvolvimento das plantas atacadas (DEQUECH *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, a severidade do ataque dessa praga vem aumentando em várias regiões produtoras devido ao desequilíbrio biológico causado pela eliminação dos inimigos naturais, bem como pelo aumento na exploração de culturas das quais a espécie se alimenta (CRUZ e MONTEIRO, 2004). Nesse contexto, a grande disponibilidade de hospedeiros alternativos, mais de 80 espécies vegetais incluindo algodão, soja e arroz, é um dos principais fatores que afetam a dinâmica populacional de *S. frugiperda* (CRUZ *et al.*, 2009), intensificando seus níveis de danos.

Porque se alimenta de uma grande diversidade de culturas, este inseto está sendo estudado em vários laboratórios ao redor o mundo. Produtos naturais isolados ou extratos de *Flourensia oolepis* (NAPAL *et al.*, 2009), Ar-turmerone (TAVARES *et al.*, 2013), *Jatropha gossypifolia*, *Melia azedarach* (BULLANGPOTI *et al.*, 2012), Asteraceae (TAVARES *et al.*, 2009), piperina (TAVARES *et al.*, 2011), dentre outros têm sido avaliados como uma alternativa para o controle deste inseto praga.

Neste grupo, os óleos essenciais ainda têm sido timidamente utilizados para o controle da *S. frugiperda* como relatam os trabalhos de LABINAS e CROCOMO (2002), CASTRO *et al.* (2006), LIMA *et al.* (2009) e LIMA *et al.* (2010). Devido a sua elevada volatilidade, nestes estudos tem sido necessário a utilização de diluição em solventes, aplicação direta do óleo essencial sobre o inseto alvo ou a utilização de produtos tais com surfactantes e emulsificantes para aumentar a sua persistência no ambiente de estudo (LABINAS e CROCOMO, 2002; CASTRO *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2009), o que sugere o desenvolvimento de novas tecnologias que promovam a sua persistência no ambiente.

Assim, apesar do seu reduzido tempo de vida, o interesse nestes compostos mantem-se e tem sido estimulado pela sua diversificada composição química que apresenta elevado potencial de bioatividade, com ação repelente em insetos pragas, inibição do crescimento larval, alimentação e reprodução além de apresentarem importantes funções nas atividades ecológicas (GANJEWALA, 2009).

1.9 - Desafios analíticos

Além da etapa de encapsulamento e avaliação da atividade biológica, a extração e quantificação dos óleos essenciais encapsulados também merece atenção. Devido à suas características físico-químicas, o método mais comumente utilizado na análise dos óleos essenciais é a cromatográfica gasosa (CG) associada à alta sensibilidade de detectores, tais como o espectrômetro de massas (EM), ionização em chama (DIC) ou captura de elétrons (DCE) (Cuevas-Glory *et al.*, 2007).

O detector por ionização em chama é um detector que apresenta alta sensibilidade (quantidade mínima detectável de aproximadamente 10^{-12} g), faixa de linearidade ampla, de simples operação e resposta rápida (WANG *et al.*, 2011) que varia pouco com fatores tais como temperatura do detector, fluxo do H_2 e do gás de arraste, dentre outros fatores (HOLM, 1999). Tais fatores o tornaram um detector universal e adequado para as análises de compostos orgânicos voláteis (WANG *et al.*, 2010).

A análise dos compostos orgânicos voláteis em DIC ocorre pela queima de compostos de carbono, que leva a produção de íons (HOLM, 1999). Segundo WANG *et al.* (2010), quando os materiais separados após a eluição na coluna cromatográfica entram em contato com a chama de hidrogênio, as moléculas são decompostas em radicais de carbono singlete através de pirólise (KUIPERS e MÜLLER, 2010). Em seguida, como estes compostos movem-se para a região da chama que contém oxigênio, uma reação de ionização química ocorre (KUIPERS e MÜLLER, 2010; WANG *et al.*, 2010).

O íon CHO^+ formado durante a ionização é instável e reage rapidamente com a água na chama para gerar o hidroxônio e, finalmente, os íons H_3O^+ são coletados pelos eletrodos presentes próximos a chama (“coletor”) (WANG *et al.*, 2010). A corrente gerada a partir dos compostos ionizados coletados é amplificada formando o sinal do detector (HOLM, 1999; WANG *et al.*, 2011).

A corrente de ionização é dependente da grande quantidade de energia liberada durante a oxidação dos radicais de hidrocarbonetos, portanto, é proporcional ao número de átomos de carbono presentes, que é a base de quantificação do DIC como um detector de CG (KUIPERS e MÜLLER, 2010; WANG *et al.*, 2010).

Entretanto, esta técnica requer uma prévia etapa para remoção de compostos não voláteis, como as matrizes poliméricas (HAKKARAINEN, 2007) utilizadas no encapsulamento dos óleos essenciais. Assim, o estudo dos óleos essenciais geralmente envolve etapas de isolamento e concentração das substâncias (SÁNCHEZ-PALOMO *et al.*, 2005), uma vez que estes são formados por uma complexa mistura de substâncias voláteis em quantidades traço (BALASUBRAMANI *et al.*, 2015). Por isso, a composição química dos voláteis é diretamente dependente do método de extração e preparo de amostra.

Estas etapas não são simples e alguns métodos de análises foram desenvolvidos (JUNIOR *et al.*, 2012). Os principais métodos descritos na literatura são a microextração em fase sólida (MEFS) (DELGADO *et al.*, 2011; RIVAS-CAÑEDO *et al.*, 2011; TUCKEY *et al.*, 2013), a extração por solventes (MAGGI *et al.*, 2010; SAMPAIO e NOGUEIRA, 2006) e a extração por *headspace* (BRUNETTO *et al.*, 2009; RIVAS-CAÑEDO *et al.*, 2011).

Dentre as técnicas existentes, uma alternativa interessante é o *headspace*. Os termos “*headspace*” e “análises por *headspace*” foram relacionados, pela primeira vez, em publicações científicas por BOVIJN *et al.* (1958) para o monitoramento de hidrogênio em amostras aquosas. Desde então, a técnica chamou a atenção dos pesquisadores por permitir um preparo de amostras livre de solventes, sendo aperfeiçoada e em constante evolução (BICCHI *et al.*, 2008).

Dentre os tipos de técnicas de *headspace*, o processo estático é um dos mais importantes para as análises por cromatografia gasosa (SNOW e BULLOCK, 2010). O sistema estático analisa a fase vapor presente em um frasco fechado. No processo da análise quantitativa é preciso esperar que um equilíbrio termodinâmico entre a amostra (líquida ou sólida) tenha se estabelecido no sistema (KOLB e ETTRE, 2006) conforme se pode observar na Figura 1.11.

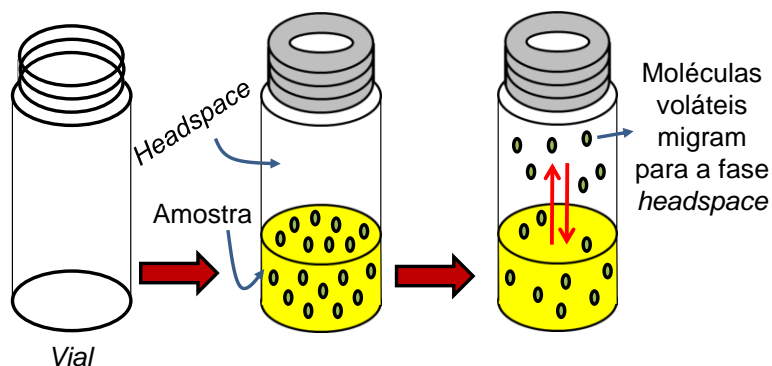


Figura 1.11 - Representação do movimento das moléculas voláteis em um *vial* fechado e submetido a aquecimento.

Adaptado de FREIRE *et al.*, 2008.

Esta técnica é uma boa alternativa por garantir que apenas moléculas voláteis sejam transferidas para o sistema cromatográfico (SITARAMARAJU *et al.*, 2008), o que é interessante na análise de produtos encapsulados, que possuem uma matriz polimérica em sua composição. Além disso, esta técnica não necessita de instrumentos sofisticados (FREIRE *et al.*, 2008), utilização de solventes extratores e grande manipulação da amostra (HELENO *et al.*, 2012). Estas vantagens foram demonstradas nos estudos de QIAN e REINECCIUS (2003), SERRANO *et al.* (2013), RASANEN *et al.* (2010) que realizaram a extração da fração volátil em amostras de queijo, água, sangue e urina respectivamente.

Segundo KOLB e ETTRE (2006) para a utilização eficiente da técnica de *headspace* estático deve-se avaliar os fatores que promovem a migração dos compostos para o *headspace*. Pois, além da sua volatilidade, a sua afinidade na matriz (a amostra na Figura 1.11, que pode ser líquida ou sólida) também é um fator limitante. Se o conteúdo dentro da amostra for mantido por tempo suficiente, as concentrações relativas ao composto entre as duas fases (amostra e *headspace*) atingirá um valor constante (equilíbrio) (KOLB e ETTRE, 2006).

Uma maneira de avaliar o equilíbrio é por meio do coeficiente de partição (K), que é um valor proporcional a concentração de moléculas entre as duas quando o equilíbrio é estabelecido, conforme se observa na equação 1.1.

$$K = C_A/C_{HS}$$

Equação 1.1

Em que C_A representa a concentração do analito na amostra (líquida ou sólida) e C_{HS} representa a concentração do analito na fase gasosa (*headspace*). O coeficiente de partição será influenciado por várias variáveis com o analito, quantidade de amostra, volume do *vial*, temperatura e tempo (KOLB e ETTRE, 2006).

Deve-se levar em consideração a relação do coeficiente de partição com a pressão de vapor, uma vez que ao analisar o *headspace*, pode-se encontrar na fase gasosa uma variedade de compostos e cada um deles influenciará na pressão total observada dentro do frasco (HARLEY e COULTER-BURKE, 2000). O aumento da temperatura no *vial* favorece a vaporização dos analitos e, ao atingir o equilíbrio, a pressão parcial de um dado composto será equivalente a pressão da fase gasosa (MENG *et al.*, 2009). A lei dos gases indica que a pressão total exercida em mistura gasosa será igual a soma das pressões parciais de cada componente individual em uma mistura gasosa (HARLEY e COULTER-BURKE, 2000; KOLB e ETTRE, 2006). Como a concentração de um dado composto no vapor é diretamente proporcional ao número de moléculas presentes, pode-se considerar que sua concentração é proporcional a sua pressão parcial (KOLB e ETTRE, 2006).

Portanto, para se obter sistemas encapsulados contendo óleo essencial de citros, com posterior extração e quantificação por cromatografia gasosa foram desenvolvidas metodologias para encapsulamento por *Spray Drying*, extração por *headspace* e quantificação por cromatografia gasosa. Os produtos obtidos nas melhores condições foram, posteriormente, submetidos a caracterizações microestruturais, físico-químicas e ensaios biológicos.

2 - Objetivos

2.1 - Objetivo geral

Obter um bioinseticida formulado por meio do microencapsulamento de óleo essencial de citros em pó para o controle de *Spodoptera frugiperda*.

2.2 - Objetivos específicos

- a. Melhorar a dispersão em meio aquoso e a retenção do óleo essencial de citros;
- b. Desenvolver protocolos de secagem por *Spray Drying* para produção de micropartículas em pó;
- c. Caracterizar todas as propriedades físico-químicas, morfológicas, cinética de liberação e atividade biológica das micropartículas em pó;
- d. Desenvolver e validar métodos de extração e quantificação do óleo essencial de citros por *headspace* e análise simultânea em cromatógrafo gasoso acoplado a detector de ionização em chama.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Desenvolvimento de metodologias para encapsulamento e quantificação
de óleo essencial de citros

3 - Materiais e Métodos

3.1 - Reagentes

Solução padrão estoque de *d*-limoneno (99% m m⁻¹) obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos da América) foi preparada em acetona com concentração de 50.10³ mg L⁻¹ e armazenada a 4°C. Soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução estoque nas concentrações de 10.10³ e 50.10² mg L⁻¹ no mesmo solvente.

Uma segunda solução de concentração igual a $80.10^2 \text{ mg L}^{-1}$, utilizada como padrão interno, foi preparada pela solubilização do padrão de mentol (Arora Produtos Químicos, São Marcos, Brasil) em acetona.

Como solvente utilizou-se acetona (grau HPLC e obtido da Panreac (Barcelona, Espanha)), *p*-cimeno (99% m m⁻¹) obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos da América) e água ultrapura. Gelatina tipo B (Synth, São Paulo, Brasil), lignina (Suzano, São Paulo, Brasil), nanofibra de lignina, maltodextrina e carboximetilcelulose (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América) foram utilizadas como material encapsulante. O surfactante monoesterato de sorbitano - *span 60* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América) e o adjuvante dióxido de silício coloidal - *aerosil 200* (Evonik, Essen, Alemanha) também foram utilizados.

3.2 – Desenvolvimentos Analíticos

3.2.1 - Extração por *headspace*

A otimização das condições de extração é essencial para o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica e, dessa forma, parâmetros indispensáveis para uma extração utilizando *headspace* foram otimizados. Assim, uma solução de *d*-limoneno a 1 mg L^{-1} , contendo o padrão interno mentol na mesma concentração foi preparada e as seguintes variáveis foram avaliadas: volume de amostra, temperatura de extração, tempo de extração e rotação (MANZANO *et al.*, 2014). Essas variáveis são descritas na Tabela 3.1.

TABELA 3.1 - Variáveis otimizadas na extração do óleo essencial de *d*-limoneno por *headspace*.

Variáveis	Níveis
A Volume de amostra (μL)	2, 10, 20, 50 e 100
B Temperatura de extração ($^{\circ}\text{C}$)	50, 75 e 100
C Tempo de extração (min)	0, 15, 30, 45 e 60
D Rotação (rpm)	0 e 500

Em *vial* de *headspace* (10 mL) foi transferido determinado volume da amostra conforme Tabela 3.1. O frasco foi lacrado com tampa de alumínio e septo de PTFE/SIL.

A extração dos compostos voláteis foi realizada utilizando-se um sistema de *headspace* estático, em que o amostrador do *headspace* está acoplado ao injetor do cromatógrafo a gás (FREIRE *et al.*, 2008). Uma ilustração do sistema pode ser observada na Figura 3.1. O amostrador automático possui um recipiente (forno) para o *vial* que contém a amostra, promovendo o seu aquecimento. Assim, as substâncias voláteis são transferidas ao *headspace* após o sistema atingir o equilíbrio de volatilização (FREIRE *et al.*, 2008).

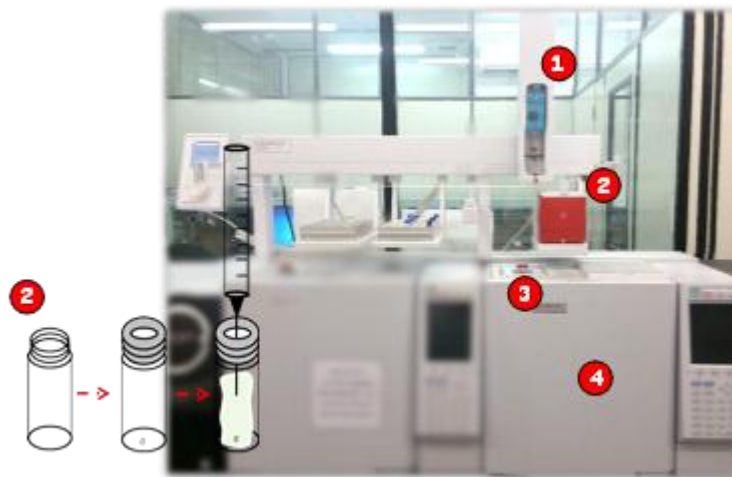


FIGURA 3.1 – Representação de sistema de *headspace* estático (1) autoamostrador, (2) forno e processo de evaporação e equilíbrio que ocorre dentro do vial, (3) injetor e (4) coluna cromatográfica.

Dessa forma, o equilíbrio de extração foi estabelecido em função do tempo e da temperatura em que o *vial* contendo a amostra manteve-se dentro do forno do amostrador (Tabela 2.1.), sendo que, nesse intervalo de tempo, o sistema foi submetido ou não a agitação de 500 rpm. Após este período, 1000 μ L da fase vapor foram recolhidos e injetados no cromatógrafo a gás.

As melhores condições de extração foram avaliadas através da área relativa do *d*-limoneno nos cromatogramas. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas (n=3).

3.2.2 - Separação por cromatografia gasosa

Para as análises cromatográficas foi utilizado cromatógrafo a gás Shimadzu (GC 2010 Plus), acoplado a um detector de ionização em chama (CG-DIC). Utilizou-se coluna capilar ZB-Wax (Phenomenex, fase estacionária de polietilenoglicol, 30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μm espessura do filme). Hélio 5.0 (99,9999%) foi utilizado como gás de arraste. O volume da amostra introduzido foi de 1000 μL no modo de injeção com divisão de fluxo, *split*, utilizando um injetor Combi PAL 5000. Ar sintético (300 mL min^{-1}), hidrogênio (40 mL min^{-1}) e nitrogênio (30 mL min^{-1}) foram utilizados para o DIC.

No processo de análise do *d*-limoneno por CG-DIC, parâmetros cromatográficos foram avaliados com o intuito de determinar as condições ótimas de análise, com menor tempo, baixo custo e elevada sensibilidade. Alguns fatores que influenciam a resposta cromatográfica do analito como fluxo do gás de arraste, *split*, taxa de aquecimento e temperatura do injetor foram avaliados conforme Tabela 3.2.

TABELA 3. 2 - Variáveis avaliadas na análise de *d*-limoneno por CG-DIC.

Variáveis independentes	Níveis
Fluxo do gás de arraste (mL min^{-1})	1,00 e 1,40.
<i>Split</i>	15:1 e 30:1.
Taxa de aquecimento ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)	5 e 15.
Temperatura do injetor ($^{\circ}\text{C}$)	170 e 220.

Os parâmetros propostos (Tabela 3.2) foram avaliados a partir de análises do padrão de *d*-limoneno nas concentrações de 2 e 0,5 mg L^{-1} . A avaliação da eficiência da condição cromatográfica foi determinada em função da intensidade e área do sinal obtido nos cromatogramas.

3.3 - Amostra de óleo essencial

Óleo essencial de citros obtido pela prensagem a frio da casca de laranja da região de Santa Cruz do Rio Pardo, São Paulo (Brasil), foi utilizado neste estudo como material de núcleo volátil. O material apresentava as seguintes especificações: densidade a 25°C: 0,842 g mL⁻¹, índice de refração a 20°C: 1,473; aldeídos: 1,4%.

3.4 - Preparação das micropartículas de óleo essencial de citros por *Spray Drying*

3.4.1 - Caracterização da matriz

Inicialmente foi realizada uma análise da composição de voláteis da mostra de óleo essencial de laranja por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Os compostos voláteis foram analisados em cromatógrafo a gás da Shimadzu (GC 2010 Plus) acoplado ao espectrômetro de massas sequencial (MS TQ8030), com coluna capilar Rtx-5MS (Restek), fase estacionária composta por 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano (30 m x 0.25 mm d.i. x 0,25 µm de espessura do filme) e hélio 5.0 como gás de arraste (1 mL min⁻¹). As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura do injetor 220°C; a temperatura da coluna inicialmente a 60°C foi mantida por 1 min, posteriormente foi aquecida a uma taxa de 3°C min⁻¹ até 230°C, permanecendo nesta temperatura por 1 min. A temperatura de transferência da interface foi de 240°C e a injeção realizada foi do tipo *split* (100:1). O volume de amostra introduzido foi de 1 µL.

O analisador de massas quadrupolar foi operado com varredura na faixa de 40 a 700 u. A identificação dos compostos voláteis foi realizada por comparação com os dados espectrais da biblioteca (NIST 11.0), com aqueles descritos por Adams (1995) e por comparação com o índice de retenção proposto por Van den Dool e Kratz (ADAMS, 1995).

Os índices de retenção (IR) das substâncias foram obtidos pela análise de uma mistura padrão de hidrocarbonetos (C₇ a C₄₀) aplicando-se a equação 3.1, conforme se observa a seguir.

$$IR = 100n + 100[(T_{R(i)} - T_{R(n)}) / (T_{R(n+1)} - T_{R(n)})] \quad \text{Equação 3.1}$$

Em que T_R = representa o tempo de retenção, (i) = analito, (n) = número de carbonos do alcano adjacente menos retido e (n+1) = número de carbonos do alcano adjacente mais retido.

3.4.2 - Seleção dos biopolímeros

Testes preliminares para seleção da matriz biopolimérica que seria utilizada para o encapsulamento do óleo essencial de citros foram realizados. Avaliou-se o potencial de utilização dos cinco biopolímeros: nanofibra de lignina, maltodextrina, lignina, gelatina e carboximetilcelulose. A partir da adaptação de estudos para o encapsulamento de substâncias voláteis com secagem por nebulização em *Spray Dryer* (BOTREL *et al.*, 2012; CARNEIRO *et al.*, 2013; ROCCIA *et al.*, 2014) realizou-se o procedimento discriminado a seguir.

Suspensões coloidais foram preparadas pela mistura de 1500 mg do biopolímero, 840 mg do óleo essencial de citros, 200 mg de surfactante (*Span 60*) e 30 mL de água deionizada, sendo o procedimento conduzido em temperatura ambiente (25 °C). A mistura foi homogeneizada durante cinco minutos em dispersor (Ultra Turrax, IKA, T10 basic) a 20000 rpm.

As condições de secagem por *Spraying Dryer* para a formação das microesferas foram vazão do ar de secagem 536 L h⁻¹; vazão de injeção 35000 L h⁻¹; vazão de alimentação 0,45 L h⁻¹, temperatura do ar de secagem 130±5°C e temperatura de saída do produto seco 60±5°C. As micropartículas foram obtidas em triplicata. Micropartículas controle foram desenvolvidas na ausência do óleo essencial. Os produtos microparticulados foram armazenados sob refrigeração (aproximadamente 10°C).

3.4.3 - Preparo da emulsão e secagem por nebulização

Emulsões foram progressivamente produzidas ao adicionar quantidades conhecidas do biopolímero (mg), do surfactante (mg) e do óleo essencial (mg) em 30 mL de água ultrapura em erlenmeyer (125 mL). Manteve-se o sistema sob agitação a 20000 rpm durante 60 segundos utilizando dispersor (Ultra-Turrax IKA T10 basic, Wilmington, Estados Unidos da América) à temperatura de 20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). A quantidade de material utilizado para a obtenção da emulsão foi avaliada conforme Tabela 3.2.

As emulsões preparadas foram imediatamente transferidas para secador por pulverização (mini *Spray Dryer* BÜCHI, B 290, Flawil, Suíça) equipado com uma câmara de secagem de 500 mm x 200 mm e atomizador com bico de 0,7 mm. Nesta etapa, o erlenmeyer contendo a emulsão foi fechado para proteger o núcleo volátil de evaporação e o sistema foi mantido em constante agitação utilizando um agitador magnético sob temperatura ambiente ($23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$). As condições utilizadas para a secagem por atomização também foram otimizadas conforme a Tabela 3.2. Os produtos secos resultantes foram coletados e armazenados sob refrigeração (aproximadamente 8°C).

A Figura 3.2 apresenta um fluxograma das etapas para a obtenção das micropartículas contendo óleo essencial de citros.

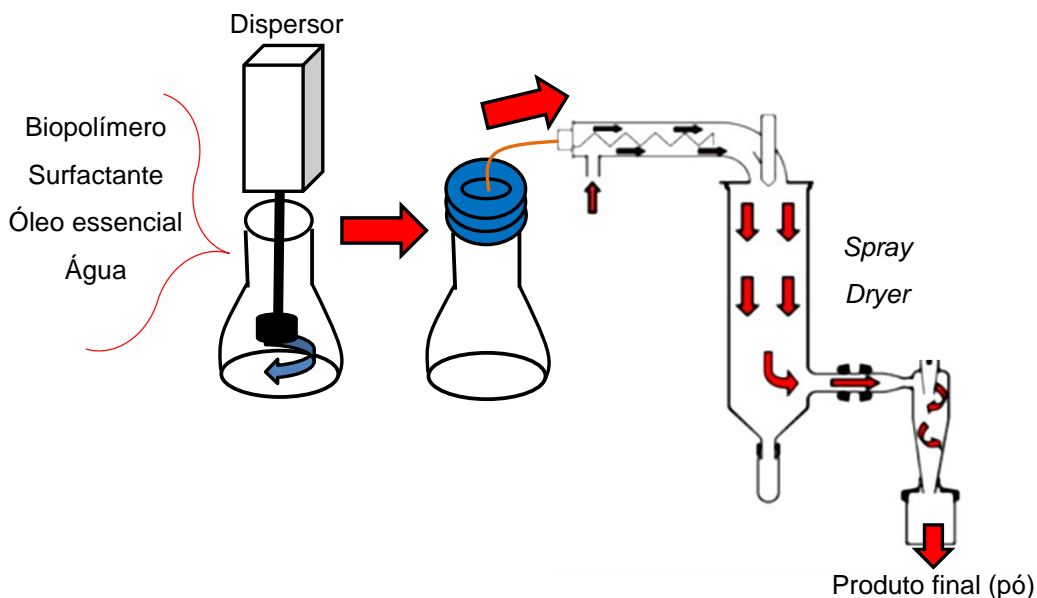


FIGURA 3.2 - Fluxograma dos processos de preparo de amostra e secagem em *Spray Dryer* para obtenção de micropartículas contendo óleo essencial de citros.

3.4.4 - Planejamento experimental

A otimização multivariada foi utilizada para determinar as variáveis que mais influenciam o processo de encapsulamento do óleo essencial de citros por secagem por nebulização. Para isso, foi empregado o Planejamento Fatorial Fracionário com oito variáveis independentes (2^{8-4}), totalizando 16 experimentos. As variáveis avaliadas com alto e baixo incremento: temperatura do ar de secagem (A), vazão de alimentação (B), vazão do ar de secagem (C), vazão de injeção (D), concentração do polímero no solvente (E), relação polímero:adjuvante (F), relação óleo essencial:polímero (G) e surfactante (H) (Tabela 3.3) foram selecionadas a partir de estudos prévios (BOTREL *et al.*, 2012; ROCCIA *et al.*, 2014). Como biopolímeros (material de encapsulamento), avaliou-se gelatina e lignina.

TABELA 3.3 - Níveis codificados das variáveis independentes empregadas na obtenção de micropartículas contendo óleo essencial de citros por secagem por atomização.

	Variáveis	Níveis	
		-1	+1
A	Temperatura do ar de secagem (°C)	110	150
B	Vazão de alimentação (L h ⁻¹)	0,15	0,45
C	Vazão do ar de secagem (L h ⁻¹)	301	536
D	Vazão de injeção (L h ⁻¹)	8000	35000
E	Concentração do polímero no solvente (% (m v ⁻¹))*	5	10
F	Relação polímero:adjuvante (m m ⁻¹)	1:0	1:1
G	Relação óleo essencial:polímero (m m ⁻¹)	1:1,78	1:3,56
H	Surfactante (mg)	0	200

*Volume final de trabalho de 30 mL.

Os experimentos foram realizados em ordem aleatória a fim de minimizar o efeito da variabilidade inesperada nas respostas observadas devido aos erros sistemáticos (FERREIRA *et al.*, 2007a). Como respostas (variáveis dependentes) selecionaram-se o rendimento sólido (porcentagem de material sólido recuperado, m m⁻¹) e a eficiência de encapsulamento (concentração de óleo essencial recuperado nas micropartículas).

A partir do rendimento sólido e da eficiência de encapsulamento calcularam-se os efeitos principais e de interação. Para encontrar uma condição que relacionasse os níveis das respostas (variáveis dependentes) que produziram as respostas mais desejáveis, foi necessário utilizar metodologias estatísticas que tratassem respostas com dimensões distintas ao mesmo tempo (FERREIRA *et al.*, 2007b).

Dessa forma, utilizou-se a função desejabilidade, em que os valores das respostas foram transformados em um valor adimensional, a desejabilidade individual (di), que pode variar de um valor igual a zero (resposta totalmente indesejável) até um valor igual a um (resposta totalmente desejável) (SILVA *et al.*, 2013). O valor de desejabilidade global (D) foi obtido para cada experimento, pelo cálculo da média

geométrica dos valores de desejabilidade individual e foi utilizado para realização dos cálculos dos efeitos principais e de interação das variáveis para o encapsulamento do óleo essencial de laranja (SILVA *et al.*, 2013).

3.5 - Análise das micropartículas

3.5.1 - Rendimento sólido

O rendimento sólido (RS) do processo de encapsulamento foi calculado como o percentual de material seco coletado após a secagem em *Spray Dryer* em relação à quantidade inicial de sólidos no volume de emulsão pulverizado (mg de sólidos em 30 mL de emulsão), conforme equação 3.2.

$$RS = (\text{massa de sólidos}_{\text{inicial}} / \text{massa de sólidos}_{\text{final}}) * 100 \quad \text{Equação 3.2}$$

3.5.2 - Eficiência de encapsulamento

A eficiência do processo de encapsulamento (EE) foi avaliada pela quantificação do teor de óleo essencial interno (encapsulado) e superficial (adsorvido). Para isto, 25 mg do material seco foram ressuspensos em 1000 μL de acetona e mantidos em repouso por 30 min. Em 800 μL da mistura resultante, adicionou-se 100 μL de solução $10 \cdot 10^2 \text{ mg L}^{-1}$ de mentol (padrão interno). Posteriormente, adicionou-se 10 μL da mistura em *vial de headspace* de 10 mL hermeticamente fechado com tampa de alumínio e septo de PTFE/SIL e submeteu-se a amostra a extração por *headspace* com análise simultânea em cromatógrafo gasoso acoplado a detector de ionização em chama (CG-DIC).

Avaliou-se a quantidade de óleo essencial encapsulado utilizando a razão entre a área do *d*-limoneno e a do PI obtidas nas análises cromatográficas. Estes valores foram utilizados em associação com as curvas de calibração construídas para o *d*-limoneno nos diferentes tipos de matrizes propostas com o planejamento fatorial (gelatina, gelatina e aerosil, lignina e lignina e aerosil).

3.5.3 - Características microestruturais

Visualizou-se a morfologia da superfície das micropartículas obtidas nas melhores condições utilizando-se microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram fixadas sobre fita de carbono com revestimento duplo e diâmetro de 12 mm (Koch, São Paulo, Brasil) previamente anexada em suporte metálico de alumínio - *stub* - com diâmetro de 12,7 mm (TAAB, Inglaterra, Reino Unido). Posteriormente, foram metalizadas com uma fina camada de ouro/paládio para obter uma superfície condutora. Após a metalização, as amostras foram observadas com ampliações de 200 a 50000x em microscópio FEI Inspect S50 operando em 25 kV.

Nesta etapa, após a análise das micrografias obtidas selecionou-se as melhores condições para a obtenção de micropartículas contendo óleo essencial de citros. A partir das melhores formulações, procedeu-se com a validação do método, caracterização do produto e realização de ensaios biológicos, conforme se observa a seguir.

3.6 - Validação do método desenvolvido

Para assegurar a credibilidade do método analítico desenvolvido, este foi submetido a uma validação, conforme proposto por THOMPSON *et al.*, (2002) e INMETRO (2010). Os critérios considerados, neste trabalho, para a validação do método de microencapsulamento do óleo essencial de laranja com posterior análise por *headspace* estão dispostos a seguir.

3.6.1 - Seletividade

A seletividade foi avaliada comparando-se os cromatogramas dos extratos obtidos após a extração dos componentes da matriz isenta do analito em estudo, com os cromatogramas dos extratos das micropartículas, preparada e analisada conforme o procedimento otimizado. Avaliou-se a presença ou não de interferentes da matriz eluindo no mesmo tempo de retenção do analito de interesse.

3.6.2 - Avaliação do efeito de matriz

Para avaliar a influência dos componentes da matriz, preparou-se cinco grupos de soluções padrão individuais de *d*-limoneno na concentração de 25, 75, 25.10, 75.10, 20.10² e 30.10² mg L⁻¹). Nestas soluções adicionaram-se 100 µL de solução de mentol a 10.10² mg L⁻¹ utilizado como padrão interno. Para as análises cromatográficas, adicionou-se 10 µL da solução padrão contendo o padrão interno em *vial de headspace* de 10 mL e, assim, as concentrações finais de cada solução padrão foram 25.10⁻³, 75.10⁻³, 25.10⁻², 75.10⁻², 20.10⁻¹ e 30.10⁻¹ mg L⁻¹ contendo 10.10⁻¹ mg L⁻¹ do PI. A evolução dos co-extrativos na resposta cromatográfica foi avaliada pela relação entre a área do analito em solvente puro e a área obtida ao se utilizar padrão preparado em extratos aquosos da matriz (*matrix-matching*) de acordo com a equação 3.3.

$$\text{Efeito de matriz (\%)} = (\bar{A}_{\text{matriz}} - \bar{A}_{\text{solvente}} / \bar{A}_{\text{solvente}} \times 100) \quad \text{Equação 3.3}$$

Em que, \bar{A}_{matriz} é a média das áreas da solução dos analitos preparados em extratos da matriz e $\bar{A}_{\text{solvente}}$ é a média das áreas destes compostos preparados no solvente puro.

Foi utilizando extrato da matriz (gelatina, gelatina e aerosil, lignina e lignina e aerosil) como meio de dispersão para o preparo das curvas em extrato da matriz.

3.6.3 - Curva analítica

A linearidade foi verificada preparando soluções padrão de concentrações crescentes do analito (25, 75, 25.10, 75.10, 20.10² e 30.10² mg L⁻¹) utilizando extrato da matriz (gelatina e lignina) como meio de dispersão. Nestas soluções adicionaram-se 100 µL de solução de mentol a 10.10² mg L⁻¹ utilizado como padrão interno. Para as análises cromatográficas, adicionou-se 10 µL da solução padrão contendo o padrão interno em *vial de headspace* de 10 mL e, assim, as concentrações finais de cada solução padrão foram 25.10⁻³, 75.10⁻³, 25.10⁻², 75.10⁻², 20.10⁻¹ e 30.10⁻¹ mg L⁻¹ contendo 10.10⁻¹ mg L⁻¹ do PI. Após a análise dessas soluções, foi construído um

gráfico relacionando a razão de áreas entre a área do analito e a área do padrão interno com as respectivas concentrações do analito de calibração. Foram obtidos por regressão linear, as equações das retas e os parâmetros que permitiram calcular as concentrações do analito nas amostras. Realizou-se análise de variância (ANOVA).

Nos extratos das amostras de micropartículas adicionou-se a mesma quantidade de PI.

3.6.4 - Limite de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para o *d*-limoneno foram determinados usando os parâmetros da curva analítica. Para este cálculo, construiu-se uma curva analítica utilizando solução padrão de *d*-limoneno nas construída de acordo com o item 3.8. O LD e o LQ foram considerados como 3,3 e 10 vezes, respectivamente, a razão entre os coeficientes linear e angular da curva analítica.

3.6.5 - Linearidade da resposta do detector

A linearidade da resposta do detector foi verificada pela curva analítica preparada, conforme descrito no item 3.8, em que padrão de *d*-limoneno foi preparado nas concentrações especificadas, com três replicatas em cada ponto. Após a análise cromatográfica, foi construída uma curva analítica, relacionando a razão das áreas (área do analito/área do padrão interno) com a concentração do analito. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação (R^2) determinado pela regressão linear. Também verificada pela análise de variância na regressão, exatidão, precisão e recuperação.

3.6.6 - Precisão

A precisão do método de encapsulamento foi verificada sob condições de repetitividade. A repetitividade do método foi determinada, realizando-se o preparando-se sete formulações e extrações idênticas do óleo essencial de citros na concentração

de $10 \cdot 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$, segundo as condições otimizadas de encapsulamento, secagem em *Spray Dryer* e extração por *headspace* determinando o desvio padrão relativo e o coeficiente de variação (CV).

3.6.7 - Exatidão

Entre as maneiras de avaliar a exatidão de um método, pode-se recorrer aos ensaios de recuperação. Os ensaios de recuperação foram realizados em amostras de microcápsulas contendo *d*-limoneno em diferentes níveis: $50 \cdot 10^{-2}$ e $12,5 \cdot 10^{-2}$ e $10 \cdot 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$. Estas amostras em triplicatas foram preparadas de acordo com o método otimizado e analisadas por cromatografia gasosa nas condições descritas no item 3.2.2. A exatidão foi avaliada pela recuperação do analito e pela comparação entre o valor nominal e o observado para cada concentração avaliada.

3.7 - Caracterização das micropartículas

3.7.1 - Cinética de liberação

Para esta etapa de avaliação, as formulações que apresentaram melhores valores para rendimento sólido e porcentagem de encapsulamento do óleo essencial de citros foram preparadas de acordo com as condições do planejamento experimental utilizando gelatina e lignina. Todas as formulações foram preparadas em triplicata.

Para a avaliação da cinética de liberação foram realizados dois ensaios. No primeiro, avaliou-se a influência da temperatura na liberação do óleo essencial encapsulado no produto seco. Dessa forma, 25 mg do produto seco obtido foi pesado em *vial* de *headspace* (10 mL) e adicionou-se 10 μL da solução padrão contendo o padrão interno ($10 \cdot 10^2 \text{ mg L}^{-1}$). O frasco foi lacrado com tampa de alumínio e septo de politetrafluoretileno/silicone e submetido à extração por *headspace* a 40°C e avaliou-se a liberação do *d*-limoneno durante os tempos de 0, 15, 30, 45, 60 e 90 min. Posteriormente, 1000 μL da fase vapor foram transferidos e analisados em CG-DIC.

Para o segundo ensaio, avaliou-se a influência da temperatura na liberação do óleo encapsulado no produto em solução. Dessa forma, 25 mg do produto seco obtido foi pesado em *ependorf* (1500 μL), adicionou-se 1000 μL de água ultrapura e 100 μL da solução padrão contendo o padrão interno ($10 \cdot 10^2 \text{ mg L}^{-1}$). O *ependorf* foi lacrado e submetido à homogeneização em vortex até completa dispersão do material seco (90 s). Posteriormente, 10 μL foram transferidos para *vial* de *headspace* (10 mL). O frasco foi lacrado com tampa de alumínio e septo de PTFE/SIL e submetido à extração por *headspace* a 40°C. Avaliou-se a liberação do *d*-limoneno durante os tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 min. Posteriormente, 1000 μL da fase vapor foram transferidos e analisados em CG-DIC.

3.7.2 - Construção de curvas analíticas para quantificação dos produtos da cinética de liberação

Para esta etapa, fez-se necessário construir novas curvas de calibração, uma vez que as matrizes analisadas eram diferentes das obtidas nas etapas anteriores da pesquisa. Esta etapa foi realizada com a formulação em pó e a formulação dispersa em meio aquoso.

Dessa forma, para a quantificação dos dados obtidos pela liberação do óleo essencial encapsulado no produto seco, construíram-se seis séries de curvas de calibração. Na primeira série foi utilizado acetona como solvente, na segunda óleo mineral e na terceira *p*-cimeno. As curvas foram preparadas utilizando-se como matriz gelatina e lignina, assim, totalizaram-se as seis séries de curvas, todas preparadas em triplicatas.

As curvas de calibração foram construídas nas concentrações de 25, 75, 25.10, 75.10, 20.10² e 30.10² mg L⁻¹. Assim como descrito no item 3.8 sobre o preparo das soluções para construção das curvas de calibração, nestas soluções adicionaram-se 100 μL de solução de mentol a $10 \cdot 10^2 \text{ mg L}^{-1}$ utilizado como padrão interno. Para as análises cromatográficas, adicionou-se 10 μL da solução padrão contendo o padrão interno em *vial* de *headspace* de 10 mL e, assim, as concentrações finais de cada solução padrão foram 25.10⁻³, 75.10⁻³, 25.10⁻², 75.10⁻², 20.10⁻¹ e 30.10⁻¹ mg L⁻¹

contendo $10 \cdot 10^{-1}$ mg L⁻¹ do PI. Após a análise dessas soluções, foi construído um gráfico relacionando a razão de áreas (área do analito/área do padrão interno) com as respectivas concentrações dos analitos. Foram obtidos por regressão linear, as equações das retas e os parâmetros que permitiram calcular as concentrações do analito nas amostras. Realizou-se análise de regressão (ANOVA).

Para a análise dos dados obtidos pela liberação do óleo essencial encapsulado no produto solubilizado em meio aquoso, as curvas foram construídas de maneira similar as obtidas para a análise do produto seco, contudo, como solvente utilizou-se água deionizada. As curvas foram preparadas utilizando gelatina e lignina, em triplicatas, totalizando duas curvas de calibração. Os dados obtidos também foram analisados por regressão.

3.8 - Ensaio biológico contra *Spodoptera frugiperda*

Os insetos de *Spodoptera frugiperda* utilizados nos bioensaios foram obtidos de uma colônia estabelecida a partir de insetos coletados em cultivos de milho da região sudeste do Brasil. As lagartas foram mantidas em meio artificial adaptado ao proposto por KASTEN JUNIOR *et al.* (1978) e os adultos foram alimentados com solução de mel a 10% (m m⁻¹). Ambos foram mantidos em condições controladas: 26 ± 2 °C e fotoperíodo de 14 h de luz e 10 h de escuro.

Os efeitos do óleo essencial encapsulado sobre parâmetros biológicos da *S. frugiperda* foram avaliados em meio artificial utilizando-se as concentrações de 10^2 , 10^3 e 10^4 µg princípio ativo (*d*-limoneno) por g da dieta. Para isso, as micropartículas dispersas em água destilada foram incorporadas em 63 g do meio artificial ao final do seu preparo, quando este apresentava temperatura de 50°C. Como controle, utilizou-se água destilada. Foram preparados ensaios de branco, contendo apenas os materiais utilizados para o encapsulamento (lignina e gelatina) como uma maneira de avaliar a compatibilidade dos produtos utilizados no preparo das formulações. Ensaios contendo extratos de nim, produto natural com ação comprovada no controle da *S. frugiperda*, e contendo *d*-limoneno puro e livre de encapsulamento também foram preparados. Todos

os experimentos foram mantidos em condições controladas: $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 14 h de luz e 10 h de escuro.

Após a incorporação dos tratamentos no meio, aproximadamente 4 mL da dieta artificial foram transferidos para tubo de ensaio de vidro de fundo chato (8,5 cm de altura X 2,5 cm de diâmetro). Em cada tubo, à temperatura, adicionou-se uma lagarta de *S. frugiperda* de segundo instar (aproximadamente 4 mm). Para cada tratamento, utilizaram-se cinco repetições, sendo cada repetição constituída por quatro tubos (n = 20).

As avaliações foram realizadas de dois em dois dias até a formação dos adultos. Os parâmetros avaliados foram a viabilidade, duração da fase larval e pupal, peso das pupas, porcentagem de pupas e de adultos defeituosos e mortalidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Caracterização da Matriz

A caracterização do óleo essencial de laranja foi realizada por espectrometria de massas. O cromatograma obtido pode ser observado na Figura 4.1. Os tipos de compostos voláteis, assim como o tempo de retenção e a área correspondente a cada composto estão apresentados na Tabela 4.1.

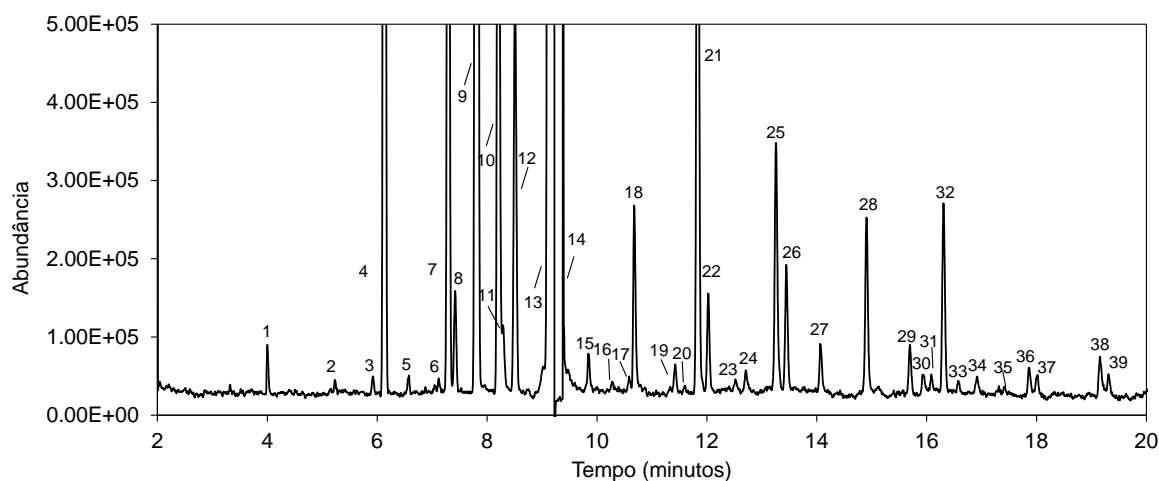


FIGURA 4.1 - Comatograma de íons totais de compostos voláteis do óleo essencial de citros. Os números dos picos referem-se aos compostos da Tabela 4.1.

Foi verificada a presença de 38 compostos. Destes, 24 foram identificados e destacam-se o α -limoneno (77,47%), β -mirceno (11,12%), α -pineno (3,99%) e linalol (1,44%), totalizando 90,03% da área relativa total. Estes terpenos também estavam entre os majoritários em trabalhos com extração do óleo essencial de laranja por *clevenger* (FERHAT *et al.*, 2006), extração com fluido supercrítico (MIRA *et al.*, 1999) e destilação a vapor de micro-ondas (FARHAT *et al.*, 2011) e relacionam-se com a atividade biológica do óleo essencial de citros.

Os ésteres, que têm sido descritos como os compostos essenciais para formação de *flavor* característico em óleo essencial de laranja (QIAO *et al.*, 2008), butanoato de etila, acetato de etila, propanoato de etila e butanoato de metila, comumente presentes no suco de laranja não foram detectados.

O α -limoneno foi o principal componente identificado e, devido a suas características para atuação no controle de insetos pragas (IBRAHUM *et al.*, 2001) e ao seu elevado teor no óleo essencial de citros utilizado, foi selecionado como marcador para avaliação da eficiência de encapsulamento do óleo essencial.

TABELA 4.1 - Áreas relativas dos compostos voláteis de óleo essencial de citros.

Pico nº	Composto	t _R (min.)	I.R.	I.R. _{Ref}	Área relativa (%)	[M ⁺]	Principais Fragmentos m/z (%) ¹
1	heptanal	5,23	903	901	0,01	114	55(64,64); 57(58,14); 70(96,54);
2	n.i.	5,92	959	1002	0,02	136	77(44,04); 91(83,63); 92(48,61); 93(100); 136(13,37)
3	α-pineno	6,13	934	932	3,99	136	77(26,53); 79(24,16); 91(51,15); 93(100); 105(10,71); 136(6,54)
4	canfeno	6,57	950	946	0,02	136	67(27,00); 77(20,72); 79(41,19); 91(38,66); 93(100); 107(30,80); 121(66,67)
5	heptanol	7,12	968	959	0,01	116	41(72,26); 42(53,24); 43(67,26); 55(78,60); 56(83,15); 57(22,52); 70(100)
6	sabineno	7,29	974	969	1,80	136	41(20,88); 77(37,74); 79(28,41); 80(12,85); 91(52,44); 93(100); 136(12,97)
7	β-pineno	7,42	979	974	0,12	136	41(36,45); 69(29,07); 77(20,84); 79(24,67); 80(13,57); 91(32,60); 93(100); 136(5,58)
8	β-mirceno	7,81	992	988	11,12	136	41(92,25); 67(13,48); 69(67,75); 77(15,53); 79(16,89); 91(31,35); 93(100)
9	octanal	8,20	904	998	1,55	128	41(87,87); 43(100); 44(75,71); 56(74,06); 69(39,49); 84(50,77)
10	α-tujeno	8,29	907	924	0,02	136	41(11,84); 77(33,69); 91(65,49); 93(100); 136(24,25)
11	3-careno	8,51	1013	1008	0,57	136	77(30,89); 79(32,29); 91(57,58); 93(100); 105(14,05); 121(19,31); 136(12,38)
12	d-limoneno	9,21	1031	1024	77,47	136	67(89,91); 68(100); 79(40,97); 93(88,01); 94(46,36); 107(27,69); 121(27,38); 136(19,23)
13	n.i.	9,49	-	-	0,01	-	41(21,59); 67(48,13); 119(100); 134(32,20)
14	E-β-ocimeno	9,84	1048	1044	0,03	136	41(28,51); 79(51,57); 91(60,97); 93(100); 105(16,79); 121(13,63)
15	γ-terpineno	10,28	1060	1054	0,01	136	44(27,97); 77(28,25); 91(73,63); 93(100); 107(17,70); 121(22,60); 136(37,95)
16	n.i.	10,58	-	-	0,01	-	43(100); 71(72,71); 81(46,36); 93(89,36); 111(42,26); 121(25,08); 136(28,45)
17	n.i.	10,68	-	-	0,22	-	41(81,64); 43(64,90); 55(79,33); 56(100); 69(65,50); 70(55,93); 83(34,82); 84(40,21);
18	2-careno	11,42	1091	1001	0,04	136	41(23,05); 79(36,87); 91(57,42); 93(100); 105(22,48); 121(69,89); 136(61,55)
19	n.i.	11,60	-	-	0,01	-	41(86,89); 59(51,07); 71(42,15); 79(100); 93(30,40)
20	linalol	11,83	1101	1095	1,44	154	41(73,51); 43(72,28); 55(63,32); 71(100); 80(38,88); 93(92,68); 121(23,06);
21	nonanal	12,03	1106	1100	0,09	142	41(78,30); 43(64,03); 57(100); 70(40,84); 82(33,74); 98(31,48);

22	n.i.	12,52	-	-	0,02	-	41(58,06); 69(100)
23	n.i.	12,71	-	-	0,02	-	43(75,74); 79(93,98); 94(100); 109(84,14); 121(59,25); 137(34,91)
24	n.i.	13,26	-	-	0,37	-	43(100); 67(82,21); 109(43,37); 137(33,52)
25	n.i.	13,45	-	-	0,15	-	43(100); 67(66,99); 79(51,25); 94(61,87); 108 (41,81)
26	citronelal	14,07	1154	1153	0,05	154	41(100); 55(44,43); 69(76,01); 95(50,19); 121(27,93)
27	mentol ²	14,91	1174	1167	0,25	156	55(44,03); 71(90,33); 81(100); 95(82,36); 109(12,83); 123(31,22); 138(12,56)
28	α -terpineol	15,69	1193	1186	0,06	154	59(100); 93(84,05); 121(58,83); 136(49,53)
29	n.i.	15,93	-	-	0,02	-	43(35,66); 67(62,03); 79(100); 94(98,31); 105(39,46); 121(52,34)
30	n.i.	16,08	-	-	0,01	-	67(58,73); 79(95,04); 94(79,96); 105(37,62); 121(100)
31	decanal	16,31	1207	1201	0,27	156	43(100); 57(95,40); 82(54,26); 112(22,89)
32	n.i.	16,57	-	-	0,01	-	43(100); 56(41,98); 70(37,55); 84(34,43)
33	n.i.	16,92	-	-	0,03	-	55(21,49); 84 (50,08); 109(100)
34	n.i.	17,42	-	-	0,01	-	41(70,60); 84(100); 109(76,39); 134(25,78)
35	neral	17,86	1243	1235	0,04	152	41(100); 69(71,66); 109(22,76)
36	<i>d</i> -carvona	18,02	1247	1239	0,02	150	54(48,69); 82(100); 93(43,58); 108 (41,02)
37	geranial	19,15	1273	1264	0,06	152	41(100); 69(94,40); 109(10,77); 137(10,94)
38	perilal	19,31	1277	1269	0,02	150	41(43,20); 67(100); 79(87,03) 107(62,61); 135(35,64)

t_R = Tempo de retenção; n.i. = não identificado; I.R. = índice de retenção; I.R._{Ref} = índice de retenção apresentado por ADAMS (2009);

¹ = Os espectros de massas obtidos podem ser consultados no Apêndice A; ² = adicionado como padrão interno.

4.2 - Análises qualitativas por cromatografia gasosa e detector de ionização em chama: desenvolvimento do método cromatográfico

Para o desenvolvimento do método cromatográfico por CG-DIC, as melhores condições de separação cromatográfica do *d*-limoneno foram avaliadas em função da temperatura do detector, taxa de quecimento, fluxo do gás de arraste e razão *split*. Os cromatogramas obtidos em função da variação destes fatores estão representados na Figura 4.2.

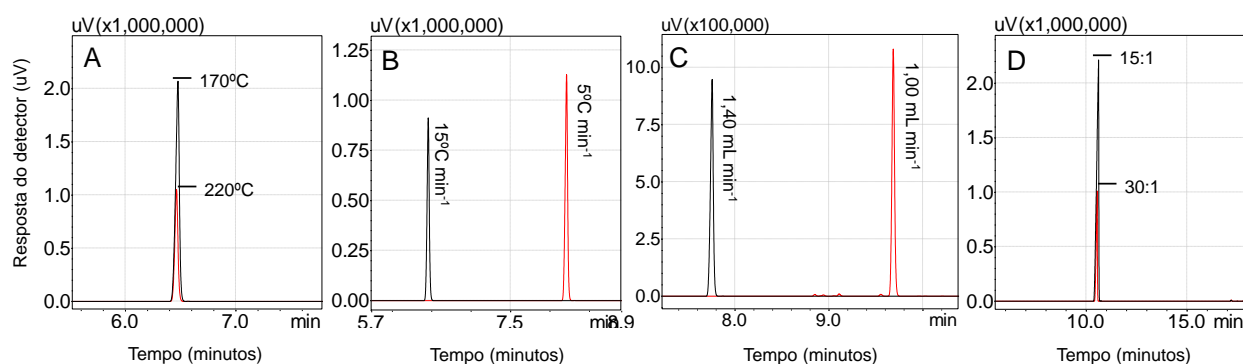


FIGURA 4.2 – Representação do cromatograma da solução padrão de 1 mg L^{-1} do *d*-limoneno em acetona com: (A) temperatura do injetor de 170 e 220°C , (B) taxa de aquecimento de 5 e $15^{\circ}\text{C min}^{-1}$, (C) fluxo do gás de arraste de 1,00 e $1,40 \text{ mL min}^{-1}$ e (D) vazão *split* 15:1 e 30:1.

Na análise por cromatografia gasosa, a temperatura do injetor deve ser elevada o suficiente para garantir uma completa e rápida vaporização da amostra, mas, ao mesmo tempo, deve-se evitar que ela seja elevada ao ponto de promover uma decomposição térmica dos compostos de interesse (LANÇAS, 1993). Em nosso estudo, as temperaturas de 170°C e 220°C foram avaliadas (Figura 4.2 A). Pode-se observar que o aumento na temperatura do injetor para 220°C ocasionou em redução no sinal cromatográfico obtido para o *d*-limoneno, indicando que a temperatura elevada acarretou em alterações na amostra. Sendo assim, selecionou-se 170°C como temperatura do injetor.

Também é interessante que o tempo da análise por cromatografia seja curto, com boa sensibilidade e resolução dos picos (LANÇAS, 1993) e os fatores como taxa de aquecimento e fluxo do gás de arraste relacionam-se diretamente com estas características desejáveis. Como se verifica na Figura 4.2 foi utilizado uma taxa de aquecimento de $15^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e um fluxo do gás de arraste de $1,40 \text{ mL min}^{-1}$ (Figuras 4.2 B e C, respectivamente) para promover menor tempo de análise. Contudo, nestas condições, observou-se diminuição na sensibilidade para o *d*-limoneno com redução do sinal cromatográfico. Portanto, optou-se por utilizar uma taxa de aquecimento de $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e um fluxo do gás de arraste de $1,00 \text{ mL min}^{-1}$.

Para finalizar o desenvolvimento do método cromatográfico, avaliou-se a razão *split*. Pela Figura 4.2 D, pode-se verificar que ao comparar a razão *split* 15:1 e 30:1 não ocorreu alteração na resolução do pico do *d*-limoneno. Dessa forma, optou-se por utilizar um *split* 15:1, pois analisaremos amostras que podem conter quantidades traço do *d*-limoneno e dessa forma, garante-se que maior volume do composto será transferido ao sistema cromatográfico.

Os parâmetros avaliados, nas melhores condições, foram combinados e o cromatograma obtido pode ser observado na Figura 4.3 A. Neste trabalho, a identificação do *d*-limoneno foi realizada por comparação entre os tempos de retenção (t_R) deste nas amostras de óleo essencial de citros com o da solução padrão. Na Figura 4.3. A está representado o cromatograma da solução padrão do *d*-limoneno em acetona. O cromatograma do extrato do óleo essencial obtido após a prensagem a frio do resíduo de laranja é ilustrado na Figura 4.3. B.

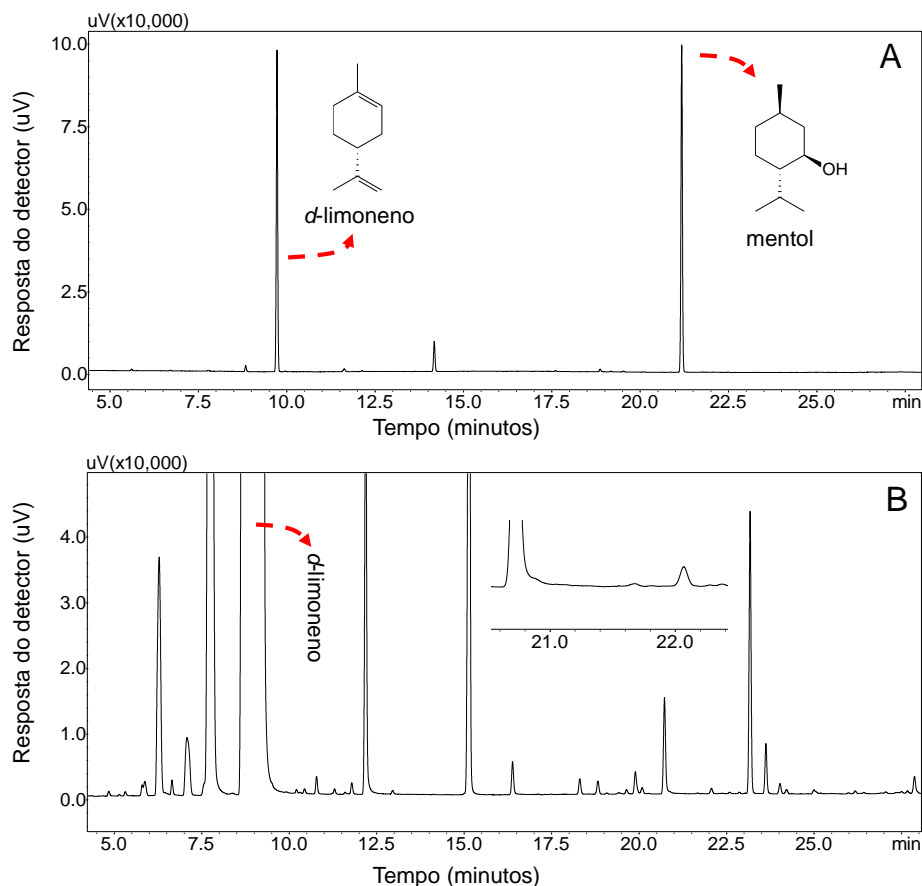


FIGURA 4.3 – Representação do (A) cromatograma da solução padrão de 1 mg L⁻¹ do α -limoneno em acetona, (B) cromatograma da amostra de óleo essencial de laranja contendo α -limoneno ($t_R = 9,73$ min: α -limoneno, $t_R = 21,1$ min: padrão interno).

Pelas características dos cromatogramas (Figura 4.3) observa-se que as condições de análise, como a programação de temperatura, coluna utilizada e o fluxo do gás de arraste, possibilitou uma boa separação do composto avaliado.

Neste estudo, optou-se por utilizar o método de padronização interna, para torná-lo menos sensível a erros aleatórios de injeção e variações instrumentais, como temperatura ou quantidade de amostra (RIBANI *et al.*, 2004; VISENTAINER, 2012). Dessa forma, o mentol foi avaliado como padrão interno. Comparando-se os cromatogramas da amostra do óleo essencial de laranja contendo α -limoneno (Figura 4.3 B) com o da solução padrão do α -limoneno (Figura 4.3. A), observa-se que não há interferentes da matriz no mesmo tempo de retenção do padrão interno.

Além de não estar presente na amostra, ele é acessível, de baixo custo, elui separadamente dos componentes da amostra e é quimicamente similar ao analito de interesse (RIBANI *et al.*, 2004; LIGIERO *et al.*, 2009). Portanto, foi selecionado como padrão interno para as próximas etapas deste estudo.

4.3 - Desenvolvimento da metodologia de extração por *headspace*

Em nosso estudo, o *headspace* estático se destacou como a técnica ideal para a análise dos produtos encapsulados. Os métodos tradicionais, com injeção de uma amostra líquida no sistema cromatográfico, utilizam solventes para extrair as substâncias encapsuladas e que podem solubilizar o material de parede utilizado (polímero) (KOLB e ETTRE, 2006). Neste caso, a solução da amostra obtida, ao ser introduzida no sistema cromatográfico, poderá levar ao acúmulo dos compostos não voláteis do polímero no sistema de injeção e na coluna cromatográfica. Tais fatores podem ocasionar em degradação e alteração no desempenho do equipamento (KOLB e ETTRE, 2006).

A técnica de *headspace* permite a utilização de solventes para favorecer a extração dos compostos voláteis microencapsulados, mesmo que estes também solubilizem o material de parede utilizado, já que apenas a fase vapor será transferida para o sistema cromatográfico (MANZANO *et al.*, 2014; KOLB e ETTRE, 2006). Este processo ocorre devido a baixa pressão de vapor dos biopolímeros utilizados, evitando um acúmulo de pressão adicional na fase gasosa do vial e *headspace* que poderia interferir na sensibilidade ao se determinar os analitos de interesse (MENG *et al.*, 2009). Portanto, apenas substâncias voláteis com maiores pressões de vapor, como os óleos essenciais serão analisadas (MANZANO *et al.*, 2014; KOLB e ETTRE, 2006).

Dessa forma, inicialmente, um estudo para selecionar as melhores condições de extração por *headspace* estático foi realizado. Dentre os fatores que podem interferir na sensibilidade do *headspace*, a temperatura, o tempo de equilíbrio, a quantidade e a agitação do sistema contendo a amostra, são os que mais se destacam (MANZANO *et al.*, 2014).

Alguns testes preliminares foram realizados para determinar uma faixa de trabalho utilizando-se extração dos compostos de uma fase líquida para a fase gasosa (*headspace*). Observou-se que temperaturas superiores à 100°C e volumes superiores a 100 μL , exibiam maior influência sobre a extração dos compostos voláteis. Estes resultados são similares aos obtidos por WEI *et al.* (2011), que selecionaram 120°C e ALVARADO e ROSE (2004), SANZ *et al.* (2001) e GODINHO e BOTTOLI (2013) que obtiveram melhores resultados ao utilizarem 90°C para a extração dos analitos em uma fase líquida para o *headspace*.

Para a temperatura, verificou-se que esta pode favorecer a transferência do analito da fase aquosa para a fase gasosa, diminuindo o tempo necessário para que se atinja o equilíbrio de partição (SANTOS *et al.*, 2009). Já que, o aumento da temperatura favorece a diminuição do coeficiente de partição amostra/ar (K_{aa}), reduzindo a concentração do analito na amostra (líquida ou sólida) e aumentando a sua concentração no *headspace* (WEI *et al.*, 2011).

Em relação à quantidade de amostra dentro do *vial* de *headspace*, foi observado que para uma maior sensibilidade de extração o volume de amostra não deve ser maior que o espaço ocupado pela fase vapor (HELENO *et al.*, 2010). Por isso, iniciamos a nossa triagem com um volume de 100 μL de amostra em um recipiente com capacidade de 10000 μL . Esse volume seria o volume mínimo para as análises futuras.

Contudo, nos estudos, houve uma elevação da pressão de vapor interna ao utilizar 100°C para o volume de 100 μL ocasionando alterações na estrutura do septo que compõe a tampa do *vial* de *headspace* quando utilizado tempo de homogeneização de cinco minutos. Nestas condições, o aquecimento da amostra ocasionou em vaporização parcial do solvente (que apresenta elevada pressão de vapor), aumentando o número de moléculas na fase vapor e resultando no aumento da pressão acumulada no *headspace* (MENG *et al.*, 2009).

Como tais alterações podem interferir na operação do auto injetor, reprodutibilidade e na sensibilidade da técnica (MENG *et al.*, 2009), avaliou-se volumes de amostras de 2, 10, 20 e 50 μL e temperaturas de 50, 75 e 100°C com homogeneização durante cinco minutos. Verificou-se que 10 μL e 75°C eram as condições máximas que não ocasionavam em elevação da pressão interna no *vial* de

headspace. Desse modo, estes parâmetros foram fixados e avaliou-se o efeito do tempo e agitação do sistema.

4.3.1 - Efeito do tempo na extração por *headspace*

O efeito do tempo de extração nas análises do *d*-limoneno em 0, 15, 30, 45 e 60 minutos à 75°C são apresentados na Figura 4.4.

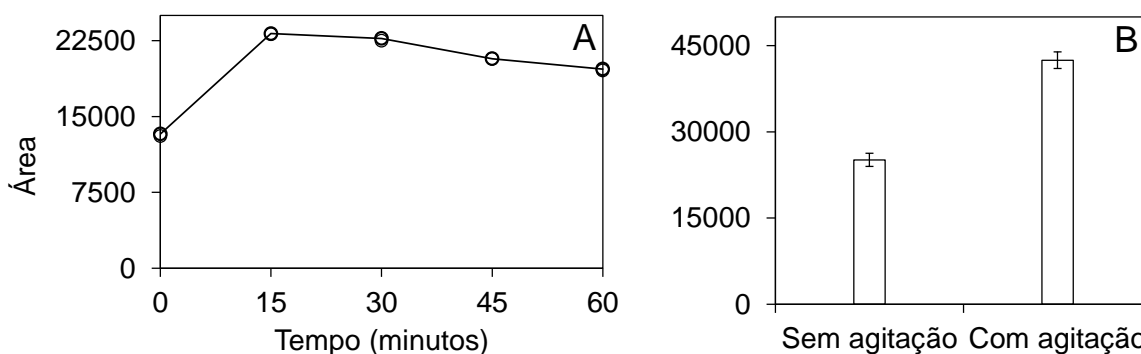


FIGURA 4.4 - Variações na área do *d*-limoneno analisado por CG-DIC A) utilizando 0, 15, 30, 45 e 60 min. de extração por *headspace* e temperatura de 75°C e B) sem e com agitação (500 rpm) como homogeneização na extração por *headspace* à 75°C e 15 min de extração. As condições cromatográficas utilizadas podem ser encontradas no subitem 3.2.2.

Como mostrado na Figura 4.4 A a partir de 15 minutos de extração, ocorreu diminuição da área obtida para o *d*-limoneno. Neste intervalo de tempo ocorreu a completa saturação do recipiente do *vial*, pela total evaporação do solvente e do analito presente. A diminuição no sinal cromatográfico do *d*-limoneno e, portanto, em sua área, pode ocorrer porque após quinze minutos de extração, o vapor de água formado no sistema pode ser transferido para o sistema cromatográfico e interferir na operação do detector (ALVARADO e ROSE, 2004).

4.3.2 - Efeito da agitação na extração por *headspace*

A agitação do *vial* contendo a amostra que será submetida a extração por *headspace* pode influenciar a cinética do equilíbrio de partição entre a fase aquosa e a fase de *headspace* (SANTOS et al., 2009). A agitação auxilia na transferência de massa entre o analito volátil na amostra e a fase vapor, pois permite que as moléculas voláteis sejam mais facilmente difundidas para a superfície da amostra líquida favorecendo a sua distribuição para o *headspace* (WARDENCKI et al., 2003). Portanto, o equilíbrio de partição será atingido em menor intervalo de tempo (LUO e PAWLISZYN, 2000; WARDENCKI et al., 2003).

Neste estudo verificou-se um aumento da eficiência da extração do *d*-limoneno (Figura 4.4. B) quando se emprega agitação. Dessa forma, 500 rpm foram selecionadas para as análises posteriores, assim como a temperatura de 75°C, volume de amostra de 10 μ L e 15 minutos de homogeneização.

4.4 - Seleção do biopolímero para o encapsulamento do óleo essencial de citros por secagem por nebulização

A recuperação do óleo essencial encapsulado e o rendimento sólido obtido ao se avaliar nanofibra de lignina, lignina, gelatina, carboximetilcelulose e maltodextrina podem ser observados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Eficiência de secagem e rendimento sólido obtidos para micropartículas contendo óleo essencial de citros encapsulado nos biopolímeros: nanofibra de lignina, lignina, maltodextrina, gelatina e carboximetilcelulose.

Biopolímero	Recuperação do óleo essencial (mg g ⁻¹)	Rendimento sólido (m m ⁻¹) (%)
Nanofibra de lignina	0,102	0,977
Lignina	4,44	71,9
Maltodextrina	2,96	75,0
Gelatina	15,9	61,0
Carboximetilcelulose	4,03	58,0

Na Tabela 4.2 observa-se uma maior retenção do óleo essencial quando se utilizou gelatina como matriz biopolimérica (15,9 mg g⁻¹). Outros polímeros, como lignina e maltodextrina também não apresentaram uma elevada recuperação do óleo essencial, mas apresentaram um elevado rendimento de secagem (superior a 70%). Estes dados demonstram a necessidade de avaliar as condições instrumentais utilizadas, uma vez que todos os agentes encapsulantes utilizados foram submetidos às mesmas condições, sem uma otimização prévia. Para as próximas etapas, gelatina e lignina foram avaliadas como biopolímeros por apresentaram as maiores retenções do óleo essencial de citros.

4.4 - Desenvolvimento da metodologia de encapsulamento do óleo essencial de citros

A seleção dos parâmetros da metodologia para obtenção de micropartículas contendo óleo essencial de citros são fatores indispensáveis para obtenção de extratos secos com melhores características físico-químicas e aumento do rendimento da operação. Assim, nesta etapa da pesquisa, testaram-se o maior número de parâmetros em diferentes níveis, para avaliar quais seriam os mais significativos no

encapsulamento do óleo essencial de citros utilizando gelatina e lignina como materiais de parede.

A seleção do biopolímero é fundamental para maximizar a retenção do óleo essencial após a conclusão do processo de secagem (FERNANDES *et al.*, 2014). A gelatina foi selecionada por ser um produto natural, biocompatível e rapidamente degradada em produtos não tóxicos (BRUSCHI *et al.*, 2003). Tem sido amplamente utilizada pela indústria de alimentos e farmacêutica no preparo de sistemas de liberação controlada apresentando um baixo custo, estabilidade e fácil acesso para realizações químicas (CHANCHAL *et al.*, 2014).

A gelatina foi avaliada como material encapsulante no encapsulamento de compostos voláteis de manjeriço, eugenol e *Zanthoxylum limonella* (NGAMAKEUE e CHITPRASERT, 2016; SHINDE e NAGARSENKER, 2011; MAJI *et al.*, 2007). Já a lignina, um biopolímero de estrutura altamente complexa, é considerada o segundo biopolímero renovável mais abundante na Terra, pois desempenha importante papel no crescimento e desenvolvimento das plantas (SALAZAR-VALENCIA *et al.*, 2006). O encapsulamento de compostos voláteis com lignina como material de parede reduziu a volatilidade do nootkatone, componente característico do *flavor* da toranja (BEHLE *et al.*, 2011).

Dessa forma, um planejamento fatorial fracionário 2^{8-4} foi realizado para investigar a influência dos principais parâmetros de preparo de amostra e atomização no desempenho da secagem em *Spray Dryer* utilizando diferentes biopolímeros e permitir identificar possíveis interações entre eles. Na Tabela 4.3, podem-se observar os 16 experimentos propostos pelo planejamento experimental e as respostas (variáveis dependentes) correspondentes obtidas.

TABELA 4.3 - Representação da matriz do planejamento fatorial com os níveis codificados e as respostas obtidas em função da eficiência de secagem e de encapsulamento.

Ensaio n ^o	Níveis codificados								Resposta			
									Eficiência de secagem (%)		Eficiência de encapsulamento (mg g ⁻¹)	
	A	B	C	D	E	F	G	H	Gelatina	Lignina	Gelatina	Lignina
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	21,59	31,16	623,6	190,6
2	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	41,63	44,52	322,8	248,8
3	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	17,58	16,88	203,9	115,0
4	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	13,67	25,60	655,6	111,3
5	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	10,98	52,11	648,0	309,6
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	41,13	53,29	269,4	139,1
7	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	43,23	79,85	109,4	88,5
8	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	18,54	59,02	904,1	156,2
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	32,30	43,30	94,71	132,8
10	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	21,18	33,96	805,4	276,5
11	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	15,09	32,66	712,0	125,8
12	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	25,68	34,96	131,3	125,5
13	-1	-1	1	1	1	1	-1	-1	42,78	62,34	136,1	139,8
14	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	44,25	72,70	534,7	236,2
15	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	7,560	50,48	864,0	139,2
16	1	1	1	1	1	1	1	1	49,98	54,13	98,35	201,4

A = temperatura do ar de secagem; B = vazão de alimentação; C = vazão do ar de secagem; D = vazão de injeção; E = concentração do polímero no solvente; F = relação polímero adjuvante; G = relação óleo essencial:polímero; H = surfactante; -1 = nível inferior e 1 = nível superior das variáveis avaliadas.

As variáveis dependentes utilizadas foram o rendimento sólido e eficiência de secagem, ambos importantes parâmetros para avaliar a eficiência do processo de encapsulamento. O rendimento sólido está diretamente relacionado ao caminho percorrido pela amostra líquida (solução, suspensão ou emulsão) no *Spray Dryer* para promover o seu encapsulamento e formação de um fino pó (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). Assim, o rendimento sólido final relaciona-se com a retenção do material na superfície do *Spray Dryer* (câmara de secagem, tubo coletor), alterações na viscosidade da amostra, temperatura, taxa de transferência da amostra, dentre outros (TONON *et al.*, 2008).

A eficiência de secagem, além de avaliar a influência do processo de secagem em *Spray Dryer* no óleo essencial, também avalia o impacto da etapa da formação da emulsão, etapa determinante que desempenha um papel importante no teor de óleo essencial presente ao final do processo (FRASCARELI *et al.*, 2012). Segundo FRASCARELI *et al.* (2012) se uma emulsão estável e com boas condições de viscosidade é obtida, a secagem em nebulizador irá maximizar a eficiência de encapsulamento.

Neste estudo, pode-se verificar que os resultados apresentaram uma alta variabilidade, com relação ao rendimento sólido entre 7,56 e 49,98% ($m\ m^{-1}$) para gelatina e entre 16,88 e 79,85% ($m\ m^{-1}$) para lignina. Embora tenha ocorrido uma ampla variação entre os valores obtidos de rendimento sólido e os obtidos para eficiência de encapsulamento, eles estão adequados ao processo de *Spray Drying* de encapsulamento de óleos essenciais.

Os valores de rendimento sólido obtidos neste estudo são similares aos obtidos em outros trabalhos em que micropartículas contendo óleos essenciais foram preparadas. Por exemplo, nos trabalhos de BRUSCHI *et al.* (2003), TONON *et al.* (2008) e ANEKELLA e ORSAT (2013) o rendimento sólido variou de 24,64 a 55,66%.

Resultados similares também foram obtidos para a eficiência de encapsulamento neste estudo. Observaram-se variações entre 94,71 a 904,1 $mg\ g^{-1}$ para gelatina e entre 88,50 a 309,6 $mg\ g^{-1}$ para lignina. Uma ampla variação também já esperada devido à variação observada no rendimento sólido.

A partir dos resultados obtidos, calcularam-se os efeitos de cada variável independente. Estas tiveram seus níveis codificados variando de -1 a 1. Contudo, como se avaliou duas respostas distintas (eficiência de encapsulamento e rendimento sólido)

e os resultados foram obtidos em dimensões diferentes, fez-se necessário a aplicação da uma metodologia que possui escala adimensional, a desejabilidade (FERREIRA *et al.*, 2007b).

Segundo LAZIC (2004), a aplicação da desejabilidade permite normalizar os valores obtidos a partir dos valores de desejabilidade individual (d_i). Os valores de desejabilidade variam em uma escala de 0 a 1, sendo considerados desejáveis quanto mais próximos os valores forem de 1, conforme se pode observar na Tabela 4.4.

TABELA 4.4 - Padrões de estimativa na escala de desejabilidade.

Estimativa	Desejabilidade	Qualidade do produto
1,00	Excelente	O máximo em satisfação ou qualidade e melhoria.
1,00 – 0,80	Muito boa	Aceitável e excelente.
0,80 – 0,63	Boa	Aceitável e bom.
0,63 – 0,37	Satisfatória	Aceitável, mas pobre. A qualidade é aceitável para os limites de especificação, mas uma melhoria é desejada.
0,37 – 0,20	Ruim	Inaceitável. Materiais desta qualidade levariam ao fracasso do projeto
0,20 – 0,00	Muito ruim	Totalmente inaceitável.

Adaptado de LAZIC (2004).

Os valores de desejabilidade individual e desejabilidade global (média das desejabilidades individuais) obtidos nos experimentos podem ser observados na Tabela 4.5. Nestes estudos, os resultados desejáveis foram considerados os que apresentavam alta eficiência de encapsulamento e alto rendimento de sólidos.

TABELA 4.5 - Valores de desejabilidade individual e global obtidos ao se utilizar gelatina e lignina como material de parede.

Ensaio	Gelatina			Lignina		
	$di_{(RS)}$	$di_{(EE)}$	D	$di_{(RS)}$	$di_{(EE)}$	D
1	0,33	0,65	0,49	0,23	0,46	0,34
2	0,80	0,28	0,54	0,44	0,72	0,58
3	0,24	0,13	0,19	0,00	0,12	0,06
4	0,14	0,69	0,42	0,14	0,10	0,12
5	0,08	0,68	0,38	0,56	1,00	0,78
6	0,79	0,22	0,50	0,58	0,23	0,40
7	0,84	0,02	0,43	1,00	0,00	0,50
8	0,26	1,00	0,63	0,67	0,31	0,49
9	0,58	0,00	0,29	0,42	0,20	0,31
10	0,32	0,88	0,60	0,27	0,85	0,56
11	0,18	0,76	0,47	0,25	0,17	0,21
12	0,43	0,05	0,24	0,29	0,17	0,23
13	0,83	0,05	0,44	0,72	0,23	0,48
14	0,86	0,54	0,70	0,89	0,67	0,78
15	0,00	0,95	0,48	0,53	0,23	0,38
16	1,00	0,00	0,50	0,59	0,51	0,55

$di_{(RS)}$ = desejabilidade individual obtidos a partir dos dados de rendimento sólido; $di_{(EE)}$ = desejabilidade individual obtidos a partir dos dados de eficiência de encapsulamento; D = desejabilidade global.

Através dos resultados obtidos, pode-se observar que o experimento 14 (D = 0,70) seria o melhor para a obtenção de microcápsulas de óleo essencial utilizando gelatina como material de parede. Já para obter-se microcápsulas com lignina como material de parede, a melhor condição seria a dos experimentos 5 e 14, com D = 0,78. A partir dos dados de desejabilidade, foram construídos os gráficos de efeito, conforme se pode observar na Figura 4.5.

Verifica-se que, ao utilizar gelatina como biopolímero, as variáveis vazão de alimentação (B), vazão de injeção (D), concentração do polímero no solvente (E),

relação óleo essencial:polímero (G) e surfactante (H) apresentaram efeitos negligenciáveis (inferiores a 10%). Apenas a temperatura do ar de secagem (A), vazão do ar de secagem (C) e relação polímero:adjuvante (F) tiveram maior influência sobre o processo (Figura 4.5 C).

O efeito positivo da temperatura (Figura 4.5 A) indica maior encapsulamento do óleo essencial e maior rendimento sólido para maiores temperaturas do ar de secagem. Resultados similares também foram obtidos por BORGES *et al.* (2012), FERNANDES *et al.* (2014), SOOTTITANTAWAT *et al.* (2005) e JAFARI *et al.* (2007), em que temperaturas superiores à 130°C favoreceram no encapsulamento do óleo essencial de orégano, óleo essencial de alecrim, mentol e limoneno, respectivamente.

Altas temperaturas relacionam-se com o tempo de secagem e a estrutura da micropartícula obtida (BORGES *et al.*, 2015). O aumento na temperatura favorece o processo de secagem por reduzir a tensão superficial e a viscosidade do material, auxiliando na formação de gotículas (ALVES *et al.*, 2014; GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). Assim, em altas temperaturas, o líquido pulverizado é instantaneamente seco e imediatamente exposto a temperaturas moderadas (50 a 80°C – “temperatura de saída”) o que limita a degradação térmica (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). Além disso, baixas temperaturas de secagem promovem difusão mais lenta da água, o que resulta em maior tempo de secagem, encolhimento e colapso na estrutura (OLIVEIRA e PETROVICK, 2010).

A vazão de alimentação é um parâmetro que deve ser ajustada de maneira que o líquido pulverizado evapore antes de entrar em contato com a superfície da câmara de secagem e ocasiona em perda do material no processo

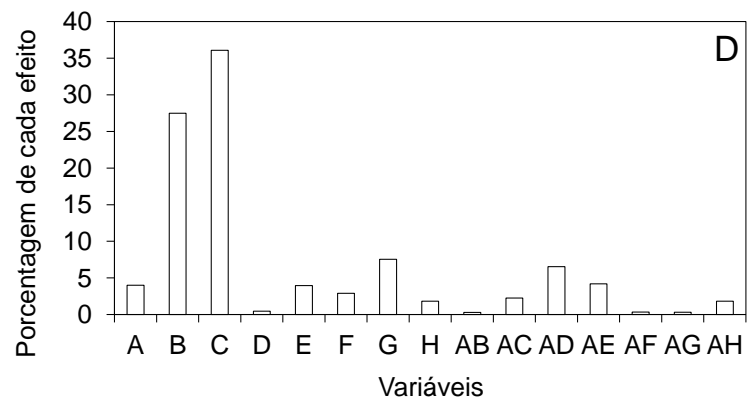
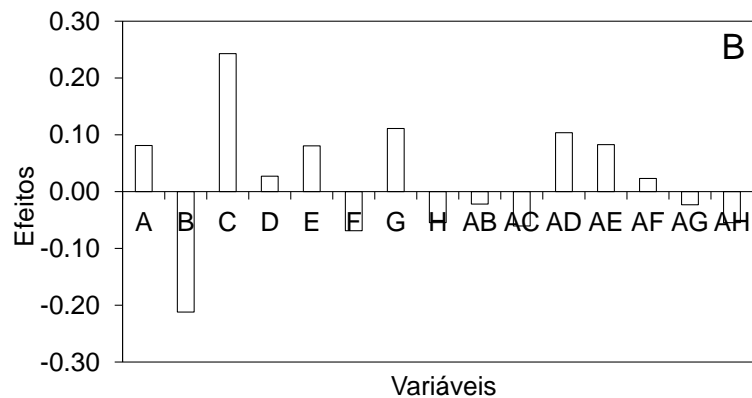
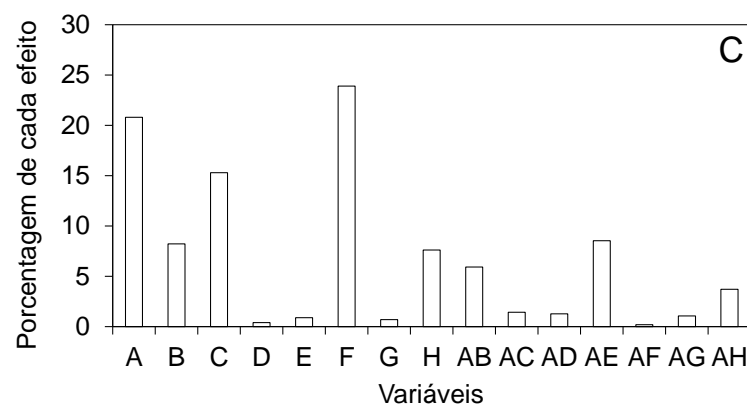
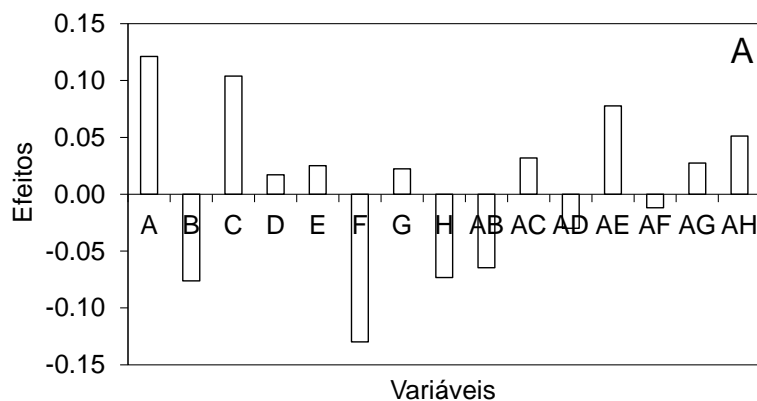


FIGURA 4.5 - Representação dos efeitos das variáveis investigadas sobre o encapsulamento do óleo essencial de citros utilizando gelatina (FIGURA 4.4 A) e lignina (FIGURA 4.4 B) como materiais de parede. Porcentagem de cada efeito das variáveis investigadas ao utilizar gelatina (FIGURA 4.4 C) e lignina (FIGURA 4.4 D) como materiais de parede. Sendo as variáveis avaliadas: A = temperatura do ar de secagem; B = vazão de alimentação; C = vazão do ar de secagem; D = vazão de injeção; E = concentração do polímero no solvente; F = relação polímero adjuvante; G = relação óleo essencial:polímero; H = surfactante.

(OLIVEIRA e PETROVICK, 2010). Neste estudo, este parâmetro apresentou efeito positivo (Figura 4.4 A), em que o aumento da taxa do ar aquecido para a câmara de secagem favoreceu o processo de encapsulamento (Figura 4.5 A). Em 2003, BRUSCHI *et al.* demonstrou que maior fluxo do ar de secagem, além de promover maior rendimento sólido e eficiência de encapsulamento, favorece a formação de produtos com menor teor de umidade.

A relação polímero:adjuvante foi a única a apresentar efeito negativo (Figura 4.5 A), ou seja, a adição de adjuvante em nossa formulação não favoreceu o processo de encapsulamento. Em geral, o uso de adjuvantes tecnológicos (“secadores auxiliares”) tais como dióxido de silício coloidal, maltodextrinas e ciclodextrinas (SOUZA *et al.*, 2007; TEWA-TAGNE *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2013) influencia no rendimento do processo de secagem e na recomposição em água do produto (LINDEN *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2000).

Além disso, os adjuvantes podem reduzir a higroscopicidade dos produtos secos, diminuir a viscosidade e favorecer na formação de gotículas menores resultando em um pó com menor densidade (OLIVEIRA e PETROVICK, 2010). Neste estudo, a presença do adjuvante nos experimentos favoreceu o aumento do rendimento sólido, com a formação de pó fino e solto (Figura 4.6), contudo interferiu na eficiência de encapsulamento (Tabela 4.3). Tais resultados relacionam-se a menor concentração de biopolímero presente, o que levou a formação de micropartículas com superfície biopolimérica menos espessa com menor eficiência para retenção do óleo essencial.



FIGURA 4.6 - Diferenças observadas na textura do pó obtido após a secagem em *Spray Dryer*. Sendo representadas as micropartículas de (A) gelatina, (B) gelatina e aerosil, (C) lignina e (D) lignina e aerosil.

Para os produtos obtidos ao se utilizar lignina como material de parede, verificou-se que a vazão do ar de secagem e a vazão de alimentação tiveram maiores influências sobre o processo (Figura 4.5 D). De maneira geral, os resultados demonstraram que a velocidade de transferência da amostra no *Spray Dryer* foi o fator mais importante para a eficiência de encapsulamento. A combinação entre a mais baixa taxa de transferência de amostra (aproximadamente $0,45 \text{ L min}^{-1}$) e o maior fluxo do ar de secagem (aproximadamente 301 L h^{-1}) ocasionou em uma melhor eficiência neste processo. Menores fluxos de alimentação da amostra permitem, associado a um alto fluxo do ar de secagem, que o líquido presente nas gotículas evapore antes que elas entrem em contato com a parede da câmara de secagem (OLIVEIRA e PETROVICK, 2009).

Comparando os valores obtidos para ambos os polímeros nos experimentos avaliados, pode-se verificar que apesar da lignina promover maior rendimento sólido, a gelatina foi mais favorável no processo de encapsulamento, conforme se pode observar na Figura 4.7.

Essa tendência pode ser explicada pelas propriedades da emulsão, como viscosidade e a tensão superficial (RAJABI *et al.*, 2015). O aumento da viscosidade da emulsão até um ponto compatível ao sistema de secagem por *Spray Drying* geralmente aumenta a eficácia de encapsulamento (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). No caso dos dois polímeros utilizados, os sistemas contendo gelatina sempre produziram uma amostra mais viscosa que os mesmos sistemas contendo lignina. Além disso, conforme verificado por YOSHII *et al.* (2001) a gelatina promove a formação de uma crosta superficial antes do processo de secagem, o que auxilia na retenção do princípio ativo. O mesmo efeito, não foi observado para a lignina.

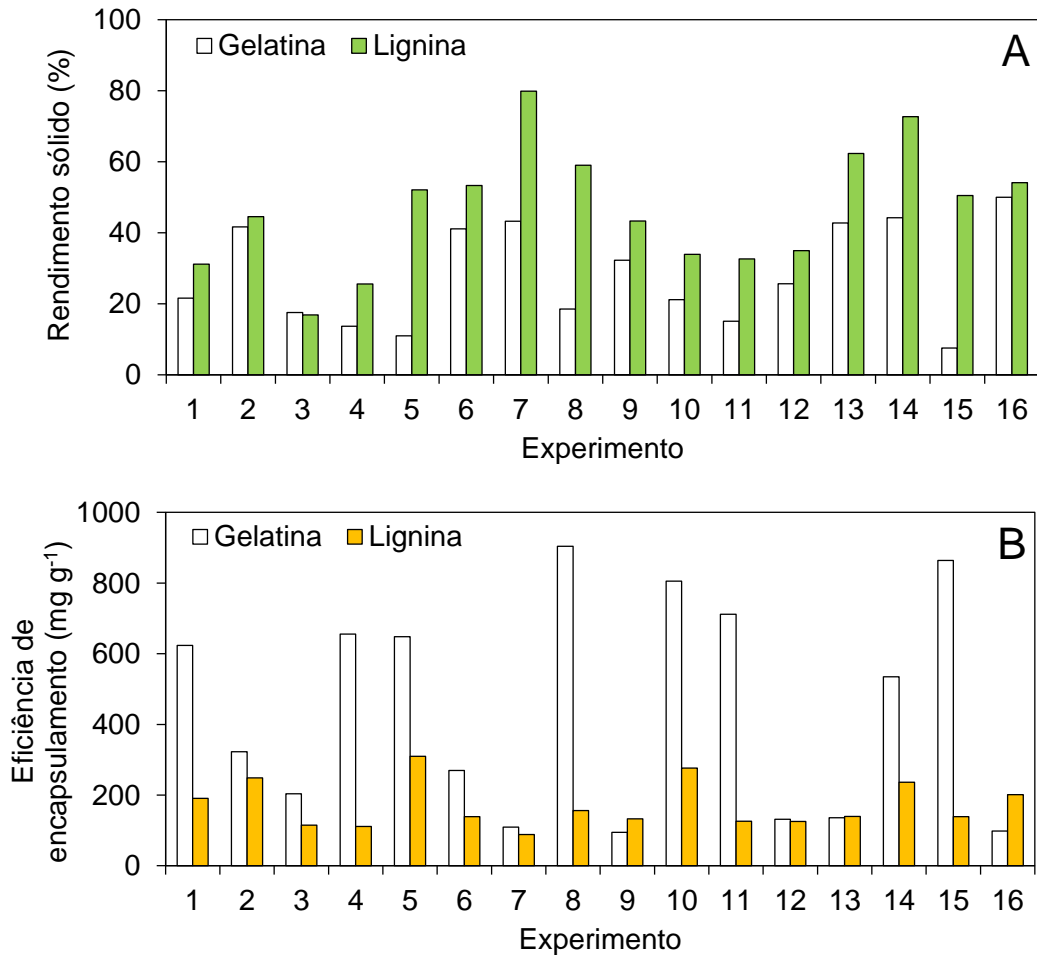


FIGURA 4.7 - Representação da influência do biopolímero utilizado (gelatina e lignina) nas respostas: rendimento sólido (A) e eficiência de encapsulamento (B). Os experimentos de 1 a 16 referem-se ao planejamento fatorial e estão descritos na Tabela 4.3.

Dessa forma, as melhores condições apresentaram eficiência de secagem entre 7 e 44% (gelatina) e entre 44 e 72% (lignina) de massa do produto final e eficiência de encapsulamento entre 320 e 900 mg g⁻¹ para gelatina e 200 e 309 mg g⁻¹ para lignina, considerando-se a relação óleo essencial:polímero. Para ambos os polímeros, não foram observadas interações entre as variáveis.

4.5 - Caracterizações microestruturais

A análise da morfologia das microcápsulas desempenha um importante papel na análise dos extratos obtidos após secagem por *Spray Dryer*, como alterações nas estruturas de incrustação, encolhimento e tamanho das partículas. Assim, foram selecionadas as melhores condições de secagem obtidas a partir da análise de desejabilidade e submetem-se as amostras a análises de morfologia.

Para seleção das amostras obtidas no planejamento experimental, selecionou-se as amostras obtidas nos experimentos 2, 8, 10, 14 e 15 e os experimentos 2, 5, 10, 14 e 16 (Tabela 4.3) para gelatina e lignina como materiais de parede, respectivamente. Estes experimentos foram selecionados por apresentarem os maiores valores de desejabilidade global, maiores teores de eficiência de encapsulamento e apresentarem as maiores porcentagens de recuperação do óleo essencial ao final do processo de secagem, como pode ser observado na Figura 4.8.

Uma representação das micrografias obtidas pode ser observada na Figura 4.9 e na Figura 4.10. As micrografias das micropartículas nas melhores condições de secagem foram microesféricas. As micropartículas obtidas a partir da gelatina (Figura 4.8 A, B, C, D e E) apresentaram, de forma geral, estrutura microesférica, com superfície lisa e contínua, que é vital para impedir a penetração de gases e fornecer uma melhor proteção do núcleo (AGHBASHLO *et al.*, 2012). Já as micropartículas obtidas para lignina não apresentaram superfície porosa. Tais características estão associadas ao material de parede utilizado. As micropartículas obtidas para gelatina e lignina também apresentaram formação heterogênea de tamanho, com diâmetro médio de partícula variando entre 1,85 a 19,5 μm e 1,59 a 16,7 μm para gelatina e lignina, respectivamente.

Embora algumas micropartículas tenham se aglomerado umas às outras, para ambos os polímeros, elas são facilmente delineadas e é possível identificar claramente micropartículas individuais. Isso indica que os aglomerados provavelmente foram formados após a completa secagem de cada micropartícula. Esses resultados corroboram com os obtidos por RODEA-GONZÁLEZ *et al.* (2012) e BOTREL *et al.* (2012), no encapsulamento de óleo essencial de chia e orégano, respectivamente.

As micropartículas também não apresentaram fissuras ou rachaduras que têm, em geral, uma influência significativa na perda da fração volátil dos compostos encapsulados (AGHBASHLO *et al.*, 2012), pois podem favorecer a permeabilidade a gases (FERNANDES *et al.*, 2014).

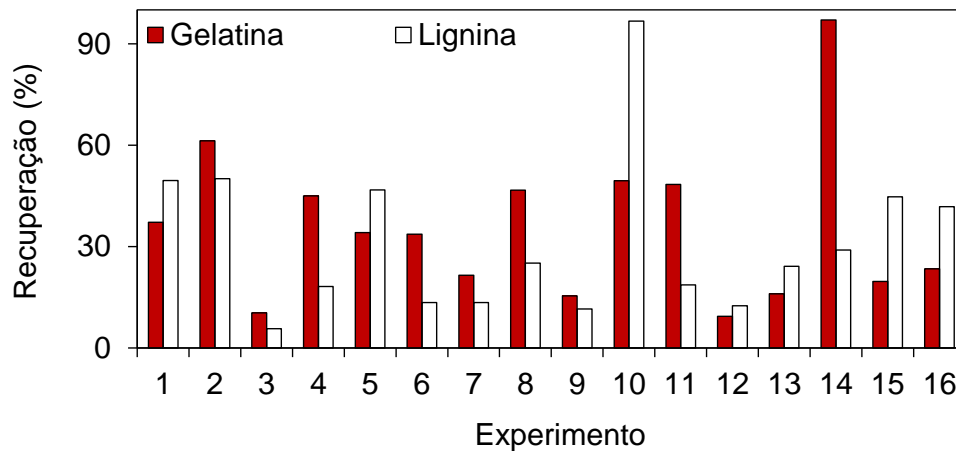


FIGURA 4.8 – Porcentagem de recuperação do *d*-limoneno, considerando-se a quantidade inicial adicionada (mg) e a quantidade final recuperada ao final do processo de secagem em *Spray Dryer*. Os experimentos de 1 a 16 referem-se ao planejamento fatorial e estão descritos na Tabela 4.3.

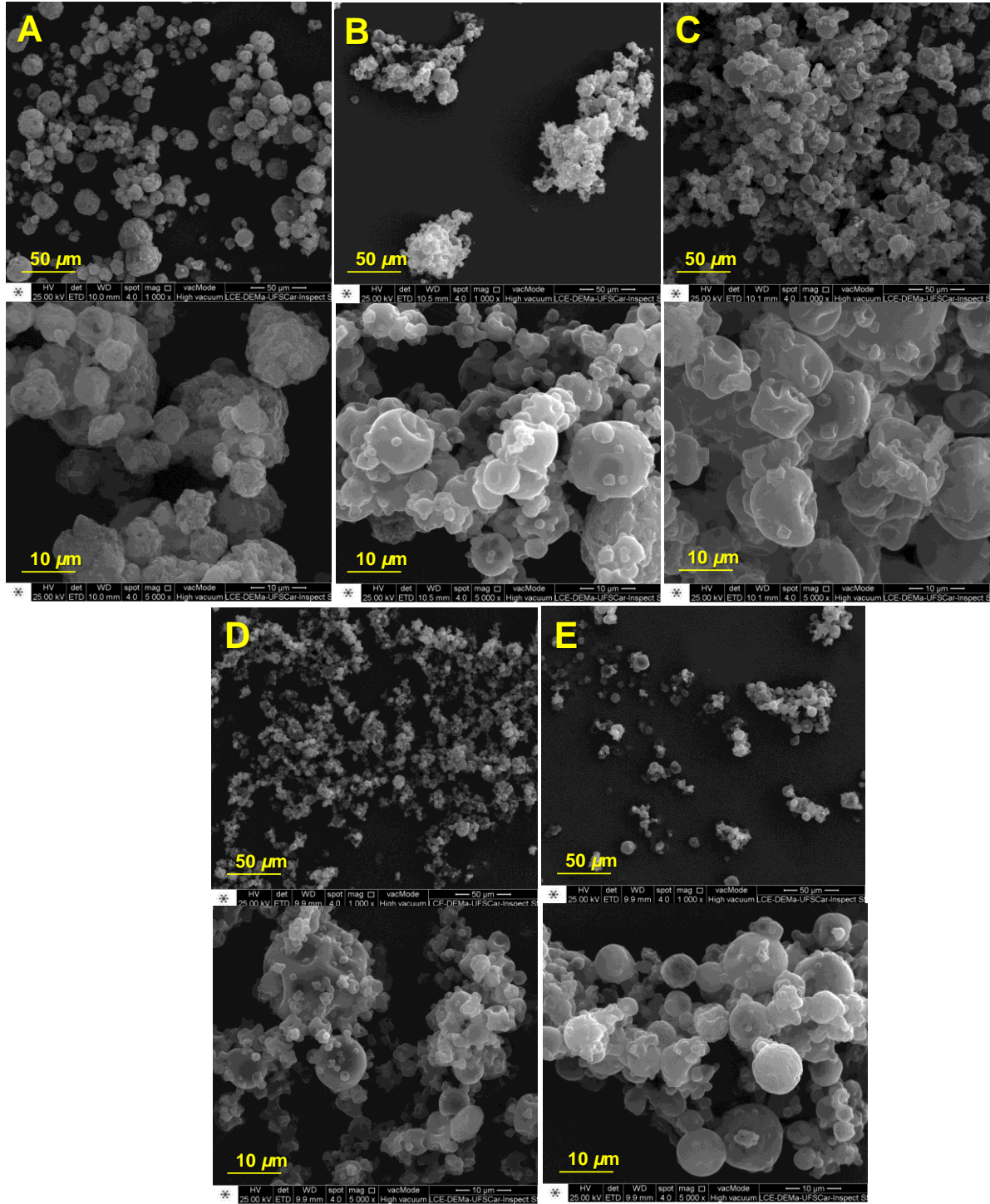


FIGURA 4.9 - Representação das micrografias obtidas pela análise das micropartículas obtidas nos experimentos 2 (A), 8 (B), 10 (C), 14 (D) e 15 (E) utilizando gelatina como biopolímero. Os experimentos de 2, 8, 10, 14 e 15 estão descritos na Tabela 4.3.

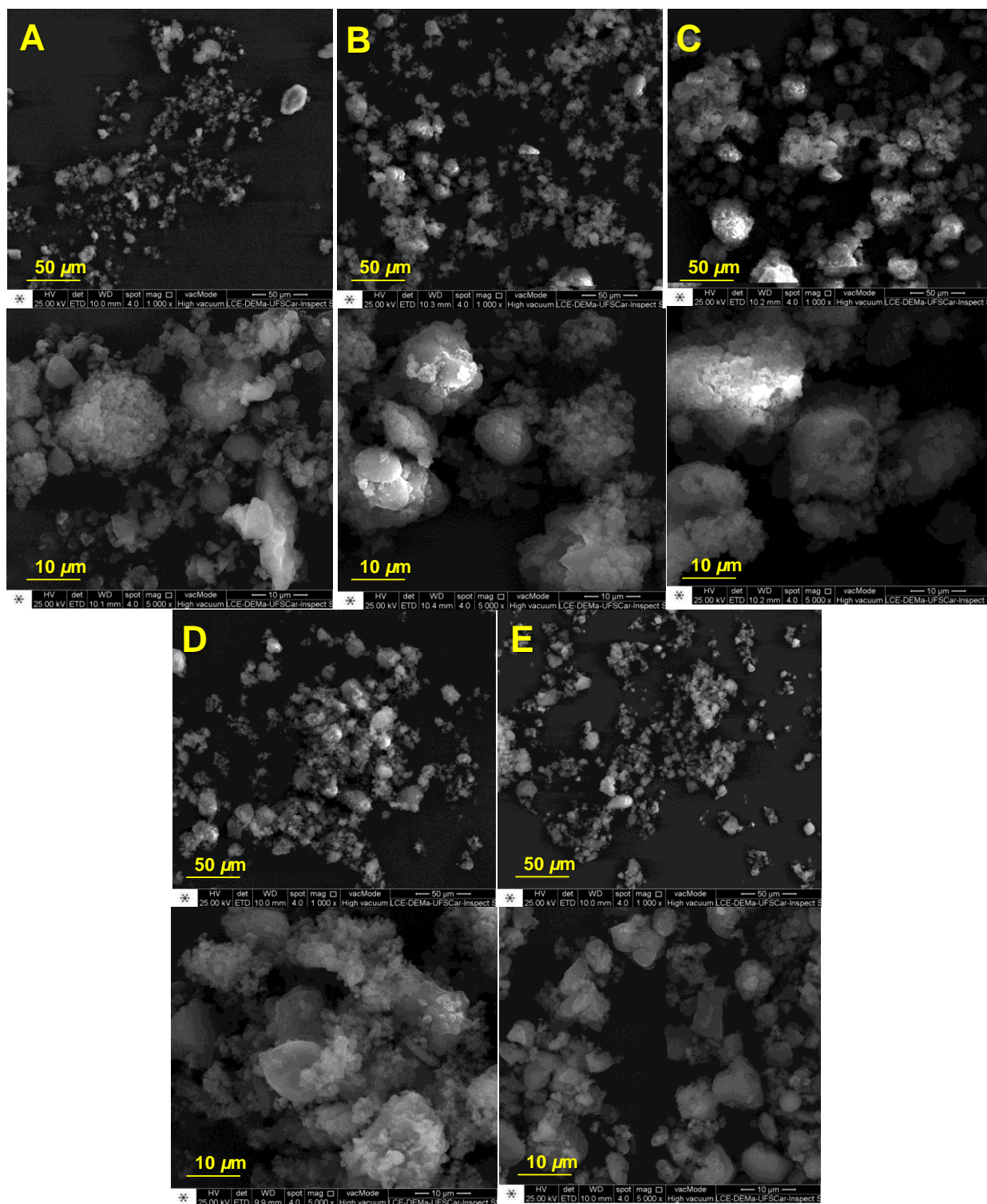


FIGURA 4.10 - Representação das microfotografias obtidas pela análise das micropartículas obtidas nos experimentos 2 (A), 5 (B), 10 (C), 14 (D) e 16 (E) utilizando lignina como biopolímero. Os experimentos de 2, 5, 10, 14 e 16 estão descritos na Tabela 4.3.

Considerando a análise das micrografias, não foi possível verificar diferenças significativas entre as imagens dos produtos de gelatina ou entre os produtos de lignina nos diferentes experimentos avaliados. Dessa forma, optou em selecionar duas formulações de biopolímero. Assim, os experimentos 8 e 14 para gelatina e os experimentos 5 e 10 para lignina foram selecionados para as próximas etapas.

Os experimentos 8 e 5 foram aqueles que apresentaram a maior eficiência de secagem com maior teor de *d*-limoneno por grama de formulação e os experimentos 14 e 10 não apresentaram a maior eficiência de encapsulamento, mas apresentaram maiores porcentagem de recuperação do produto sólido e do óleo essencial, considerando a quantidade de óleo adicionada antes do processo de secagem e recuperada no produto final.

4.6 - Validação

Para avaliar o desempenho dos melhores métodos analíticos desenvolvidos e garantir as suas confiabilidades realizaram-se diversas análises investigando-se parâmetros como a seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão.

4.6.1 - Seletividade

Para avaliar a seletividade do método de encapsulamento, extração e análise por cromatografia gasosa do óleo essencial de citros compararam-se os cromatogramas do extrato obtido na análise de uma matriz de gelatina e lignina isentas de *d*-limoneno (Figura 4.11 A e C) com o extrato da amostra fortificada com o *d*-limoneno (Figura 4.11 B e D).

Observa-se que as amostras de gelatina e de lignina, apesar de possuírem uma composição complexa, não apresentaram interferentes nos mesmos tempos de retenção do *d*-limoneno ou do padrão interno, pois estes biopolímeros não possuem compostos que sejam voláteis nas condições de análise utilizadas.

A seletividade baseia-se na capacidade de um método em quantificar com precisão o analito na presença de todos os outros componentes potenciais na amostra (GONZÁLEZ e HERRADOR, 2007). Portanto, a etapa de preparo de amostra se torna determinante para a eliminação de interferências da matriz que poderiam influenciar a identificação do analito (PRESTES *et al.*, 2009). Neste trabalho, utilizou-se a técnica de *headspace* para extração do óleo essencial encapsulado que também é considerada como uma técnica de *clean up* por garantir que em uma dada matriz, apenas as substâncias voláteis serão extraídas e analisadas (KOLB e ETTRE, 2006).

Dessa forma, o método desenvolvido neste estudo mostrou-se seletivo, pois não apresentou interferentes da matriz no mesmo tempo de retenção do *d*-limoneno. Também se mostrou confiável para a análise do *d*-limoneno uma vez que produz diferentes respostas analíticas para diferentes substâncias, possibilitando distinguir a resposta do analito de interesse (*d*-limoneno) das outras respostas produzidas por componentes da matriz (biopolímeros) (TAVERNIERS *et al.*, 2004).

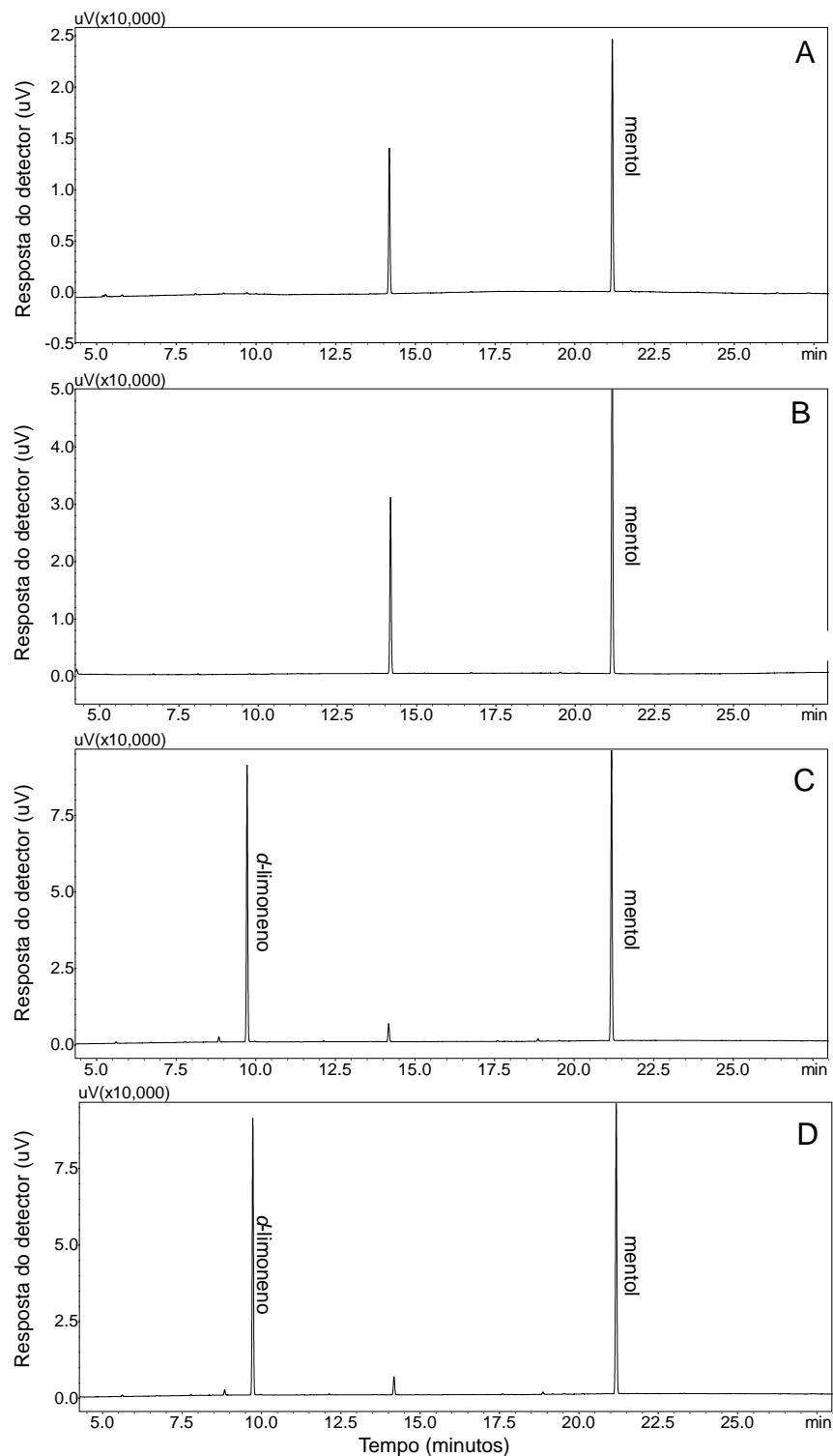


FIGURA 4.11 - Representação do cromatograma do extrato da matriz de (A) gelatina e (C) lignina isentas de *d*-limoneno e fortificadas com 1 mg L⁻¹ de *d*-limoneno para (B) matriz de gelatina e (D) matriz de lignina ($t_R = 9,73$ min: *d*-limoneno, $t_R = 21,1$ min: padrão interno).

4.6.2 - Estudos de calibração

4.6.2.1 - Avaliação do efeito de matriz na porcentagem de recuperação do *d*-limoneno encapsulado

Matrizes complexas podem alterar a resposta do analito em análises cromatográficas (SOUSA *et al.*, 2012). Componentes da matriz, como metabólitos secundários, impurezas ou produtos de degradação, co-eluem ou podem co-eluir junto ao analito interferindo no sinal analítico como, por exemplo, na ionização do analito (CHAMBERS *et al.*, 2007). Além disso, a matriz pode possuir substâncias quelantes que indisponibilizam o composto ou componentes não voláteis que se acumulam no sistema cromatográfico originando novos sítios ativos (FRENICH *et al.*, 2009).

O efeito de matriz pode ser positivo ou negativo, aumentando ou suprimindo o sinal analítico (CHAMBERS *et al.*, 2007). Contudo, independente do efeito provocado, o efeito de matriz prejudica parâmetros analíticos de validação, pois resulta em altas (>100 %) ou baixas taxas de recuperação do analito, interferindo na exatidão e gerando imprecisão dos resultados (CHAMBERS *et al.*, 2007).

Algumas metodologias têm sido propostas para reduzir o efeito de matriz, como a adição de uma etapa de *clean up*, que consiste em remover componentes da amostra, reduzindo a contaminação do sistema cromatográfico (SOUSA *et al.*, 2012). Entretanto, este procedimento pode ser demorado e aumenta o risco de perda do analito ou contaminação da amostra em alguma etapa do processo (FRENICH *et al.*, 2009).

Outra alternativa é a utilização de uma solução padrão preparada em extrato da matriz (*matrix-matching*) (SOUSA *et al.*, 2012). Neste caso, os co-extrativos irão competir com o analito pela ocupação dos sítios ativos do sistema cromatográfico. Estes ficarão predominantemente preenchidos por componentes da matriz, aumentando o número de pratos teóricos da separação, com conseqüente aumento da transferência do analito para a coluna cromatográfica e aumento da eficiência do sistema cromatográfico (KNOW *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2012).

Para avaliar o efeito de matriz na extração do *d*-limoneno, foi realizado um estudo preparando cinco séries de soluções padrão nas concentrações de $25 \cdot 10^{-3}$, $75 \cdot 10^{-3}$, $25 \cdot 10^{-2}$, $75 \cdot 10^{-2}$, $20 \cdot 10^{-1}$ e $30 \cdot 10^{-1}$ mg L⁻¹ contendo $10 \cdot 10^{-1}$ mg L⁻¹ do PI, sendo uma preparada em solvente puro (acetona) e as outras em extratos de gelatina, gelatina:aerosil, lignina e lignina:aerosil. A análise de variância para as curvas obtidas pode ser consultada no Apêndice B.

Na Figura 4.12, a inclinação da curva analítica preparada em acetona e no extrato da matriz de gelatina:aerosil são correspondentes, sugerindo que o *d*-limoneno não apresentou efeito de matriz, ou seja, a presença dos componentes da matriz não interferiram, significativamente, em sua análise cromatográfica.

No entanto, para as soluções padrão preparados em gelatina, lignina e lignina:aerosil, o padrão de *d*-limoneno apresentou uma maior resposta quando comparado a curva obtida em acetona.

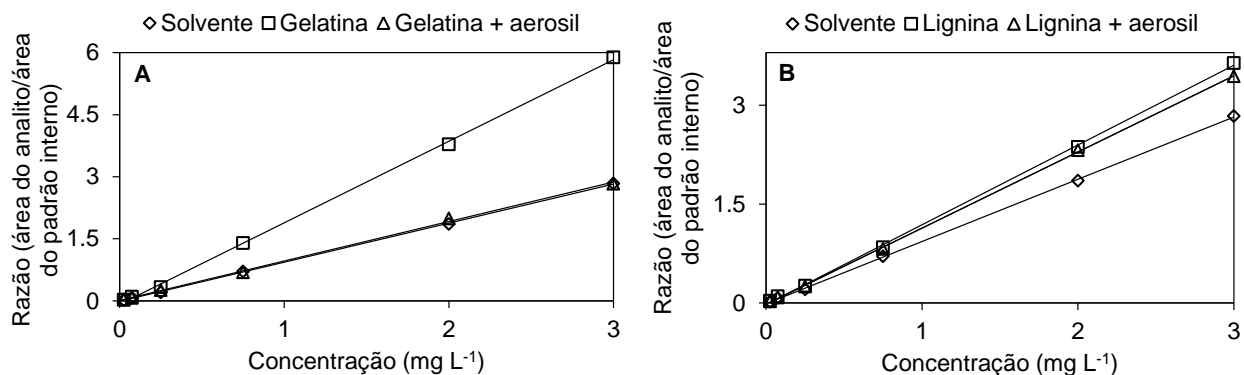


FIGURA 4.12 - Curvas analíticas preparadas em solvente puro (acetona) e em extratos da matriz sendo (A) matrizes acetona, gelatina e gelatina:aerosil e (B) acetona, matrizes lignina e lignina:aerosil.

Na Tabela 4.6, os valores da razão entre os coeficientes angulares (extrato da matriz e solvente) quando superiores a 1,00 indicam efeito de matriz negativo, ou seja, a resposta analítica do *d*-limoneno é reduzida na presença dos componentes da matriz durante as análises por CG-DIC.

TABELA 4.6 - Equações da reta e relação entre os coeficientes lineares e angulares das curvas obtidas em extratos da matriz e em solvente (acetona).

Matriz	Equação	CA _m /CA _s	CL _m /CL _s
Solvente	$y = 0,941x - 0,009$		
Gelatina	$y = 1,972x - 0,086$	2,10	9,77
Gelatina + aerosil	$y = 0,985x - 0,007$	1,05	0,85
Lignina	$y = 1,212x - 0,025$	1,29	2,90
Lignina + aerosil	$y = 1,148x - 0,026$	1,22	3,00

CA_m = coeficiente angular da matriz; CA_s = coeficiente angular do solvente;

CL_m = coeficiente linear da matriz; CL_s = coeficiente linear do solvente;

O mesmo padrão também pode ser observado na Figura 4.13. Nela estão apresentadas as variações da resposta cromatográfica nas taxas de recuperação do *d*-limoneno após o processo de microencapsulamento, quando comparadas com soluções padrão preparadas em acetona e em extratos da matriz. Observa-se que, ao considerar a interferência dos componentes da matriz, as porcentagens de extração do *d*-limoneno apresentaram diferenças de até 80% e 86% para matrizes de gelatina e lignina, respectivamente.

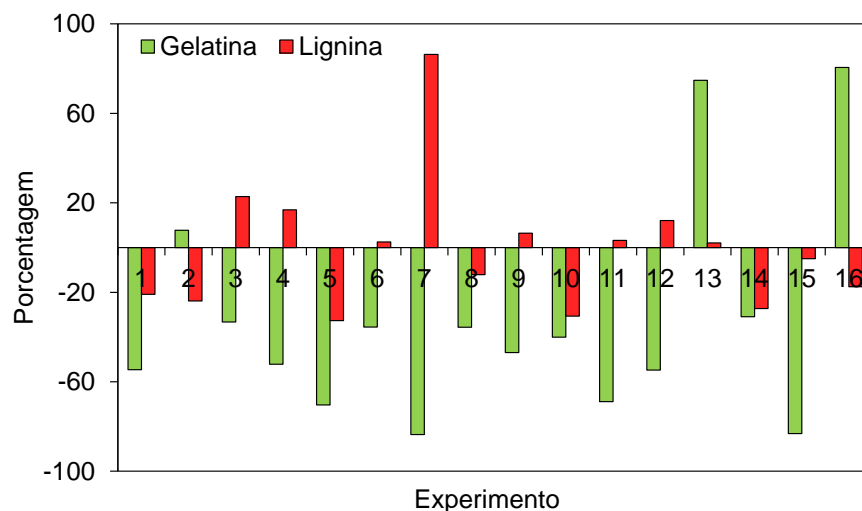


FIGURA 4.13 - Representação da porcentagem de variação da resposta cromatográfica do *d*-limoneno em soluções padrão preparadas em extratos da matriz (gelatina, gelatina:aerosil, lignina e lignina:aerosil) em relação às preparadas em solvente puro (acetona).

As médias das porcentagens de variação foram consideradas estatisticamente diferentes (Apêndice C), confirmando que a matriz possui efeito significativo sobre a exatidão dos métodos na faixa de concentração estabelecida. Dessa forma, a quantificação *d*-limoneno foi realizada utilizando curva analítica preparada em extratos de gelatina e lignina.

4.6.2.2 - Linearidade da resposta do detector

A linearidade do método proposto foi avaliada em função das curvas de calibração preparadas na matriz biopolimérica de gelatina e de lignina e em solvente puro (acetona) (Figura 4.14). Foi utilizado o método de padronização interna, relacionando-se a concentração do *d*-limoneno com a razão das áreas (área do *d*-limoneno/área do padrão interno). Os valores de coeficiente de variação e exatidão obtidos para cada concentração utilizada para a construção das curvas de calibração podem ser verificados na Tabela 4.7. As equações de regressão, os valores dos

coeficientes de correlação encontrados e a relação entre os coeficientes lineares e angulares estão apresentados na Tabela 4.8.

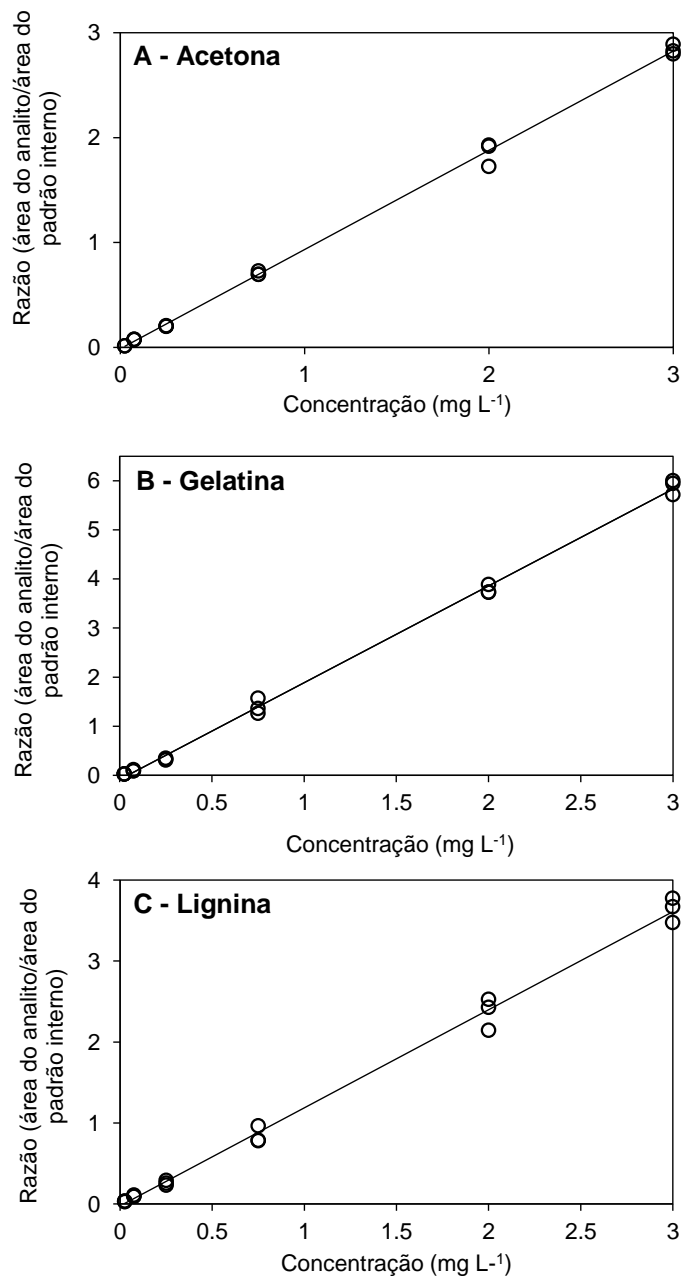


Figura 4.14 - Curvas analíticas preparadas em solvente puro (acetona) (A) e em extratos da matriz sendo (B) gelatina e (C) lignina.

TABELA 4.7 - Concentrações de *d*-limoneno, razão do sinal do analito e do padrão interno, coeficientes de variação (CV) e exatidão para as curvas de calibração preparadas em acetona, gelatina e lignina.

A – Solvente					
Concentração de <i>d</i> -limoneno (mg L ⁻¹)	Razão (sinal analito/sinal padrão interno)			CV (%)	Exatidão (%)
	R ₁	R ₂	R ₃		
25.10 ⁻³	0,01	0,01	0,01	6,31	113
75.10 ⁻³	0,07	0,08	0,08	2,41	123
25.10 ⁻²	0,20	0,21	0,20	1,81	91
75.10 ⁻²	0,73	0,70	0,70	2,77	101
20.10 ⁻¹	1,73	1,93	1,92	6,13	99
30.10 ⁻¹	2,89	2,83	2,80	1,64	100
B – Gelatina					
Concentração de <i>d</i> -limoneno (mg L ⁻¹)	Razão (sinal analito/sinal padrão interno)			CV (%)	Exatidão (%)
	R ₁	R ₂	R ₃		
25.10 ⁻³	0,02	0,03	0,03	4,38	223
75.10 ⁻³	0,12	0,09	0,09	14,9	124
25.10 ⁻²	0,31	0,33	0,35	5,52	84
75.10 ⁻²	1,36	1,57	1,26	11,3	100
20.10 ⁻¹	3,89	3,73	3,73	2,38	98
30.10 ⁻¹	5,72	6,00	5,95	2,59	100
C – Lignina					
Concentração de <i>d</i> -limoneno (mg L ⁻¹)	Razão (sinal analito/sinal padrão interno)			CV (%)	Exatidão (%)
	R ₁	R ₂	R ₃		
25.10 ⁻³	0,04	0,03	0,03	13,0	185
75.10 ⁻³	0,11	0,09	0,10	10,1	136
25.10 ⁻²	0,29	0,25	0,23	11,9	93
75.10 ⁻²	0,96	0,78	0,78	12,5	95
20.10 ⁻¹	2,15	2,43	2,53	8,38	98
30.10 ⁻¹	3,78	3,48	3,67	4,19	100

TABELA 4.8 - Equações das retas e os respectivos coeficientes de correlação obtidos para as curvas preparadas em acetona, gelatina e lignina. Relação entre os coeficientes angulares das curvas.

Matriz	Equação	R^2	CA_m/CA_s
Acetona	$y = 0,941x - 0,009$	0,999	
Gelatina	$y = 1,972x - 0,086$	0,998	2,10
Lignina	$y = 1,212x - 0,025$	0,995	1,29

CA_m = coeficiente angular da matriz; CA_s = coeficiente angular do solvente.

Os valores de correlação encontrados estão de acordo com as normas do ANVISA (2011) que recomenda valores superiores a 0,99. Assim, o detector de ionização em chama apresentou linearidade na faixa de concentração de $25 \cdot 10^{-3}$ a $30 \cdot 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ para o *d*-limoneno para ambas as matrizes utilizadas (acetona, gelatina e lignina).

No entanto, observa-se alteração na sensibilidade (inclinação da função de calibração) avaliada pela razão entre coeficientes angulares das matrizes e do solvente puro, conforme se observa na Tabela 4.8. Assim como também há alteração na exatidão conforme se observa na Tabela 4.7, indicando uma tendência positiva de desvio nos resultados para as menores concentrações do analito.

Observa-se uma maior tendência nas concentrações entre $25 \cdot 10^{-3}$ e $75 \cdot 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ utilizadas para a construção da curva de calibração. Tais alterações são ocasionadas por erros sistemáticos, relacionados, por exemplo, a interferentes da amostra (efeito de matriz). Nos pontos iniciais da curva de calibração os componentes da matriz estão mais concentrados, aumentando a força do efeito de matriz e interferindo significativamente na sensibilidade e eficiência da análise realizada por CG-DIC (KARJOU, 2007). Este efeito é mais acentuado ao se utilizar a gelatina como biopolímero, conforme se pode observar na Tabela 4.8. Verifica-se que ao se utilizar a gelatina como matriz, a curva de calibração apresenta uma maior sensibilidade para detectar variações na concentração do *d*-limoneno.

4.6.2.3 - Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) para métodos cromatográficos representa a menor quantidade da substância estudada que pode ser diferenciada do ruído do equipamento com segurança. Entretanto, o LD não implica que o analito seja quantificável (CHAI e TAN, 2009). O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito que pode ser quantificada com exatidão.

Os valores de limite de detecção e de quantificação para o método proposto foram determinados considerando três e dez vezes a intensidade do sinal do ruído do cromatográfico, conforme equação [sinal do analito/sinal do ruído do equipamento]. Os resultados encontrados estão apresentados Na Tabela 4.9.

TABELA 4.9 - LD, LQ, porcentagem de recuperação (%R) e coeficiente de variação (CV) obtidos após extração da amostra de gelatina e lignina, contendo *d*-limoneno em três concentrações diferentes.

Matriz	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração (mg L^{-1})					
			50×10^{-3a}		$12,5 \times 10^{-2a}$		10×10^{-1b}	
			%R	CV	%R	CV	%R	CV
Acetona	0,031	0,093	-	-	-	-	-	-
Gelatina	0,143	0,433	113,3 \pm 12,4	11,0	126,6 \pm 21,2	16,7	102,2 \pm 4,56	4,50
Lignina	0,069	0,209	117,6 \pm 18,7	15,9	99,9 \pm 18,2	18,2	96,6 \pm 1,19	1,20

^a = média de três repetições; ^b = média de sete repetições; CV = coeficiente de variação.

Os valores de LD e LQ relacionam-se com o desempenho do método validado (GONZÁLEZ e HERRADOR, 2007). Dessa forma, considerando-se os valores de LD e LQ obtidos observa-se um melhor desempenho do sistema cromatográfico ao se utilizar solvente puro (acetona) na construção das curvas de calibração. Contudo, esta menor eficiência para curvas na matriz relaciona-se ao efeito da concentração dos compostos da matriz sobre os valores de LD e LQ. Ao se utilizar curvas analíticas preparadas em extratos das matrizes biopoliméricas, os valores de LD e LQ são aproximadamente 4 (gelatina) e 2 (lignina) vezes superiores aos valores obtidos em

solvente puro. Sugerindo que os componentes da matriz (gelatina e lignina) interferem na sensibilidade e eficiência da análise por CG-DIC.

4.6.3 - Precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade dos resultados. Assim, realizou-se cálculo da estimativa do coeficiente de variação (CV) de sete repetições do procedimento otimizado de encapsulamento, extração por *headspace* e quantificação por CG-DIC. Os coeficientes de variação obtidos para a amostra de gelatina variaram entre 4 e 17% (Tabela 4.7) e para as amostras contendo lignina variaram de 1 a 19%. Estes resultados demonstram repetitividade, uma vez que os coeficientes de variação se encontram abaixo do aceito para amostras complexas (FDA, 2001; ANVISA, 2011).

Segundo RIBANI *et al.* (2004), são aceitáveis CV de até 20% para amostras complexas, como por exemplo, extratos de gelatina e lignina. Resultados similares foram obtidos por CALLEJÓN *et al.* (2008) para a validação da extração por *headspace* dos compostos voláteis de vinagre de vinho. Neste estudo, os autores observam variações de até 30% nos ensaios de recuperação.

4.6.4 - Exatidão

A exatidão do procedimento para encapsulamento por *Spray Drying* e extração do óleo essencial de citros por *headspace* foi avaliada realizando ensaios de recuperação, em que a porcentagem de extração foi calculada adicionando o *d*-limoneno em concentrações superiores ao limite de quantificação (LQ) sendo elas $50 \cdot 10^{-3}$, $12,5 \cdot 10^{-2}$ e $10 \cdot 10^{-1}$ mg L⁻¹. Assim, os ensaios de recuperação foram realizados extraíndo o *d*-limoneno, presente na matriz de gelatina e lignina. Os resultados obtidos para extração do *d*-limoneno, bem como os seus coeficientes de variação estão representados na Tabela 4.9.

Os resultados apresentados na Tabela 4.6, para a extração do *d*-limoneno nos produtos microencapsulados para as diferentes concentrações avaliadas são estatisticamente equivalentes entre si (Apêndice D), mostrando a exatidão do método,

pois há concordância entre os valores experimentais com os valores nominais (“valor verdadeiro”).

4.7 - Cinética de liberação

4.7.1 - Microcápsulas em pó

Na análise da influência da temperatura na cinética de liberação das amostras sólidas inicialmente foi necessário avaliar o solvente de dissolução do analito, do padrão interno e da construção da curva de calibração para, posteriormente, definir como preparar as amostras para quantificação. Em geral, a análise quantitativa de compostos voláteis a partir de amostras sólidas é complexa, havendo falta de literatura adequada, além de materiais de referência certificados a serem utilizados como padrões de calibração para métodos de análise direta (EZQUERRO *et al.*, 2003).

Em geral para as análises de compostos orgânicos voláteis (COV) em matrizes sólidas, têm-se utilizado a técnica de múltiplas extrações por *headspace*. Essas consecutivas extrações são realizadas em uma única amostra com o objetivo de retirar toda a fração volátil presente (EZQUERRO *et al.*, 2003).

Com a técnica de múltiplas extrações, a concentração do analito é reduzida exponencialmente até a exaustão e sua área total pode ser calculada pela soma das áreas de cada extração individual (EZQUERRO *et al.*, 2003). Assim, não ocorre influência da matriz (HAKKARAINEN, 2007), já que toda a fração volátil é extraída, sendo desnecessário preparar uma curva de calibração na matriz (KOLB, 1982). Contudo, na etapa de avaliação da cinética de liberação do óleo essencial microencapsulado, é analisada a fração volátil liberada em função de determinado tempo de extração por *headspace*. Assim, não há a necessidade de realizar a completa extração da fração volátil como sugerido na literatura (EZQUERRO *et al.*, 2003).

Portanto, para a análise da cinética de liberação do óleo essencial de citros microencapsulado, 25 mg da amostra sólida (microcápsulas de gelatina e lignina contendo o óleo essencial) foram transferidos para frasco de *headspace*, submetidos à aquecimento por tempos controlados e a fração volátil extraída foi analisada por CG-

DIC. Para minimizar erros aleatórios foi necessário introduzir um volume conhecido do padrão interno (diluído em solvente). Para a quantificação da fração volátil liberada após a extração por *headspace*, foi necessário construir curvas de calibração na matriz (microcápsulas de gelatina e lignina vazias – sem o óleo essencial de citros).

Para a análise de compostos voláteis retidos em matrizes sólidas deve-se levar em consideração que a presença de uma amostra sólida dentro do frasco de *headspace* pode interferir diretamente na difusão, volatilidade e adsorção do óleo essencial analisado (KOLB e ETTRE, 2006).

A interação dos compostos voláteis com a matriz biopolimérica diminui sua habilidade em se difundir pela amostra sólida, diminuindo sua disponibilidade para volatilização, com conseqüente aumento do coeficiente de partição (KOLB e ETTRE, 2006). Assim, tempos de equilíbrios de volatilização no frasco de *headspace* ao se utilizar matrizes sólidas são mais longos quando comparados com os observados ao utilizarem-se matrizes líquidas. Fatores como o diâmetro, porosidade, umidade e espessura da partícula sólida também influenciam na adsorção, difusão e volatilização do analito volátil em amostras sólidas (KOLB *et al.*, 1984).

Além das características da amostra (sólida ou líquida) a introdução de determinado solvente no frasco de *headspace* pode favorecer, ou não, na extração do óleo essencial. Durante a etapa de extração por *headspace*, a pressão do vapor do solvente afeta na sensibilidade da extração do analito de interesse, além disso, o solvente pode interagir e dissolver moléculas presentes na matriz, como o biopolímero utilizado, também interferindo na sensibilidade da análise (MENG *et al.*, 2009). Contudo, a utilização do solvente na análise das microcápsulas de óleo essencial é indispensável, pois este é utilizado na solubilização do padrão interno e para a diluição do padrão de *d*-limoneno durante o preparo de soluções para a construção de curvas de calibração.

Nesse contexto, objetivou-se determinar um sistema de extração por *headspace* contendo uma amostra sólida similar ao obtido para a análise das microcápsulas em pó contendo óleo essencial de citros. Assim, realizou-se um estudo para avaliar os solventes que menos interfeririam na cinética de liberação do óleo essencial de citros. Dessa forma, tem-se um sistema semelhante ao obtido com o

microencapsulamento do óleo essencial e este poderá ser utilizado para uma adequada quantificação do óleo essencial presente.

Foram selecionados para uma avaliação detalhada da influência do solvente na extração por *headspace*, os seguintes compostos: acetona, óleo mineral e *p*-cimeno. Esses solventes foram escolhidos, pois a acetona é o solvente tradicional utilizado para a solubilização de óleos essenciais e foi utilizado nas etapas anteriores deste estudo em que a amostra era líquida. O óleo mineral foi selecionado por apresentar baixa volatilidade e o *p*-cimeno por ser um óleo essencial (alta volatilidade) que também é utilizado como solvente.

Curvas de calibração foram construídas utilizando acetona, óleo mineral e *p*-cimeno como solventes. Mentol foi utilizado como padrão interno na concentração de $10 \cdot 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$. As soluções de calibração foram preparadas em balão volumétrico e $10 \mu\text{L}$ foram transferidos para frasco de *headspace* contendo 25 mg da amostra sólida (microcápsulas vazias de gelatina e lignina – sem óleo essencial). As curvas de calibração obtidas nas concentrações de $25 \cdot 10^{-3}$, $75 \cdot 10^{-3}$, $25 \cdot 10^{-2}$, $75 \cdot 10^{-2}$, $20 \cdot 10^{-1}$ e $30 \cdot 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ podem ser observadas na Figura 4.15. As equações das retas e os respectivos coeficientes de correlação (R^2) obtidos para as curvas preparadas em acetona, gelatina e lignina podem ser verificados na Tabela 4.10. A análise de variância obtida para as curvas pode ser consultada no Apêndice E.

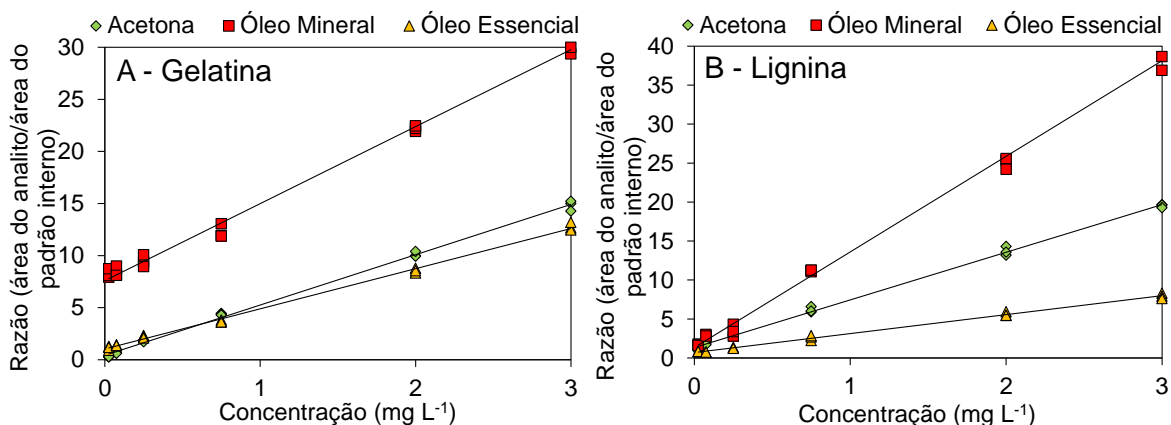


FIGURA 4.15 - Curvas analíticas preparadas em solvente puro, óleo mineral e em óleo essencial (*p*-cimeno) de *d*-limoneno e em amostras de gelatina (A) e lignina (B) como matrizes sólidas.

TABELA 4.10 - Equações das retas e os respectivos coeficientes de correlação (R^2) obtidos para as curvas preparadas em acetona, gelatina e lignina.

Solvente	Amostra			
	Gelatina	R^2	Lignina	R^2
acetona	$y = 4,83x + 0,42$	0,998	$y = 6,10x + 1,34$	0,997
óleo mineral	$y = 7,39x + 7,60$	0,994	$y = 12,3x + 1,34$	0,995
<i>p</i> -cimeno	$y = 3,86x + 1,03$	0,997	$y = 2,43x + 0,69$	0,995

Analisando-se as curvas de calibração na Figura 4.14 e as equações de reta obtida (Tabela 4.10) verifica-se que todas apresentaram boa precisão com R^2 superiores a 0,99. Maior sensibilidade para discriminar entre concentrações diferentes do analito na curva de calibração foi verificada ao utilizar óleo mineral como solvente para ambos os biopolímeros (Figura 4.15 A e B). O óleo mineral foi estudado por ser um óleo de baixa densidade e não volátil (LEE *et al.*, 2001). Assim, na extração do *d*-limoneno por *headspace*, quando o analito encontra-se solubilizado no óleo mineral, este auxilia no seu carreamento, protegendo-o de maneira similar à realizada no processo de microencapsulamento. Esta habilidade em reter o óleo essencial é positiva, pois torna a curva de calibração preparada em óleo mineral mais próxima ao processo que ocorre na análise das amostras obtidas após o processo de encapsulamento.

Utilizando as curvas de calibração, os valores das constantes de partição (K) foram medidos em seis níveis de concentrações diferentes utilizando amostragem por *headspace*. O comportamento de particionamento do óleo essencial do *d*-limoneno em diferentes solventes pode ser observado na Tabela 4.11.

TABELA 4.11 - Coeficientes de partição (K) para extração do d -limoneno por *headspace* utilizando diferentes solventes para solubilização.

Solvente	Coeficiente de partição (K) para o d -limoneno	
	Gelatina	Lignina
Acetona	$4,46 \times 10^2$	$1,39 \times 10^3$
Óleo mineral	$7,91 \times 10^3$	$1,40 \times 10^3$
p -cimeno	$1,08 \times 10^3$	$7,15 \times 10^2$

Pela Tabela 4.11 observa-se que os solventes utilizados apresentaram diferentes comportamentos no particionamento do d -limoneno em função do biopolímero utilizado. Ao utilizar-se amostra sólida de microcápsulas de gelatina como matriz biopolimérica na construção das curvas de calibração, o óleo mineral apresentou maior coeficiente de partição. Esse resultado indica uma menor difusão do d -limoneno no solvente e menor volatilidade, conseqüentemente havendo menor liberação do d -limoneno para a fase vapor do frasco de *headspace*. Resultados semelhantes foram obtidos por LIU e WENE (2000) em que o preparo de soluções em óleo essencial reduziu o particionamento de amostras de perfume. A volatilização do d -limoneno em amostras de lignina como matriz biopolimérica foi estatisticamente semelhante para os solventes acetona e óleo mineral. Tal resultado sugere que os biopolímeros também interferem na retenção do óleo essencial no frasco de *headspace*. A gelatina apresentou maior interação da sua superfície com o óleo essencial, com maior retenção do composto, como se observa pelos valores da constante de partição presentes na Tabela 4.11.

Para ambos os biopolímeros analisados, as curvas de calibração preparadas em p -cimeno foram as que apresentaram menor sensibilidade para discriminar entre concentrações diferentes do analito (Tabela 4.10) e menor retenção do d -limoneno durante a extração por *headspace*, pois apresentou menores coeficientes de partição (Tabela 4.11). Tais resultados podem relacionar-se com a maior volatilidade apresentada pelo p -cimeno, que pode aumentar a pressão do vapor do frasco de *headspace* durante a extração, reduzindo o coeficiente de partição do d -limoneno e a sensibilidade na quantificação por CG-DIC.

Considerando que se espera menor influência da matriz para promover uma adequada quantificação das amostras sólidas e, que o óleo mineral representa o melhor solvente, pois promove um aumento no coeficiente de partição do *d*-limoneno e aumenta a sensibilidade da quantificação por CG-DIC, as curvas de calibração preparadas em óleo mineral foram selecionadas para os estudos de cinética de degradação. Assim, estas curvas representam o sistema mais similar aos obtidos para a análise da influência da temperatura na cinética de liberação.

Dessa forma, as curvas de calibração de *d*-limoneno em óleo mineral foram utilizadas para a quantificação do *d*-limoneno liberado de microcápsulas em pó contendo aproximadamente 300 mg g⁻¹ de óleo essencial de citros encapsulado em matriz biopolimérica de gelatina e lignina. As microcápsulas foram submetidas à temperatura de 40°C por 0, 15, 30, 45, 60 e 90 min e posteriormente a fração volátil obtida foi analisada por CG-DIC. Em todas as amostras adicionaram-se 10.10⁻¹ mg L⁻¹ de mentol como padrão interno. Os dados obtidos podem ser observados na Figura 4.16.

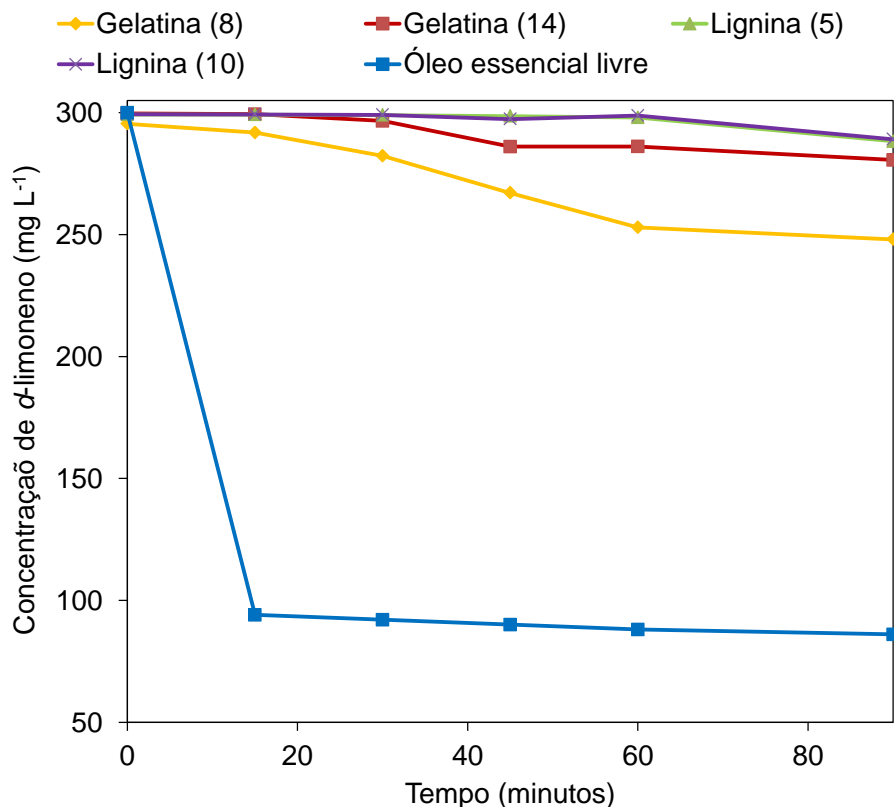


FIGURA 4.16 - Curvas do monitoramento da concentração de *d*-limoneno presente nas microcápsulas de gelatina (8 e 14) e de lignina (5 e 10) e do *d*-limoneno puro (não encapsulado) utilizando o produto formulado em pó submetido à 40°C. Sendo os experimentos 5 e 8 com menor teor de biopolímero e os experimentos 10 e 14 com maior teor de biopolímero em sua composição.

Como se pode observar na Figura 4.16 a curva de liberação do *d*-limoneno livre atinge um equilíbrio de volatilização no frasco de *headspace* antes de 20 min de exposição à temperatura de 40°C. Para os produtos formulados a estabilização ocorreu após 60 min (Figura 4.16). Estes dados sugerem que os produtos microencapsulados atuaram como sistemas de liberação controlada do princípio ativo. É importante observar que em tempos superiores à 90 min podem

ocorrer alterações no perfil de liberação, uma vez que podem ocorrer mudanças no mecanismo de liberação do óleo essencial.

A partir dos valores obtidos na quantificação da liberação do *d*-limoneno em amostras sólidas, foi possível obter os valores dos coeficientes de partição conforme se observa na Tabela 4.12.

TABELA 4.12 - Coeficientes de partição (*K*) para extração do *d*-limoneno por *headspace* utilizando micropartículas de gelatina (8 e 14), lignina (5 e 10) e *d*-limoneno puro (não encapsulado) em pó. Sendo os experimentos 5 e 8 com menor teor de biopolímero e os experimentos 10 e 14 com maior teor de biopolímero em sua composição.

Amostras	Experimento	Coeficiente de partição (<i>K</i>) para o <i>d</i> -limoneno
Gelatina	8	1,15
	14	10,8
Lignina	5	10,0
	10	12,2
Óleo essencial livre		1,11

Dentre as formulações de gelatina, a produzida no experimento 8 apresentou maior taxa de transferência do *d*-limoneno em comparação a produzida no experimento 14, conforme se observa na Figura 4.15 e pelo menor coeficiente de partição (Tabela 4.12). O menor coeficiente de partição relaciona-se à uma maior concentração do *d*-limoneno na fase vapor, portanto, maior liberação do *d*-limoneno encapsulado. Considerando que ambos os sistemas possuem a mesma concentração inicial do princípio ativo (300 mg g⁻¹), podemos supor que, como o experimento 14 possui maior teor de biopolímero, este atuou como uma maior proteção ao material de núcleo volátil, diminuindo a influência da temperatura no sistema.

Resultados similares também foram obtidos para as amostras de lignina, em que o experimento 10 também apresentou maior teor de biopolímero e, portanto, maior retenção do material de núcleo volátil. O experimento 10 também apresentou maior coeficiente de partição, confirmando a maior retenção do *d*-limoneno na microcápsula.

Também pode-se verificar que o encapsulamento utilizando lignina como biopolímero apresentou maior retenção do *d*-limoneno em comparação com a utilização da gelatina (Figura 4.15). A extração por *headspace* dos biopolímeros encapsulados em lignina apresentaram maiores coeficientes de partição, indicando maior concentração do *d*-limoneno na amostra (microcápsula) do que na fase vapor (Tabela 4.12). Estes dados sugerem que a lignina apresenta uma menor cinética de liberação para o *d*-limoneno em comparação com a gelatina ao se avaliar a cinética de liberação do analito em meio sólido.

Para avaliar o mecanismo de liberação do óleo essencial nas micropartículas em pó, analisou-se os coeficientes de regressão para diferentes modelos cinéticos, conforme observa-se na Tabela 4.13.

TABELA 4.13 - Modelos matemáticos propostos para a cinética de liberação do óleo essencial encapsulado em formulações de gelatina e lignina em pó e do óleo essencial livre submetidas à 40°C.

Formulação	Coeficiente de regressão (R^2)		
	Ordem zero	Primeira ordem	Segunda ordem
Gelatina (8)	0,96	0,92	0,92
Gelatina (14)	0,85	0,85	0,85
Lignina (5)	0,90	0,87	0,87
Lignina (10)	0,99	0,99	0,99
Óleo essencial livre	0,90	0,87	0,78

Os experimentos 5 e 8 apresentam menor teor de biopolímero e os experimentos 10 e 14 maior teor de biopolímero em sua composição.

Verifica-se pela Tabela 4.13 que os valores de R^2 demonstraram que um modelo matemático de ordem zero apresentou maior relação com a cinética de liberação do α -limoneno encapsulado em microcápsulas em pó, pois apresentou valores de R^2 mais próximos de 1. A cinética de liberação do ordem zero propõe que a velocidade de difusão do α -limoneno, do interior para o exterior da matriz biopolimérica, ocorre lentamente e representa um modelo ideal para a liberação controlada de substâncias (COSTA, 2002). Desse modo, calculou a constante de velocidade e o tempo de meia vida para cada uma das formulações (Tabela 4.14).

TABELA 4.14 - Constantes de velocidades e tempos de meia vida para formulações de gelatina, lignina e óleo essencial livre com cinética de ordem zero.

Dados cinéticos	Formulações				
	Gelatina		Lignina		Óleo essencial livre
	8	14	5	10	
k (mg L ⁻¹ min ⁻¹)	1,38	0,05	0,59	0,04	13,73
Tempo de meia vida (min)	108,51	2832,85	253,90	3716,54	10,93

Os experimentos 5 e 8 apresentam menor teor de biopolímero e os experimentos 10 e 14 maior teor de biopolímero em sua composição.

Verifica-se pela Tabela 4.14 que o encapsulamento do óleo essencial aumentou a persistência do mesmo no ambiente, apresentando maiores tempos de meia vida. Além disso, micropartículas contendo maiores teores de biopolímero induziram uma maior retenção do óleo essencial (Tabela 4.14). Por fim, os dados cinéticos sugerem uma maior interação da lignina com o óleo essencial em comparação com a gelatina, pois os tempos de meia vida ao se utilizar lignina como biopolímero são superiores aos obtidos para a gelatina.

4.7.2 - Microcápsulas em meio aquoso

Na análise da influência da temperatura na cinética de liberação das amostras de microcápsulas em solução, construíram-se curvas de calibração do d -

limoneno em água nas concentrações de $25 \cdot 10^{-3}$, $75 \cdot 10^{-3}$, $25 \cdot 10^{-2}$, $75 \cdot 10^{-2}$, $20 \cdot 10^{-1}$ e $30 \cdot 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ e $10 \cdot 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ de mentol como padrão interno (Figura 4.17).

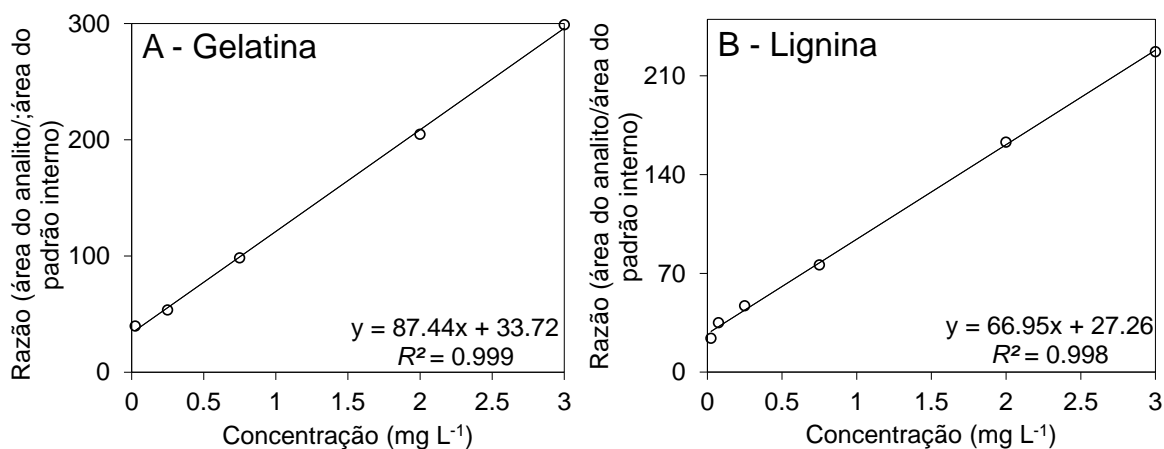


FIGURA 4.17 - Curvas analíticas de *d*-limoneno em gelatina (A) e lignina (B) como matrizes dispersão em água. Equações das retas e os respectivos coeficientes de correlação (R^2) obtidos.

As equações de reta obtidas (Figura 4.17) apresentaram boa precisão com R^2 superiores a 0,99. A curva de calibração preparada em gelatina apresentou maior sensibilidade para diferenciar a concentração de *d*-limoneno em solução em comparação com a curva de calibração preparada em lignina (Figura 4.17). Tal resultado sugere maior efeito de matriz ao se utilizar solução de gelatina como matriz biopolimérica.

As curvas de calibração obtidas foram utilizadas para a quantificação do *d*-limoneno liberado de microcápsulas contendo aproximadamente 300 mg g^{-1} de óleo essencial de citros encapsulado em matriz biopolimérica de gelatina e lignina. Para as análises, 25 mg das microcápsulas foram solubilizadas em meio aquoso, 10 μL da dispersão obtida foram transferidos para vial de headspace e submetidas à temperatura de 40°C por 0, 15, 30, 45 e 60 min. Em todas as amostras adicionou $10 \cdot 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ de mentol como padrão interno em acetona. Os dados obtidos podem ser observados na Figura 4.18.

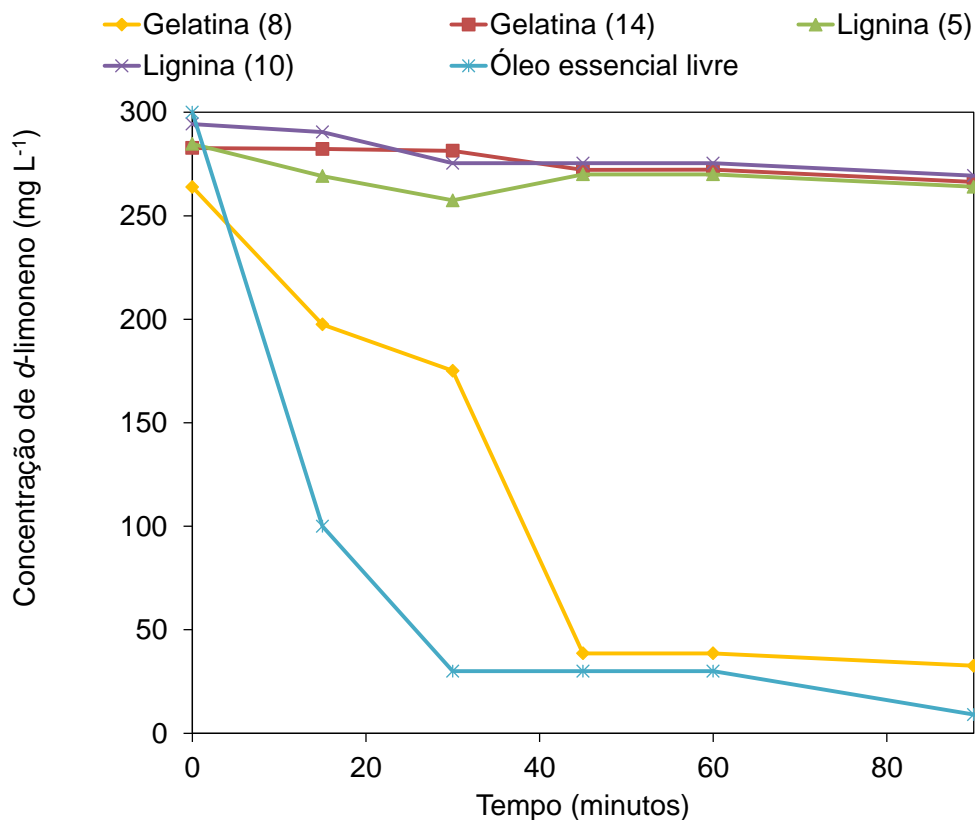


FIGURA 4.18 - Curvas do monitoramento da concentração do *d*-limoneno presente nas microcápsulas obtidas no experimento (8 e 14) e de lignina (5 e 10) e do *d*-limoneno puro (não encapsulado) utilizando o produto formulado em solução. Sendo os experimentos 5 e 8 com menor teor de biopolímero e os experimentos 10 e 14 com maior teor de biopolímero em sua composição.

Pode-se observar que, a curva de liberação do *d*-limoneno livre atinge um equilíbrio de volatilização no frasco de *headspace* a partir de 30 min de exposição à temperatura, enquanto que nos produtos de lignina e gelatina a saturação ocorreu em 45 min.

A partir dos valores obtidos na quantificação da liberação do *d*-limoneno em amostras aquosas, foi possível obter os valores dos coeficientes de partição conforme se observa na Tabela 4.15.

TABELA 4.15 - Coeficientes de partição (*K*) para extração do *d*-limoneno por *headspace* utilizando micropartículas de gelatina (8 e 14), lignina (5 e 10) e *d*-limoneno puro (não encapsulado) em meio aquoso. Sendo os experimentos 5 e 8 com menor teor de biopolímero e os experimentos 10 e 14 com maior teor de biopolímero em sua composição.

Amostras	Experimento	Coeficiente de partição (<i>K</i>) para o <i>d</i> -limoneno
Gelatina	8	6,37
	14	21,6
Lignina	5	150,9
	10	250,9
Óleo essencial livre		1,5

De maneira similar ao verificado para as micropartículas em pó, dentre as formulações as produzidas no experimento 5 e 8 também apresentaram maior taxa de transferência do *d*-limoneno em comparação as produzidas nos experimentos 10 e 14. Estas formulações apresentaram os maiores coeficientes de partição (Tabela 4.15) indicando maior retenção do *d*-limoneno na microcápsula solubilizada em meio aquoso do que na fase vapor formada dentro do frasco de *headspace*. Portanto, estes dados também sugerem que maior teor de material de parede, atuou como uma maior proteção ao material de núcleo volátil, diminuindo a influência da temperatura no sistema microencapsulado.

Para avaliar o mecanismo de liberação do óleo essencial nas micropartículas em meio aquoso, analisou-se os coeficientes de regressão para diferentes modelos cinéticos, conforme observa-se na Tabela 4.16.

TABELA 4.16 - Modelos matemáticos propostos para a cinética de liberação do óleo essencial encapsulado em formulações de gelatina e lignina dispersas em meio aquoso e do óleo essencial livre submetidas à 40°C.

Formulação	Coeficiente de regressão (R^2)		
	Ordem zero	Primeira ordem	Segunda ordem
Gelatina (8)	0,91	0,78	0,67
Gelatina (14)	0,98	0,80	0,70
Lignina (5)	0,41	0,41	0,39
Lignina (10)	0,90	0,90	0,89
Óleo essencial livre	0,99	0,50	0,75

Os experimentos 5 e 8 apresentam menor teor de biopolímero e os experimentos 10 e 14 maior teor de biopolímero em sua composição.

Verifica-se pela Tabela 4.16 que os valores de R^2 demonstraram que um modelo matemático de ordem zero também apresentou maior relação com a cinética de liberação do α -limoneno encapsulado em microcápsulas em dispersão aquosa, pois apresentou valores de R^2 mais próximos de 1. Calculou-se a constante de velocidade e o tempo de meia vida para cada uma das formulações (Tabela 4.17).

TABELA 4.17 - Constantes de velocidades e tempos de meia vida para formulações em meio aquoso de gelatina, lignina e óleo essencial livre com cinética de ordem zero.

Dados cinéticos	Formulações				
	Gelatina		Lignina		Óleo essencial livre
	8	14	5	10	
k (mg L ⁻¹ min ⁻¹)	4.16	1.18	2.05	0.64	13.33
Tempo de meia vida (min)	36.04	126.81	73.05	236.18	11.25

Os experimentos 5 e 8 apresentam menor teor de biopolímero e os experimentos 10 e 14 maior teor de biopolímero em sua composição.

Verifica-se pela Tabela 4.17 que o encapsulamento do óleo essencial aumentou a persistência do mesmo em meio aquoso, apresentando maiores tempos de meia vida. Além disso, micropartículas contendo maiores teores de biopolímero induziram uma maior retenção do óleo essencial (Tabela 4.17). Os dados cinéticos sugerem uma maior interação da lignina com o óleo essencial em comparação com a gelatina em meio aquoso, pois os tempos de meia vida ao se utilizar lignina como biopolímero são duas vezes maiores que os obtidos para a gelatina. Tal resultado pode-se relacionar com a maior solubilidade da gelatina em água, o que auxilia na liberação do óleo essencial encapsulado e conseqüente menor tempo de meia vida em meio aquoso.

As análises de cinética de liberação permitiram avaliar a influência das diferentes matrizes biopoliméricas (gelatina e lignina) e a relação entre o teor de biopolímero na recuperação e quantificação do óleo essencial encapsulado. As formulações que apresentaram maior teor de biopolímero em sua composição (10 para lignina e 14 para gelatina) apresentaram maior eficiência na retenção do *d*-limoneno encapsulado para ensaios de liberação da amostra em pó e da amostra em meio aquoso. Portanto, estas formulações foram selecionadas para avaliação da ação biológica do *d*-limoneno contra insetos de *Spodoptera frugiperda*.

4.8 - Ensaio biológico contra *Spodoptera frugiperda*

Os produtos formulados nas melhores condições de encapsulamento e cinética foram submetidos a ensaios biológicos com insetos de *Spodoptera frugiperda*, principal praga da cultura de milho. Os produtos selecionados foram os obtidos no experimento 14 para gelatina e no experimento 10 para lignina. Dessa forma, realizaram-se testes de ingestão com lagartas no segundo ínstar com o óleo essencial livre ($10^4 \mu\text{g g}^{-1}$ de óleo essencial por grama de dieta artificial) e microencapsulado incorporado à dieta nas concentrações de 10^2 , 10^3 e $10^4 \mu\text{g g}^{-1}$. A gelatina e lignina utilizadas para o encapsulamento do óleo essencial também foram incorporadas à dieta artificial para avaliar sua compatibilidade com o desenvolvimento da *S. frugiperda*. Análises utilizando extrato de nim incorporado à dieta como controle positivo também foram realizadas. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 4.18.

TABELA 4.18 - Quantidade de pupas, médias da massa pupal, número de adultos e de ovos produzidos de insetos de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com formulação de óleo essencial de citros utilizando gelatina e lignina como biopolímeros.

Tratamento	Concentração do princípio ativo ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Número de pupas viáveis	Massa pupal	Número de adultos	Número de ovos
Controle (dieta)	-	20	253,9 \pm 20,7 ^{a1}	20	1360 ^{a1}
Branco Gelatina	-	14	235,1 \pm 25,9 ^{a1}	14	2280 ^{a2}
Branco Lignina	-	12	230,1 \pm 15,48 ^{a1}	12	730 ^{a2}
Gelatina	10 ²	14	223,6 \pm 16,28 ^{a1}	13	2240 ^{a3}
	10 ³	14	206,8 \pm 15,56 ^{a1}	11	1450 ^{a4}
	10 ⁴	15	229,2 \pm 16,4 ^{a1}	15	1730 ^{a5}
Lignina	10 ²	14	250,0 \pm 14,8 ^{a1}	14	890 ^{a6}
	10 ³	18	235,2 \pm 19,04 ^{a1}	16	860 ^{a7}
	10 ⁴	16	245,7 \pm 13,4 ^{a1}	15	1990 ^{a7a8}
Óleo essencial puro	10 ⁴	16	231,2 \pm 17,24 ^{a1}	19	2210 ^{a8}
Extrato de nim	3.10 ²	0	-	-	-

Valores seguidos por letras iguais, não diferem pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade (Apêndice F).

Pela Tabela 4.18 pode-se verificar que a alimentação das lagartas com a dieta artificial contendo óleo essencial de citros não interferiu significativamente no peso das pupas. Os experimentos utilizando extrato de nim como princípio ativo causaram mortalidade em todas as lagartas, assim, estas não atingiram os estádios mais avançados de desenvolvimento. Por outro lado, a presença das micropartículas contendo óleo essencial de citros produziu um aumento no consumo da dieta nas primeiras 48 h. Lima *et al.* (2009b) indicam que este aumento no consumo inicial relaciona-se com uma tentativa das lagartas em superar o efeito fagodeterrente apresentado pelo óleo essencial. Após 96 h em contato com a dieta artificial contendo óleo essencial de citros microencapsulado, observou-se uma não-preferência das lagartas pela dieta e diminuição no consumo. Resultados semelhantes também foram obtidos para Lima *et al.* (2009a) utilizando óleo essencial de folhas de goiabeira no controle de *S. frugiperda*.

A toxicidade associada ao óleo essencial encapsulado também ocasionou em tentativas de fuga das lagartas do tubo de vidro contendo a dieta artificial, conforme está ilustrado na Figura 4.19. Estas observações sugerem o efeito repelente do óleo essencial de citros. O mesmo comportamento não foi observado no controle (dieta isenta de óleo essencial) e nos brancos de gelatina e lignina.

Durante o desenvolvimento das análises biológicas, observou-se que após 144 h de contato com a dieta as lagartas ficaram imóveis até o estágio pupal (efeito *knock-down*). Este efeito relaciona-se com bloqueios de funções neurotóxicas, como o bloqueio de neurotransmissores (LIMA *et al.*, 2009a), esta mudança no comportamento larval relaciona-se com a liberação do óleo essencial microencapsulado. Também se verificou mortalidade larval e pupal, má formação da pupa e da mariposa adulta, ausência de escamas nos ovos (proteção contra a ação de inimigos naturais) e alterações no tegumento (cobertura natural do inseto) (Figura 4.19). As alterações morfológicas podem relacionar-se à alimentação inicial da dieta contendo o óleo essencial, indicando que o óleo essencial de citros interferiu no comportamento da lagarta e alterou a sua morfologia.

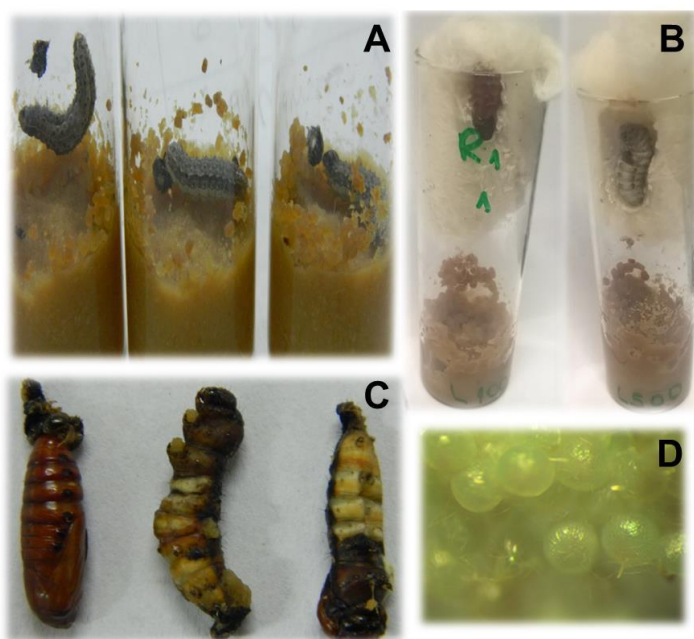


FIGURA 4.19 - Representação de lagartas defeituosas, com alterações na morfologia (A); tentativa de fuga das lagartas (B); má formação de pupas e retenção de exúvia ao final da fase larval (C) e ausência de escamas nos ovos (D).

Em relação à quantidade de ovos produzidos, verificou-se que os experimentos utilizando lignina como matriz biopolimérica apresentaram redução na produção (Tabela 4.18) quando comparados ao controle contendo apenas dieta artificial. Este resultado indica uma possível atuação do biopolímero na reprodução das lagartas.

Assim, as análises biológicas demonstraram a atividade do óleo essencial de citros sobre lagartas *S. frugiperda*. Indicando seu potencial para utilização no controle do inseto pela ação repelente e fagodeterrância observadas nos testes de ingestão.

CONCLUSÕES

Sistemas nano e microencapsulados contendo produtos naturais com ação inseticida têm sido desenvolvidos como uma alternativa para substituição e/ou complemento aos defensivos tradicionais. Neste estudo foi proposta uma alternativa para substituição dos defensivos tradicionais com o microencapsulamento do óleo essencial de citros em matrizes biopoliméricas.

Para o desenvolvimento de sistema microencapsulado contendo óleo essencial de citros foram desenvolvidos e validados métodos analíticos de análise compatíveis ao sistema estudado: óleo essencial retido em uma matriz biopolimérica. Assim, avaliou-se a extração do óleo essencial por *headspace* com simultânea separação por cromatografia gasosa e análises por detector de ionização em chama.

Verificou-se que a extração do *d-limoneno* foi influenciada pelas variáveis de extração por *headspace* (volume de amostra, homogeneização, temperatura e tempo de extração). Sendo as condições ótimas de análise obtidas ao se utilizar 500 rpm, 1000 μL de amostra e extração à 75°C por 15 min. A extração por *headspace* e separação do analito por CG-DIC resultou em um método rápido e simples. Além disso, a separação do analito ocorreu com elevada sensibilidade utilizando cromatografia gasosa.

Um método para o encapsulamento do óleo essencial de citros em *Spray Dryer* também foi desenvolvido. O planejamento fatorial fracionário indicou que as variáveis que influenciam significativamente o encapsulamento foram maior fluxo do ar de secagem e taxa de transferência da amostra. Assim, a condição ideal para o encapsulamento possui uma combinação entre a mais baixa taxa de transferência de amostra (aproximadamente 0,45 L min⁻¹) e o maior fluxo do ar de secagem (aproximadamente 301 L h⁻¹).

O método desenvolvido para o encapsulamento, extração e quantificação do óleo essencial de citros encapsulado foi validado analisando-se as principais figuras de mérito. O estudo permitiu concluir que o método desenvolvido é confiável e aplicável para o desenvolvimento de formulações contendo óleo essencial.

Os produtos obtidos utilizando-se as melhores condições foram caracterizados quanto à morfologia e ensaios de estabilidade. Todos os produtos apresentaram estrutura microesférica e ganho de estabilidade em meio aquoso sob influência de altas temperaturas. Uma vez que ocorreu maior retenção do óleo essencial nos produtos encapsulados em comparação com emulsões aquosas do óleo essencial puro. Durante a caracterização dos produtos obtidos, também foi desenvolvido um método para quantificação do teor de óleo essencial liberado após o encapsulamento e um estudo do perfil cinético da liberação, bem como uma estimativa

do tempo de meia vida do produto, estas análises permitiram realizar um controle quantitativo dos produtos.

Também se observou que ao utilizar as condições ótimas para o encapsulamento, a atividade do óleo essencial foi efetiva em ensaios biológicos com insetos de *Spodoptera frugiperda*. Indicando que sua aplicação no controle deste inseto praga pode ser viável. Estes dados demonstram a necessidade de realizar em estudos futuros, análises com outros insetos pragas ou micro-organismos para avaliação do efeito do óleo essencial de citros encapsulado.

- ABREU, F. O. M. S.; OLIVEIRA, E. F.; PAULA, H. C. B. & DE PAULA, R. C. M.,
“Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation”. *Carbohydr. Polym.*,
89 : 1277, 2012.
- ABURTO, L. C.; TAVARES, D. Q. & MARTUCCI, E. T. “Microencapsulação de óleo essencial
de laranja”. *Ciê. Tecnol. Aliment.*, **18** : 45, 1998.
- ADAMS, R. P. “Identification of essential oil components by gas chromatography/Mass
Spectrometry”, 4th ed., Illinois: Allured Business Media, 2009.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº 7, de 18/02/2011.
- AGHBASHLO, M.; MOBILI, H.; RAFIEE, S. & MADADLOU, A. “Optimization of emulsification
procedure for mutual maximizing the encapsulation and exergy efficiencies of fish oil
microencapsulation”. *Powder Technol.*, **225** : 107, 2012.
- AHMAD, M. M.; IQBAL, Z.; ANJUM, F. M. & SULTAN, J. I. “Genetic variability to essential oil
composition in four citrus fruit species”. *Pak. J. Bot.*, **38** : 319, 2006.
- AKTHAR, M. S.; DEGAGA, B. & AZAM, T., “Antimicrobial activity of essential oils extracted
from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review”. *Issue Biol.
Sci. Pharm. Res.*, **2** : 001, 2014..
- ALTIERI, M. A. “Agroecology: the science of natural resource management for poor
farmers in marginal environments”. *Agri., Ecosyst. Environ.*, **93** : 1, 2002.
- ALVARADO, J. S. & ROSE, C. “Static headspace analysis of volatile organic compounds in
soil and vegetation for site characterization”. *Talanta*, **62** : 17, 2004.

- ANEKELLA, K. & ORSAT, V. "Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying". *LWT – Food Sci. Technol.*, **50** : 17, 2013.
- ANGIONI, A., BARRA, A., CORONEO, V., DESSI, S. & CABRAS, P. "Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers". *J. Agric. Food Chem.*, **54** : 4364, 2006.
- ARIMURA, G.; KOST, C. & BOLAND, W. "Herbivore-induced, indirect plant defenses". *Biochim. Biophys. Acta*, **1734** : 91, 2005.
- AZEVEDO, F. R.; SANTOS, C. A. M.; NERE, D. R.; MOURA, E. S. & GURGEL, L. S. "Inseticidas vegetais no controle de *Anastrepha* spp. (DIPTERA: TEPHRITIDAE) em pomos de goiaba". *Holos*, **4** : 77, 2013.
- BAYRAM, Ö. A.; BAYRAM, M. & TEKIN, A. R. "Spray drying of sumaric flavor using sodiul chloride, sucrose, glucose and starch as carries". *J. Food Eng.*, **69** : 253, 2005.
- BEHLE, R. W.; FLOR-WEILER, L. B.; BHARADWAJ, A. & STAFFORD, K. C. "A formulation to encapsulate nootkatone for tick control". *J. Med. Entomol*, **48** : 1120, 2011.
- BEIRÃO DA COSTA, S.; DUARTE, C.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; SERRA, A. T.; MOLDÃO MARTINS, M.; NUNES JANUÁRIO, M. I.; VICENTE, A. A.; DELGADILLO, I.; DUARTE, C. & BEIRÃO DA COSTA, M. L. "Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated Oregano essential oil". *J. Food Eng. Int. Conf. Food Innov. – FoodInnova*, **110** : 190, 2012.
- BERNHARDT, E. S.; ROSI, E. J. & GESSNER, M. O. "Synthetic chemicals as agents of global change". *Front. Ecol. Environ.*, **15** : 84, 2017.
- BICCHI, C.; CORDERO, C.; LIBERTO, E.; SGOBINI, B. & RUBIOLO, P. "Headspace sampling of the volatile fraction of vegetable matrices". *J. Chromatogr. A*, **1184** : 220, 2008.
- BIRCHAL, V. S.; Huang, L.; Mujumdar, A. S. & Passos, M. L. "Spray Dryer: modeling and simulation". *Drying Technol.*, **24** : 359, 2006.
- BORGES, L. L.; MARTINS, F. S.; CONCEIÇÃO, E. C. & SILVEIRA, D. "Optimization of the spray-drying process for developing jabuticaba waste poder employing response surface methodology". *J. Food Process Eng.*, **40** : 1, 2015.
- BOTREL, D. A.; BORGES, S. S.; FERNANDES, R. V. B.; VIANA, A. D.; COSTA, J. M. G. & MARQUES, G. R. "Evaluation of spray drying conditions on properties of microencapsulated oregano essential oil". *Int. J. Food Sci. Technol.*, **47** : 2289, 2012.
- BULLANGPOTI, V.; WAJNBERG, E.; AUDANT, P. & FEYEREISEN, R. "Antifeedant activity of *Jatropha gossypifolia* and *Melia azedarach* senescent leaf extracts on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and their potential use as synergists". *Pest Manage. Sci.*, **68** : 1255, 2012.
- CALLEJÓN, R. M.; GONZÁLEZ, A. G.; TRANCOSO, A. M. & MORALES, M. L. "Optimization and validation of headspace sorptive extraction for the analysis of volatile compounds in wine vinegars". *J. Chromatogr. A*, **1204** : 93, 2008.
- CARNEIRO, H. C. F.; TONON, R. V.; GROSSO, C. R. F. & HUBINGER, M. D. "Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall material". *J. Food Engineer.*, **115** : 443, 2013.
- CARVALHO, F. P. Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environ. I Sci. Policy*, **9** : 685, 2006.
- CASMUZ, A.; JUÁREZ, M. L.; SOCÍAS, M. G.; MURÚA, M. G.; PRIETO, S.; MEDINA, S.; WILLINK, E. & GASTAMINZA, G. "Revisión de los hospedeiros del gusano cogollero del maíz,

- Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)". Rev. Soc. Entomol. Arg., **69** : 209, 2010.
- CASTRO, D. P.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C.; SANTOS, N. M. & BALIZA, D. P. "Não-preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L.". Rev. Bras. Pl. Med., **8** : 27, 2006.
- CHAI, M. K. & TAN, G. H. "Validation of a headspace solid-phase microextraction procedure with gas chromatography-electron capture detection of pesticide residues in fruits and vegetables". Food Chem., **117** : 561, 2009.
- CHAMBERS, E.; WAGROWSKI-DIEHL, D. M.; LU, Z. & MAZZEO, J. R. "Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses". J. Chromatogr. B, **852** : 22, 2007.
- CHANCHAL, A.; VOHRA, R.; ELESELA, S.; BHUSHAN, L.; KUMAR, S.; KUMAR, S.; AHMAD, S. & PANDEY, R. P. "Gelatin biopolymer: a journey from micro to nano". J. Pharm. Res., **8** : 1387, 2014.
- CHANDLER, D.; BAILEY, A. S.; TATCHELL, G. M.; DAVIDSON, G.; GREAVES, J. & GRANT, W. P. "The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management". Phil. Trans. R. Soc. B., **366** : 1987, 2011.
- CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; GRANT, W. P.; GREAVES, J. & TATCHELL, G. M. "Microbial biopesticides for integrated crop management: an assessment of environmental and regulatory sustainability". Trends Food Sci. Technol., **19** : 275, 2008.
- CHEMAT-DJENNI, Z.; FERHAT, M. A.; TOMAO, V.; & CHEMAT, F. "Carotenoid extraction from tomato using a green solvent resulting from orange processing waste". J. Essent. Oil-Bear. Plants, **13** : 139, 2010.
- CHOWDHURY, M. A. "The controlled release of bioactive compounds from lignina and lignina-based biopolymer matrices". Int. J. Biol. Macromol., **65** : 136, 2014.
- CIRIMINNA, R.; LOMELI-RODRIGUEZ, M.; CARÀ, P. D.; LOPEZ-SANCHEZ, J. A. & PAGLIARO, M. "Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy". Chem. Commun., **50** : 15288, 2014.
- COSTA, J. M. G.; BORGES, S. V.; HIJO, A. A. C. T.; SILVA, E. K.; MARQUES, G. R.; CIRILLO, M. Â. & AZEVEDO, V. M. "Matrix structure selection in the microparticles of essential oil orégano produced by spray dryer". J. Microencapsulation, **30** : 717, 2013.
- COSTA, P. J. C. "Avaliação in vitro da lioequivalência de formulações farmacêuticas". Ver. Bras. Ciênc. Farm., **38** : 141, 2002.
- CRUZ, I. & MONTEIRO, M. A. R. "Controle biológico da lagarta-do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, utilizando o parasitoide *Trichogramma pretiosum*". Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo (Comunicado técnico, 98). 2004.
- CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L. C.; SILVA, R. B., SARTO, M. L. D. & PENTEADO-DIAS, A. M. "Monitoramento de parasitoides de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em municípios de Minas Gerais, Brasil." Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo (Documentos, 92). 2009.
- CUEVAS-GLORY, L. F.; PINO, J. A.; SANTIAGO, L. S. & SAURI-DUCH, E. "A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey". Food Chem., **103** : 1032, 2007.
- Czaja, K.; Góralczyk, K.; Struciński, P.; Hernik, A.; Korcz, W.; Minoerczyk, M.; Łyczewska, M. & Ludwicki, J. K. "Biopesticides – towards increased consumer safety in the European Union". Pest Manag. Sci., **71** : 3, 2015.

- D'AMATO, C.; TORRES J. P. M. & MALM, O. "DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano): Toxicidade e Contaminação Ambiental – Uma Revisão". *Quim. Nova*, **25** : 995, 2002.
- DAUDT, R. M.; EMANUELLI, J.; KULKAMP-GUERREIRO, I. C.; POHLMANN, A. R. & GUTERRES, S. S. "A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos". *Ciênc. Cult.*, **65** : 28, 2013.
- DAVIN, L. B. & LEWIS, N. G. "Lignin primary structures and dirigent sites". *Curr. Opin. Biotechnol.*, **16** : 407, 2005.
- DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L. & DUKE, S. O. "Natural products in crop protection". *Bioorg. Med. Chem.*, **17** : 4022, 2009.
- DE OLIVEIRA, E. F.; PAULA, H. C. B. & PAULA, R. C. M. "Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation". *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **113** : 146, 2014.
- DEQUECH, S. T. B.; CAMERA, C.; STURZA, V. S.; RIBEIRO, L. P.; QUERINO, R. B. & PONCIO, S. "Population fluctuation of *Spodoptera frugiperda* eggs and natural parasitism by *Trichogramma* in maize". *Acta Sci. Agron.*, **35** : 295, 2013.
- DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D. A. & ORLOVA, I. "Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives" *Crit. Rev. Plant Sci.*, **25** : 417, 2006.
- DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G. & RIMANDO, A. M. "Natural products as sources of herbicides: current status and future trends". *Weed Res.*, **40** : 99, 2000.
- DUSCONSEILLE, A.; ASTRUC, T.; QUINTANA, N. & MEERSMAN, F. "Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: a review". *Food Hydrocolloids*, **43** : 360, 2015.
- EL ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; AÏT ADDI, E. H.; CASABIANCA, H.; EL MOUSADIK, A.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N. R.; ELAÏSSARI, A. "Essential oils: from extraction to encapsulation". *Int. J. Pharm.*, **483** : 220, 2015.
- ESFANDYARI-MANESH, M.; GHAEDI, Z.; ASEMI, M.; KHANAVI, M.; MANAYI, A.; JAMALIFAR, H.; ATYABI, F. & DINARVAND, R. "Study of antimicrobial activity of anethole and carvone loaded PLGA nanoparticles". *J. Pharm. Res.*, **7** : 290, 2013.
- EVERGETIS, E.; MICHAELAKIS, A. & HAROUTOUNIAN, S. A. "exploitation of Apiaceae family essential oils as potent biopesticides and rich source of phellandrenes". *Ind. Crops Prod.*, **41** : 365, 2013.
- EZE, U. A. "In vitro antimicrobial activity of essential oils from the Lamiaceae and Rutaceae plant families against β -Lactamase producing clinical isolates of *Moraxella catarrhalis*". *EC Pharm. Sci.* **2** : 325, 2016.
- EZQUERRO, Ó.; PONS, B. & TENA, M. T. "Multiple headspace solid-phase microextraction for the quantitative determination of volatile organic compounds in multilayer packagings". *J. Chromatogr. A*, **999** : 155, 2003.
- FARHAT, A.; FABIANO-TIXIER, A.-S.; MAATAOUI, M. E.; MAINGONNAT, J.-F.; ROMDHANE, M. & CHEMAT, F. "Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: kinetic data, extract's global yield and mechanism". *Food Chem.*, **125** : 255, 2011.
- FDA (Food and Drug Administration). *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. Rockville, MD : US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, 2001 .
- FERHAT, M. A.; MEKLATI, B. Y.; SMADJA, J. & CHEMAT, F. "An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel". *J. Chromatogr. A*, **1112** : 121, 2006.

- FERNANDES, R. V. B.; BORGES, S. V. & BOTREL, D. A. "Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of Rosemary essential oil". *Carbohydr. Polym.*, **101** : 524, 2014.
- FERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; FLORES-CÉSPEDES, F.; DAZA-FERNÁNDEZ, I.; VIDAL-PEÑA, F. & VILLAFRANCA-SÁNCHEZ, M. "Lignin and lignosulfonate-based formulations to protect pyrethrins against photodegradation and volatilization". *Ind. Eng. Chem. Res.*, **53** : 13557, 2014.
- FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; REIS, P. S.; SOUZA, A. S. & SANTOS, W. N. L. "Box-Behnken design: na alternative for the optimization of analytical methods". *Anal. Chim. Acta*, **597** : 179, 2007b.
- FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; SILVA, E. G. P.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLAA, C. M.; DAVID, J. M.; ANDRADE, J. B.; BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F. & BARROS NETO, B. "Statistical design and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems". *J. Chromatogr. A*, **1158** : 2, 2007a.
- FIGUEIREDO, M. L. C.; MARTINS-DIAS, A. M. P. & CRUZ, I. "Relação entre a lagarta-do-cartucho e seus agentes de controle biológico natural na produção de milho". *Pesq. Agropecu. Bras.*, **41** : 1693, 2006.
- FRANCO, A. S. M. "O suco de laranja brasileiro no mercado global". *Análise conjuntural*, **38** : 11, 2016.
- FRANK VAN VEEN, F. J.; MORRIS, R. J. & GODFRAY, H. C. J. "Apparent competition, quantitative food webs, and the structure of phytophagous insect communities". *Annu. Rev. Entomol.*, **51** : 187, 2006.
- FRASCARELI, E. C.; SILVA, V. M.; TONON, R. V. & HUNBINGER, M. D. "Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying". *Food Bioprod. Process.*, **90** : 413, 2012.
- FREIRE, M. T. A.; BOTTOLI, C. B. G.; FABRIS, S. & REYES, F. G. R. "Contaminantes voláteis provenientes de embalagens plásticas: desenvolvimento e validação de métodos analíticos". *Quím.Nova*, **31**:1522, 2008.
- FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M.; MORENO, J. L. F. & ROMERO-GONZÁLEZ, R. "Compensation for matrix effects in gas chromatography-tandem mass spectrometry using a single point standard addition". *J. Chromatogr. A*, **1216** : 4798. 2009.
- GANJEWALA, D. "*Cymbopogon* essential oils: chemical composition and bioactivities". *Int. J. Essent. Oil. Ther.*, **3** : 56, 2009.
- GERAGE, J. M.; MEIRA, A. M. G. & SILVA, M. V. "Food and nutrition security: pesticide residues in food". *Nutrite*, **42** : 1, 2017.
- GERWICK, B. C.; SPARKS, T. C. "Natural products for pest control: an analysis of their role, value and future". *Pest Manage. Sci.*, **70** : 1169, 2014.
- GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A. & SAUREL, R. "Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients; An overview". *Food Research International*, **40** : 1107, 2007.
- GLARE, T.; CARADUS, J.; GELERNTER, W.; JACKSON, T.; KEYHANI, N.; KÖHL, J.; MARRONE, P.; MORIN, L. & STEWART, A. "Have biopesticides come of age?". *Trends Biotechnol.*, **30** : 250, 2012.
- GOBBO-NETO, L. & LOPES, N. P. "Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários". *Quim. Nova*, **30** : 374, 2007.

- GODINHO, R. B. & BOTTOLI, C. B. G. "Avaliação de fragrância em detergente em pó por microextração em fase sólida e cromatografia gasosa". *Scientia Chromatogr.*, **5** : 229, 2013.
- Gómez-Guillén, M. C.; Giménez, B.; López-Caballero, M. E. & Montero, M. P. "Functional and bioactive properties of collagen and gelatina from alternative sources: a review". *Food Hydrocolloids*, **25** : 1813, 2011.
- GONZÁLEZ, A. G. & HERRADOR, M. Á. "A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles". *Trends Anal. Chem.*, **26** : 227, 2007.
- GUPTA, S. & DIKSHIT, A. K. "Biopesticides: An ecofriendly approach for pest control". *J. Biopestic.*, **3** : 186, 2010.
- HAKKARAINEN, M. "Developments in multiple headspace extraction". *J. Biochem. Biophys*, **70** : 229, 2007.
- HARLEY, R. A. & COULTER-BURKE, S. C. "Relating liquid fuel and headspace vapor composition for California reformulated gasoline samples containing ethanol". *Environ. Sci. Technol.*, **34** : 4088, 2000.
- HELENO, F.F.; LIMA, A. C.; AFONSO, E. J. C. F. & COUTRIM, M. X. "Otimização e validação de métodos analíticos para determinação de BTEX em água utilizando extração por *headspace* e microextração em fase sólida". *Quim. Nova*, **33** : 329, 2010.
- HOLLINGSWORTH, R. G. "Limonene, a citrus extract, for control of mealybugs and scale insects". *J. Econ. Entomol.*, **93** : 772, 2005.
- HOLM, T. "Aspects of the mechanism of the flame ionization detector". *Journal of Chromatogr. A*, **842** : 221, 1999.
- IANNITELLI, A.; GRANDE, R.; DI STEFANO, A.; DI GIULIO, M.; SOZIO, P.; BESSA, L.J.; LASERRA, S.; PAOLINI, C.; PROTASI, F. & CELLINI, L. "Potential antibacterial activity of carvacrol loaded poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles against microbial biofilm". *Int. J. Mol. Sci.*, **12** : 5039, 2011.
- IBRAHIM, M. A.; KAINULAINEN, P.; ABBAS, A.; KARI, T. & HOLOÁINEN, J. K. "Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests". *Agric. Food Sci. Finl.*, **10** : 243, 2001.
- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); "Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos", DOQ-CGCRE-008, 2010.
- ISMAN, M. B.; MIRESMALLI, S. & MACHIAL, C. "Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products". *Phytochem Rev.*, **10** : 197, 2011.
- JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y. & BHANDARI, B. "Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying". *Drying Technol.*, **26** : 816, 2008.
- JAFARI, S. M.; HE, Y. & BHANDARI, B. "Encapsulation of nanoparticles of d-limonene by spray drying: role of emulsifiers and emulsifying techniques". *Drying Technol.*, **25** : 1079, 2007.
- JYOTHI, N. V. N.; PRASANNA, P. M.; SAKARKAR, S. N.; PRABHA, K. S.; RAMAIAH, P. S. & SRAWAN, G. Y. "Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency". *J. Microencapsulation*, **27** : 187, 2010.
- KAILASA, S. K.; WU, H. & HUANG, S. "Recent Developments on Mass Spectrometry for the Analysis of Pesticides in Wastewater". *Waste Water - Treatment Technologies and*

- Recent Analytical Developments, Prof. Fernando Sebastián García Einschlag (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/51929. 2013.
- KASTEN JUNIOR, P.; 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, 1978.
- KIM, E. H.-J.; CHE, X. D. & PEARCE, D. “Surface composition of industrial spray-dried milk powders. 2. Effects of spray drying conditions on the surface composition”. *J. Food. Eng.*, **94** : 169, 2009.
- KNOW, H.; LEHOTAY, S. J. & GEIS-ASTEGGIANTE, L. “Variability of matrix effects in liquid and gas chromatography-mass spectrometry analysis of pesticides residues after QuEChERS sample preparation of different food crops”. *J. Chromatogr. A*, **1270** : 235, 2012.
- KNOWLES, A. “Recent development of safer formulations of agrochemicals”. *Environmentalist*, **28** : 35, 2008.
- KOLB, B. & ETTRE, L. S. “Static headspace-gas chromatography: theory and practice”. 2nd ed. 2006.
- KOLB, B. “Multiple Headspace Extraction – A procedure for eliminating the influence of the sample matrix in quantitative headspace gas chromatography”. *Chromatographia*, **15**: 587, 1982.
- KOLB, B.; POSPISIL, P. & AUER, M. “Quantitative headspace analysis of solid samples: a classification of various sample types”. *Chromatographia*, **19** : 113, 1984.
- KOOKANA, R. S. “The role of biochar in modifying the environmental fate bioavailability, and efficacy of pesticides in soils: a review”. *Aust. J. Soil Res.*, **48** : 627, 2010.
- KOUL, O. “Microbial biopesticides: opportunities and challenges”. *CAB Rev. Perspect. Agric. Veterinary Sci. Nutr. Nat.*, **6** : 1, 2011.
- KUIPERS, W. & MÜLLER, J. “Sensitivity of a planar micro-flame ionization detector”. *Talanta*, **82** : 1674, 2010.
- LABINAS, A. M. & CROCOMO, W. B. “Effect of Java grass (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) essential oil on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae)”. *Acta Sci.*, **24** : 1401, 2002.
- LADJ-MINOST, A. Répulsifs d'arthropodes à durée d'action prolongée: étude pharmacotechnique, devenir in situ et efficacité. , Lyon I, Programa de Pós-Graduação em Ecologia Química - Université Claude Bernard, 2012. Tese de Doutorado. 374 p.
- LANÇAS, F. M. L. “Cromatografia em fase gasosa”. São Carlos: Acta, 1993.
- LAZARTIGUES, A.; THOMAS, M.; BANAS, D.; BRUN-BELLUT, J.; CREN-OLIVÉ, C. & FEIDT, C. “Accumulation and half-lives of 13 pesticides in muscle tissue of freshwater fishes through food exposure”. *Chemosphere*, **91** : 530, 2013.
- LEE, J.-H.; PARK, T. G.; LEE, Y.-B.; SCHIN, S.-C. & CHOI, H.-K. “Effect of adding non-volatile oil as a core material for the floating microspheres prepared by emulsion solvent diffusion method”. *J. Microencapsul.*, **18** : 65, 2001.
- LEIMANN, F.V.; GONÇALVES, O.H.; MACHADO, R.A.F. & BOLZAN, A. “Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology”. *Mater. Sci. Eng. C*, **29** : 430, 2009.

- LIGIERO, C. B. P.; REIS, L. A.; PARRILJA, G. L.; FILHO, M. P. & CANELA, M. C. “Comparação entre métodos de quantificação em cromatografia gasosa: um experimento para cursos de química”. *Quim. Nova*, **32** : 1338, 2009.
- LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C.; ANDRADE, M. A.; MELO, B. A. & RODRIGUES, V. G. “Caracterização química e atividade inseticida do óleo essencial de *Argeratum conyzoides* L. sobre a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepdoptera: Noctuidae)”. *Biosci. J.*, **26** : 1, 2010.
- LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C.; MELO, B. A.; RODRIGUES, V. G. & GUIMARÃES, P. L. “Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do minho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)”. *Acta Amaz.*, **39** : 337, 2009a.
- LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; SANTOS, C. D.; MORAES, J. C.; NÉRI, D. K. P. & NASCIMENTO, E. A. “Caracterização química do óleo essencial de folhas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) e seus efeitos no comportamento da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)”. *Ciênc. Agrotec.*, **33** : 1777, 2009b.
- LINDEN, R.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. & BASSANI, V. L. “Response surface analysis applied to the preparation of tablets containing a high concentration of vegetable spray-dried extract”. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **26** : 441, 2000.
- LIU, Z. & WENE, M. J. “Measurement of gas-liquid partition coefficient and headspace concentration profiles of perfume materials by solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry”. *J. Chromatogr. Sci.*, **38** : 377, 2000.
- LÓPEZ, A.; CASTRO, S.; ANDINA, M. J.; URES, X.; MUNGUÍA, B.; LLABOT, J. M.; ELDER, H.; DELLACASSA, E.; PALMA, S. & DOMÍNGUEZ, L. “Insecticidal activity of microencapsulated *Schinus molle* essential oil”. *Ind. Crops Prod.*, **53** : 209, 2014.
- LÓPEZ, J. A. S.; LI, Q. & THOMPSON, I. P. “Biorefinery of waste Orange peel”. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **30** : 63, 2010.
- LUO, Y. Z. & PAWLISZYN, J. “Membrane extraction with a sorbent interface for headspace monitoring of aqueous samples using a cap sampling device”. *Anal. Chem.*, **72** : 1058, 2000.
- LV, Y.; YANG, F.; LI, X.; ZHANG, X. & ABBAS, S. “Formation of heat-resistant nanocapsules of jasmine essential oil via gelatin/gum arabic based complex coacervation”. *Food Hydrocoll.* **35** : 305, 2014.
- MADENE, A.; JACQUOT, M. SCHER, J. & DESOBRY, S. “Flavour encapsulation and controlled release – a review”. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **41** : 1, 2006.
- MAJI, T. K.; BARUAH, I.; DUBE, S. & HUSSAIN, M. R. “Microencapsulation of *Zanthoxylum limonella* oil (ZLO) in glutaraldehyde crosslinked gelatina for mosquito repelente application”. *Bioresour. Technol.*, **98** : 840, 2007.
- MANSOUR, S. A.; EL-SHARKAWY, A. Z. & ABDEL-HAMID, N. A. “Toxicity of essential plant oils, in comparison with conventional insecticides, against the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål)”. *Ind. Crops Prod.*, **63** : 92, 2015.
- MARTÍN, M. A. SILES, J. A. CHICA, A. F. & MARTÍN, A. “Biomethanization of orange peel waste”. *Bioresou. Technol.*, **101** : 8993, 2010.
- MASOTTI, V., JUTEAU, F., BESSIÈRE, J.M. & VIANO, J. “Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities.” *J. Agric. Food Chem.*, **51** : 7115, 2003.

- MENG, Y.; PINO, V. & ANDERSON, J. L. "Exploiting the versatility of ionic liquids in separation science: determination of low-volatility aliphatic hydrocarbons and fatty acid methyl esters using headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography". *Anal. Chem.*, **81** : 7107, 2009.
- MICHEREFF FILHO, M.; FARIA, M.; WRAIGHT, S. P. & SILVA, K. F. A. S. "MicoInseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos após quatro décadas?". *Arq. Inst. Biol.*, **76** : 769, 2009.
- MIRA, B.; BLASCO, M.; BERNA, A. & SUBIRATS, S. "Supercritical CO₂ extraction of essential oil from Orange peel. Effect of operation conditions on the extract composition". *J. Supercrit. Fluids*, **14** : 95, 1999.
- MIRESMALLI, S. & ISMAN, M. B. "Botanical insecticides inspired by plant-herbivore chemical interactions". *Trends Plant Sci.*, **19** : 29, 2014.
- MNIF, I. & GHRIBI, D. "Potential of bacterial derived biopesticides in pest management". *Crop Prot.*, **77** : 52, 2015.
- MOHAREB, A. S. O.; BADAWEY, M. E. I. & ABDELGALEIL, S. A. M. "Antifungal activity of essential oils isolated from Egyptian plants against wood decay fungi". *J. Wood Sci.*, **59** : 499, 2013.
- MORETTI, M. D. L.; SANNA-PASSINO, G.; DEMONTIS, S. & BAZZONI, E. "Essential oil formulation useful as a new tool for insect pest control". *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **3** : 1, 2002.
- MULDER, W. J.; GOSSELINK, R. J. A.; VINGERHOEDS, M. H.; HARMSSEN, P. F. H. & EASTHAM, D. "Lignin based controlled release coatings". *Ind. Crops Prod.*, **34** : 915, 2011.
- MURÚA, M.; VIRLA, E. & DEFAGÓ, V. "Evaluación de cuatro dietas artificiales para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides". *Bol. San. Veg. Plagas*, **29** : 43, 2003.
- MUTHAIYAN, A.; MARTIN, E. M.; NATESAN, S.; GRANDALL, P. G.; WILKINSON, B. J. & RICKE, S. C. "Antimicrobial effect and mode of action of terpeneless cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*". *J. Appl. Microbiol.*, **112** : 1020, 2012.
- NAIR, R.; VARGHESE, S. H.; NAIR, B. G.; MAEKAWA, T.; YOSHIDA, Y. & KUMAR, D. S. "Nanoparticulate material delivery to plants". *Plant Sci.*, **179** : 154, 2010.
- NAPAL, G. N. D.; CARPINELLA, M. C. & PALACIOS, S. M. "Antifeedant activity of ethanolic extract from *Flourensia oolepis* and isolation of pinocembrin as its active principle compound". *Bioresour. Technol.*, **100** : 3669, 2009.
- NGAMAKEUE, N. & CHITPRASERT, P. "Encapsulation of Holy Basil essential oil in gelatina: effects of Palmitic acid in carboxymethyl cellulose emulsion coating on antioxidant and antimicrobial activities". *Food Bioprocess Technol.*, **9** : 1735, 2016.
- OERKE, E.-C. "Crop losses to pests". *J. Agric. Sci.*, **144** : 31, 2006.
- OLIVEIRA, O. W. & PETROVICK, P. R. "Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações". *Rev. Bras. Farmacogn.*, **20** : 641, 2010.
- PAGGIOLA, G.; STEMPOORT, S. V.; BUSTAMANTE, J.; BARBER, J. M. V.; HUNT, A. J. & CLARK, J. H. "Can bio-based chemicals meet demand? Global and regional case-study around citrus waste-derived limonene as a solvent for cleaning applications". *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, **10** : 686, 2016.
- PANELLA, N. A.; DOLAN, M. C.; KARCHESY, J. J.; XIONG, Y.; PERALTA-CRUZ, J.; KHASAWNEH, M.; MONTENIERI, J. A. & MAUPIN, G. O. "Use of novel compounds for pest control:

- insecticidal and acaricidal activity of essential oil components from heartwood of Alaska yellow cedar". *J. Med. Entomol.*, **42** : 352, 2005.
- PATEL, R. P.; PATEL, M. P. & SUTHAR, A. M. "Spray drying technology: an overview". *Indian J. Sci. Technol.*, **2** : 44, 2009.
- PATIL, V.; CHAUHAN, A. K. & SINGH, R. P. "Optimization of the spray-drying process for developing guava powder using response surface methodology". *Powder Technol.*, **253** : 230, 2014.
- PAVELA, R. & BENELLI, G. "Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and Constraints". *Trends Plant Sci.*, **21** : 1000, 2016.
- PINGALI, P. L. "Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead". *PNAS*, **109** : 12302, 2012.
- PINO, O.; SÁNCHEZ, Y. & ROJAS, M. M. "Plant secondary metabolites as an alternative in pest management. I: Background, research approaches and trends". *Rev. Protección Veg.*, **28** : 81, 2013.
- POPP, J.; PETŐ, K. & NAGY, J. "Pesticide productivity and food security. A review". *Agron. Sustainable Dev.*, **33** : 243, 2013.
- PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B. & ZANELLA, R. "QuEChERS – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas". *Quím. Nova*, **32** : 1620, 2009.
- QIAN, M. & REINECCIUS, G. "Static headspace and aroma extract dilution analysis of Parmigiano Reggiano cheese". *J. Food Sci.*, **68** : 794, 2003.
- QIAO, Y.; XIE, B. J.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; FAN, G.; LIN, X. & PAN, S. Y. "Characterization of aroma active compounds in fruit juice and peel oil of jinchen sweet orange fruit (*Citrus sinensis* (L.) *osbeck*) by GC-MS and GC-O". *Molecules*, **13** : 1333, 2008.
- RAI, M.; PARALIKAR, P.; JOGEE, P.; AGARKAT, G.; INGLE, A. P.; DERITA, M. & ZACHINO, S. "Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives". *Int. J. Pharm.*, **519** : 67, 2017.
- RAJABI, H.; GHORBANI, M.; JAFARI, S. M.; SADEGHIL, A. & RAJABZADEH, Q. "Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials". *Food Hydrocoll.*, **51** : 327, 2015.
- RAMÍREZ, M. Á.; RODRÍGUEZ, A. T.; ALFONSO, L. & PENICHE, C. "Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications". *Biotecnol. Apl.*, **27** : 270, 2010.
- RASANEN, I.; VIINAMÄKI, J.; VUORI, E. & OJANPERÄ, I. "Headspace in-tube extraction gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of hydroxylic methyl-derivatized and volatile organic compounds in blood and urine". *J. Anal. Toxicol.*, **34** : 113, 2010.
- REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C. & ARNASON, J. T. "Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes Word". *Annu. Rev. Entomol.* **57** : 405, 2012.
- REZZADORI, K.; BENEDITTI, S. & AMANTE, E. R. "Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products". *Food Bioprod. Process.*, **90** : 606, 2012.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. & MELO, L. F. C. "Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos". *Quim. Nova*, **27** : 771, 2004.

- RIBEIRO, L. P.; DEQUECH, S. T. B.; CAMERA, C.; STURZA, V. S.; PONCIO, S. & VENDRAMIM, J. D. "Vertical and temporal distribution of *podoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) egg masses, parasitized and non-parasitized, on maize plants". *Maydica*, **59** :1, 2014.
- ROCCIA, P.; MARTÍNEZ, M. L.; LLABOT, J. M. & RIBOTTA, P. D. "Influence os spray-drying operating conditions on sunflower oil poder qualities". *Powder Technol.*, **254** : 307, 2014.
- RODEA-GONZÁLEZ, D. A.; CRUZ-OLIVARES, J.; ROMÁN-GUERRERO, A.; RODRÍGUEZ-HUEZO, M. E.; VERNON-CARTER, E. J. & PÉREZ-ALONSO, C. "Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispânica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices". *J. Food Eng.*, **111** : 102, 2012.
- RODRÍGUEZ, A.; PERIS, J. E.; REDONDO, A; SHIMADA T.; COSTELL E.; CARBONELL, I.; ROJAS, C. & PEÑA, L. "Impact of D-limonene synthase up- or down-regulation on sweet orange fruit and juice odor perception". *Food Chem.*, **217** : 139, 2017.
- ROHLFS, M. & CHURCHILL, A. C. L. "Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods". *Fungal Genet. Biol.*, **48** : 23, 2011.
- RUSSELL, P. E. "A century of fungicide evolution". *J. Agric. Sci.*, **143** : 11, 2005.
- SALAZAR-VALENCIA, P. J.; PÉREZ-MERCHANCANO, S. T. & BOLÍVAR-MARINÉZ, L. E. "Optical properties in biopolymers: lignina fragments". *Braz. J. Phys.*, **36** : 840, 2006.
- SANTOS, M. S.; MARTENDAL, E. & CARASEK, E. "Desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação de clorofórmio em amostras de águas saborizadas utilizando a técnica de *headspace* micro extração em fase sólida". *Orbital*, **1** : 238, 2009.
- SANZ, C.; ANSORENA, D.; BELLO, J. & CID, C. "Optimization Headspace Temperature and Time Sampling for Identification of Volatile Compounds in Ground Roasted Arabica Coffee". *J. Agric. Food Chem.*, **49** : 1364, 2001.
- SCHMIDT-DURÁN, A.; VILLALBA-VELÁSQUEZ, V.; CHACÓN-CERDAS, R.; MARTÍNEZ, K. & FLORES-MORA, D. " Larval stage prediction modelo f *Spodoptera frugiperda* collected in fig (*Ficus carica*) and discovery of *Apanteles* sp. Its parasitoid". *Tecnología en Marcha*, **28** : 47 2015.
- SEIBER, J. N.; COATS, J.; DUKE, S. O. & GROSS, A. D. "Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities". *J. Agric. Food Chem.*, **62** : 11613, 2014.
- SERRANO, M.; GALLEGO, M. & SILVA, M. "Static headspace gas chromatography-mass spectrometry for the one-step derivatization and extraction of eleven aldehydes in drinking water". *J. Chromatogr. A*, **1307** : 158, 2013.
- SHINDE, U. & NAGARSENKER, M. "Microencapsulation of eugenol by gelatin-sodium alginate complex coacervation". *Indian J. Pharm. Sci.*, **73** : 311, 2011.
- SINGH, M. N.; HEMANT, K. S. Y.; RAM, M. & SHIVAKUMAR, H. G. "Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery". *Res. Pharm. Sci.*, **5** : 65, 2010.
- SNOW, N. H. & BULLOCK, G. P. "Novel techniques for enhancing sensitivity in static headspace extraction-gas chromatography". *J. Chromatogr. A*, **1217** : 2726, 2010.
- SOOTTITANTAWAT, A.; TAKAYANA, K.; OKAMURA, K.; MURANAKA, D.; YOSHII, H.; FURUTA, T.; OHKAWARA, M. & LINKO, P. "Microencapsulation of *l*-menthol by spray drying and its release characteristics". *Innovative Food Sci. Emerging Technol.*, **6** : 163, 2005.
- SOUSA, F. A.; COSTA, A. I. G.; QUEIROZ, M. E. L. R.; TEÓFILO, R. F.; NEVES, A. A. & PINHO, G. P. "Evaluation of matrix effect on the GC response of eleven pesticides by PCA!". *Food Chem.*, **135** : 179, 2012.

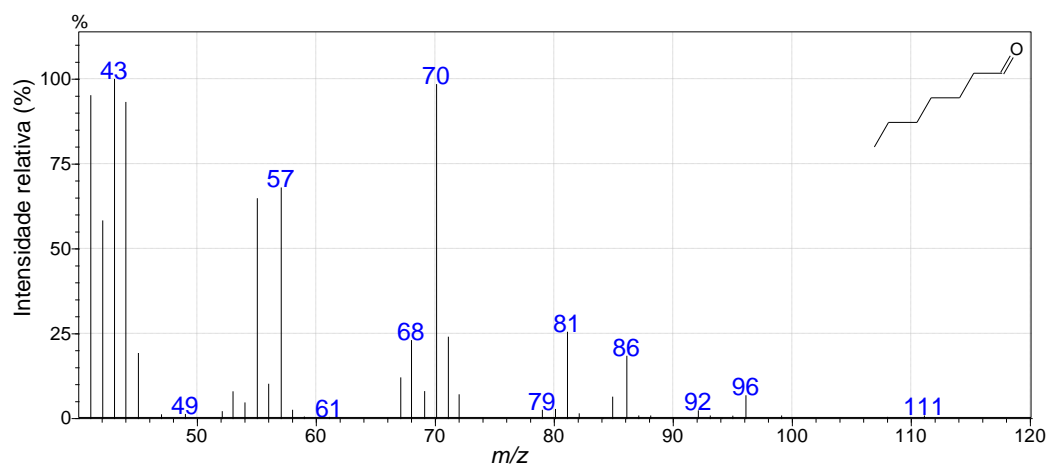
- SOUSA, F. A.; COSTA, A. I. G.; QUEIROZ, M. E. L. R.; TEÓFILO, R. F.; NEVES, A. N. & PINHO, G. P. "Evaluation of matrix effect on the GC response of eleven pesticides by PCA". *Food Chem.*, **135** : 179, 2012.
- SOUSSAN, E.; Cassel, S.; Blanzat, M. & Rico-Lattes, I. "Drug delivery by soft matter: matrix and vesicular carriers". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48** : 274, 2009.
- SOUZA, K. C. B.; BASSANI, V. L. & SCHAPOVAL, E. E. S. "Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route". *Phytomedicine*, **14** : 102, 2007.
- SOUZA, K. C. B.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. & ORTEGA, G. G. "The adjuvants aerosil 200 and Gelita-Sol-P influence on the technological characteristics of spray-dried powders from *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*". *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **26** : 331, 2000.
- SUTAPHANIT, P. & CHITPRASERT, P. "Optimisation of microencapsulation of holy basil essential oil in gelatin by response surface methodology". *Food Chem.* **150** : 313, 2014.
- TASCONE, O., ROY, C.; FILIPPI, J.-J. & MEIERHENRICH, U. J. "Use, analysis, and regulation of pesticides in natural extracts, essential oils, concretes, and absolutes". *Anal. Bioanal. Chem.*, **406** : 971, 2014.
- TAVARES, W. S.; CRUZ, I.; PETACCI, F.; ASSIS JÚNIOR, S. L.; FREITAS, S. S.; ZANUNCIO, J. C. & SERRÃO, J. E. "Potential use of Asteraceae extracts to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae)". *Ind. Crop Prod.*, **30** : 384, 2009.
- TAVARES, W. S.; CRUZ, I.; PETACCI, F.; FREITAS, S. S.; SERRÃO, J. E. & ZANUNCIO, J. C. "Insecticide activity of piperine: toxicity to eggs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) and phytotoxicity on several vegetables". *J. Med. Plants Res.*, **5** : 5301, 2011.
- TAVARES, W. S.; FREITAS, S. S.; GRAZZIOTTI, G. H.; PARENTE, L. M. L.; LIÃO, L. M. & ZANUNCIO, J. C. "Ar-turmene from *Curcuma longa* (Zinziberaceae) rhizomes and effects on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)". *Ind. Crops Prod.*, **46** : 158, 2013.
- TAVERNIERS, I.; LOOSE, M. D. & BOCKSTAELE, E. V. "Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance". *Trends Anal. Chem.*, **23** : 535, 2004.
- TEWA-TAGNE, P.; DEGOBERT, G.; BRIANÇON, S.; BORDES, C.; GAUVRIT, J.-Y.; LANTERI, P. & FESSI, H. "Spray-drying nanocapsules in presence of colloidal silica as drying auxiliary agent: formulation and process variables optimization using experimental designs". *Pharm. Res.*, **24** : 650, 2007.
- Than, M. L.; Thibeau, P.; Thibaut, M. A. & Voilley, A. "Interactions between volatile and non-volatile compounds in the presence of water". *Food Chem.*, **43** : 129, 1992.
- THOMPSON, M.; Ellison, S. L. R. & Wood, R. "Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis". *Pure Appl. Chem.*, **74** : 835, 2002.
- TILMAN, D.; CASSMAN, K. G.; MATSON, P. A.; NAYLOR, R. & POLASKY, S. "Agricultural sustainability and intensive production practices". *Nature*, **418** : 671, 2002.
- TONON, R. V.; BRABET, C. & HUBINGER, M. D. "Influence of process conditions on the physicochemical properties of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) powder produced by spray drying". *J. Food Eng.*, **88** : 411, 2008.

- TRIPATHI, A. K.; PRAJAPATI, V.; KHANUJA, S. P. & KUMAR, S. "Effect of d-Limonene on Three Stored-Product Beetles". *J. Econ. Entomol.*, **96** : 990, 2003.
- TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A. & ITÄVAARA, M. "Biodegradation of lignin a compost environment: a review". *Bioresour. Technol.*, **72** : 169, 2000.
- VENKATESAN, P.; MANAVALAN, R. & VALLIAPPAN, K. V. "Microencapsulation: a vital technique in novel drug delivery system". *J. Pharm. Sci. & Res.*, **1** : 26, 2009.
- VISENTAINER, J. V. "Aspectos analíticos do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos". *Quim. Nova*, **35** : 274, 2012.
- WANG, J.; PENG, H.; DUAN, C. & GUAN, Y. "Developmetn of Micro-Flame Ionization Detector for Portable Gas Chromatograph". *Chin. J. Anal. Chem*, **39** : 439, 2011.
- WANG, J.; WANG, H.; DUAN, C. & GUAN, Y. "Micro-flame ionization detector with a novel structure for portable gas chromatograph". *Talanta*, **82** : 1022, 2010.
- WARDENCKI, W.; SOWIŃSKI, P. & CURYO, J. "Evaluation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile carbonyl compounds in spirits and alcoholic beverages". *Chromatogr. A*, **984**: 89, 2003.
- WEI, S.; ZHANG, H.; WANG, Y.; WANG, L.; LI, X.; WANG, Y.; ZHANG, H.; XU, X. & SHI, Y. "Ultrasonic nebulization extaction-heating gas flow transfer-headspace single drop microextraction of essential oil from pericarp of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim.". *J. Chromatogr. A*, **1218** : 4599, 2011.
- WILSON, C. & TISDEL, C. "Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs". *Ecological Economics*, **39** : 449, 2001.
- YOSHII, H.; SOOTTITANTAWAT, A.; LIU, X.-D.; ATARASHI, T.; FURUTA, T.; AISHIMA, S.; OHGAWARA, M. & LINKO, P. "Flavor release from spray-dried maltodextrin/gum arabic or soy matrices as a function of storage relative humidity". *Innovative Food Sci. Emerging Technol.*, **2** : 55–61, 2001.
- ZHANG, D.; DEL RIO-CHANONA, E. A. & SHAH, N. "Screening synthesis pathways for biomass derived sustainable polymer production". **5** : 4388, 2017.
- ZENNER, I; ARÉVALO, H. & MEJÍA, R. "El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y algunas plantas transgénicas". *Ver. Colomb. Cienc. Hortic.*, **1** : 103, 2007.
- ZHOU, O.; BAI, H.; XIE, G. & XIAO, J. "Trace determination of organophosphorus pesticides in environmental samples by temperatura-pcontrolled ionic liquid dispersive liquide-phase microextraction". *J. Chromatogr. A*, **1188** : 148, 2008.
- ZORZI, G. K.; CARVALHO, E. L. S.; VON POSER, G. L. & TEIXEIRA, H. F. "On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts". *Rev. Bras. Farmacogn.*, **25** : 426, 2015.

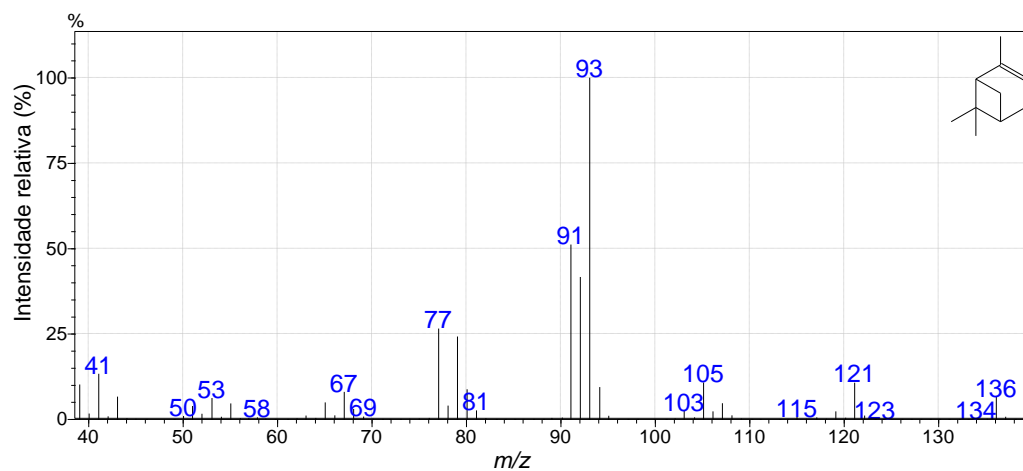
APÊNDICE A

Espectro de massas e estrutura dos compostos identificados no óleo essencial de citros. Os espectros estão listados em ordem do tempo de retenção.

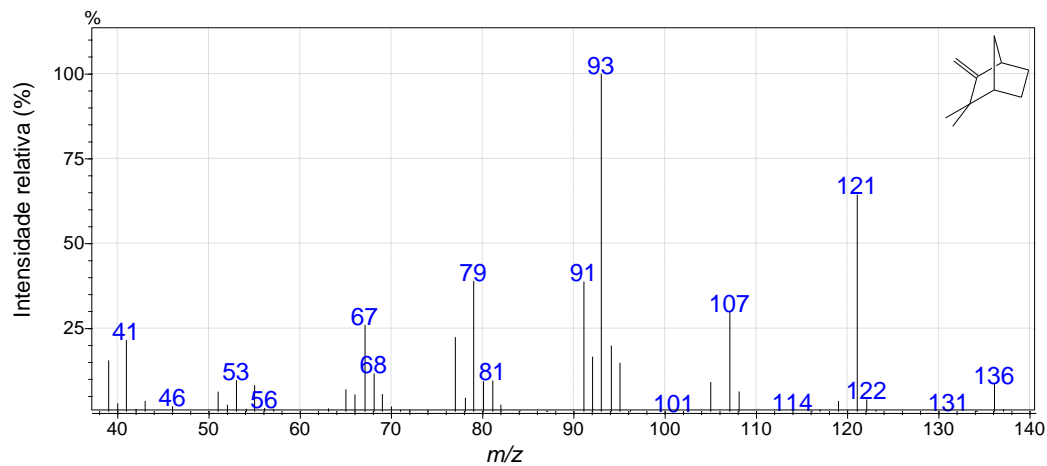
$T_R = 5,23$ I.R. = 903 I.R._{Lit} = 901 I.K._{Lit} = 902 **heptanal**
MM = 114 FM = C₇H₁₄O



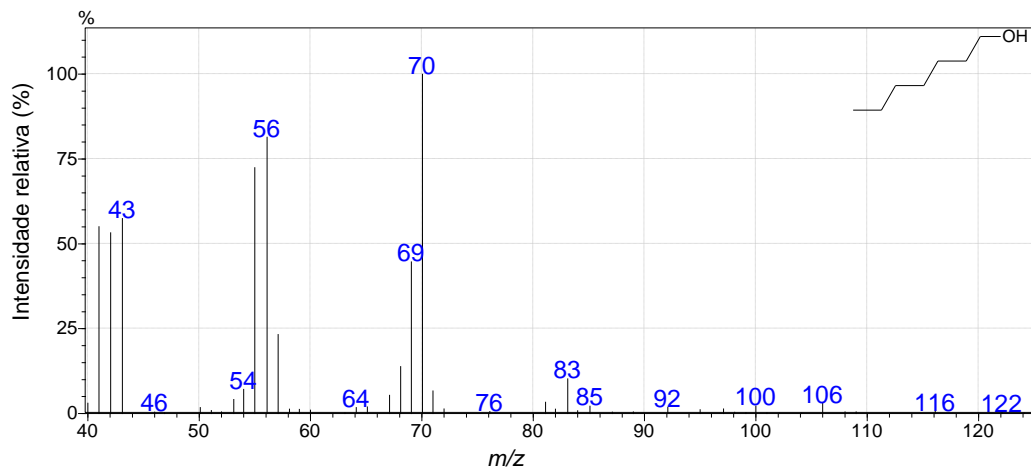
$T_R = 6,13$ I.R. = 934 I.R._{Lit} = 932 I.K._{Lit} = 939 **α -pineno**
MM = 136 FM = C₁₀H₁₆



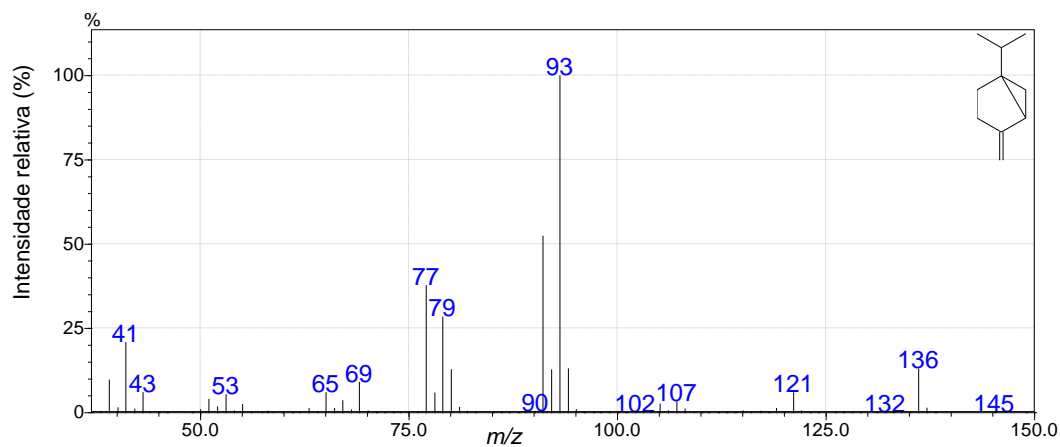
$T_R = 6,57$ I.R. = 950 I.R._{Lit} = 946 I.K._{Lit} = 954 **canfeno**
MM = 136 FM = C₁₀H₁₆



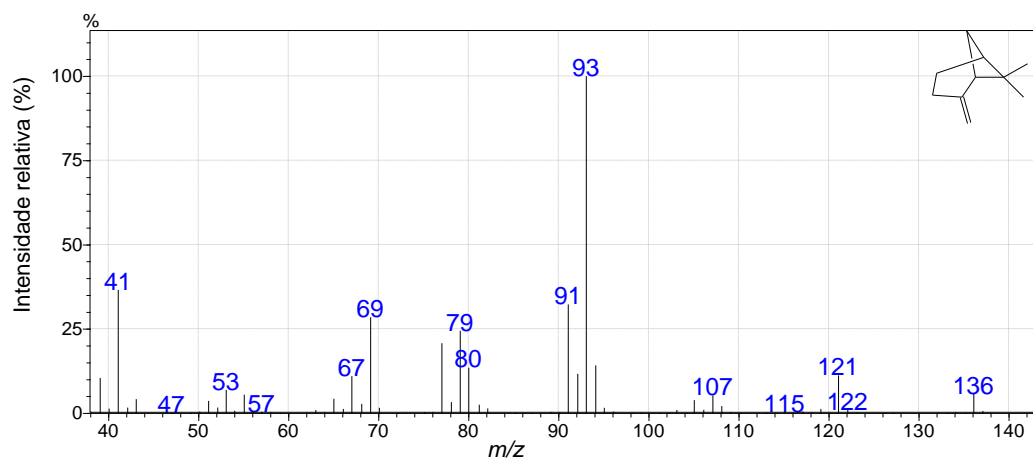
$T_R = 7,12$ I.R. = 968 I.R._{Lit} = 959 I.K._{Lit} = 966 **heptanol**
MM = 116 FM = C₇H₁₆O



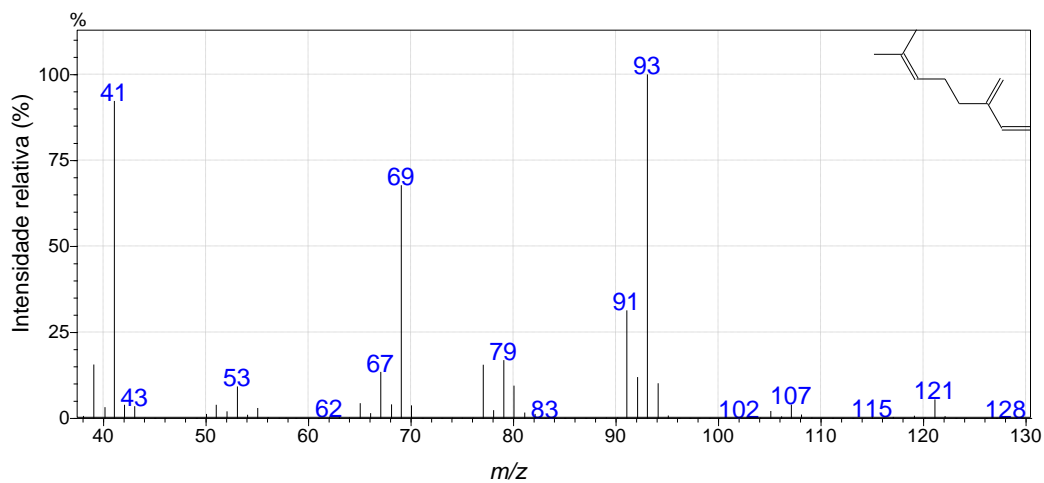
$T_R = 7,29$ I.R. = 974 I.R._{Lit} = 969 I.K._{Lit} = 975 **sabineno**
MM = 136 FM = C₁₀H₁₆



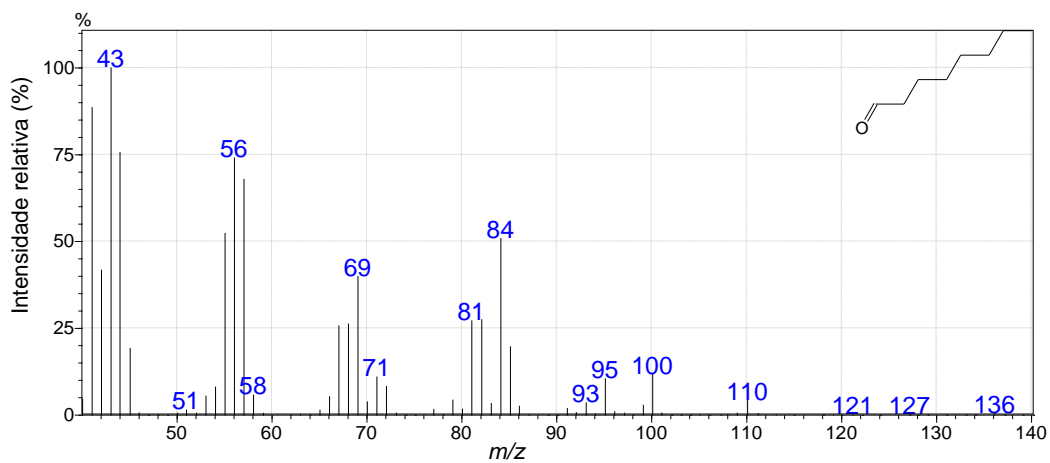
$T_R = 7,42$ I.R. = 979 I.R._{Lit} = 974 I.K._{Lit} = 979 **β -pineno**
MM = 136 FM = C₁₀H₁₆



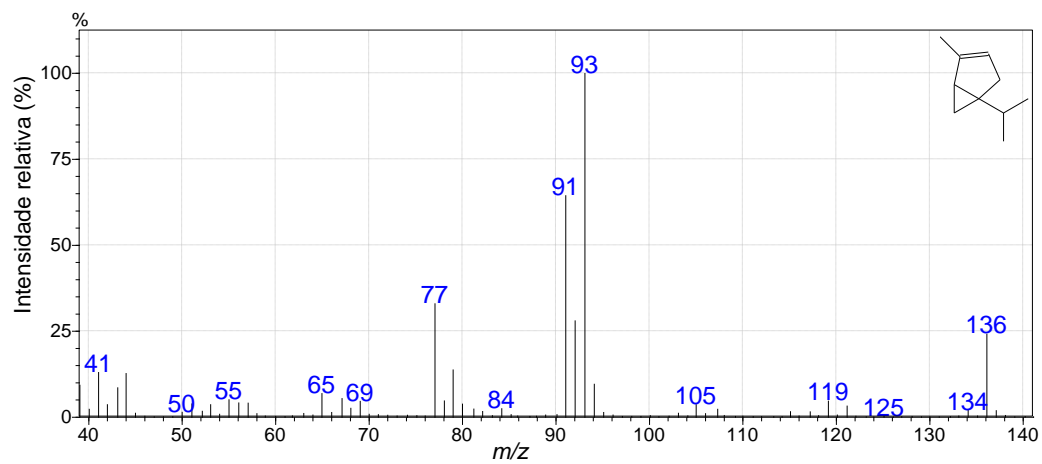
$T_R = 7,81$ I.R. = 992 I.R._{Lit} = 988 I.K._{Lit} = 990 **β -mirceno**
MM = 136 FM = C₁₀H₁₆



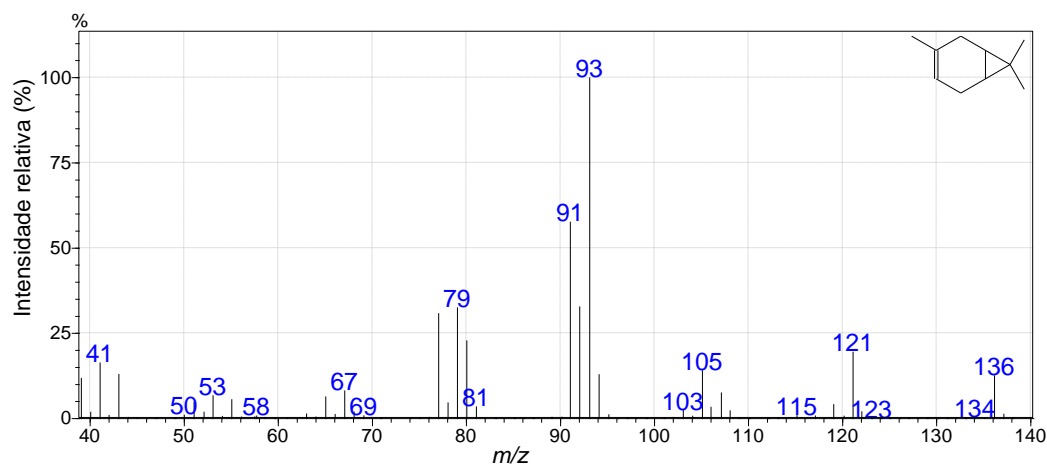
$T_R = 8,20$ I.R. = 904 I.R._{Lit} = 998 I.K._{Lit} = 998 **octanal**
MM = 128 FM = C₈H₁₆O



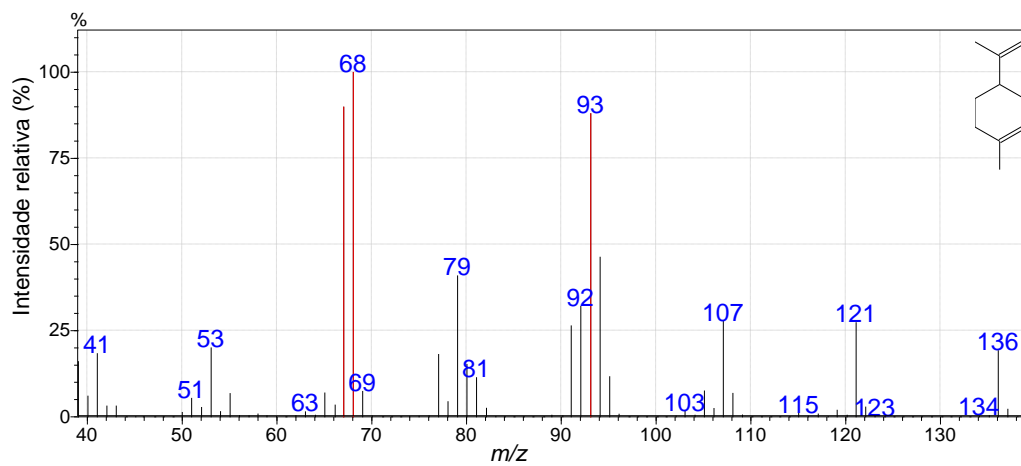
$T_R = 8,29$ I.R. = 907 I.R._{Lit} = 924 I.K._{Lit} = 930 **α -tujeno**
MM = 136 FM = C₁₀H₁₆



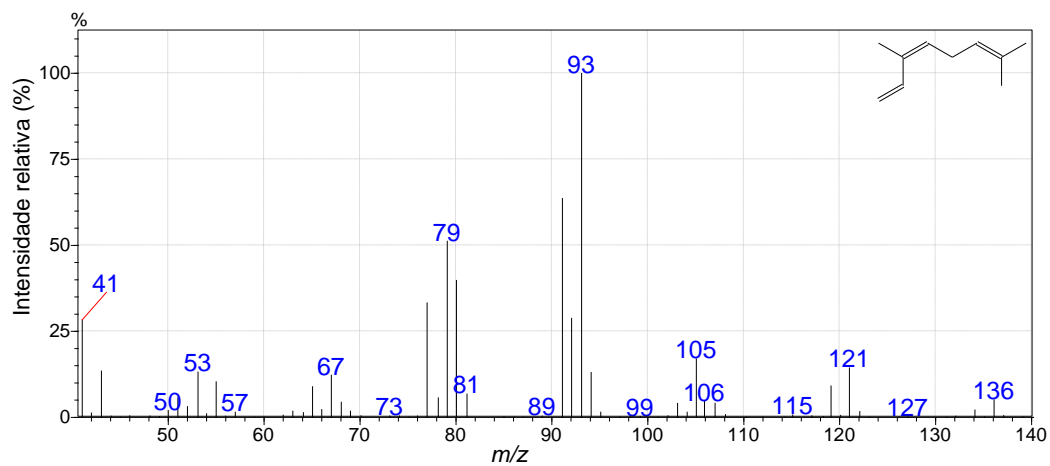
$T_R = 8,51$ I.R. = 1013 I.R._{Lit} = 1008 I.K._{Lit} = 1011 **3-careno**
MM = 136 FM = C₁₀H₁₆



$T_R = 9,21$ I.R. = 1031 I.R._{Lit} = 1024 I.K._{Lit} = 1029 ***d*-limoneno**
MM = 136 FM = C₁₀H₁₆

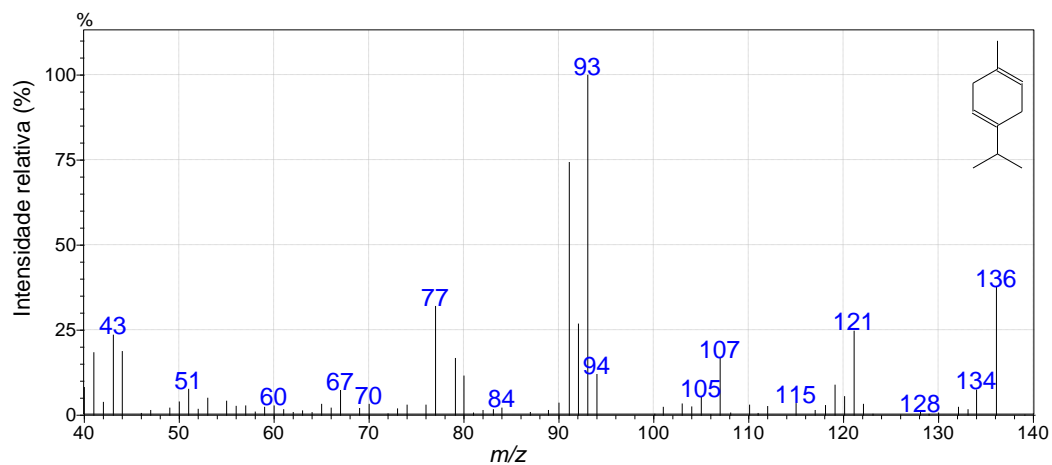


$T_R = 9,84$ I.R. = 1048 I.R._{Lit} = 1044 I.K._{Lit} = 1050 ***E*- β -ocimeno**
MM = 136 FM = C₁₀H₁₆



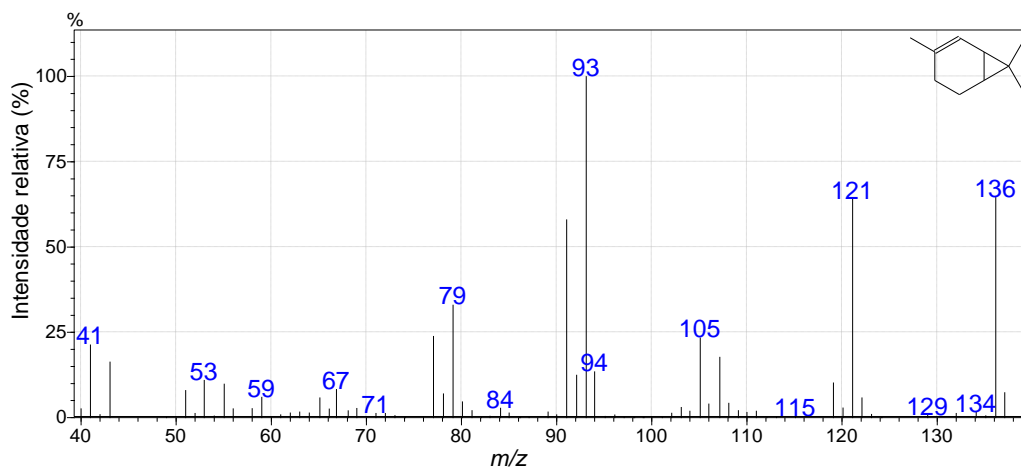
$T_R = 10,28$ I.R. = 1060 I.R._{Lit} = 1054 I.K._{Lit} = 1059 **γ -terpineno**

MM = 136 FM = C₁₀H₁₆

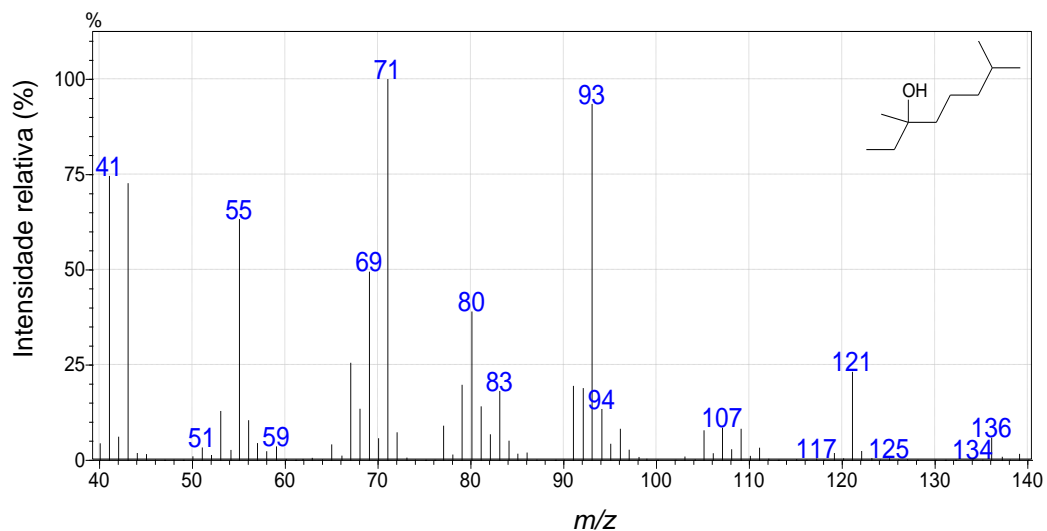


$T_R = 11,42$ I.R. = 1091 I.R._{Lit} = 1001 I.K._{Lit} = 1002 **2-careno**

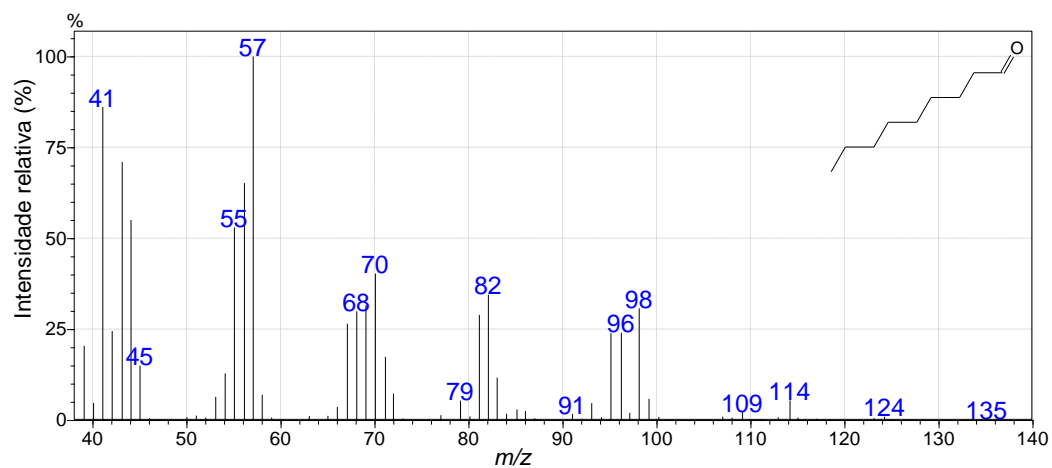
MM = 136 FM = C₁₀H₁₆



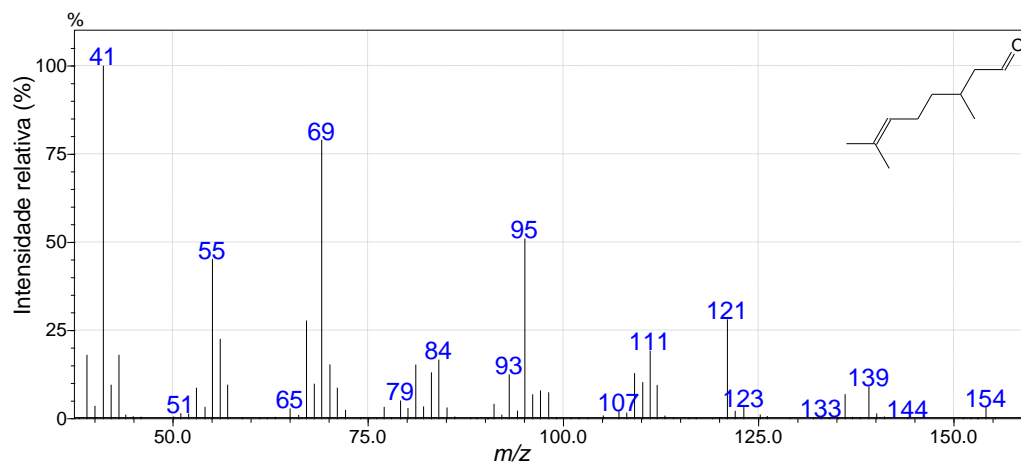
$T_R = 11,83$ I.R. = 1101 I.R._{Lit} = 1095 I.K._{Lit} = 1096 **linalol**
MM = 116 FM = C₁₀H₁₈O



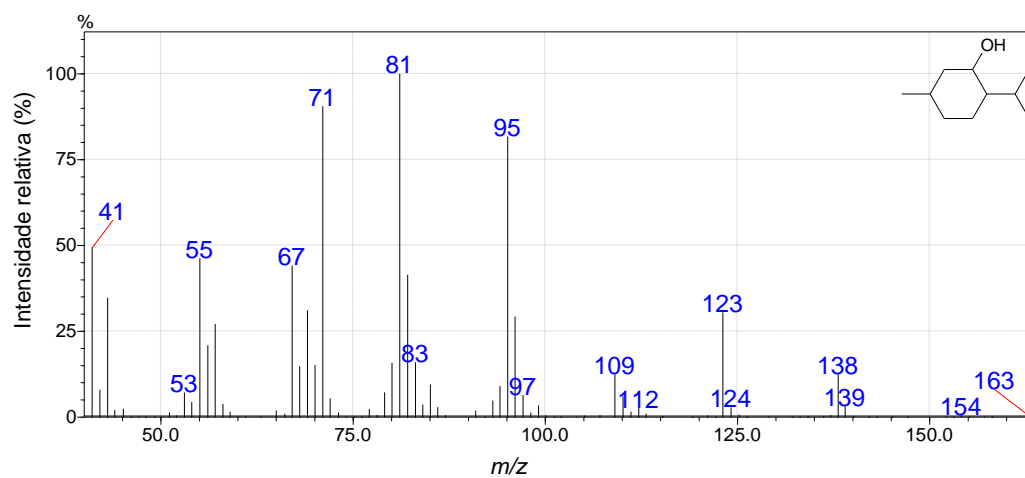
$T_R = 12,03$ I.R. = 1106 I.R._{Lit} = 1100 I.K._{Lit} = 1100 **nonanal**
MM = 136 FM = C₉H₁₈O



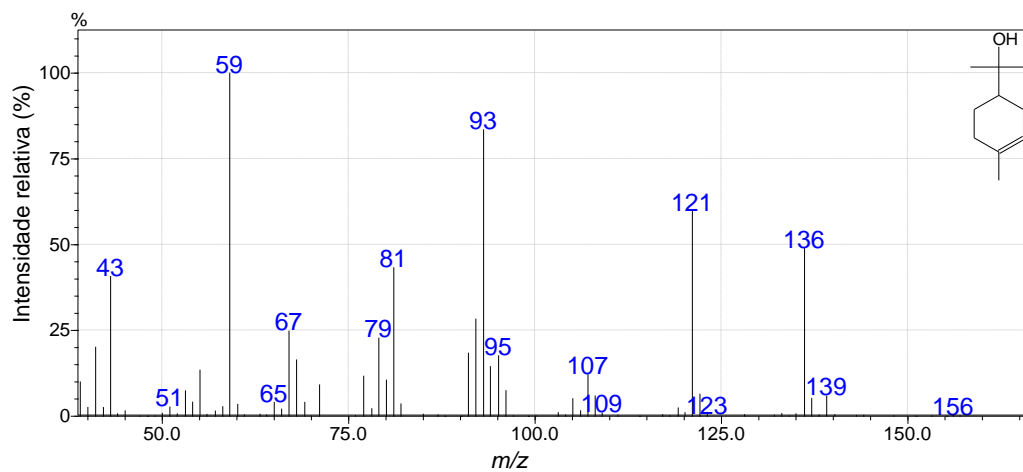
$T_R = 14,07$ I.R. = 1154 I.R._{Lit} = 1148 I.K._{Lit} = 1153 **citronelal**
MM = 154 FM = C₁₀H₁₈O



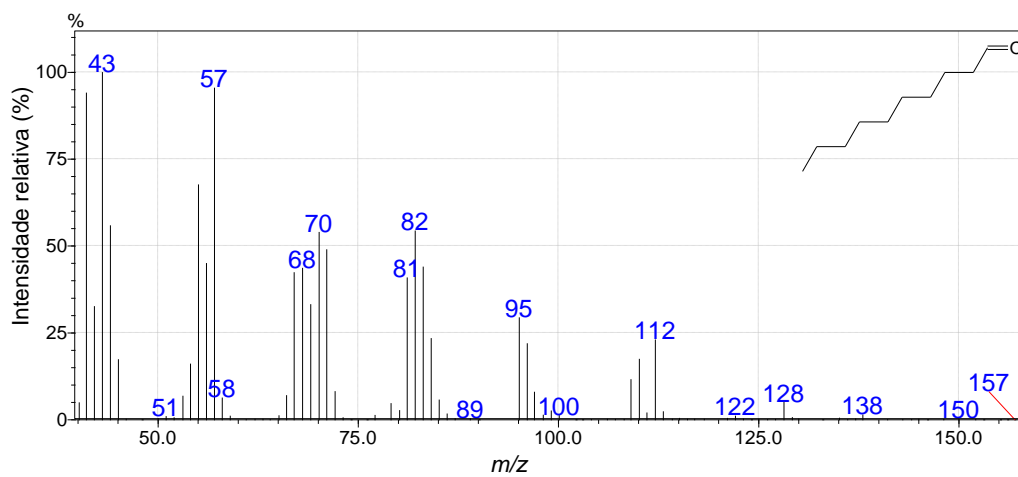
$T_R = 14,91$ I.R. = 1174 I.R._{Lit} = 1167 I.K._{Lit} = 1171 **mentol**
MM = 156 FM = C₁₀H₂₀O



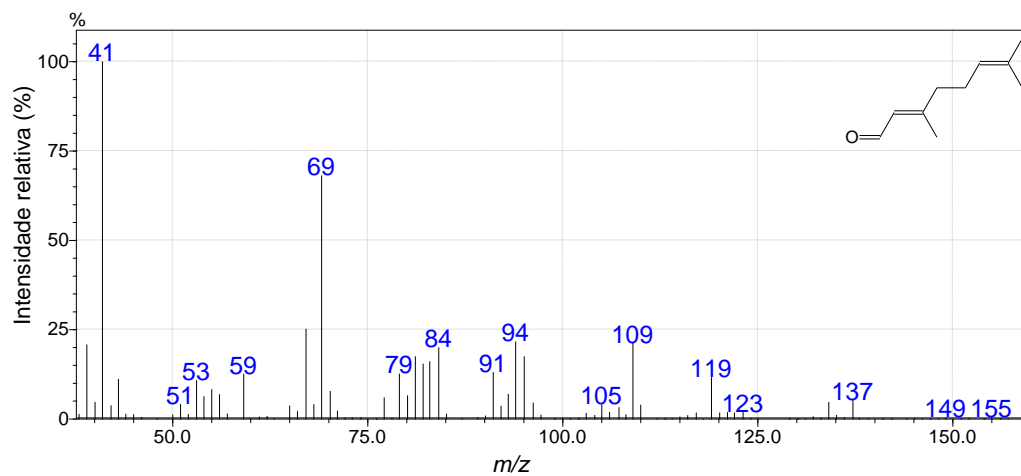
$T_R = 15,69$ I.R. = 1193 I.R._{Lit} = 1186 I.K._{Lit} = 1188 **α -terpineol**
MM = 154 FM = C₁₀H₁₈O



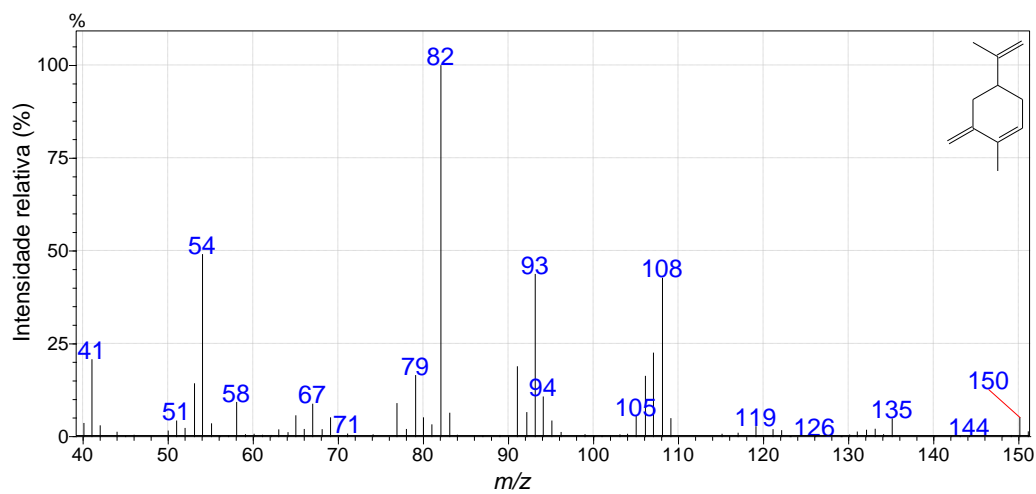
$T_R = 16,31$ I.R. = 1207 I.R._{Lit} = 1201 I.K._{Lit} = 1201 **decanal**
MM = 156 FM = C₁₀H₂₀O



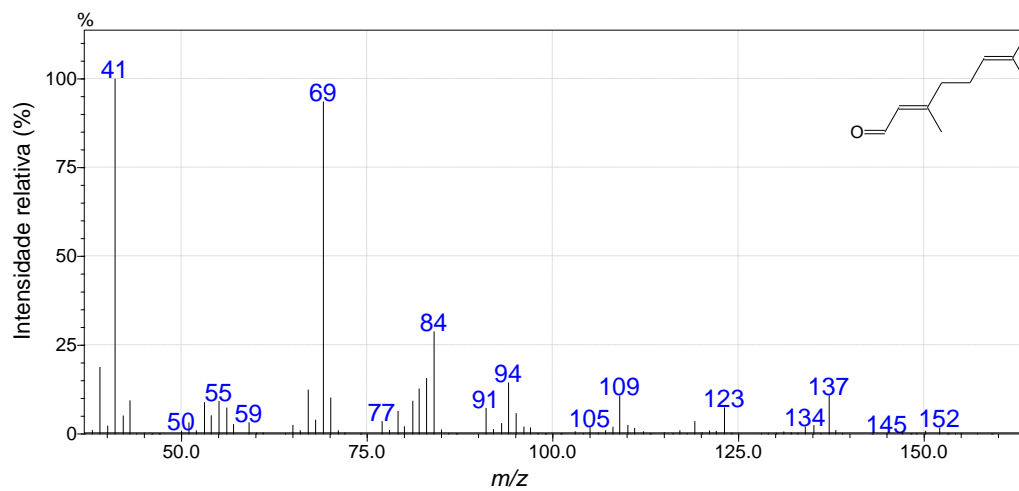
$T_R = 17,86$ I.R. = 1243 I.R._{Lit} = 1235 I.K._{Lit} = 1238 **neral**
MM = 152 FM = C₁₀H₁₆O



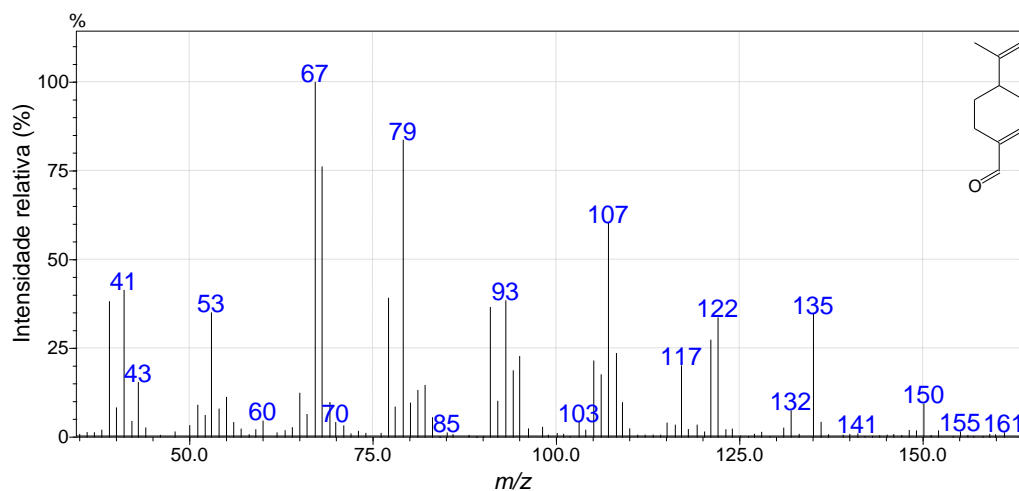
$T_R = 18,02$ I.R. = 1247 I.R._{Lit} = 1239 I.K._{Lit} = 1243 **d-carvona**
MM = 150 FM = C₁₀H₁₄O



$T_R = 19,15$ I.R. = 1273 I.R._{Lit} = 1264 I.K._{Lit} = 1267 **geranial**
 MM = 152 FM = C₁₀H₁₆O



$T_R = 19,31$ I.R. = 1277 I.R._{Lit} = 1269 I.K._{Lit} = 1271 **perilal**
 MM = 150 FM = C₁₀H₁₄O



T_R = tempo de retenção em minutos;

I.R. = índice de retenção;

I.R._{Lit} = índice de retenção proposto por ADAMS (2009);

I.K._{Lit} = índice de Kovats proposto por ADAMS (2009);

MM = massa molecular (g mol⁻¹);

FM = fórmula molecular.

APÊNDICE B

Tabelas das análises de variância para as curvas de calibração de α -limoneno preparado em matrizes diversas.

Matriz: acetona

	SQ	g.l	MQ	Fcal.	Ftab.
SQR	27.77	1	27.77	10934.42	4.49
SQr	0.04	16	0.00		
SQT	27.81	17			
SQEP	0.03	2	0.02	0.08	3.26
SQFaj	0.01	4	0.00		

Matriz: gelatina e aerosil

	SQ	g.l	MQ	Fcal.	Ftab.
SQR	99.82	1	99.82	6624.27	4.49
SQr	0.24	16	0.01		
SQT	100	17			
SQEP	0.16	12	0.01	1.61	3.26
SQFaj	0.08	4	0.02		

Matriz: gelatina

	SQ	g.l	MQ	F cal.	Ftab.
SQR	86.714	1	86.71	7937.79	4.49
SQr	0.17	16	0.01		
SQT	86.89	17			
SQEP	0.11	12	0.01	1.61	3.26
SQFaj	0.06	4	0.02		

Matriz: lignina e aerosil

	SQ	g.l	MQ	F cal.	Ftab.
SQR	37.27	1	37.27	3275.13	4.49
SQr	0.18	16	0.01		
SQT	37.46	17			
SQEP	0.12	12	0.01	1.71	3.26
SQFaj	0.07	4	0.016		

Matriz: lignina

	SQ	g.l	MQ	F cal.	Ftab.
SQR	32.73	1	32.73	3145.24	4.49
SQr	0.17	16	0.01		
SQT	32.89	17			
SQEP	0.15	12	0.01	0.34	3.26
SQFaj	0.02	4	0.00		

SQ = Soma do quadrado;

g.l. = Grau de liberdade;

MQ = Média quadrática;

F cal. = valor obtido no teste F

F tab. = valor tabelado para F à nível de 95% de significância.

SQR = Soma do quadrado da regressão;

SQr = Soma do quadrado do resíduo;

SQT = Soma do quadrado total;

SQEP = Soma do quadrado do erro puro;

SQFaj = Soma do quadrado da falta de ajuste.

APÊNDICE C

Tabelas da análise de variância e do teste de comparações múltiplas entre as médias - Tukey (em nível de 5% de probabilidade).

Gelatina

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
experimento	15	354955317.937500	23663687.862500	1.0E+0009	0.0000
erro	0	0.000000000E+0000	0.000000000E+0000		
Total corrigido	15	354955317.937500			
CV (%) =	0.00				
Média geral:	-3293.4375000	Número de observações:	16		

Teste Tukey para a FV experimento

DMS: 0 NMS: 0,05

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
7	-8361.000000	a1
15	-8316.000000	a2
5	-7039.000000	a3
11	-6890.000000	a4
12	-5475.000000	a5
1	-5463.000000	a6
4	-5217.000000	a7
9	-4697.000000	a8
10	-4005.000000	a9
8	-3561.000000	a10
6	-3557.000000	a11
3	-3329.000000	a12
14	-3089.000000	a13
2	776.000000	a14
13	7478.000000	a15
16	8050.000000	a16

Lignina

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
experimento	15	126859282.437500	8457285.495833	1.0E+0009	0.0000
erro	0	0.000000000E+0000	0.00000000E+0000		
Total corrigido	15	126859282.437500			
CV (%) =	0.00				
Média geral:	-110.1875000		Número de observações:	16	

Teste Tukey para a FV experimento

DMS: 0 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 1
 Erro padrão: 0

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5	-3266.000000	a1
10	-3068.000000	a2
14	-2728.000000	a3
2	-2387.000000	a4
1	-2090.000000	a5
16	-1754.000000	a6
8	-1211.000000	a7
15	-499.000000	a8
13	211.000000	a9
6	252.000000	a10
11	323.000000	a11
9	646.000000	a12
12	1206.000000	a13
4	1691.000000	a14
3	2277.000000	a15
7	8634.000000	a16

APÊNDICE D

Tabelas da análise de variância e do teste de comparações múltiplas entre as médias - Tukey (em nível de 5% de probabilidade).

d-limoneno $50.10^2 \text{ mg L}^{-1}$

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
exp	2	11850.000000	5925.000000	1.777	0.2477
erro	6	20004.000000	3334.000000		
Total corrigido	8	31854.000000			
CV (%) =	10.50				
Média geral:	550.0000000	Número de observações:		9	

Teste Tukey para a FV exp

DMS: 144,598919711455 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 33,3366665000167

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	500.000000	a1
2	565.000000	a1
3	585.000000	a1

d-limoneno 12,5.10² mg L⁻¹

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
exp	2	2114.000000	1057.000000	1057.000	0.0000
erro	6	6.000000	1.000000		
Total corrigido	8	2120.000000			
CV (%) =	0.74				
Média geral:	135.3333333	Número de observações:	9		

Teste Tukey para a FV exp

DMS: 2,50427634148412 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,577350269189626

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	124.000000	a1
1	125.000000	a1
2	157.000000	a2

d-limoneno 12.10¹ mg L⁻¹

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
exp	2	38.000000	19.000000	19.000	0.0025
erro	6	6.000000	1.000000		
Total corrigido	8	44.000000			
CV (%) =	1.00				
Média geral:	99.6666667	Número de observações:	9		

Teste Tukey para a FV exp

DMS: 2,50427634148412 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,577350269189626

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	97.000000	a1
1	100.000000	a2
2	102.000000	a2

APÊNDICE E

Tabelas das análises de variância para as curvas de calibração de α -limoneno preparado em matrizes diversas.

Matriz: gelatina e acetona

	SQ	g.l	MQ	Fcal.	Ftab.
SQR	520.57	1	520.57	6406.23	4.49
SQr	1.30	16	0.08		
SQT	521.87	17			
SQEP	0.63	2	0.05	3.22	3.26
SQFaj	0.67	4	0.17		

Matriz: gelatina e óleo mineral

	SQ	g.l	MQ	Fcal.	Ftab.
SQR	1216.35	1	1216.35	2657.56	4.49
SQr	7.32	16	0.46		
SQT	1223.67	17			
SQEP	3.85	12	0.32	2.70	3.26
SQFaj	3.47	4	0.87		

Matriz: gelatina e p-cimeno

	SQ	g.l	MQ	F cal.	Ftab.
SQR	331.32	1.00	331.32	5036.08	4.49
SQr	1.05	16.00	0.07		
SQT	332.37	17.00			
SQEP	0.53	12.00	0.04	2.99	3.26
SQFaj	0.53	4.00	0.13		

Matriz: lignina e acetona

	SQ	g.l	MQ	F cal.	Ftab.
SQR	832.08	1	832.08	6088.38	4.49
SQr	2.19	16	0.14		
SQT	834.27	17			
SQEP	1.16	12	0.10	2.68	3.26
SQFaj	1.03	4	0.26		

Matriz: lignina e óleo mineral

	SQ	g.l	MQ	F cal.	Ftab.
SQR	3352.33	1	3352.33	3518.33	4.49
SQr	15.25	16	0.95		
SQT	3367.58	17			
SQEP	7.81	12	0.65	2.85	3.26
SQFaj	7.43	4	1.86		

Matriz: lignina e p-cimeno

	SQ	g.l	MQ	F cal.	Ftab.
SQR	132.12	1	132.12	2981.91	4.49
SQr	0.71	16	0.04		
SQT	132.83	17			
SQEP	0.61	12	0.05	0.50	3.26
SQFaj	0.10	4	0.03		

SQ = Soma do quadrado;

g.l. = Grau de liberdade;

MQ = Média quadrática;

F cal. = valor obtido no teste F

F tab. = valor tabelado para F à nível de 95% de significância.

SQR = Soma do quadrado da regressão;

SQr = Soma do quadrado do resíduo;

SQT = Soma do quadrado total;

SQEP = Soma do quadrado do erros puro;

APÊNDICE F

Tabelas da análise de variância e do teste de comparações múltiplas entre as médias - Tukey (em nível de 5% de probabilidade).

Peso das pupas

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
exp	9	5444.400000	604.933333	1.153	0.3293
erro	150	78687.375000	524.582500		
Total corrigido	159	84131.775000			
CV (%) =	9.29				
Média geral:	246.6625000	Número de observações:	160		

Teste Tukey para a FV exp

DMS: 26,0131552942984 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 16

Erro padrão: 5,72594151646696

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
Branco (lignina)	237.000000	a1
Lignina 10 ⁴	238.187500	a1
Óleo essencial puro	240.187500	a1
Gelatina 10 ⁴	247.750000	a1
Lignina 10 ²	247.937500	a1
Branco (gelatina)	248.062500	a1
Branco (controle)	249.625000	a1
Gelatina 10 ²	251.062500	a1
Lignina 10 ³	251.250000	a1
Gelatina 10 ³	255.562500	a1

Quantidade de ovos

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
exp	9	9885120.000000	1098346.666667	2745.867	0.0000
erro	20	8000.000000	400.000000		
Total corrigido	29	9893120.000000			
CV (%) =	1.27				
Média geral:	1574.0000000		Número de observações:	30	

Teste Tukey para a FV exp					

DMS: 57,8360125074873 NMS: 0,05					

Média harmonica do número de repetições (r): 3
 Erro padrão: 11,5470053837925

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
Branco (lignina)	730.000000	a1
Lignina 10 ³	860.000000	a2
Lignina 10 ²	890.000000	a2
Controle (dieta)	1360.000000	a3
Gelatina 10 ³	1450.000000	a4
Gelatina 10 ⁴	1730.000000	a5
Lignina 10 ⁴	1990.000000	a6
Óleo essencial puro	2210.000000	a7
Gelatina 10 ²	2240.000000	a7 a8
Branco (gelatina)	2280.000000	a8