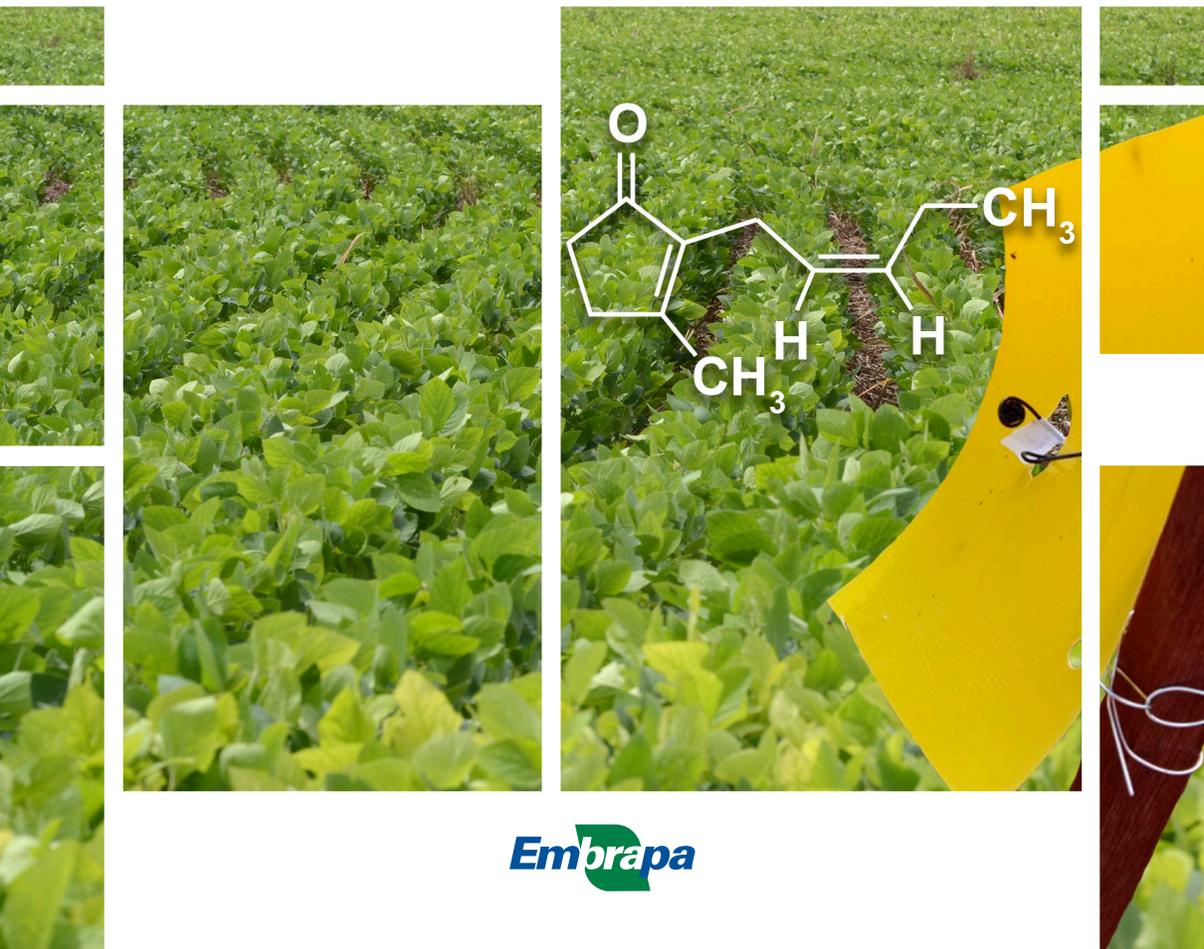


Estudo da Aplicação de Lignina Kraft em Formulação de Liberação Controlada para Manejo Integrado de Pragas



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroenergia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
17**

**Estudo da Aplicação de Lignina Kraft em
Formulação de Liberação Controlada
para Manejo Integrado de Pragas**

*Silvio Vaz Jr.
Maria Carolina Blassioli Moraes
Eveline Soares Costa
Miguel Borges
Raul Alberto Laumann
Jorge Luiz Colodette*

**Embrapa Agroenergia
Brasília, DF
2018**

Embrapa Agroenergia
Parque Estação Biológica (PqEB), s/nº
Ed. Embrapa Agroenergia
Caixa Postal 40315
CEP 70770-901, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-1581
Fax: +55 (61) 3448-1589
www.embrapa.br/agroenergia
www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

Embrapa Agroenergia

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agroenergia

Presidente
Alexandre Alonso Alves

Secretária-Executiva
Lorena Costa Garcia Calsing

Membros
Adilson Kenji Kobayashi
André Pereira Leão
Dasciana de Sousa Rodrigues
Emerson Léo Schultz
Felipe Brandão de Paiva Carvalho
Maria Iara Pereira Machado
Thais Fabiana Chan Salum
Wesley Gabriel de Oliveira Leal

Supervisão editorial e revisão de texto
Luciane Chedid Melo Borges

Normalização bibliográfica
Maria Iara Pereira Machado

Tratamento das ilustrações e
editoração eletrônica
Maria Goreti Braga dos Santos

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Fotos da capa
Silvio Vaz Jr., Neide Makiko Furukawa e
André Fachini Minitti. Montagem, tratamento e
ilustração de Maria Goreti B. dos Santos.

1ª edição
Publicação digitalizada (2018)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroenergia

Estudo da Aplicação de Lignina Kraft em Formulação de Liberação Controlada
para Manejo Integrado de Pragas / autores, Silvio Vaz Junior ... [et al.]. –
Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2018.

46 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Agroenergia,
ISSN 2177-0395 ; 17).

Disponível em: <http://www.embrapa.br/agroenergia/publicacoes>

1. biomassa lignocelulósica. 2. Semioquímicos. 3. Adsorção. 4. dessorção. I.
Vaz Junior, Sílvio. II. Série.

333.9539 – CDD 22.

Sumário

Resumo.	5
Abstract.	7
Introdução.....	8
Objetivos.....	13
Material e Métodos.....	14
Resultados e Discussão.....	24
Conclusões.....	43
Agradecimentos.....	43
Referências.....	44

Estudo da Aplicação de Lignina Kraft em Formulação de Liberação Controlada para Manejo Integrado de Pragas

Sílvio Vaz Jr.¹

Maria Carolina Blassioli Moraes²

Eveline Soares Costa³

Miguel Borges⁴

Raul Alberto Laumann⁵

Jorge Luiz Colodette⁶

Resumo – A lignina, resíduo abundante da indústria de papel e celulose, foi utilizada como suporte para promover a liberação controlada do semioquímico *cis*-jasmone. Foi desenvolvido um processo de adsorção simples, solubilizando a primeira em acetona e adicionando o semioquímico. A lignina utilizada neste estudo foi obtida pela precipitação do licor negro do processo kraft de polpação de madeiras, majoritariamente o eucalipto. Para a determinação da proporcionalidade entre a lignina e o semioquímico, foi elaborado um experimento em bloco, sendo testadas quatro proporções diferentes entre os dois materiais. Todos os experimentos foram analisados por aeração para determinar o grau de liberação do *cis*-jasmone de cada um. Desse modo, verificou-se que a quantidade de lignina utilizada no processo de adsorção do *cis*-jasmone foi diretamente proporcional à concentração liberada do mesmo. No intuito de estudar o mecanismo de liberação após a interação molecular da lignina com o semioquímico, dois compostos com polaridades diferentes à do *cis*-jasmone foram utilizados, o linalol (polaridade superior) e o tetradeca-

¹ Químico, doutor em Química Analítica, pesquisador da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

² Química, doutora em Química Analítica, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

³ Química, doutora em Química Orgânica, bolsista de pós-doutorado da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

⁴ Biólogo, doutor em Insect Chemical Ecology, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

⁵ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

⁶ Engenheiro florestal, Ph.D. em “Environmental Science and Engineering”, professor da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

no (polaridade inferior). Os resultados obtidos demonstraram que compostos polares sofrem uma maior interação com a lignina, promovendo uma liberação mais lenta.

Foram realizados experimentos a campo e de olfatométrica para atração do parasitoide *T. podisi*, com um resultado positivo, utilizando-se a formulação lignina-semioquímico. Com isso, foi possível observar que a lignina apresenta alto potencial para ser utilizada como suporte para a promoção da liberação controlada do semioquímico *cis*-jasmone, o que pode vir a ser estendido a outras moléculas de agroquímicos.

Termos para indexação: biomassa lignocelulósica, semioquímicos, adsorção, dessorção.

Study of the Application of Kraft Lignin in Controlled Release Formulation for Integrated Pest Management

Abstract – Lignin, an abundant residue in the pulp and paper industry, was used as a support to promote the controlled release of the semiochemical *cis*-jasmone. A simple adsorption process was developed by solubilizing the polymer in acetone and adding the semiochemical. The lignin used in this study was obtained by the precipitation of the black liquor from the wood pulping kraft process, mainly eucalyptus. To determine the ratio between the lignin and the semiochemical, a block experiment was elaborated, and four different ratios were tested between the two materials. All experiments were analyzed by aeration to determine the degree of release of *cis*-jasmone from each one. Thus, it was found that the amount of lignin used in the *cis*-jasmone adsorption process was directly proportional to the concentration released therefrom. In order to study the mechanism of release after the molecular interaction of lignin with semiochemical, two compounds with polarities other than *cis*-jasmone were used, linalool (upper polarity) and tetradecan (lower polarity). The results obtained demonstrated that polar compounds undergo a greater interaction with lignin, promoting a slower release. Field experiments and olfactometry were carried out to attract the parasitoid *T. podisi*, with a positive result using the lignin-semiochemical formulation. Thus, it was possible to observe that lignin presents a high potential to be used as support for the promotion of the controlled release of the semiochemical *cis*-jasmone, which may be extended to other molecules of agrochemicals.

Index terms: lignocellulosic biomass, semiochemicals, adsorption, desorption.

Introdução

O conceito da biorrefinaria florestal propõe investigar métodos mais racionais da utilização de materiais fibrosos e, conseqüentemente, extrair maior valor dos mesmos (Bastos, 2012). A biorrefinaria florestal deve empregar matéria-prima renovável, abundante, barata e específica, como a biomassa lignocelulósica obtida a partir de espécies híbridas de *Eucalyptus* sp. e *Pinus* sp., bambu, capim-elefante e bagaço de cana-de-açúcar, dentre outras.

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de celulose, com uma produção em 2016 de 18,77 milhões de toneladas (Valor Econômico, 2017). Para cada tonelada de polpa de celulose produzida pelo processo kraft – o mais comumente utilizado pelo setor –, gera-se de 1,7 a 1,8 tonelada de licor negro (em massa seca) (Darmawan et al., 2017). A lignina responde por cerca de 35% do conteúdo mássico total do licor negro (Wallmo et al., 2017); ou seja, para cada tonelada de polpa produzida, tem-se de 595 kg a 630 kg de lignina kraft disponíveis após sua recuperação desse licor. A partir desses valores, pode-se supor que em 2016 foram produzidas de 11,17 a 11,83 milhões de toneladas de lignina kraft, tornando-a uma matéria-prima de grande disponibilidade para as biorrefinarias para a produção de ampla variedade de bioprodutos (produtos químicos, materiais e energia).

Os materiais lignocelulósicos, ou biomassa lignocelulósica, são formados por estruturas duras e fibrosas constituídas, majoritariamente, pelos polisacarídeos celulose e hemicelulose (cerca de 70% da massa seca), entremeados por uma macromolécula fenólica, a lignina (cerca de 30% da massa seca), à qual se encontram unidos por ligações covalentes e de hidrogênio. Em menores proporções, e dependendo da origem do vegetal, também podem ser encontrados resinas, ácidos graxos, fenóis, taninos, compostos nitrogenados e sais minerais, principalmente, de cálcio, potássio e magnésio (Neureiter et al., 2002).

A agricultura é fortemente dependente dos defensivos agrícolas. Segundo documento do Instituto Nacional do Câncer (Inca), a venda de agrotóxicos – ou agroquímicos – no Brasil saltou de US\$ 2 bilhões em 2001 para mais de US\$ 8,5 bilhões em 2011 (Brasil, 2015). Desde 2009, o País é o maior consumidor mundial dessas substâncias, com uma média de um milhão de toneladas por ano (Milhorange, 2015). Os agrotóxicos no Brasil estão dis-

poníveis por meio de 1.079 produtos à base de 470 ingredientes ativos, os quais são divididos em herbicidas (45%), inseticidas (27%) e fungicidas (28%) (Pedlowski et al., 2012).

Esses agroquímicos são usados de diferentes maneiras, em função das suas características físico-químicas. No entanto, devido a vários processos de degradação, tais como lixiviação ou destruição por luz, temperatura, micro-organismo e hidrólise, apenas uma pequena quantidade desses produtos químicos alcança o seu alvo e a sua performance desejada. Desse modo, as concentrações aplicadas desses compostos têm sido muito maiores do que o necessário. Por outro lado, a concentração que alcança efetivamente o seu alvo pode ser mais baixa do que o mínimo necessário para a eficácia (Mogul et al., 1996).

Em geral, dependendo do tempo e do método de aplicação, em até 90% dos casos a quantidade de agroquímicos aplicada pode não atingir o alvo (ex.: planta daninha, fungo, inseto), não produzindo a resposta biológica desejada. Por essa razão, a aplicação repetida dos agroquímicos se torna necessária para se alcançar um eficiente controle das pragas, provocando um aumento do custo e consequências indesejáveis para o ecossistema (Mogul et al., 1996).

Portanto, é extremamente desejável o desenvolvimento de novos agroquímicos, os quais possam promover uma redução e uma otimização no uso dos defensivos agrícolas convencionais, contribuindo diretamente para uma maior sustentabilidade da agricultura.

Lignina

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

Pesquisas têm sido realizadas com o intuito de permitir aplicações mais nobres em termos tecnológicos das ligninas a partir de um maior conhecimento das propriedades desta complexa e abundante matéria-prima (Alessio et al., 2008). As ligninas são biossintetizadas via polimerização de três monômeros fenilpropanóides (C6-C3) (Figura 1). Esses monômeros apresentam estruturas que variam entre si apenas no grau de metoxilação dos carbonos 3 e 5. São eles os alcoóis *p*-coumarílico (ausência de grupamentos metoxilícos), coniferílico (metoxilação no C3) e sinapílico (metoxilação em C3 e C5) (Fukushima; Hatfield, 2003). A presença desses monolignóis, ou unidades 4-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), variam de acordo com a planta (SUHAS; CarrotT, 2007; Dewick, 2009; Donaldson, 2001).

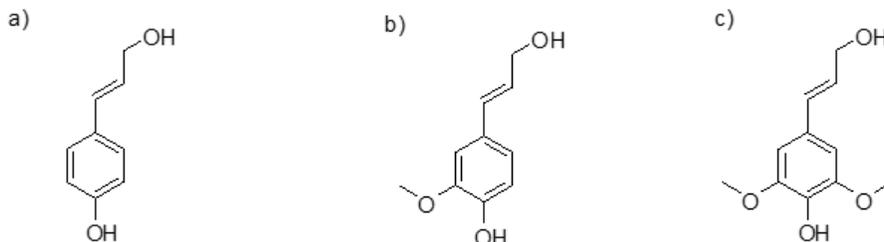


Figura 1. Monômeros de monolignol: (a) álcool *p*-coumaril (unidade 4-hidroxifenil, H); (b) álcool coniferílico (unidade guaiacil, G); (c) álcool sinapílico (unidade siringil, S).

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

Devido à sua estrutura química, a lignina é insolúvel na maioria dos solventes orgânicos; por isso, o seu isolamento é difícil. Porém, quando se consegue sua separação, geralmente se compromete a sua estrutura molecular original. A concentração da lignina é grande na lamela média e menor na parede secundária da célula vegetal (Sarkanen; Ludwig, 1971). Embora não seja possível extrair a lignina sem degradá-la, estima-se que a sua massa molecular possa estar compreendida na faixa de 1.000 g mol⁻¹ a 20.000 g mol⁻¹. Quando isola-

das, apresentam uma cor escura, sendo relativamente estáveis em soluções de ácidos minerais e solúveis em bases aquosas quentes (Hocking, 2005).

Semioquímicos

A produção agrícola tem na ocorrência de pragas e doenças um dos principais fatores limitantes ao seu desenvolvimento. É inevitável o uso de defensivos agrícolas para reduzir a perda de produção. Devido à urgência no combate às pragas, a introdução dos mesmos aconteceu de tal forma que muitos não tiveram seus efeitos toxicológicos testados ou comprovados (Sail et al., 1993).

No entanto, nos últimos anos tem sido aceito o princípio de que se pode trabalhar de forma ecologicamente e economicamente racional com controle de pragas, como insetos, o que resultou no denominado Manejo Integrado de Pragas (MIP). Para tanto, pesquisas são direcionadas para a busca de estratégias alternativas promissoras a serem empregadas em programas de MIP (Gallo, 2002). Entre tais estratégias, tem se destacado a utilização de semioquímicos, os quais são estimulantes químicos e, em particular, feromônios sexuais. Pesquisas na área têm aumentado consideravelmente para várias ordens de insetos, com os estudos envolvendo aspectos biológicos, fisiológicos, comportamentais, bioquímicos e genéticos (Zarbin, et al., 2009).

Do ponto de vista prático, os feromônios podem ter diversas utilidades, incluindo (Bento, 2001):

- Monitoramento para avaliações numéricas de populações, visando determinar se há necessidade de pulverizações, bem como quando e quanto aplicar.
- Avaliação de níveis de resistência a inseticidas em populações de pragas.
- Supressão de populações através de coleta massal ou confundimento.

No Brasil, as tecnologias baseadas no uso de feromônios já resultaram em mais de 15 produtos registrados e outros em fase de registro junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa). A aplicação dessas tecnologias está em expansão para o controle de insetos-praga de diver-

sas culturas agrícolas, como o dendê, a maçã, a goiaba, a uva, a cana-de-açúcar entre várias outras, no Brasil e no exterior (EMBRAPA, 2015).

Um dos semioquímicos estudados na atualidade para uso em MIP é o *cis*-jasmone, ou *cis*-jasmona (Figura 2). Ele é extraído do óleo essencial do jasmim (*Jasminum officinale* L.) e tem como funcionalidade o controle de insetos a campo (Ueda et al., 2011), com efeito comprovado de atração frente ao parasitoide *Telenomus podisi* (Moares et al., 2009) que ataca os ovos do *Euschistus heros*, comumente conhecido como percevejo da soja.

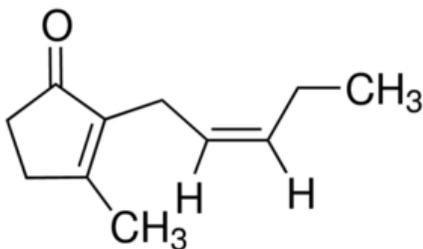


Figura 2. Estrutura química da molécula de *cis*-jasmone.

As propriedades estruturais e físico-químicas da molécula do *cis*-jasmone são as seguintes (PUBCHEM, 2017):

- Fórmula estrutural: $C_{11}H_{16}O$
- Massa molecular: $164,248 \text{ g mol}^{-1}$
- Aspecto físico: líquido amarelo
- Odor: jasmim
- Ponto de ebulição: $285 \text{ }^\circ\text{C}$
- Ponto de fulgor: $107 \text{ }^\circ\text{C}$
- Solubilidade: fracamente solúvel em água; solúvel em etanol, éter, tetracloreto de carbono
- Densidade: $0,9437 \text{ g mL}^{-1}$ a $22 \text{ }^\circ\text{C}$
- Pressão de vapor: $0,029 \text{ mmHg}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$
- Logaritmo do coeficiente de partição *n*-octanol/água ($\log K_{ow}$): 3,55

Suportes para liberação controlada

Suportes são materiais orgânicos e/ou inorgânicos cujas superfícies servem à adsorção, e posterior liberação, de compostos ativos, levando a uma melhoria da eficácia das formulações farmacêuticas e agroquímicas, o que os torna foco de grande interesse em pesquisas acadêmicas e industriais. Exemplos desses materiais atualmente em estudo são: argilas, silicatos, carbonatos, hidróxidos metálicos, ciclodextrina, quitosana, biocarvão, polímeros sintéticos e lignina (Yusoff et al., 2016). As características desejadas para que um dado material possa ser usado como suporte para agroquímicos são: biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade, processo simplificado de preparo, promoção de liberação lenta – via encapsulamento ou nanoencapsulamento –, e baixa mobilidade no solo (Yusoff et al., 2016).

A adição de uma macromolécula fenólica natural e renovável, como a lignina, poderá melhorar as propriedades físico-químicas de superfície envolvidas no encapsulamento – ex.: disponibilidade e acessibilidade a sítios de interação e aumento da área superficial –, por meio da formação de um sistema multicamadas com interações do tipo pontes de H e forças de van der Waals (Scheufele et al., 2016). Cabe ressaltar que, por ser um constituinte da biomassa lignocelulósica, a lignina pode ser obtida de várias origens como, por exemplo, resíduos agrícolas e do processamento kraft da madeira (conforme já comentado), a um baixo custo (Hu et al., 2017). Ademais, a aplicação da lignina na agricultura como encapsulante de defensivos agrícolas já vem sendo explorada (Asrar; Ding, 2010). No entanto, ainda não é observada sua utilização na liberação controlada de semioquímicos.

Objetivos

O estudo teve como objetivo geral desenvolver um suporte de lignina kraft para a liberação controlada do semioquímico *cis*-jasmone para manejo integrado de pragas em lavouras.

Objetivos específicos

- Caracterizar a lignina por cromatografia de permeação em gel (GPC, *gel permeation chromatography*) e absorção no infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR, *Fourier-transform infrared spectroscopy*).
- Desenvolver métodos de adsorção de semioquímicos à lignina kraft.
- Avaliar a liberação do semioquímico *cis*-jasmone em laboratório e a campo.

Materiais e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Processos Químicos, localizado na Embrapa Agroenergia (Brasília, DF), e no Laboratório de Semioquímicos, localizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF).

Lignina

A lignina utilizada foi fornecida pelo Laboratório de Celulose e Papel da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG). A precipitação ácida para a recuperação da mesma a partir do licor negro do cozimento kraft de polpa de *Eucalyptus* sp. se deu por meio de processo previamente desenvolvido no próprio Laboratório (Colodette, 2002).

Análise da lignina por cromatografia de permeação em gel (GPC)

A distribuição de massa molar da lignina foi realizada no Laboratório de Celulose e Papel da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG), utilizando-se um cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de espalhamento de luz (LC-20AD, Shimadzu), sob as seguintes condições de trabalho:

- Colunas: Tskgel G5000 PW, Tskgel G4000 PW e Tskgel G3000 PW
- Fase móvel: NaOH a 10 mg L⁻¹

- Temperatura do forno: 40 °C
- Fluxo de injeção: 1mL min⁻¹
- Tempo de análise: 60 min
- Padrões: Pss American Polymer com massas molares de 152000, 65400, 29500, 15800, 6430, 3420, 1670, 891 e 208 g mol⁻¹

As massas de 5 mg de cada padrão e 10 mg da lignina foram solubilizadas em 1 mL de solução da fase móvel e filtradas em filtro de 0,45 µm, antes da injeção no cromatógrafo.

Processo de adsorção do semioquímico *cis*-jasmone à lignina

Com o intuito de determinar qual a melhor razão mássica entre lignina e *cis*-jasmone, foi desenvolvido um experimento em bloco (Figura 3). A concentração final de *cis*-jasmone para posteriores análises foi determinada em 2 mg. Assim, a quantidade de lignina foi proporcional à quantidade de semioquímico (Tabela 1).

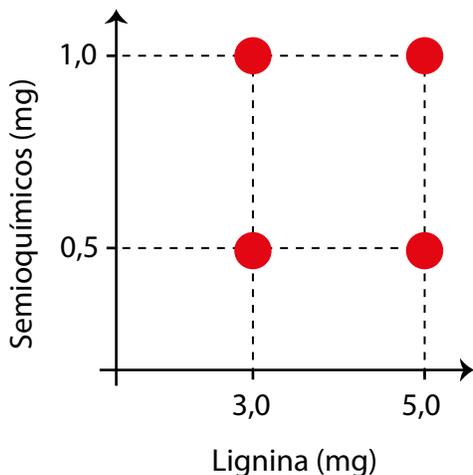


Figura 3. Desenho do experimento em bloco do processo de adsorção do semioquímico *cis*-jasmone à lignina.

Tabela 1. Valores das massas utilizadas para o processo de adsorção do *cis*-jasmone à lignina.

Exp. em bloco		Quantidades proporcionais		
Massa de lignina kraft (mg)	Massa de <i>cis</i> -jasmone (mg)	Massa de lignina kraft (mg)	Massa de <i>cis</i> -jasmone (mg)	Identificação da amostra
3	0,5	12	2	14 mg
5	0,5	20	2	22 mg
3	1	6	2	8 mg
5	1	10	2	12 mg

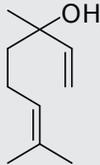
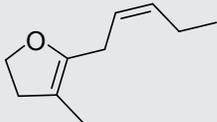
Para o processo de adsorção, a lignina kraft de todos os experimentos foi solubilizada em 2 mL de acetona (Sigma-Aldrich). A solução foi agitada em ultrassom (Unique) até ser observada a solubilização completa da lignina. A lignina solubilizada foi adicionada ao *cis*-jasmone (Sigma-Aldrich) e a mistura foi mantida em ultrassom por mais 2 min. A mistura foi mantida em repouso por 48 h para a evaporação total do solvente. As massas utilizadas no experimento são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Massas utilizadas no processo de adsorção do *cis*-jasmone à lignina.

Massa de lignina (mg)	Massa de <i>cis</i> -jasmone (mg)	Identificação da amostra
120,13	20,00	14 mg
200,25	20,67	22 mg
60,08	20,59	8 mg
100,18	20,00	12 mg

Visando determinar o grau de interação molecular entre o semioquímico e a lignina kraft, o processo de adsorção foi avaliado utilizando um composto com polaridade superior ao do *cis*-jasmone e outro com polaridade inferior. Os compostos foram selecionados por seus pontos de ebulição serem próximos aos do composto de estudo. O composto de maior polaridade foi o linalol (Sigma-Aldrich) e o de menor polaridade o tetradecano (Sigma-Aldrich). A Tabela 3 apresenta algumas propriedades físico-químicas desses compostos.

Tabela 3. Propriedades dos compostos utilizados para comparação das características de interações à molécula de lignina. Fonte: PUBCHEM (2017).

Composto	Estrutura molecular	Propriedades físico-químicas
Linalol		Fórmula molecular: $C_{10}H_{18}O$ Ponto de ebulição: 199 °C
<i>cis</i> -Jasmone		Fórmula molecular: $C_{10}H_{14}O$ Ponto de ebulição: 233,2 °C
Tetradecano		Fórmula molecular: $C_{14}H_{30}$ Ponto de ebulição: 253,58 °C

Para efeitos de comparação, o processo de adsorção do linalol e do tetradecano à lignina foi similar ao do *cis*-jasmone. No entanto, foram utilizados apenas dois pontos do experimento em bloco, sendo os experimentos denominados 8 mg e 22 mg.

Análise por espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As amostras foram analisadas utilizando um espectrômetro Bomem MB-102-*Fourier Transform Infrared*. Analisou-se a lignina pura, os compostos utilizados na adsorção à lignina (*cis*-jasmone, linalol e tetradecano) e os produtos de interação lignina-composto. As amostras foram preparadas misturando em um almofariz 1 mg de cada amostra a 99 mg de KBr anidro (Vetec). Os espectros foram registrados da região entre 4.000 e 400 cm^{-1} .

Teste de liberação do *cis*-jasmone e dos compostos de referência

Para o teste de liberação do *cis*-jasmone e dos compostos de referência – o linalol e o tetradecano –, adsorvidos à lignina, foi utilizado o sistema de aeração ilustrado na Figura 4. Cada tratamento foi analisado em triplicata.

Foto: Eveline Soares Costa.

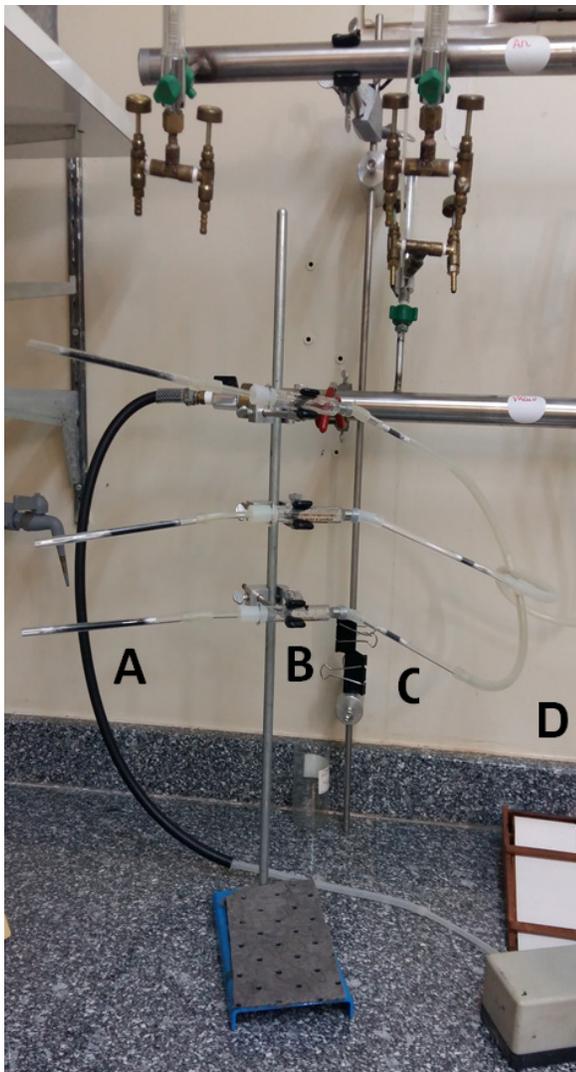


Figura 4. Sistema de aeração do Laboratório de Semioquímicos.

- A) filtro de carvão ativado;
- B) seringas contendo as amostras;
- C) tubos de vidro com adsorventes comerciais;
- D) sistema de vácuo.

No sistema de aeração, o ar purificado, após passar pelos filtros de carvão ativado, foi inserido e direcionado para dentro das seringas por meio de compressor de ar com vazão de $0,3 \text{ L min}^{-1}$ por seringa. Na saída, os compostos voláteis foram adsorvidos em cartucho de vidro contendo, cada, 100 mg do adsorvente comercial Tenax®-GR 80/100 mesh. A eluição dos cartuchos foi realizada com $500 \mu\text{L}$ de hexano (Vetec) em *vials* com capacidade para 2 mL. Após este procedimento, as amostras coletadas foram pré-concentradas a $50 \mu\text{L}$, sob fluxo de N_2 e, posteriormente, analisadas por cromatografia em fase gasosa.

Os experimentos foram executados separadamente. As massas inseridas no experimento com o *cis*-jasmone estão apresentadas na Tabela 4 e as massas inseridas dos compostos de referência, linalol e tetradecano, são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 4. Massas (em mg) inseridas no interior da seringa para o ensaio de liberação do *cis*-jasmone.

Seringa	<i>cis</i> -Jasmone 14 mg	<i>cis</i> -Jasmone 22 mg	<i>cis</i> -Jasmone 8 mg	<i>cis</i> -Jasmone 12 mg
1	14,83	22,10	8,40	12,43
2	13,80	22,52	8,24	12,23
3	14,01	22,71	8,19	12,00

Tabela 5. Massas (em mg) inseridas no interior da seringa para o ensaio de liberação dos compostos de referência linalol e tetradecano.

Seringa	Linalol 8 mg	Linalol 22 mg	Tetradecano 8 mg	Tetradecano 22 mg
1	8,58	22,97	8,73	22,67
2	8,81	22,15	8,94	22,19
3	8,69	22,35	8,15	22,69

Análise da dessorção por cromatografia em fase gasosa (CG)

Para as análises quantitativas do *cis*-jasmone liberado – ou dessorvido – da lignina, o volume inicialmente coletado foi reduzido a $50 \mu\text{L}$, seguido da adição de $1 \mu\text{L}$ do composto hexil-burirato (Sigma-Aldrich), utilizado como padrão interno. Posteriormente, $1 \mu\text{L}$ da amostra foi injetado no cromatógrafo de

fase gasosa (7890, Agilent), com coluna apolar DB-5 [0,32 mm (d) x 60 m (c), espessura de 1 μm , Supelco], com detector de ionização à chama a 250 °C, usando o modo *splitless* e N_2 como gás de arraste. Foram utilizadas rampas de aquecimento para o forno da coluna, sendo a temperatura inicial de 50 °C por 2 min, com posterior aumento gradual de 5 °C $0,1 \text{ min}^{-1}$ até 180 °C e, em seguida, um aumento de 10 °C min^{-1} até 250 °C por 20 min. A temperatura do detector foi de 270 °C e a do injetor, 250 °C. A quantificação da liberação do *cis*-jasmone a cada 24 horas foi realizada por meio de comparação das áreas do composto em relação à área do padrão interno utilizado. Assim, foi considerado o fator de resposta do detector para o *cis*-jasmone igual a 1. Os dados foram coletados com o *software* EZChrom Elite e analisados no Excel (Microsoft Office 2007).

Criação do parasitoide *Telenomus podisi*

Os indivíduos do parasitoide utilizados neste trabalho foram criados no Laboratório de Semioquímicos em gaiolas plásticas de 25 cm^2 , alimentados com mel puro e ovos de *Euschistus heros*, os quais foram utilizados como hospedeiros. A colônia foi mantida em sala com fotofase de 14 horas, a $26,0 \pm 0,5$ °C e $65 \pm 10\%$ de umidade relativa do ar. As fêmeas utilizadas nos experimentos de olfatosmetria possuíam entre 24 e 48 horas na fase adulta e foram previamente mantidas com machos para garantir que estivessem fecundadas e não possuíssem qualquer experiência prévia de oviposição.

Bioensaios de olfatosmetria com parasitoides

Para a realização dos bioensaios de olfatosmetria, foi utilizado um olfatômetro tipo “Y” desenvolvido para avaliar a resposta do inseto frente a dois tratamentos com controle das condições ambientais (temperatura, umidade e luminosidade). O aparelho foi montado em uma placa de acrílico (27,5 cm x 21,0 cm) de 10 mm de espessura prensada na sua parte superior (transparente) e inferior (fosca) com placas de vidro de 4 mm. O acrílico possuía um furo central em forma de “Y”, sendo que seu corpo central possuía 7,7 cm x 1,3 cm e cada braço 7,0 cm x 1,3 cm. A placa possuía um furo circular no extremo de cada braço (0,5 cm) e um furo similar no extremo do corpo central, com esses furos servindo para entrada e saída de ar no aparelho. Para gerar

a circulação de ar foi utilizada uma bomba de ar (bomba comum de aquário). O fluxo gerado pela bomba foi conduzido por mangueiras de silicone para os componentes do sistema. Em seguida, o ar seguiu por um filtro de carvão ativado e um umidificador até ser conduzido para seringas de vidro de 10 mL onde se encontravam os tratamentos. O escoamento de ar foi realizado utilizando uma bomba de vácuo conectada ao extremo do corpo central. Durante os bioensaios os fluxos de entrada (0,6 Lpm) e saída (0,2 Lpm) foram regulados com fluxômetro a fim de se criar uma leve pressão positiva no olfatômetro para evitar contaminação pelo ar não filtrado.

Nos bioensaios foram avaliadas as respostas dos insetos aos diferentes tratamentos (*cis*-jasmone adsorvido à lignina em duas razões lignina:semioquímico) em relação ao controle (lignina) e um branco, sendo este último lignina em resposta ao ar. As massas dos tratamentos estão apresentadas na Tabela 6. O material foi inserido na seringa e depositado na parede da mesma (Figura 5).

Tabela 6. Quantidade de material inserido nas seringas para o teste de olfatômetro.

Identificação das amostras	Massa de teste (mg)	Massa de controle (mg)
8 mg	4,30	4,04
22 mg	11,14	10,96
Lignina kraft	10,95	-

Foto: Eveline Soares Costa.

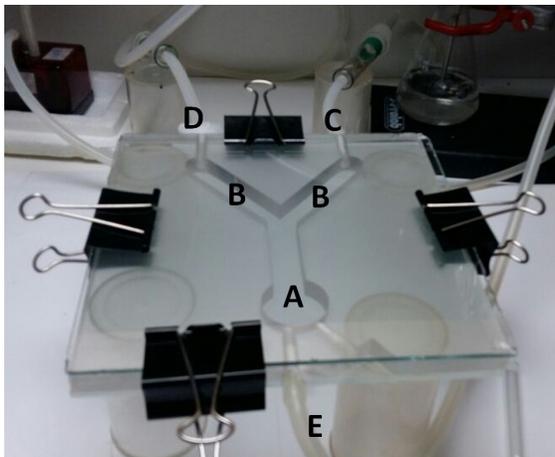


Figura 5. Olfatômetro de dupla escolha.

- A) área de liberação do parasitóide;
- B) áreas de resposta;
- C) entrada do controle;
- D) entrada do tratamento;
- E) vácuo.

Para cada bioensaio, foi colocada uma fêmea de *T. podisi* na área de liberação do olfatômetro (extremo do braço principal, oposto à área de escolha) e seu comportamento foi monitorado visualmente durante 10 minutos. A cada cinco bioensaios, foi trocado o olfatômetro (placa de acrílico e placas de vidro), além de se invertermos os braços que continham os tratamentos a fim de se evitar qualquer influência da posição na resposta dos insetos e evitar a formação de pseudorréplicas. Foram realizados 35 bioensaios para cada tratamento.

A partir deste procedimento, foram utilizadas duas variáveis para análise da resposta, sendo a primeira a escolha inicial (braço do olfatômetro onde o inseto entrou pela primeira vez e permaneceu por mais de 30 segundos) e a segunda o tempo (em segundos) de permanência em cada braço. Enquanto a escolha inicial do parasitoide entre tratamento e controle foi comparada utilizando o teste de Qui-quadrado (Excel, Microsoft), o tempo de residência foi analisado pelo teste de Wilcoxon (plataforma R – R Development Core Team 2009) a fim de se comparar as médias entre tratamento e controle no olfatômetro.

Experimento a campo de liberação do *cis*-jasmone adsorvido à lignina

O *cis*-jasmone adsorvido à lignina kraft foi depositado sob arames revestidos com plástico e, como controle, foi utilizada lignina aderida em adesivo de papel. Para cada tratamento e controle, foram realizadas 5 repetições. Para monitorar o efeito nos insetos (atração), foram utilizadas armadilhas adesivas amarelas.

Os tratamentos foram distribuídos de forma aleatória segundo o esquema abaixo (Figura 6) para a primeira semana. Posteriormente, a posição de cada tratamento foi sorteada em cada semana de amostragem. As armadilhas foram distribuídas a campo nos dias 20/05, 27/05, 03/06 e 10/06/2016. As armadilhas permaneceram no campo por um período de 72 horas, sendo retiradas nos dias 23/05, 30/05, 06/06 e 13/06/2016.



Figura 6. Esquema de distribuição dos tratamentos avaliados a campo.

Triagem dos insetos capturados a campo

Os insetos capturados foram classificados sob lupa binocular, inicialmente, em grupos funcionais segundo o hábito de alimentação e seu efeito nos ecossistemas. As categorias identificadas foram: herbívoros, polinizadores, onívoros/saprofíticos, predadores e parasitoides. Os parasitoides foram identificados até ao nível de família.

Todos os insetos identificados e adjudicados a cada categoria foram contabilizados.

Análise dos dados do experimento a campo

Para cada categoria de grupos funcionais dos insetos, o seu total de indivíduos capturados em cada tratamento, armadilha e data de amostragem foi comparado utilizando uma análise de variância de medidas repetidas. Cada tratamento específico – identificado com os números 1 a 5 – foi incorporado como a fonte de erro prévia à análise; o número de insetos (ou indivíduos) em cada armadilha foi transformado como $\log(x)$ para normalizar os dados.

Para analisar o efeito dos tratamentos na comunidade de parasitoides, foram utilizadas técnicas de análises de estrutura de comunidades como: cálculo de índices de diversidade, curvas de Rényi, análise de *cluster* e análise de componentes principais. Também foi realizada uma análise de PRC (*principal responses curves*).

Resultados e Discussão

A lignina proveniente da polpação kraft da madeira de *Eucalyptus* sp. foi analisada pela técnica de GPC, obtendo-se a massa molar média em massa (M_w) e a massa molar média em número (M_n). Por meio desses dados, foi possível obter a polidispersividade da lignina, que é expressa pela relação M_w/M_n . O cromatograma obtido é apresentado na Figura 7.

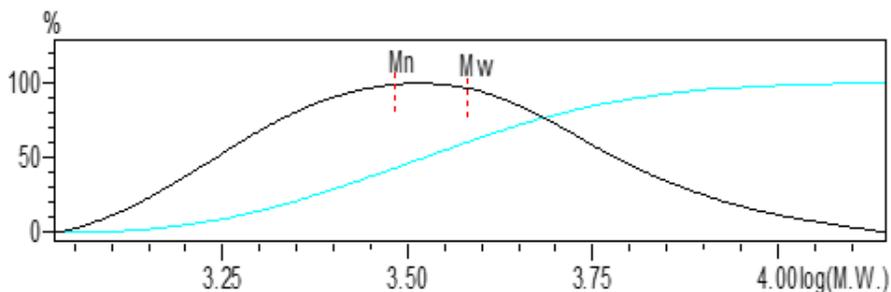


Figura 7. Cromatograma da análise por GPC da lignina kraft.

A lignina apresentou uma massa molar média em massa (M_w) de 3.815 g mol⁻¹, e uma massa molar média em número (M_n) de 3.036 g mol⁻¹, com uma polidispersividade de 1,26. Diversas distribuições de massa molecular são relatadas na literatura, com a diferença ocorrendo devido ao processo de polpação empregado (Adler, 1977; Benar et al., 1999; Davin; Lewis, 2005; Guerra et al., 2007; Lange et al., 2013).

Outra técnica utilizada para caracterizar a lignina foi a FTIR. As bandas de absorção geradas eram características de ligninas (Saliba et al., 2001), como observadas abaixo no espectro da Figura 8. A Tabela 7 apresenta a posição das bandas mais importantes e a atribuição das mesmas.

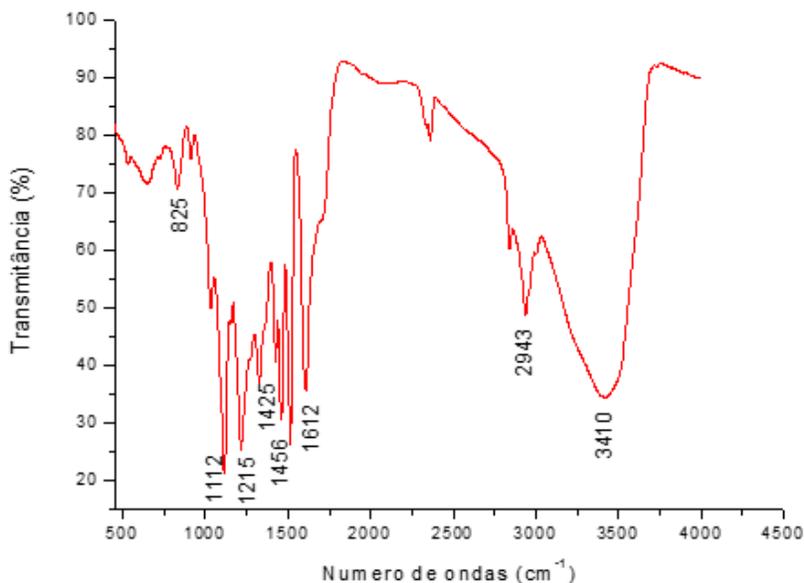


Figura 8. Espectro de absorção na região do infravermelho médio da lignina obtido em pastilha de KBr.

Tabela 7. Atribuição das bandas do espectro de FTIR.

Bandas (cm ⁻¹)	Atribuição
3450 – 3400	OH
3050 – 2840	C-H aromático
1675 – 1660	C=O conjugada
1470 – 1460	C-H metílico
1430 – 1415	C-O de anel guaiacílico
1275	C-O de anel siringílico
1240 – 1230	C-C de anel aromático
915 – 815	C-H aromático

A lignina é constituída de monômeros de estrutura química de grande complexidade, de distribuição variável ou mesmo formada por diferentes frações da macromolécula. Assim, para a interpretação do espectro da lignina, utilizou-se a comparação com dados da literatura. A banda em 1.612 cm⁻¹

está relacionada ao estiramento vibracional da ligação C=C em anéis aromáticos. A banda em 1.456 cm^{-1} está relacionada ao estiramento vibracional da ligação C-H em alcanos. As bandas em 1.425 e 1.215 cm^{-1} correspondem às vibrações condensadas de siringil (S) e guaiacil (G). As bandas em 825 cm^{-1} e em 1.112 cm^{-1} estão relacionadas às unidades G e S (Kline et al., 2010).

Após o procedimento de adsorção do *cis*-jasmone à lignina utilizando o experimento em bloco para testar diferentes proporções entre a lignina e o semioquímico, as amostras foram analisadas por FTIR a fim de observar a interação molecular entre os compostos (Figura 9). A lignina (espectro A) e o *cis*-jasmone (espectro F) foram comparados com produtos de interação ou adsorção (espectros B a E). É possível observar um desdobramento da banda na região de 1.610 a 1.700 cm^{-1} nas amostras dos produtos de adsorção, sendo este desdobramento não observado no espectro da lignina. Esta região está relacionada aos grupos dos alcenos e das vibrações dos núcleos aromáticos. O desdobramento é mais intenso no produto de adsorção denominado *cis*-jasmone 8 mg (espectro B), possivelmente por ser o experimento que utilizou a menor quantidade de lignina entre os demais testes (Figura 9). Assim, as regiões do alceno (1.696 e 1.644 cm^{-1}) referentes ao composto *cis*-jasmone estão levemente mais evidenciadas que nos demais espectros. No entanto, é possível observar que a intensidade das bandas dos produtos de adsorção nessa região é inferior ao do composto puro podendo, assim, inferir que as interações entre a lignina e o *cis*-jasmone estão ocorrendo nessa região da molécula.

Na Figura 10, é possível observar os espectros da lignina (espectro A), dos produtos de adsorção denominadas tetradecano 22 mg (espectro B), tetradecano 8 mg (espectro C) e o composto tetradecano (espectro D), para a verificação da interação molecular com os compostos-modelo.

No espectro do tetradecano (espectro D), é possível observar uma banda intensa na região 2.921 cm^{-1} referente ao estiramento das ligações C-H sp^3 característicos de alcanos (Figura 10).

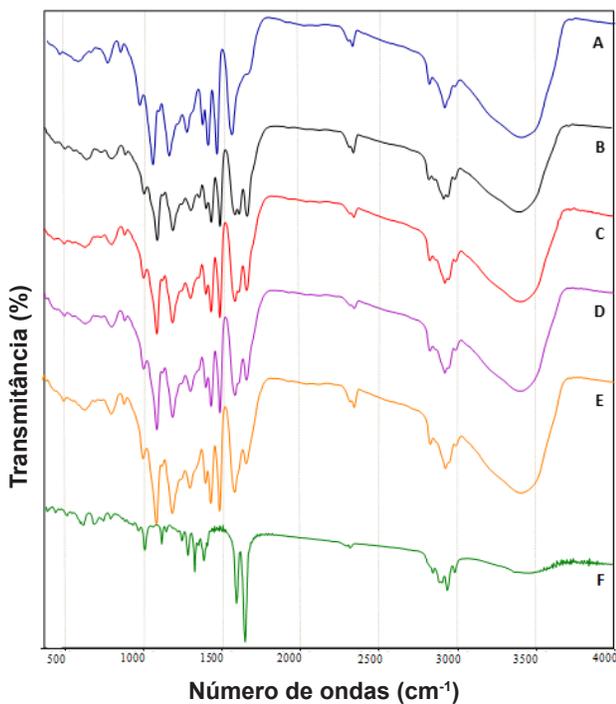


Figura 9. Sobreposição de espectros de absorção no infravermelho médio, obtidos com pastilha de KBr. A) lignina; B) *cis*-jasmone-lignina 8 mg; C) *cis*-jasmone-lignina 12 mg; D) *cis*-jasmone-lignina 14 mg; E) *cis*-jasmone-lignina 22 mg; F) *cis*-jasmone.

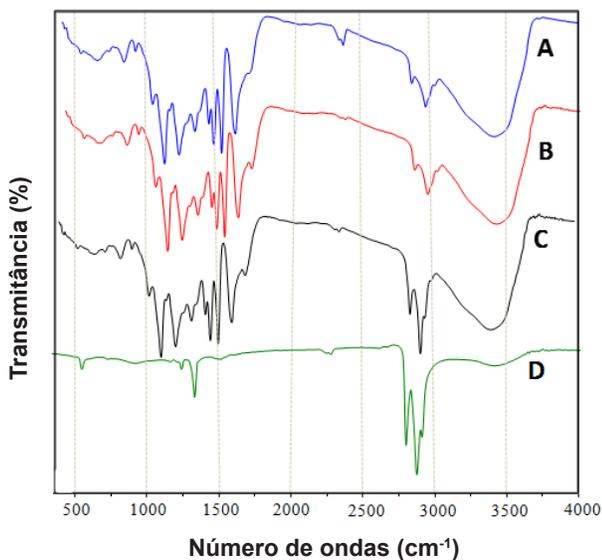


Figura 10. Sobreposição de espectros de absorção no infravermelho médio, obtidos com pastilha de KBr. A) lignina; B) tetradecano-lignina 22 mg; C) tetradecano-lignina 8 mg; D) tetradecano.

No espectro do composto referente ao produto tetradecano 8 mg (espectro C), a banda característica do alcano, o tetradecano, em 2.921 cm^{-1} , é mais evidenciada que no experimento tetradecano 22 mg (espectro D). Possivelmente, a interação molecular entre a lignina e o tetradecano no experimento utilizando menor quantidade de lignina (tetradecano 8 mg, espectro C) foi menos efetiva que no experimento utilizando maior quantidade de lignina (tetradecano 22 mg, espectro B). Nos experimentos utilizando o composto com maior polaridade, o linalol, com bandas características em 920 cm^{-1} referentes à deformação angular de alcenos, 2.921 cm^{-1} de C-H sp^3 , 2.975 cm^{-1} de C=C e em 3.418 cm^{-1} de grupos O-H livres (Figura 11, espectro D), não foi possível observar alteração nos espectros dos produtos de adsorção (espectro B e C) quando comparados com o espectro da lignina (espectro A).

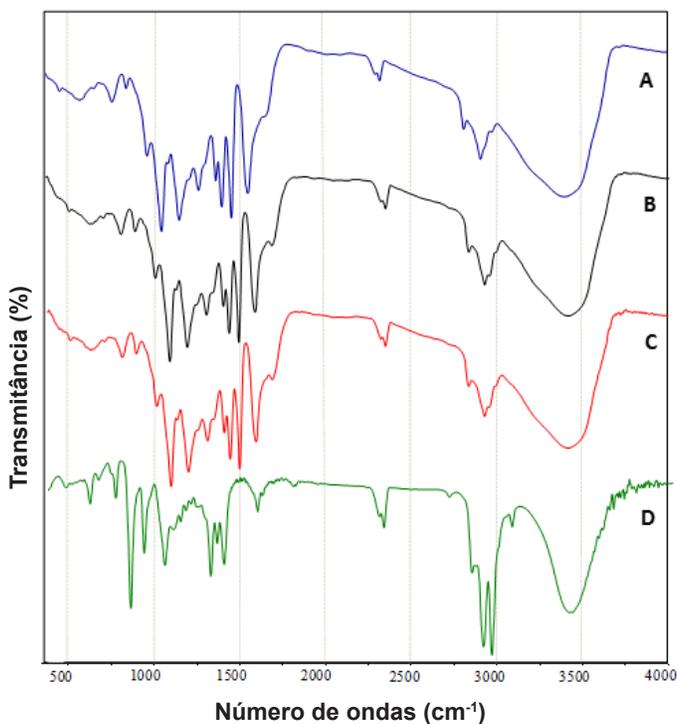


Figura 11. Sobreposição de espectros de absorção no infravermelho médio, obtidos com pastilha de KBr. A) lignina; B) linalol-lignina 22 mg; C) linalol-lignina 8 mg; D) linalol.

Os grupos que promovem bandas mais intensas no composto linalol são grupos também observados na lignina. Assim, uma possibilidade é que a concentração do linalol nos experimentos não tenha sido suficiente para que as bandas do composto fossem observadas no espectro.

Todos os produtos obtidos do experimento em bloco foram testados no processo de aeração para determinar a concentração de *cis*-jasmone liberado até ocorrer a estabilidade na liberação no decorrer dos dias. Um experimento piloto foi desenvolvido por 30 dias e, após os 10 primeiros, foi possível observar a estabilização da liberação, sendo assim fixado o tempo de 10 dias para os demais experimentos.

Todos os experimentos apresentaram uma taxa de liberação baixa. O experimento denominado *cis*-jasmone 8 mg, em que, para a produção da amostra foi utilizada a relação 6:2 de lignina: *cis*-jasmone, a quantidade de *cis*-jasmone liberada nos 3 primeiros dias foi superior à dos demais testes. Os experimentos *cis*-jasmone 12 mg e 14 mg apresentaram taxa de liberação aproximada e o experimento *cis*-jasmone 22 mg apresentou taxa de liberação inferior à dos demais tratamentos (Figura 12). A quantidade de lignina utilizada no processo de adsorção do *cis*-jasmone foi diretamente proporcional ao processo de liberação do mesmo. A busca por materiais que promovam a liberação controlada de semioquímicos no campo é muito importante para a utilização desse mecanismo para o controle biológico e, com o ensaio de aeração, a lignina demonstrou ser promissora para esse fim.

Todas as amostras, após a finalização dos ensaios de aeração, passaram pelo processo de dessorção. As mesmas foram extraídas exaustivamente com hexano destilado e analisadas por CG com detector de ionização a chama. As massas obtidas após a dessorção do *cis*-jasmone em todas as proporções (8 mg, 12 mg, 14 mg e 22 mg) não apresentaram recuperação da massa inicial inserida na etapa de adsorção (Figura 13). Duas situações podem ter ocorrido: na primeira delas, o material não foi totalmente dessorvido; e, na segunda, durante a evaporação do solvente no processo de adsorção, o excesso do material volatilizou juntamente com o solvente (efeito arraste).

A massa obtida na dessorção do *cis*-jasmone do experimento *cis*-jasmone 8 mg foi superior à dos demais experimentos. Possivelmente, a quantidade de lignina utilizada nesse experimento levou a uma menor interação com o composto e promovendo, assim, maior recuperação do *cis*-jasmone.

O gráfico corrobora com a curva de liberação obtida pelo sistema de aeração (Figura 14).

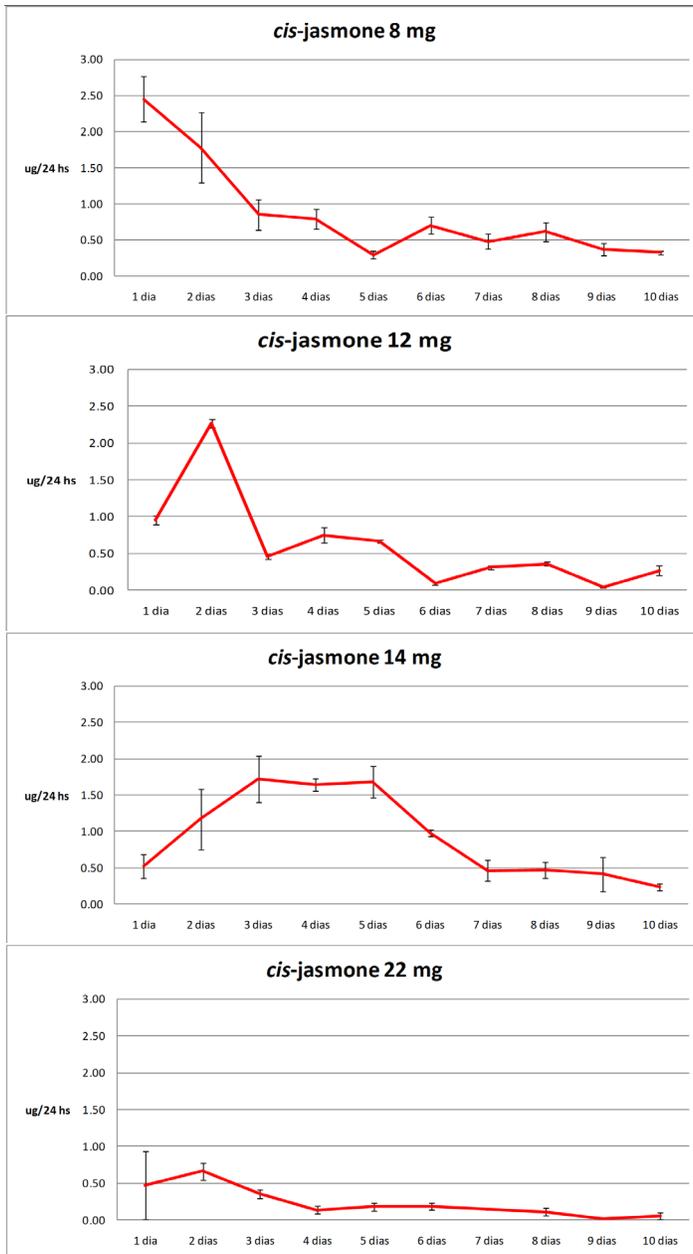


Figura 12. Curvas de liberação do *cis*-jasmone adsorvido à lignina, obtidas pelo sistema de aeração.

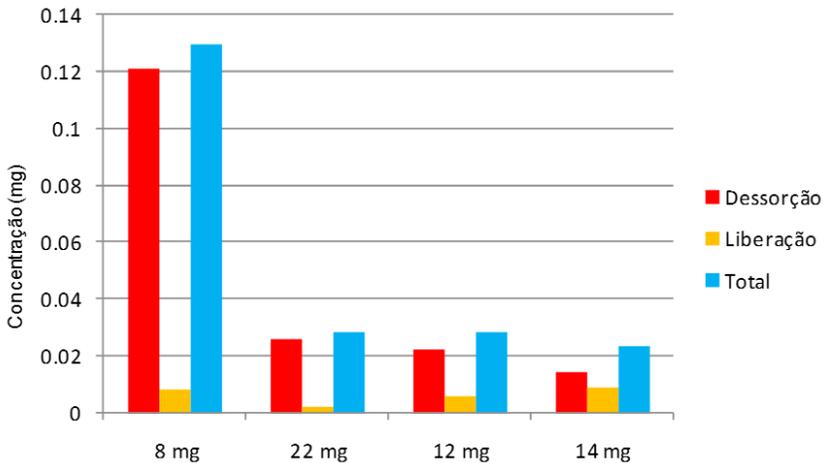


Figura 13. Gráfico de dessorção, liberação e massa total obtidas após a etapa de aeração dos experimentos com os produtos de interação *cis*-jasmone-lignina.

No intuito de avaliar o mecanismo de liberação *versus* a interação molecular, o ensaio de liberação foi promovido com o linalol e o tetradecano. Os dois compostos químicos foram adsorvidos à lignina em apenas duas proporções, a 8 mg (relação 6:2 de lignina:*cis*-jasmone) e a 22 mg (relação 20:2 de lignina:*cis*-jasmone). Essas proporções foram escolhidas devido ao perfil observado na liberação do *cis*-jasmone, havendo uma maior liberação do composto no experimento *cis*-jasmone 8 mg e uma menor liberação no experimento *cis*-jasmone 22 mg. A curva de liberação dos experimentos utilizando o linalol pode ser observada na Figura 14.

O experimento utilizando o linalol e a menor proporção de lignina (6:2, lignina:linalol), experimento linalol 8 mg, apresentou alta liberação nos 3 primeiros dias e, após o sexto dia, a liberação se manteve constante a baixa concentração. A alta liberação pode estar relacionada à pequena quantidade de lignina, sendo esta insuficiente para promover interações químicas com todo o linalol inserido ao experimento. Essa afirmação é corroborada com a curva de liberação do experimento linalol 22 mg, pois desde o primeiro dia foi possível observar uma liberação significativamente inferior ao do experimento linalol 8 mg e após o terceiro dia a quantidade de linalol liberado foi igual ao observado apenas após o sexto dia no experimento linalol 8 mg.

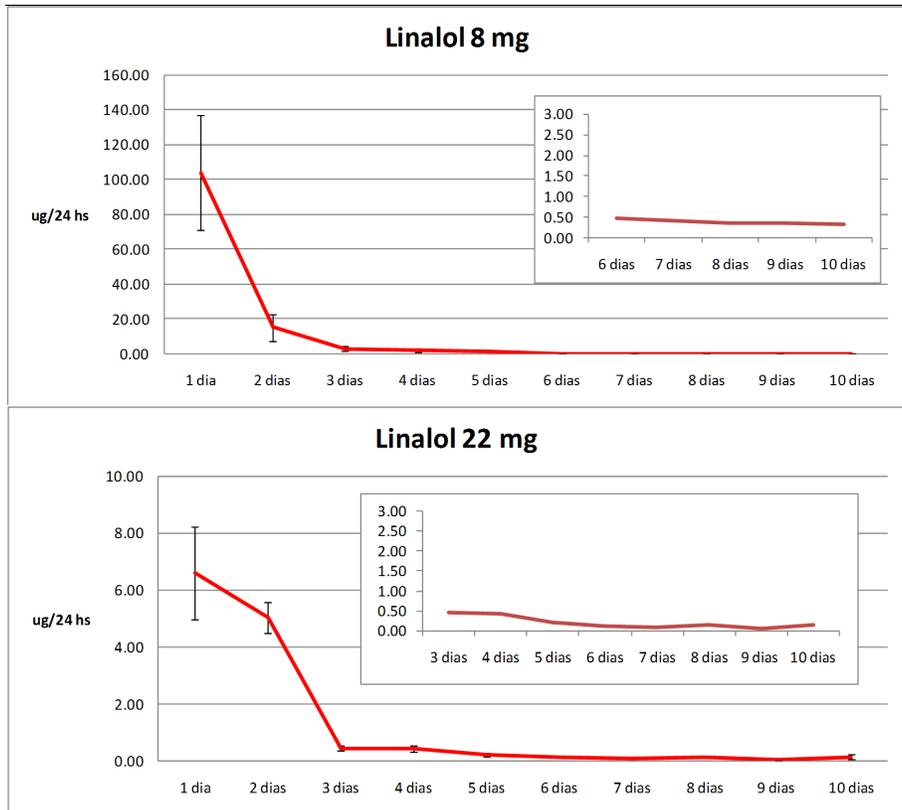


Figura 14. Curvas de liberação do linalol adsorvido à lignina obtidas pelo sistema de aeração.

O material residual, após a finalização do experimento de aeração, passou pelo processo de dessorção para determinar a quantidade residual de linalol adsorvido ao material de suporte (Figura 15).

A barra que representa a quantidade total de material liberado e dessorvido demonstra que a quantidade obtida após a dessorção não se aproximou da quantidade inserida no início do experimento, sendo este de 2 mg. O mesmo foi observado no experimento com o composto *cis*-jasmone, podendo, assim, pressupor a mesma situação. No entanto, vale ressaltar que a diferença observada nas barras dos dois experimentos corrobora a taxa de liberação observada no experimento de aeração com uso do linalol.

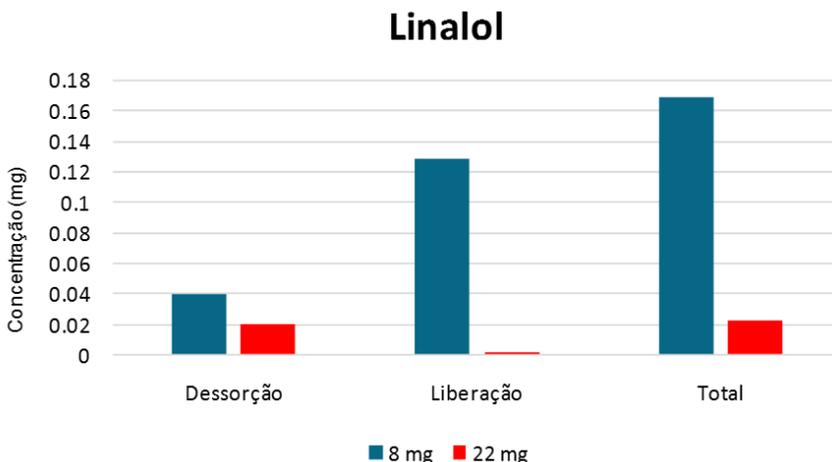


Figura 15. Gráfico de dessorção do experimento linalol 8 mg e linalol 22 mg.

O experimento com uso do tetradecano (Figura 16), composto com polaridade inferior aos compostos linalol e *cis*-jasmone, apresentou alta liberação tanto no experimento tetradecano 8 mg quanto no tetradecano 22 mg.

No experimento tetradecano 8 mg, a taxa de liberação demonstrou que o composto tetradecano não sofreu interação molecular com a lignina. Após o sexto dia, a liberação manteve uma média de 10 μg do composto. Após a análise de dessorção (Figura 17), verificou-se haver baixa quantidade do composto (<5 μg) após o período de 10 dias de análise; podendo-se, assim, pressupor que a liberação da massa de 10 μg era a quantidade residual após a volatilização do tetradecano nos primeiros 4 dias. No gráfico de dessorção do tetradecano, pode-se observar que houve uma contaminação no processo de análise da liberação do tetradecano. A massa liberada nos primeiros dias gerou uma banda cromatográfica de grande intensidade e largura, muito provavelmente devido à coeluição de impurezas as quais foram quantificadas com o produto de interesse.

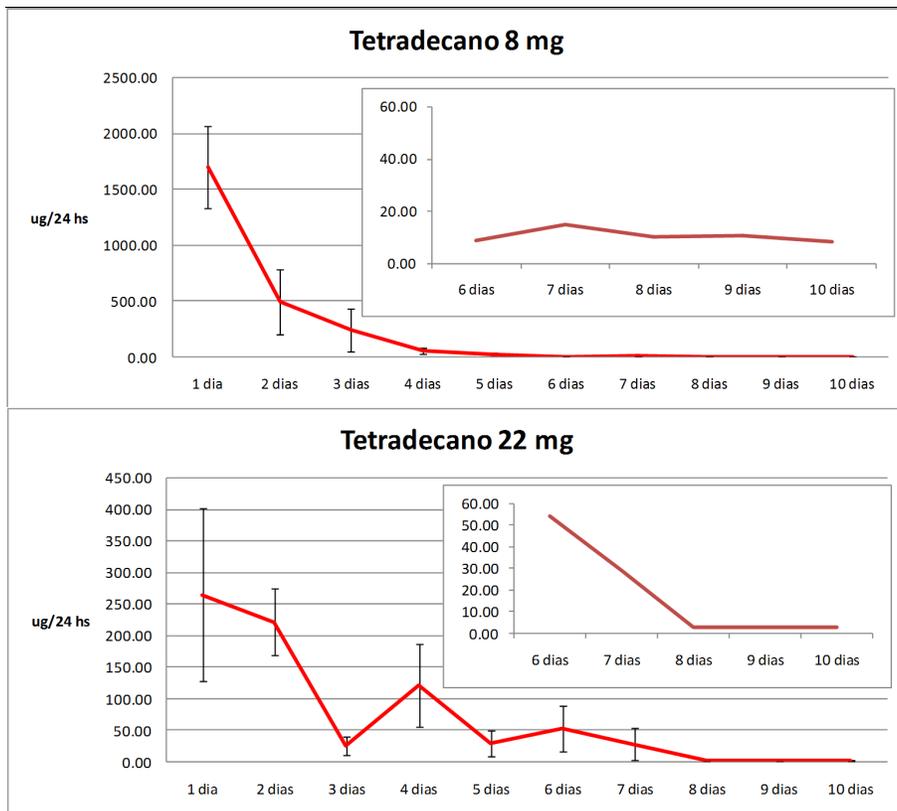


Figura 16. Curvas de liberação do tetradecano adsorvido à lignina obtidas pelo sistema de aeração.

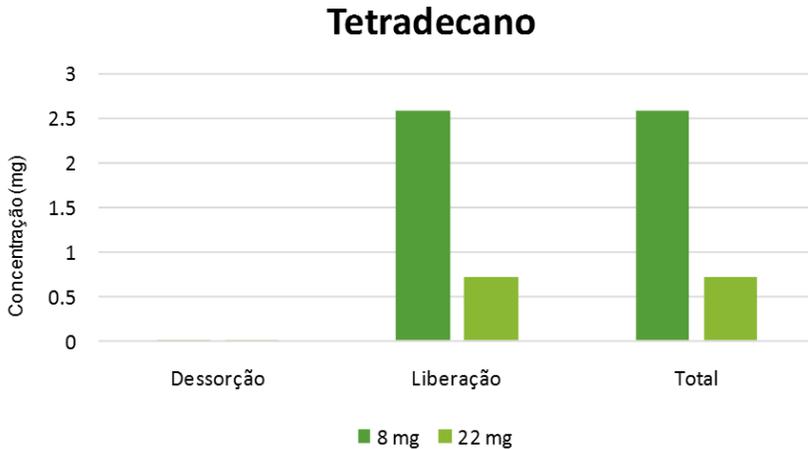


Figura 17. Gráfico de dessorção do tetradecano.

Após o conhecimento do perfil de liberação dos experimentos utilizando proporções diferentes de lignina, os experimentos *cis*-jasmone 8 mg e *cis*-jasmone 22 mg foram analisados frente à resposta observada no olfatômetro. O intuito foi verificar se a quantidade de composto liberado era suficiente para atrair indivíduos do parasitoide de trabalho *T. podisi*. Os testes foram iniciados após 6 dias do preparo da amostra, pois o experimento foi iniciado no período de estabilização de liberação observado no sistema de aeração (Figura 4). Foram analisados 5 indivíduos por dia, durante 7 dias, totalizando 35 indivíduos por experimento e, durante 18 dias, o experimento ficou em repouso no mesmo ambiente de análise. Posteriormente, o experimento foi analisado por 7 dias com 5 indivíduos por dia, totalizando 37 dias de experimento. O *cis*-jasmone tem ação comprovada de atração frente ao *T. podisi* (Moraes et al., 2009); desse modo, o teste teve o intuito de verificar apenas se a quantidade do composto liberado seria suficiente para atrair o parasitoide.

Os indivíduos foram observados durante 10 minutos, e o seu tempo de residência em cada braço e a primeira escolha foram avaliados. O tempo de residência do parasitoide foi calculado pelo teste de Wilcoxon (Figura 18).

Para o experimento *cis*-jasmone 8 mg, no período de 7 a 13 dias, não houve diferença significativa no tempo de residência do *T. podisi* entre o tra-

tamento e o controle. No entanto, a partir do trigésimo dia, o *T. podisi* apresentou uma tendência a permanecer no braço do tratamento. Essa tendência foi confirmada com o teste de Wilcoxon.

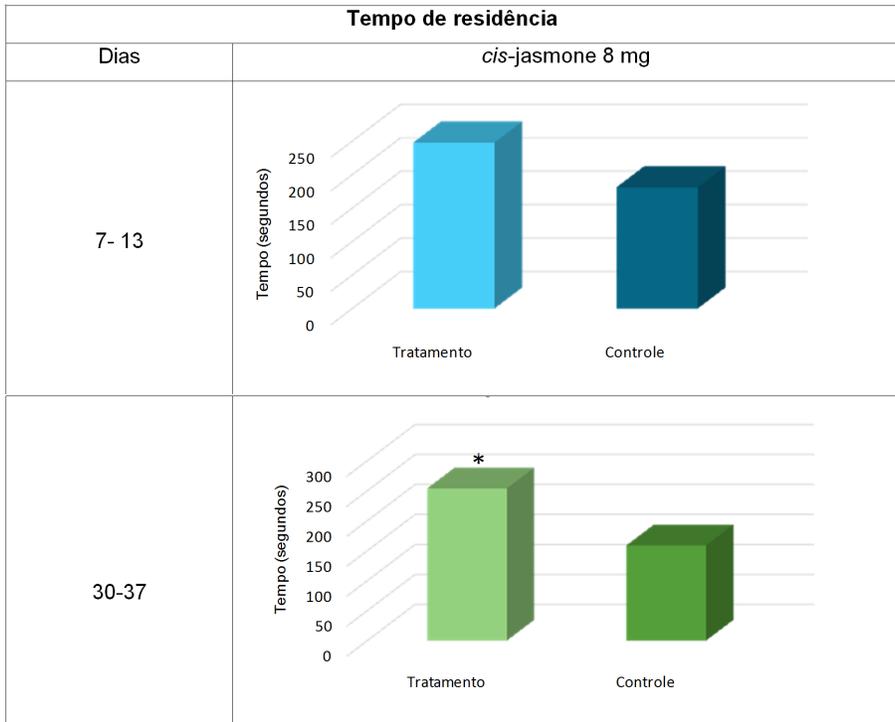


Figura 18. Tempo de residência, em segundos, dos insetos em cada braço do olfâtometro.

Durante o período de 7 a 13 dias, o parasitoide não demonstrou preferência pela área onde estava o tratamento e nem pela área do controle, esse fato é confirmado com o teste de primeira escolha (Figura 19). O parasitoide escolheu seu percurso aleatoriamente. No entanto, no período de 30 a 37 dias, o parasitoide teve como primeira escolha a área onde o tratamento se encontrava, confirmando, assim, a liberação na concentração adequada para atrair o parasitoide.

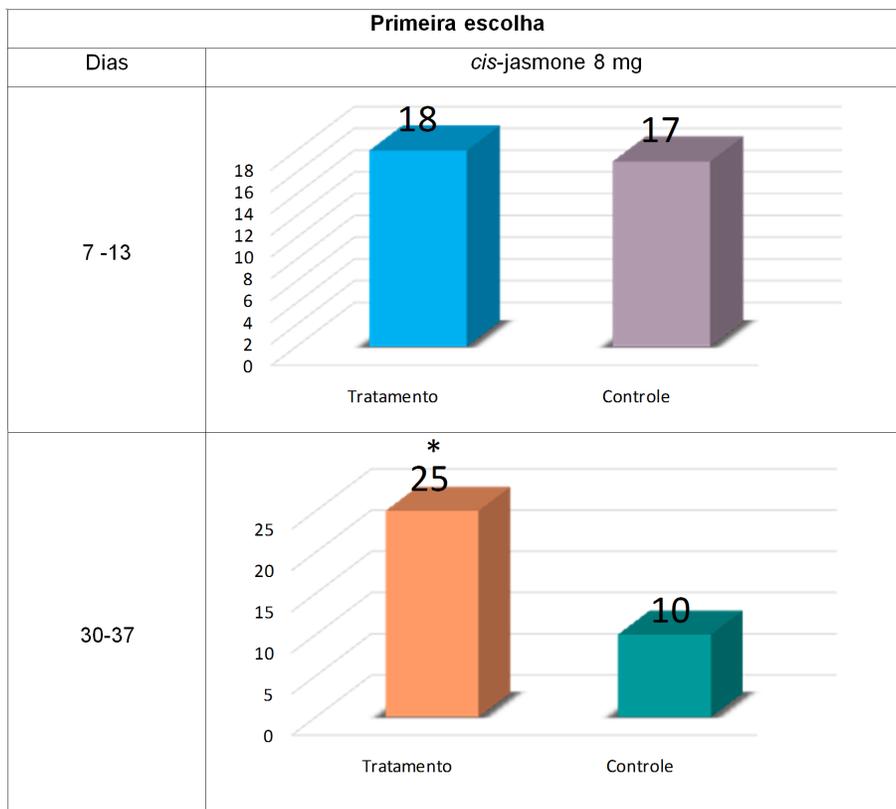


Figura 19. Resultados da primeira escolha do *T. podisi* para o experimento *cis*-jasmone 8 mg.

O resultado nos primeiros dias de análise pode estar relacionado à quantidade de substância liberada, pois o sistema do olfatômetro é fechado e, se a quantidade for maior que a necessária para o parasitoide ser atraído, o sistema pode saturar e o inseto não permanece na área onde se encontra o composto.

No experimento *cis*-jasmone 22 mg, não foi observada diferença no tempo de residência (Figura 20) e nem primeira escolha (Figura 21) para o tratamento ou para o controle.

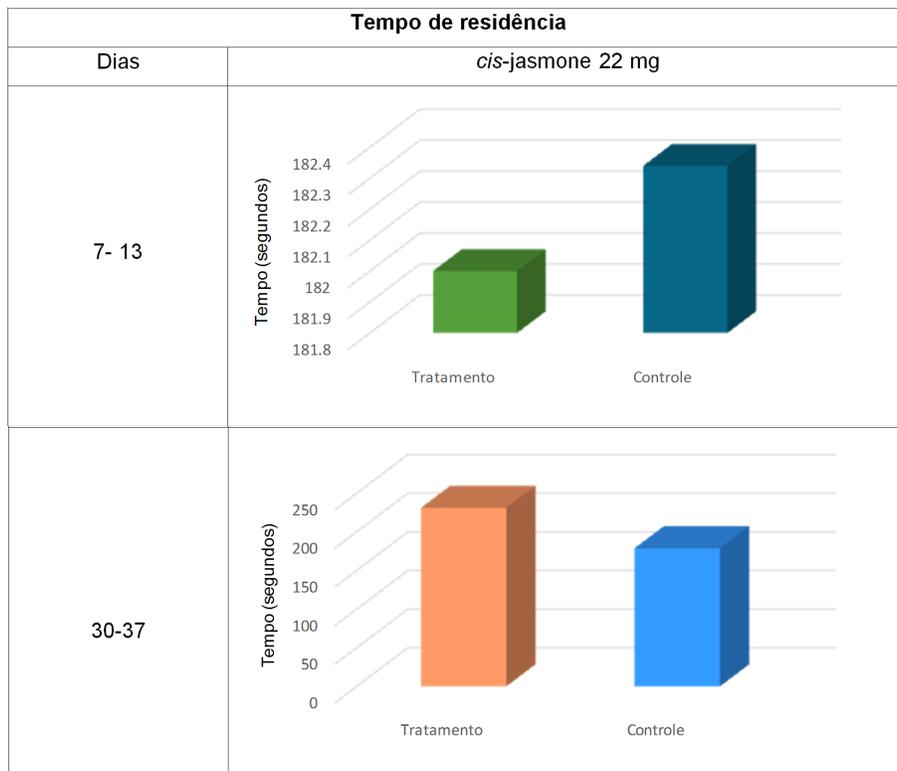


Figura 20. Tempo de residência, em segundos, dos insetos em cada braço do olfatômetro.

O experimento *cis*-jasmone 22 mg no sistema de aeração (Figura 4) apresentou liberação inferior ao experimento *cis*-jasmone 8 mg. No teste do olfatômetro, a quantidade de substância liberada não foi o suficiente para atrair o parasitoide para a área onde se encontrava o tratamento. Para confirmar se a lignina pura não teria capacidade de atração, o teste do olfatômetro foi realizado utilizando a lignina como tratamento e o ar como controle (Figura 22). Os resultados corroboram com os observados nos tratamentos. Os dados foram analisados pelo teste de Wilcoxon e pelo qui-quadrado, não sendo observada diferença significativa para o tempo de residência e para a primeira escolha.

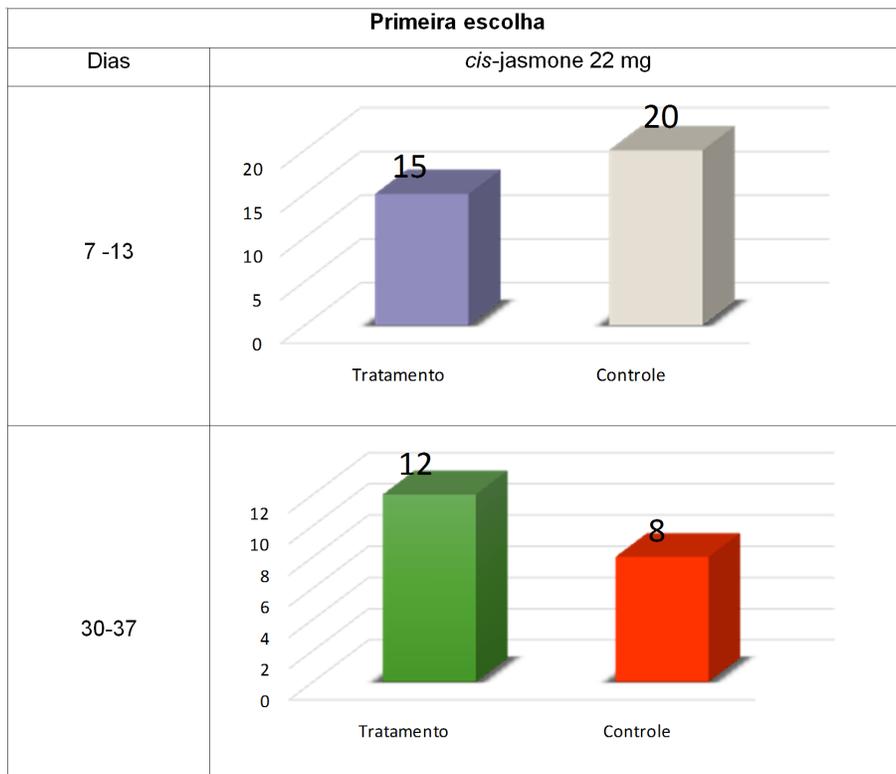


Figura 21. Resultados da primeira escolha do *T. podisi* para o experimento *cis*-jasmone 22 mg.

Para confirmar os resultados obtidos no teste do olfatômetro, os experimentos foram analisados a campo. Os tratamentos *cis*-jasmone 8 mg e *cis*-jasmone 22 mg foram aderidos a arames revestidos de plásticos enrolados para formar uma superfície com área aproximadamente de 1 cm². Etiquetas adesivas com a lignina aderida ao adesivo foram utilizadas como controle. Para cada tratamento e controle, foram utilizadas 5 repetições e, para monitorar o efeito nos insetos (atração), foram utilizadas armadilhas adesivas amarelas (Figura 23).

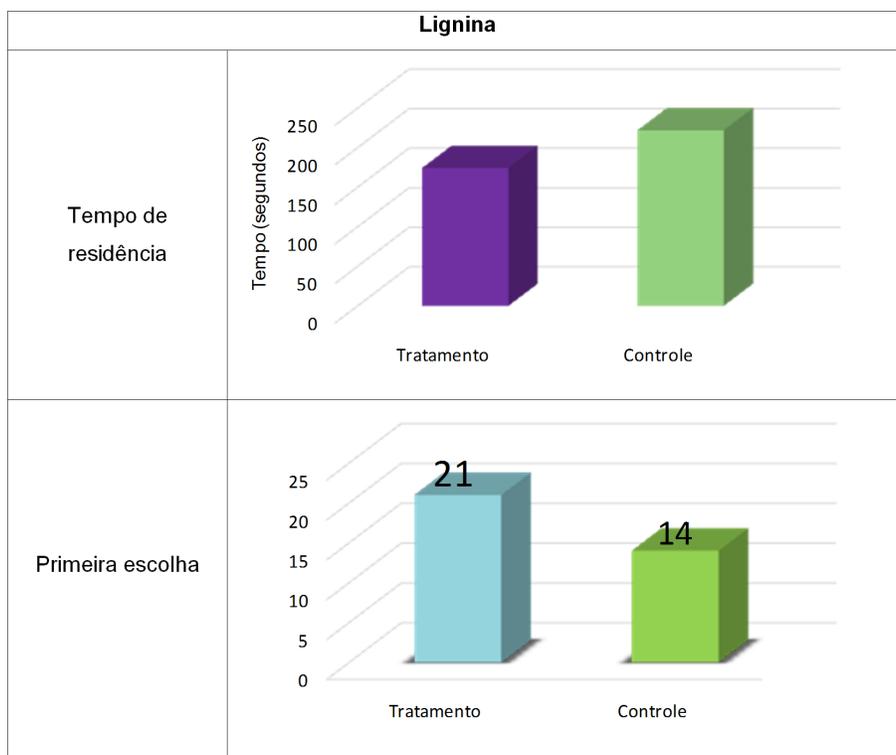


Figura 22. Teste de olfatômetro utilizando a lignina como tratamento e o ar como controle.

Os tratamentos foram distribuídos em forma aleatorizada e as posições eram alteradas a cada semana de amostragem. As armadilhas (Figura 23) permaneceram a campo por um período de 72 horas.

Fotos: Eveline Soares Costa.



Figura 23. Armadilhas adesivas com os tratamentos *cis*-jasmone 8 mg (esquerda) e *cis*-jasmone 22 mg (direita) dispostas aleatoriamente em área de cultivo de algodão.

Quanto à identificação e classificação, não foi observada resposta aos tratamentos para as categorias herbívoros, polinizadores, onívoros/saprófitos e predadores. Para os parasitoides, foi observada uma maior atração para o experimento *cis*-jasmone 8 mg (Figura 24).

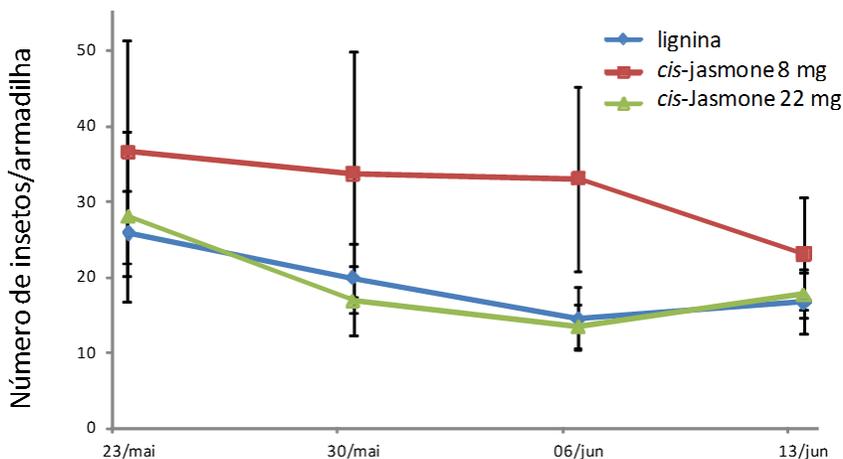


Figura 24. Número médio de parasitoides (\pm EP) coletados em armadilhas adesivas em um período de 72 horas com duas formulações de *cis*-jasmone (8mg e 22mg) e lignina.

A Figura 25 apresenta a abundância de insetos em cada família de parasitoides para cada tratamento.

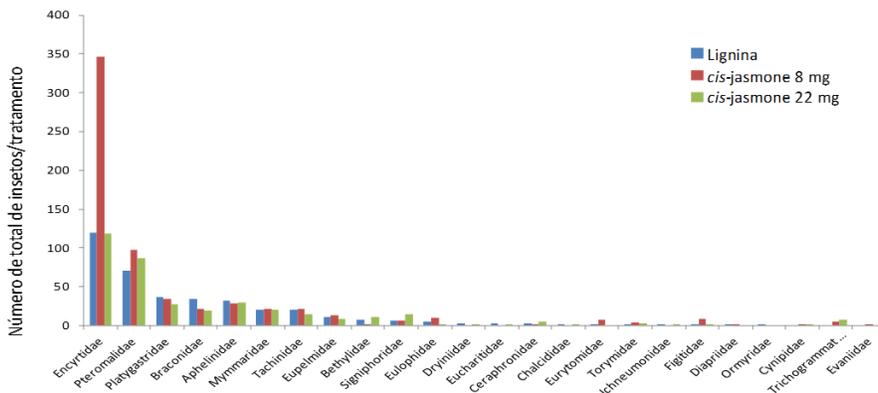


Figura 25. Abundância (número total, considerando as quatro semanas de amostragem) de insetos em cada família de parasitoides amostradas com armadilhas adesivas iscadas com 3 tratamentos diferentes.

Os experimentos a campo corroboram os dados obtidos no teste do olfatômetro. A quantidade do composto *cis*-jasmone liberado no experimento com menor quantidade de lignina (*cis*-jasmone 8mg) é o mais adequado para atrair os parasitoides para a região onde está sendo exposto o material.

Conclusão

O objetivo do trabalho foi utilizar a lignina como suporte para promover a liberação controlada do semioquímico *cis*-jasmone. Foram testadas quatro diferentes proporções mássicas de lignina:*cis*-jasmone. O processo de adsorção desenvolvido foi um procedimento rápido e – ao que tudo indica –, de baixo custo.

Foi observada em todos os experimentos a liberação controlada do *cis*-jasmone. No entanto, foi a razão mássica de 6:2 de lignina:*cis*-jasmone, denominada *cis*-jasmone 8 mg, aquela que demonstrou liberar mais quantidade adequada de *cis*-jasmone para atrair o parasitoide utilizado no estudo, o *T. podisi*.

A lignina apresentou alto potencial de uso como suporte para a promoção da liberação controlada do semioquímico *cis*-jasmone.

A formulação ótima determinada deverá ser aplicada a outros semioquímicos, expandindo o seu uso para uma maior exploração do seu potencial de mercado.

Agradecimentos

Ao Projeto CAPES-Embrapa “Biorrefinaria da Lignina”, pela bolsa de pós-doutorado de Eveline Soares Costa.

Ao Laboratório de Celulose e Papel da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG), por fornecer a amostra caracterizada de lignina kraft.

Referências

- ADLER, E. Lignin chemistry: past, present and future. **Wood Science and Technology**, v. 11, p. 169-218, 1977.
- ALESSIO, P.; CAVALHERI, A. S.; PASQUINI, D.; CURVELO, A. A. S.; CONSTANTINO, C. J. L. Fabricação de filmes ultrafinos de ligninas de bagaço de cana-de-açúcar via evaporação térmica a vácuo. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, v. 27, p. 169-174, 2008.
- ASRAR, J.; DING, Y. **Lignin-based microparticles for the controlled release of agricultural actives**. US Patent Trade Office. US7771749B2. 2010.
- BASTOS, V. D. Biorrefinarias, biocombustíveis e química renovável: revolução tecnológica e financiamento. **Revista do BNDDES**, v. 38, p. 85-138, 2012.
- BENAR, P.; GONÇALVES, A. R.; MANDELLI, D.; SCHUCHARDT, U. Eucalyptus organosolv lignins: study of the hydroxymethylation and use in resols. **Bioresource Technology**, v. 68, p. 11-16, 1999.
- BENTO, J. M. S. Fundamentos do monitoramento, da coleta massal e do confundimento de insetos-praga. In: VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 135-144.
- BRASIL. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva acerca dos agrotóxicos**. 2015. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf>. Acesso em: nov. 2017.
- COLODETTE, J. L. **Method of digesting wood with an alkaline liquor by adding an acidic agent to precipitate dissociated lignin**. Int US 6,464,827 B1, United States Patent and Trademark Office, Alexandria, Oct. 15, 2002.
- DARMAWAN, A.; HARDI, F.; YOSHIKAWA, K.; AZIZ, M.; KOJI, T. Enhanced process integration of black liquor evaporation, gasification, and combined cycle. **Applied Energy**, v. 204, p. 1035 – 1042, 2017.
- DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Lignin primary structures and dirigent sites. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 407-415, 2005.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009.
- DONALDSON, L. A. Lignification and lignin topochemistry: an ultrastructural view. **Phytochemistry**, v. 57, p. 859-873, 2001.
- EMBRAPA. **Embrapa promove I Workshop de Ecologia Química aplicada na agricultura**. 17 ago. 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/4554871/embrapa-promove-i-workshop-de-ecologia-quimica-aplicada-na-agricultura>>. Acesso em: nov. 2017.
- FUKUSHIMA, R. S.; GARIPPO, G.; HABITANTE, A. M. Q. B.; LACERDA, R. S. Extração da lignina e emprego da mesma em curvas de calibração para a mensuração da lignina em produtos vegetais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 1302-1311, 2000.
- FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. Espectros de duas formas de lignina obtidos por ressonância magnética nuclear. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 505-511, 2003.

- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002.
- GUERRA, A.; GASPAR, A. R.; CONTRERAS, S.; LUCIA, L. A.; CRESTINI, C.; ARGYROPOULOS, D. S. On the propensity of lignin to associate: a size exclusion chromatography study with lignin derivatives isolated from different plant species. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2570–2583, 2007.
- HATFIELD, R.; VERMERRIS, W. Lignin formation in plants: the dilemma of linkage specificity. **Plant Physiology**, v. 126, p. 1351–1357, 2001.
- HOCKING, M. B. **Chemical technology and pollution control**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2005.
- HU, J.; ZHANG, Q.; LEE, D.-J. Kraft lignin biorefinery: a perspective. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1181–1183, 2018.
- KLINE, L. M.; HAYES, D. G.; WOMAC, A. R.; LABBÉ, N. Simplified determination of lignin content in hard and softwood via uv-espectrophotometric analysis of biomass dissolved in ionic liquids. **Bioresources**, v. 5, p. 1366–1383, 2010.
- LANGE, H.; DECINA, D.; CRESTINI, C. Oxidative upgrade of lignin – recent routes reviewed. **European Polymer Journal**, v. 49, p. 1151–1173, 2013.
- MANN, J. **Secondary metabolism**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 2005.
- MILHORANCE, F. Brasil lidera o ranking de consumo de agrotóxicos. **O Globo**, 08 abr. 2015.
- MOGUL, M. G.; AKIN, H.; HASIRCI, N.; TRANTOLO, D. J.; GRESSER, J. D.; WISE, D. L. Controlled release of biologically active agents for purposes of agricultural crop management. **Resources Conservation and Recycling**, v. 16, p. 289–320, 1996.
- MORAES, M. C. B.; LAUMANN, R. A.; PAREJA, M. F.; MICHEREFF, M. F. F.; SOUZA-SERENO, F. T. P.; BIRKETT, M. A.; PICKETT, J. A.; BORGES, M. Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with *cis*-jasmone. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 131, p. 178–188, 2009.
- NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dillute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98, p. 49–58, 2002.
- PEDLOWSKI, M. A.; CANELA, M. C.; TERRA, M. A. C.; DE FARIA, R. M. R. Modes of pesticides utilization by Brazilian smallholders and their implications for human health and the environment. **Crop Protection**, v. 31, p. 113–118, 2012.
- PUBCHEM. **Jasmone**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1549018>>. Acesso em: nov. 2017.
- PUBCHEM. **Linalool**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6549>>. Acesso em: nov. 2017.
- PUBCHEM. **Tetradecane**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12389>>. Acesso em: nov. 2017.
- RUGGIERO, R.; MACHADO, A. E. H.; GARDRAT, C.; HOAREAU, W.; GRELIER, S.; SIEGMUND, B. & CASTELLAN, A. Photodegradation of sugar cane bagasse acidolysis lignins. **Journal of Photochemistry and Photobiology A**, v. 173, p. 150–155, 2005.

SAIL, J. M.; EL-NAHHAL, Y. Z.; SOLIMAN, S. A.; EL-SEBAE, A. H. Mutagenie and carcinogenic pesticides used in the agricultural environment of Gaza Strip. **Science of the Total Environment**, v. 132, p. 371-380, 1993.

SALIBA, E. O. S.; RODRIGUEZ, N. M.; MORAIS, S. A. L.; PILÓ-VELOSO, D.; Ligninas – métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, v. 31, p. 917-928, 2001.

SARKANEN, K. V.; LUDWING, C. A. **Lignins occurrence, formation, structure and reactions**. New York: Wiley Interscience, 1971.

SCHEUFELE, F. B.; MÓDENES, A. N.; BORBA, C. E.; RIBEIRO, C.; ESPINOSA-QUIÑONES, F. R.; BERGAMASCO, R.; PEREIRA, N. C. Monolayer–multilayer adsorption phenomenological model: Kinetics, equilibrium and thermodynamics. **Chemical Engineering Journal**, v. 284, p. 1328-1341, 2016.

SUHAS, P. J. M. C.; CARROTT, M. M. L. R. Lignin – from natural adsorbent to activated carbon: a review. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2301–2312, 2007.

UEDA, T.E.; GRAÇA, J.P.; TATIANI, J.; VIEIRA, S.S.; OLIVEIRA, M.C.N.; HOFFMANN-CAMPO, C.B. Aplicação de *cis*-jasmone como indutor de resistência de genótipos de soja a *Euschistus heros* (Hemiptera: pentatomidae). In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 6., 2011. Londrina/PR. **Anais** Londrina: Embrapa Soja, 2011. p. 86-89.

VALOR ECONÔMICO. **Produção brasileira de celulose cresce 8,1% em 2016**. 2017. Disponível em: <<http://www.valor.com.br/empresas/4856722/producao-brasileira-de-celulose-cresce-81-em-2016>> Acesso em: nov. 2017.

WALLMO, H.; WIMBY, M.; LARSSON, A. **Increase production in your boiler with LignoBoost**. Disponível em: <<http://www.tappi.org/content/events/09IBBC/papers/49.1.pdf>> Acesso em: nov. 2017.

YUSOFF, S. N. M.; KAMARI, A.; ALJAFREE, N. F. A. A review of materials used as carrier agents in pesticide formulations. **International Journal of Environmental Science & Technology**, v. 13, p. 2977-2994, 2016.

ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; LIMA, E. R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v. 32, p. 722-731, 2009.

Embrapa

Agroenergia

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

CGPE 14889