

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
CURSO DE AGRONOMIA
AGR99006 - DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO**

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR

**Monique Caumo
Número da matrícula 180266**

Utilização de Nanofibras Poliméricas como Veículo de Feromônios

PORTO ALEGRE, Novembro, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
CURSO DE AGRONOMIA

Utilização de Nanofibras Poliméricas como Veículo de Feromônios

Monique Caumo

Número da matrícula 180266

Supervisor de campo do Estágio: Dr. Cláudio Nunes Pereira

Orientador Acadêmico do Estágio: Profa. Dra. Luiza Rodrigues Redaelli

COMISSÃO DE AVALIAÇÃO

Prof ^a Mari Lourdes Bernardi.....	Depto de Zootecnia (Coordenadora)
Prof ^a Beatriz Maria Fedrizzi.....	Depto de Horticultura e Silvicultura
Prof. Elemar Antonino Cassol.....	Depto de Solos
Prof. Renata Pereira da Cruz.....	Depto de Plantas de Lavoura
Prof. Josué Sant'Ana.....	Depto de Fitossanidade
Prof ^a Lúcia Brandão Franke.....	Depto de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia

Porto Alegre, Novembro, 2014.

AGRADECIMENTOS

Desde o início do curso sempre me perguntei se havia feito a escolha certa. Ao longo desses seis anos, percebi que tudo valeu a pena e não houve arrependimentos, pois tornei-me uma mulher mais madura e responsável, apaixonada pela Agronomia.

Agradeço em primeiro lugar à minha família, pelo amor, apoio e incentivo.

Agradeço à minha mãe, Claudete Bertol Caumo, pelo amor incondicional e infinito que sempre me levou adiante de maneira otimista.

Ao meu pai, Genir João Caumo, pela confiança e orgulho que sempre demonstrou em ter uma filha Engenheira Agrônoma.

Ao meu irmão, Robson Caumo, que mesmo estando longe, susteve minhas escolhas.

Agradeço também a todos os professores, pela diligência em suas respectivas áreas, apresentando a Agronomia de maneira primordial.

Ao professor Josué Sant'Ana, que me acolheu por dois anos como orientada, acreditando em meu potencial como pesquisadora e compartilhando sua experiência e conhecimento.

À professora Luiza Redaelli, pela paciência e dedicação afável.

Aos meus amigos, sempre tão dispostos e cheios de palavras de ânimo e humor, que tornaram essa caminhada mais suave e recompensadora.

Às minhas amigas da Agronomia, pela paciência e pelo carinho imutáveis.

À Bruna Czarnobai, pelo auxílio constante durante o estágio e amizade.

E por fim à empresa Tecnano, pela oportunidade de estágio, crescimento pessoal e profissional.

APRESENTAÇÃO

A escolha da empresa baseou-se na perspectiva de um panorama sustentável e de baixo impacto ambiental apresentado no decorrer do curso de Agronomia da UFRGS. O uso de nanofibras na produção agrícola é um assunto recente e ainda em estudo, o qual deve ser cada vez mais debatido e estudado para ser empregado em prol do desenvolvimento da agricultura. Associado a este fato, ao interesse e à satisfação pessoal de trabalhar com o controle de pragas, a proposta da empresa de utilizar nanofibras poliméricas no veículo de feromônios pareceu correta, somando conhecimentos para uma futura pós-graduação.

O estágio proporciona uma segurança ao aluno que logo se lançará no mercado de trabalho, pois possibilita a visualização prática dos conhecimentos obtidos na faculdade, consolidando-os. Ao fim de minha participação na empresa, fiquei satisfeita com os conteúdos recebidos nas disciplinas relacionadas, pois estes colaboraram para a realização do estágio desenvolvido na empresa e representam o que o mercado de trabalho exige neste ramo.

RESUMO

O estágio curricular foi realizado em Porto Alegre, RS na empresa Tecnano, tendo como principal objetivo acompanhar o trabalho de pesquisa focado na avaliação da bioatividade de antenas de machos da *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera; Tortricidae) frente à nanofibras dobradas confeccionadas com diferentes tipos de materiais (polímeros). As nanofibras continham feromônio sintético específico e inseticida e foram expostas ao ambiente ao longo de oito semanas. Ao fim do período de avaliação, os polímeros continuaram produzindo respostas estatisticamente iguais ou superiores às observadas quando as mesmas não foram expostas.

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. <i>Grapholita molesta</i> . A) Adulto; B) Lagarta.	11
2. <i>Electrospinning</i> e Matriz de Nanofibras	13
3. Eletroanténgrafo. A) Eletrodo, em detalhe B) pré-amplificador de sinal elétrico, C) controlador de aquisição de dados, D) controlador de fluxo de ar	15
4. Média das respostas eletroanténográficas (EAG) em milivolts (mV) de machos de <i>Grapholita molesta</i> a nanofibras de policaprolactona com solvente polietilenoglicol (PCL/PEG) contendo feromônio sintético e Cipermetrina ao longo de oito semanas, comparando o polímero com seu respectivo controle e ao longo de cada etapa	17
5. Média das respostas eletroanténográficas (EAG) em milivolts (mV) de machos de <i>Grapholita molesta</i> a nanofibras de policaprolactona utilizando como solventes tetraidrofurano e dimetilformamida (PCL THF:DMF) contendo feromônio sintético e Cipermetrina ao longo de oito semanas, comparando o polímero com seu respectivo controle e ao longo de cada etapa	17
6. Média das respostas eletroanténográficas em milivolts (mV) de machos de <i>Grapholita molesta</i> à nanofibras de polivinil acetato + polivinilpirrolidona (PVAC/PVP) contendo feromônio sintético e Cipermetrina ao longo de oito semanas, comparando o polímero com seu respectivo controle ao longo de cada etapa	18
7. Comparação das respostas eletroanténográficas (EAG) de machos de <i>Grapholita molesta</i> entre os polímeros policaprolactona utilizando polietilenoglicol como solvente (PCL/PEG), policaprolactona utilizando tetraidrofurano e dimetilformamida como solvente (PCL THF: DMF) e polivinil acetato em composição com polivinilpirrolidona (PVAC/PVP) em diferentes momentos de exposição	19

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	8
2. Caracterização da Cientec e da empresa Tecnano	8
3. Referencial teórico	10
3.1 Comunicação química e controle comportamental.....	10
3.2 Aspectos bioecológicos e controle comportamental de <i>Grapholita molesta</i>	11
3.3 Uso de nanofibras como dispersores de feromônios	12
4. Atividades realizadas	14
4.1 Criação de <i>Grapholita molesta</i>	14
4.2 Bioensaios Eletroantegráficos – <i>Grapholita molesta</i>	14
4.2.1 Resultados	16
5. Discussão	20
6. Considerações finais	21
Referências bibliográficas	23

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com a segurança alimentar vem tomando proporções cada vez maiores com o passar dos anos, questionando a forma de emprego de tantos defensivos químicos utilizados amplamente na agricultura. Dados de pesquisa revelam resíduos em diversos alimentos, expondo a urgência da regulação do uso destes agrotóxicos ou mesmo da necessidade de alternativas para controlar pragas, responsáveis por grandes perdas de rendimento. O uso de semioquímicos no controle de insetos mostrou-se uma ferramenta importante, de modo que maneja as populações baseando-se em seu comportamento com o mínimo de liberação de formulações. Nesta linha, a empresa Tecnano alia as duas temáticas, ou seja, o controle de pragas através do desenvolvimento de ferramentas de menor impacto ambiental e social.

O estágio foi realizado na empresa Tecnano, localizada no município de Porto Alegre, RS. Fundada em 2009, com sede na Fundação de Ciência e Tecnologia, a Incubadora Tecnológica - ITCientec, possui parceria com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul e conta com a colaboração em pesquisa da Faculdade de Agronomia através dos Departamentos de Fitossanidade e Horticultura e Silvicultura (CIENTEC, 2014). O período de experiência somou pouco mais de 300 horas, iniciando no dia 2 de janeiro e terminando em 26 de fevereiro de 2014.

O objetivo do estágio consistiu em acompanhar todas as etapas de uma pesquisa científica, desde a manutenção dos componentes, realização dos testes de avaliação e interpretação de resultados, os quais podem gerar práticas alternativas às utilizadas comumente na agricultura. No caso do controle de pragas, a utilização de nanofibras poliméricas degradáveis como dispersor de feromônios torna-se uma opção de menor impacto e mais segura, se comparada aos produtos similares disponíveis no mercado.

2. CARACTERIZAÇÃO DA CIENTEC E DA EMPRESA TECNANO

A Fundação de Ciência e Tecnologia - CIENTEC é uma instituição pública, vinculada à Secretaria da Ciência Inovação e Desenvolvimento Tecnológico do estado do Rio Grande do Sul, com sede no município de Porto Alegre e um campus em Cachoeirinha, na Região Metropolitana, somando uma área construída de 6.200 m² (CIENTEC, 2014). Segundo a mesma fonte, as atividades desta Fundação concentram-se no desenvolvimento de serviços tecnológicos para empresas públicas e privadas, órgãos públicos, associações, entidades e

peças físicas, através da realização de ensaios, calibrações, consultorias, inspeções, pesquisa, desenvolvimento, extensão e informação tecnológica, atuando nas áreas de alimentos, engenharia de edificações, materiais de construção civil, engenharia eletroeletrônica, tecnologia metal-mecânica, engenharia de processos, química e geotécnica.

A Fundação também conta com duas incubadoras, visando o desenvolvimento de produtos e processos intensivos em tecnologia de novas empresas. Através de projetos de pesquisa e desenvolvimento, a Fundação estuda e cria novos processos ou produtos que sejam de interesse da sociedade, da indústria local, ou que sejam estratégicos para o país, contribuindo assim com o desenvolvimento do Rio Grande do Sul e do Brasil. Além disso, a Fundação também orienta indústrias e empresas para que ofereçam produtos de qualidade, testados e comprovados por processos ecologicamente corretos, economicamente viáveis, socialmente justos e culturalmente aceitos. A Fundação conta com diversos colaboradores como a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a Universidade Federal de Pelotas, o SEBRAE, o CNPq e o FINEP (CIENTEC, 2014).

Fundada em 1999, a Incubadora Tecnológica Cientec (ITCientec) foi criada com objetivo de facilitar a transferência de tecnologias desenvolvidas na própria Fundação, estabelecer parceria entre os diferentes departamentos e apoiar novos empreendimentos, integrando a comunidade científica e o setor produtivo. A Tecnano é uma destas empresas, apoiada em decorrência de sua base tecnológica e da admissão de profissionais jovens, egressos de cursos de pós-graduação da Região Metropolitana de Porto Alegre (CIENTEC, 2014).

Formada em 2009, a Tecnano – Soluções em Nanotecnologia - atua no desenvolvimento de sistemas de liberação de princípios ativos baseados em nanotecnologias para áreas relacionadas ao agronegócio, prevenção sanitária e indústria farmacêutica. Os materiais produzidos são emulsões, soluções ou nanofibras que se degradam no solo deixando o mínimo de resíduo no meio, reduzindo, portanto, os impactos no ambiente (TECNANO, 2014).

O grande diferencial da tecnologia promovida pela empresa está no encapsulamento de substâncias com a liberação controlada, sendo estas degradadas ou decompostas sob determinadas condições ambientais, no local e no tempo, de forma precisa. Para a agricultura torna-se uma tecnologia de interesse, principalmente com relação ao controle de pragas, uma vez que os químicos utilizados podem ter uma distribuição mais ampla no tempo e em menores dosagens (TECNANO, 2014).

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Comunicação química e controle comportamental

A comunicação entre animais é feita através de sinais visuais, acústicos, táteis e/ou químicos. Os insetos em sua maioria utilizam todos estes mecanismos no processo de comunicação, entretanto, a ênfase dada a cada um deles varia entre as espécies. A principal forma de comunicação usada por uma determinada espécie está relacionada com seu habitat, comportamento e interação da espécie com seu meio ambiente (Evershed, 1986).

Grande parte dessa comunicação é realizada através de substâncias químicas, as quais são responsáveis por diversos tipos de comportamento, como o reprodutivo, defesa, agregação etc. Essas substâncias químicas que, quando liberadas por um determinado organismo provocam mudanças fisiológicas e/ou comportamentais em outro, são denominadas semioquímicos. Tais compostos podem agir entre indivíduos de mesma espécie, denominados feromônios (ou de natureza intraespecífica) ou entre indivíduos de espécies diferentes, aleloquímicos (ou de natureza interespecífica) (Corrêa & Sant'Ana, 2001).

Os sinais químicos são percebidos por células nervosas receptoras localizadas dentro de sensilas olfativas, as quais estão presentes principalmente nas antenas, mas podem também estar localizadas em outras estruturas, como nas mandíbulas, palpos, tarsos e ovipositor (Atkins, 1980; Boeckh, 1984; Faucheux, 1991).

Os feromônios podem ser utilizados tanto no monitoramento, quanto na regulação populacional em programas de Manejo Integrado de Pragas. O monitoramento consiste na estimativa da população de insetos em uma determinada área, componente imprescindível para a tomada de decisão quanto à adoção de alguma medida de controle. Quando uma determinada espécie de praga atinge o Nível de Dano Econômico, definido como a densidade populacional de uma praga capaz de causar prejuízo de mesmo valor que seu custo de controle, uma medida deve ser empregada (Stern et al., 1959).

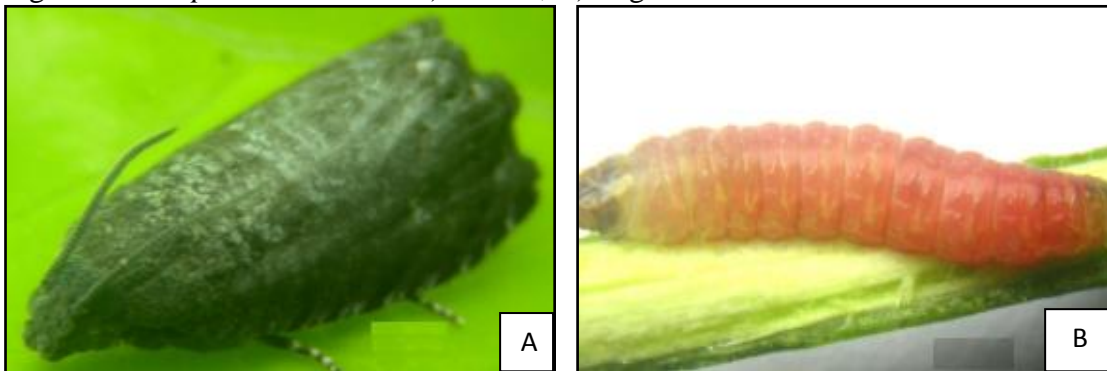
A utilização de feromônios no controle de pragas é uma alternativa de eficiência equivalente aos inseticidas, preserva a população de inimigos naturais e não apresenta risco de contaminação ao homem (Vilela, 1992). Tal ferramenta possui destaque na área da fruticultura, controlando insetos como a *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera; Tortricidae), a mariposa-oriental (Kovaleski & Ribeiro, 2002).

3.2 Aspectos bioecológicos e de controle comportamental de *Grapholita molesta*

Também chamada de mariposa-oriental, *G. molesta* (Figura 1A) é uma praga de grande importância, sobretudo nas culturas do pessegueiro e da macieira na região sul do Brasil (Salles, 1998; Mello, 2004). Originária da Ásia e considerada de distribuição cosmopolita, pode provocar perdas de 3 a 5% em variedades tardias, pois estas ficam por mais tempo expostas ao ataque da praga (Gonzalez, 1989; Botton et al., 2001).

O principal dano é causado pelas larvas (Figura 1B) que fazem galerias nas brotações jovens provocando a morte dos ponteiros. Já nos frutos, o ataque só ocorre em pomares altamente infestados, provocando queda prematura dos mesmos (Grellmann & Loeck, 1992; Monteiro & Hickel, 2004).

Figura 1 – *Grapholita molesta*. A) Adulto; B) Lagarta.



Fonte: Morais et al., 2007.

O controle químico ainda é largamente utilizado, mediante aplicações preventivas e desnecessárias (abaixo do Nível de Dano Econômico) de inseticida em cobertura. A maioria dos produtos pertence aos grupos dos piretroides e dos fosforados, os quais são de amplo espectro e eliminam os inimigos naturais que contribuiriam para o controle natural da praga. (Botton *et al.*, 2011). Além dos métodos químicos, ainda é praticado o controle cultural, composto de medidas como escolha de cultivares de ciclo precoce, catação seguida de destruição dos ponteiros e ensacamento de frutos, técnicas bastante utilizadas na fruticultura orgânica (Carvalho, 1990; Lipp & Secchi, 2002; Poltronieri et al., 2008).

Para o monitoramento e controle de *G. molesta* existe o feromônio sintético equivalente ao natural produzido pelas fêmeas que, quando liberado no ambiente, desorienta os machos na procura de uma parceira para o acasalamento provocando, assim, a diminuição do número de cópulas e da população praga. Além da redução do uso de inseticidas e dos resíduos nos frutos, esta técnica preserva os inimigos naturais por ser específica para a

mariposa-oriental, garantindo a segurança do agricultor por não se tratar de um produto tóxico (Thomson et al., 2001; Botton et al., 2011).

Os produtos comercializados à base de feromônio sintético de *G. molesta* podem se apresentar de diversas formas, variando de acordo com o tempo de liberação, forma e custo de aplicação (Molinari et al., 2000). O produto mais recente lançado no mercado nacional para a confusão sexual é um emissor em forma de pasta chamado Splat Grafo® (Specialized Pheromone and Lure Application Technology®) (ISCA, 2014a). Este emissor permite o ajuste da dose do produto de acordo com os níveis populacionais da praga melhorando a eficiência do mesmo (Stelinski et al., 2005).

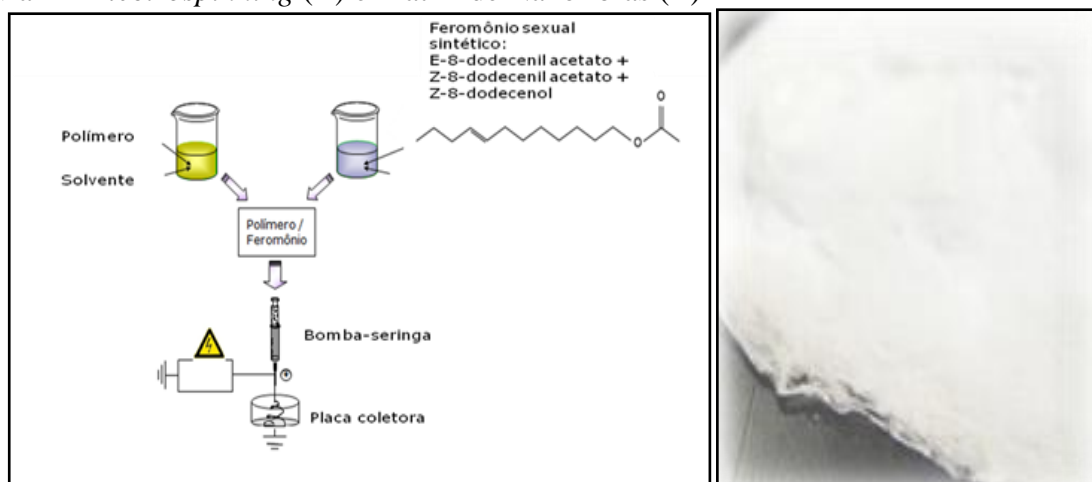
Além da disponibilidade da pasta para utilização simples, existem versões associadas a inseticidas, como a formulação Splat Cida Bona Gota® manejando juntamente *G. molesta* e *Bonagota cranaodes* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae), conhecida popularmente como lagarta-enroladeira. Neste caso, o ingrediente ativo utilizado é a Cipermetrina, pertencente ao grupo dos piretroides e com modo de ação por ingestão e contato. O inseticida é liberado gradualmente com a pasta em baixas dosagens. Inicialmente, como os indivíduos não se aproximam da fonte de odor, pela saturação do ambiente com feromônio, não há ação letal sobre os machos, porém, à medida que a concentração do feromônio reduz, os insetos atingem a fonte e acabam morrendo por ação de contato, reduzindo, assim, a população da praga (ISCA, 2014b).

3.3 Uso de nanofibras como dispersores de feromônios

Os estudos com nanotecnologia como dispersores de semioquímicos para fins agrícolas são recentes e a pesquisa pioneira teve início na Alemanha (Hellmann et al., 2009). Segundo os autores, a técnica desenvolvida consistiu na utilização de *electrospinning* para a produção de nanofibras de acetato de celulose ou poliamida 6, compostas com feromônio sintético de *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera; Tortricidae), a qual obteve sucesso na liberação do feromônio em laboratório, porém os testes a campo estão em andamento. A justificativa para o emprego deste artifício na agricultura provém de características interessantes para dispersores, como boa incorporação da molécula de feromônio, a qual permanece no veículo sofrendo menor degradação ambiental, e na taxa de liberação, a qual é lenta e gradual evitando assim doses massivas de produto (Hellman et al., 2009).

A construção das nanofibras poliméricas biodegradáveis é realizada pelo método de *electrospinning* (Figura 2A). Os polímeros dissolvidos são processados e posicionados entre eletrodos os quais estão ligados a uma alta tensão. A solução forma um fio devido ao campo de alta tensão, a qual colapsa e sai um jato do mesmo, acelerado em direção ao eletrodo oposto. Durante a aceleração, o solvente irá evaporar, remanesecendo somente uma fibra de dimensões nanométricas que, durante um processo contínuo, produzirá uma matriz de nanofibras (Figura 2B). Segundo o mesmo autor, um elevado campo elétrico, de magnitude da ordem de 100 a 500 kV/m é aplicado. A distância aos eletrodos opostos atinge tipicamente entre 10 e 25 cm, em sistemas de laboratório, e as correntes que fluem durante o *electrospinning* são da ordem de 100 nanoamperes até vários microamperes. Durante o *electrospinning*, condições ideais de formação de matrizes nanométricas são estabelecidas de acordo com a concentração de polímero e as características das matrizes que se deseja obter (Hohmann et al., 2001). Para isso, a voltagem a ser utilizada, a distância entre a ponta da agulha e a placa coletora, o diâmetro da agulha, entre outros parâmetros, são adaptados e modificados para que as características ideais das matrizes, com o feromônio, puro ou em mistura com inseticida, sejam obtidas (Boudriot et al., 2005).

Figura 2 – *Electrospinning* (A) e Matriz de Nanofibras (B)



Fonte: Morais (2012)

Os polímeros biodegradáveis produzidos pelo método de *electrospinnig* utilizados nos bioensaios tiveram como base a policaprolactona (PCL), um poliéster de cadeia alifática bastante utilizado na indústria biomédica e o polivinil acetato (PVAc), polímero solúvel em água, semicristalino, totalmente biodegradável. A diferença entre as fibras policaprolactona, por sua vez, foram os solventes usados em sua fabricação, de modo que PCL utiliza

polietilenoglicol (PEG) e PCL THF:DMF, utiliza tetraidrofurano e dimetilformamida. Já a fibra PVAC é misturada com outro polímero, o polivinilpirrolidona (PVP) e utiliza como solvente água e etanol na proporção de 1:1 (Rosa et al., 2000; Peresin et al., 2010; Jannesari et al., 2011).

4. ATIVIDADES REALIZADAS

4.1 Criação de *Grapholita molesta* (Lepidoptera; Tortricidae)

A criação de *Grapholita molesta* foi estabelecida no LEEQI - Laboratório de Etologia e Ecologia Química de Insetos, no Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul a partir de pupas cedidas pelo BIECOLAB.

As crisálidas foram colocadas em gaiolas confeccionadas em garrafa Pet com fundo removido coberto com tecido voile. Para a alimentação dos adultos, um tubo de vidro (15 mL) contendo uma solução de mel a 15% e Nipagin® 5% era inserido no orifício no topo da garrafa. A cada dois dias, os ovos eram recolhidos e higienizados com solução de hipoclorito a 15% e as mariposas remanescentes, transferidas para outra gaiola.

Após a secção da garrafa, as tiras contendo as posturas eram acondicionadas em potes plásticos de 500 mL contendo dieta específica para lagartas. A dieta foi baseada na metodologia proposta por Arioli et al. (2007), contendo maçã desidratada, farinha de milho, levedura de cerveja, gérmen de trigo, ágar, ácido ascórbico, ácido benzóico, fomaldeído e Nipagin®. Quando as lagartas atingiam o último ínstar, tornado-se robustas e rosadas, as bandejas eram recobertas com gaze hidrófila que serviria de substrato para a formação das crisálidas. Em seguida da transformação da maioria das lagartas, estas eram separadas e desinfestadas com uma solução de hipoclorito a 15% para serem novamente dispostas em gaiolas de garrafa pet. Todas as fases foram desenvolvidas em ambiente controlado (25 ± 1 °C; $60 \pm 10\%$ UR; fotofase de 16 horas).

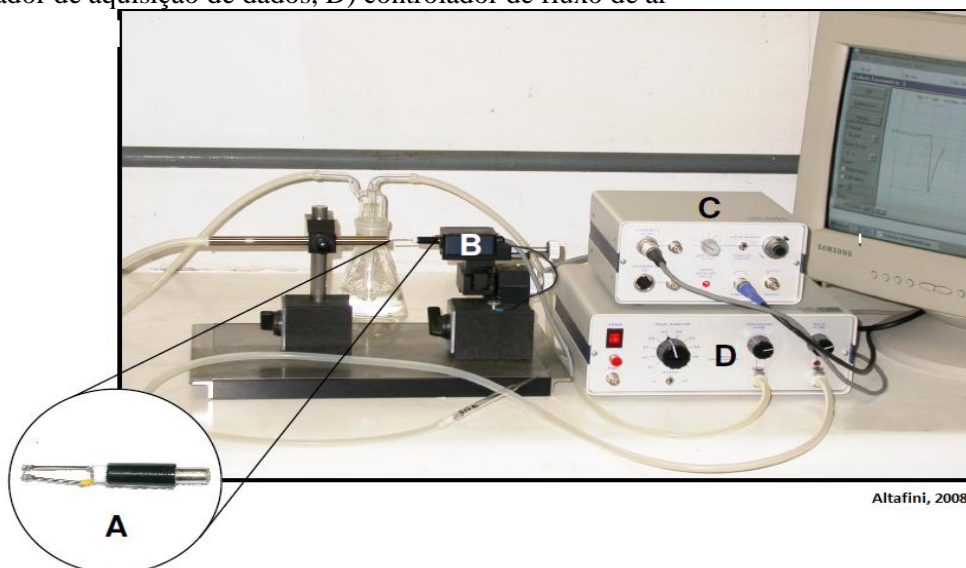
4.2 Bioensaios Eletroantenográficos

A metodologia baseou-se nos bioensaios eletroantenográficos propostos por Trimble & Marshall (2007). Cada inseto testado (machos de *G. molesta*) foi levado à observação em estereomicroscópio (400x), onde foi feita a secção de uma das antenas na altura do pedicelo, a qual foi posicionada em eletrodo bifurcado de prata. As extremidades basal e apical da antena

ficaram aderidas ao eletrodo registrador e ao neutro, respectivamente, imersas em gel Spectra® 360 Salt Free, para possibilitar a condutividade elétrica desencadeada pela antena ao ser exposta às nanofibras e compostos nela impregnados.

A resposta analógica do sinal, em milivolts (mV), foi capturada, amplificada e processada com um controlador de aquisição de dados (IDAC-4, Syntech®, the Netherlands) e, posteriormente, registrados pelo uso de software (EAG2000, Syntech®, The Netherlands). (Figura 3).

Figura 3 – Eletroanténografo. A) Eletrodo, em detalhe B) pré-amplificador de sinal elétrico, C) controlador de aquisição de dados, D) controlador de fluxo de ar



Fonte: Altafini, 2008.

Os tratamentos consistiram em nanofibras inteiras provenientes de 100 mL de solução confeccionadas com os polímeros policaprolactona utilizando polietilenoglicol como solvente (PCL/PEG); policaprolactona utilizando tetraidrofurano e dimetilformamida como solventes (PCL THF:DMF); e PVAC (polivinil acetato) em mistura com outro polímero, o polivinilpirrolidona (PVAC/PVP), todos impregnados com 10% de feromônio sexual sintético de *G. molesta* e 4% de Cipermetrina.

Os controles eram as próprias fibras puras, sem adição de feromônio ou inseticida, sendo confrontados sempre polímeros de mesma composição. As nanofibras foram dobradas até o seu limite e ficaram expostas a ambiente controlado (25 ± 2 °C; $65 \pm 10\%$ UR), dentro de potes plásticos com a tampa perfurada por um período de oito semanas. A cada sete dias, os tratamentos e controles eram retirados dos potes e dados como estímulo aos insetos.

Separadamente, cada nanofibra e controle foram inseridos em pipetas vedadas e adaptadas com volume de 50 mL. A extremidade anterior da pipeta era colocada dentro de

um orifício na parede de um tubo de metal (1 cm de diâmetro x 18 cm de comprimento), orientado em direção à antena, a uma distância aproximada de 1cm.

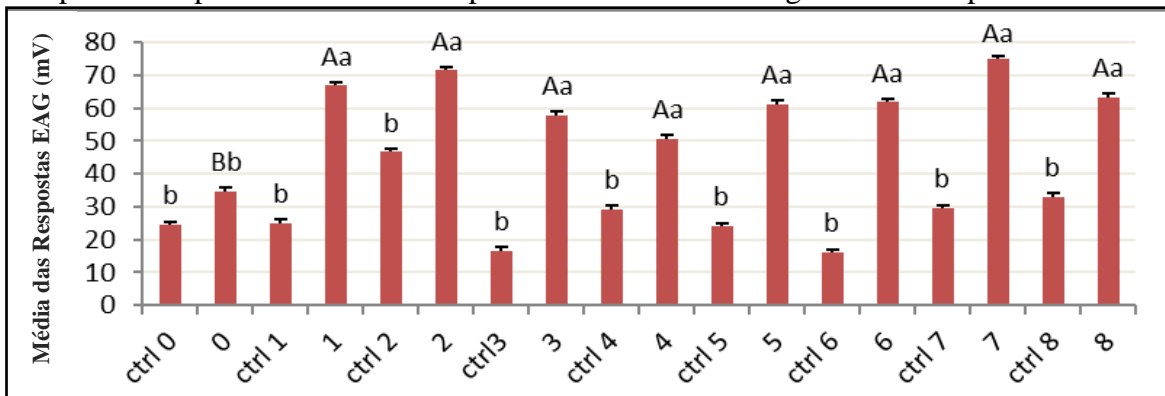
As antenas foram submetidas a pulsos de ar, gerados por um controlador de fluxo (CS-02, Syntech® The Netherlands), em um volume de 2,5 mL/0,5 s, com os diferentes tratamentos testados. Foi adotado o tempo de um minuto entre sucessivos estímulos, para que a antena readquirisse sua capacidade de percepção olfativa. Durante os bioensaios as antenas eram umidificadas por uma corrente de ar direcionada que passava por um balão de Erlenmeyer (50 mL) contendo água destilada (umidificador).

Os dados (valores em milivolts) foram submetidos à análise estatística (ANOVA; $\alpha = 0,05$; $n = 11$) com o auxílio do software Bioestat® 4.0. Os valores médios das respostas eletroantegráficas foram comparados pelo teste de Tukey a cada semana com o respectivo controle e cada nanofibra com feromônio e Cipermetrina ao longo das semanas. Foram comparadas, também, as médias das respostas eletroantegráficas entre os diferentes tipos de polímeros ao longo das oito semanas de avaliação.

4.2.2 Resultados

Os resultados obtidos pelo teste eletroantegráfico no qual as antenas de insetos foram estimuladas com nanofibras que continham feromônio e inseticida, e controles, mostraram que houve diferença estatística significativa nas respostas eletrofisiológicas entre as nanofibras que continham feromônio e seus respectivos controles nos períodos avaliados. Não houve diferença significativa entre as respostas eletroantegráficas da fibra PCL/PEG no decorrer das semanas, evidenciando a continuidade da emissão do feromônio + inseticida. Foi observado também que este polímero não se diferenciou do seu respectivo controle quando não exposto (semana zero), diferente do que ocorreu nas semanas seguintes (Figura 4).

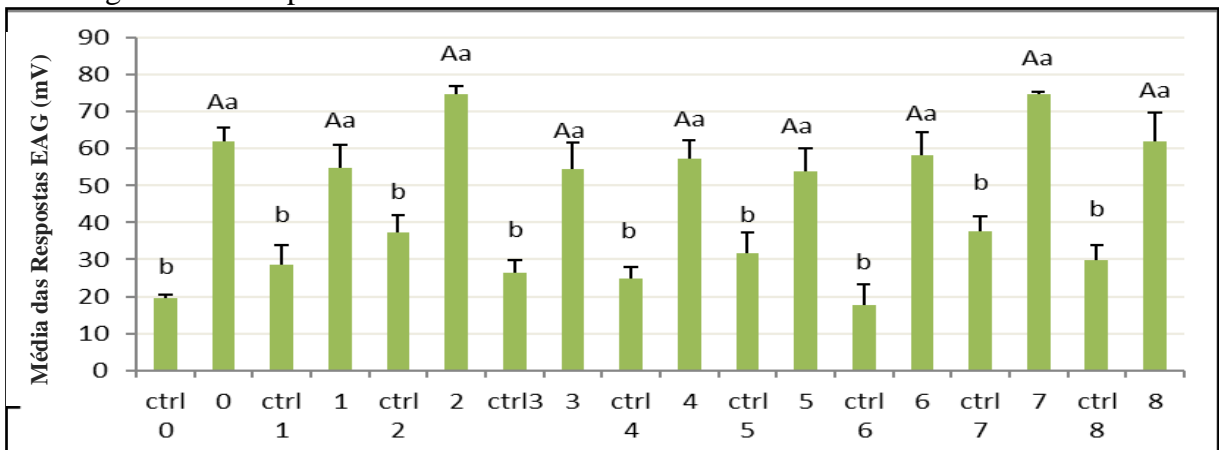
Figura 4 – Média das respostas eletroantenográficas (EAG) em milivolts (mV) de machos de *Grapholita molesta* a nanofibras de policaprolactona com solvente polietilenoglicol (PCL/PEG) contendo feromônio sintético e Cipermetrina ao longo de oito semanas, comparando o polímero com seu respectivo controle e ao longo de cada etapa.



Letras maiúsculas sobre as barras indicam diferenças significativas das nanofibras entre as semanas e letras minúsculas diferenças entre as nanofibras e seus respectivos controles. (ANOVA; $P < 0,05$; $n = 11$).

Na fibra PCL THF:DMF, as respostas não diferiram estatisticamente ao longo do tempo, porém diferiram entre tratamento e controle em todo o período. A emissão do feromônio, portanto, foi contínua durante o período avaliado (Figura 5).

Figura 5 – Média das respostas eletroantenográficas (EAG) em milivolts (mV) de machos de *Grapholita molesta* a nanofibras de policaprolactona utilizando como solventes tetraidrofurano e dimetilformamida (PCL THF:DMF) contendo feromônio sintético e Cipermetrina ao longo de oito semanas, comparando o polímero com seu respectivo controle e ao longo de cada etapa.

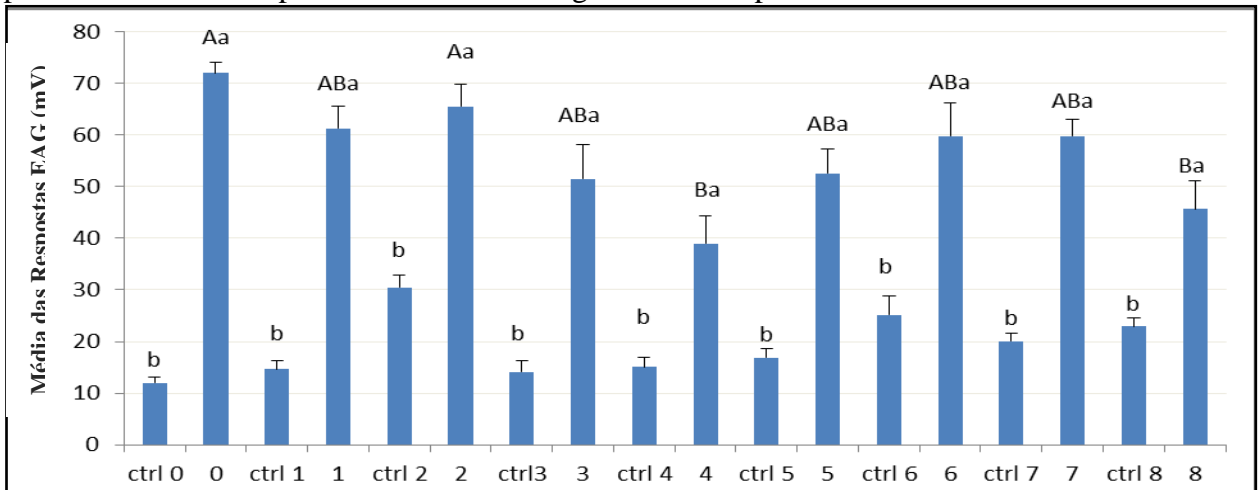


Letras maiúsculas sobre as barras indicam diferenças significativas das nanofibras entre as semanas e letras minúsculas diferenças entre as nanofibras e seus respectivos controles. (ANOVA; $P < 0,05$; $n = 11$).

A fibra PVAC/PV foi a que mais variou ao longo do tempo, mantendo resultados semelhantes até a quarta semana, período em que houve diminuição da média das respostas.

Na semana seguinte houve aumento da média avaliada, seguida novamente de diminuição, até o fim do período de estudo (Figura 6).

Figura 6 – Média das respostas eletroantenográficas em milivolts (mV) de machos de *Grapholita molesta* à nanofibras de polivinil acetato + polivinilpirrolidona (PVAC/PVP) contendo feromônio sintético e Cipermetrina ao longo de oito semanas, comparando o polímero com seu respectivo controle ao longo de cada etapa.



Letras maiúsculas sobre as barras indicam diferenças significativas das nanofibras entre as semanas e letras minúsculas diferenças entre as nanofibras e seus respectivos controles. (ANOVA; $P < 0,05$; $n = 11$).

Os resultados sugerem que a taxa de liberação do feromônio permaneceu relativamente constante ao longo do tempo. Tal associação pode estar relacionada ao fato das nanofibras terem sido dobradas, de modo que se formou uma barreira mecânica à dissipação acelerada dos compostos, podendo prolongar assim o seu período de estímulo às antenas dos insetos.

As fibras confeccionadas com PCL demonstraram melhor distribuição dos compostos impregnados no polímero ao longo do tempo, corroborando com os resultados apresentados por Moraes (2012). O material é preferencial para a utilização como dispersor de feromônios.

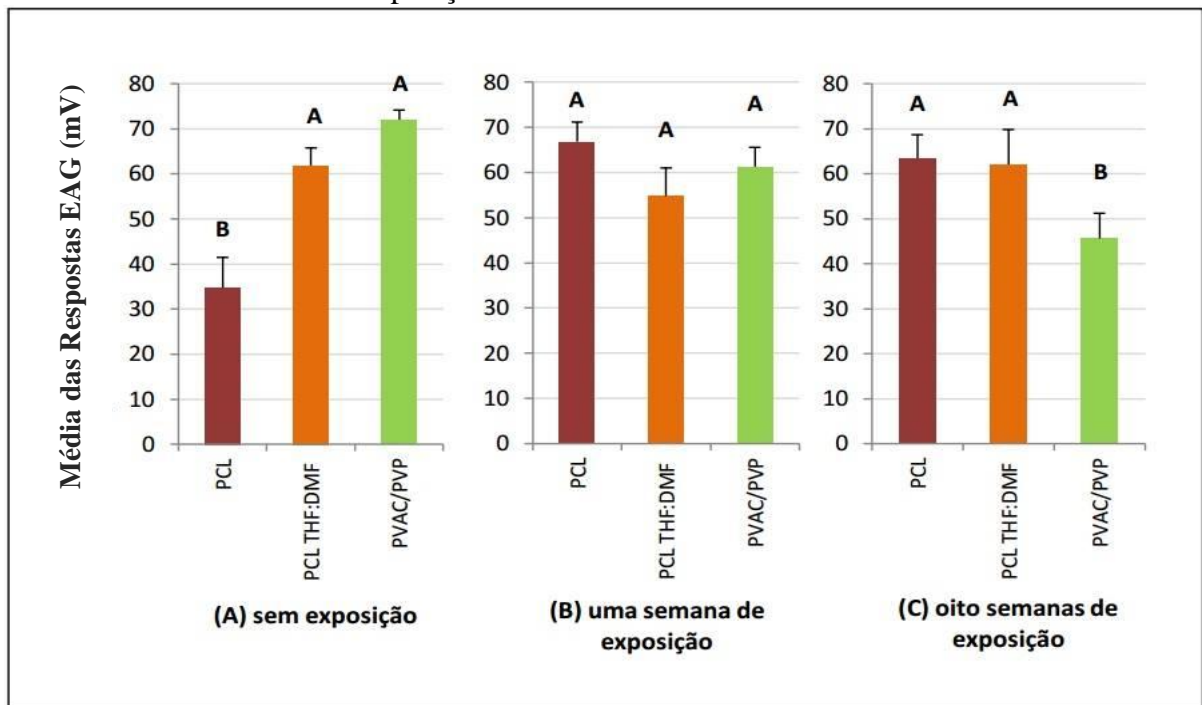
Já a fibra confeccionada com PVAC teve maior variação de distribuição dos compostos no período avaliado. Porém, este comportamento também foi observado por Moraes (2012), sendo, portanto, peculiar do material. Tal fato pode estar associado a uma maior facilidade de degradação do polímero.

O polímero PCL/PEG mostrou uma boa distribuição ao longo do tempo de maneira contínua, apesar de ter se diferenciado das outras fibras inicialmente. Ao fim do período, este material demonstrou média superior às demais nanofibras, apesar de não diferir estatisticamente de PCL THF:DMF.

A comparação entre as semanas variou de acordo com o material. A fibra confeccionada com PCL THF:DMF obteve padrão de resposta semelhante ao polímero PCL/PEG citado anteriormente, com valor semelhante ao fim do experimento, se comparado com a primeira semana de exposição. Já a fibra confeccionada com PVAC/PVP, demonstrou elevada atividade no início de exposição, no entanto oscilou nas semanas seguintes, apresentando baixa atividade na antena do inseto (Figura 7).

Durante a semana 0 (zero), ou seja, sem exposição ao ambiente, houve diferença significativa entre os polímeros, sendo as fibras PCL THF:DMF e PVAc com as maiores respostas, diferindo estatisticamente da fibra PCL/PEG. Na semana seguinte não houve diferença estatística entre as nanofibras. Na última semana de exposição, somente o polímero PVAc diferiu estatisticamente, obtendo valores inferiores em relação as outras fibras.

Figura 7 – Comparação das respostas eletroantenográficas (EAG) de machos de *Grapholita molesta* entre os polímeros policaprolactona utilizando polietilenoglicol como solvente (PCL/PEG), policaprolactona utilizando tetraidrofurano e dimetilformamida como solvente (PCL THF: DMF) e polivinil acetato em composição com polivinilpirrolidona (PVAC/PVP) em diferentes momentos de exposição.



Letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre as fibras, de acordo com o tempo de exposição. A) Polímeros sem exposição; B) Uma semana de exposição; C) Fim do período de exposição.

5. DISCUSSÃO

O protocolo empregado na criação de *Grapholita molesta* se mostrou eficiente, pois a população de insetos se manteve satisfatória para o cumprimento dos bioensaios. A dieta baseada em Arioli et al. (2007) forneceu substrato suficiente para que os indivíduos completassem suas funções biológicas e se reproduzissem habilmente em cativeiro. A rotina de assepsia preveniu a infestação de agentes que poderiam comprometer o desenvolvimento das criações, evento bastante comum nesta atividade.

A utilização de nanotecnologia como dispersores de semioquímicos para fins agrícolas faz parte de estudos recentes e possui caráter inovador. A associação das nanofibras com a aplicabilidade na agricultura surgiu em decorrência de duas características interessantes para o controle de pragas: boa incorporação da molécula de feromônio, a qual permanece no veículo sofrendo menor degradação ambiental, e na taxa de liberação, lenta e gradual, evitando doses massivas de produto. Esta tecnologia desenvolvida na Alemanha por Hellmann et al. (2009), ainda é incipiente no Brasil. As pesquisas estão no início e as informações disponíveis na literatura ainda são escassas, o que representa grande dificuldade para o desenvolvimento da técnica.

As nanofibras utilizadas nos testes eram provenientes de uma solução de 100 mL contendo feromônio, inseticida, polímeros e solvente, porém seu formato não foi padronizado. Visivelmente, o volume variou entre as fibras e conseqüentemente sua área de contato também, podendo haver distinção na quantidade de substância liberada no ambiente. Recomenda-se, portanto, a padronização dos polímeros, como já observado por Morais (2012), a qual trabalhou com fibras que possuíam dimensões de 2 x 2 cm.

O número de insetos testados também foi baixo, se comparado com o usualmente utilizado em experimentos semelhantes (Altafini et al., 2010). Segundo Lunet et al. (2006), aumentando o número de indivíduos testados, reduz-se o erro e eleva-se a precisão, sobretudo em tratamentos inconstantes, como no caso das médias das respostas eletrofisiológicas da fibra PVAC/PVP.

Os resultados demonstraram que as fibras avaliadas produziram respostas eletrofisiológicas nos insetos até o fim do período testado, ou seja, oito semanas. As fibras contendo policaprolactona se mostraram, ao fim, mais constantes que a baseada em polivinil acetato e polivinilpirrolidona, demonstrando maior potencial para a utilização como dispersor, conforme o trabalho de Morais (2012). As comparações entre os materiais com base em PCL sugerem que não há diferença entre os solventes usados, uma vez que não houve diferença

entre os polímeros a partir da primeira semana de exposição. Além disso, um maior tempo de avaliação poderia ser adotado a fim de comparar também as nanofibras com o dispersor Splat®, o qual produz efeito por até 12 semanas (90 dias), segundo o fabricante (ISCA, 2014a).

É importante ressaltar que este é um projeto de caráter inovador e está inserido em um estudo de maior proporção, uma vez que existem poucas informações disponíveis. As hipóteses adotadas são básicas, portanto testadas em ambiente controlado, etapa preliminar para a instalação a campo, o real objetivo na utilização dessa nova tecnologia em potencial.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A principal justificativa para a adoção da nanotecnologia está no menor impacto ambiental envolvido em sua utilização. Por serem biodegradáveis, não deixam resíduos no ambiente e dispensam as armadilhas plásticas usualmente aplicadas no monitoramento de pragas. A adoção desta ferramenta também condiz com o novo panorama sustentável exigido na agricultura. As pesquisas têm mostrado que os consumidores preferem alimentos orgânicos ou com selos de certificação de menor impacto ambiental, sugerindo que uma menor quantidade de resíduos está presente pelo não uso de inseticidas.

Do ponto de vista do agricultor, a utilização das nanofibras ainda deve ser avaliada levando em conta questões como facilidade de manuseio, custos de instalação e manutenção e retorno visual, as quais são de extrema importância para a disseminação de novas tecnologias, evitando que estas se tornem medidas passageiras, mas sim consolidadas como práticas úteis na agricultura.

O estágio curricular permitiu conhecer a sistemática envolvida em uma pesquisa científica diferente das aprendidas na faculdade, pela inserção em uma empresa a qual exige mais do executor. A realização do estágio aprimorou os conhecimentos em metodologias e procedimentos laboratoriais, sendo a experiência e os novos conhecimentos adquiridos importantes para a formação profissional e ingresso no mercado de trabalho. O estágio também permitiu crescimento pessoal pelo convívio com pessoas de diferentes níveis hierárquicos na empresa.

Por fim, todo o trabalho desenvolvido no estágio serviu como impulso para acreditar no desenvolvimento de tecnologias alternativas às práticas comuns utilizadas na agricultura. Ao longo da faculdade, toda a evolução agrônômica se contrapõe ao dano quase irreversível

causado aos ecossistemas pela erosão, contaminação ambiental e riscos alimentares. A utilização de nanofibras poliméricas biodegradáveis mostra-se como uma ferramenta promissora que alia as premissas de sustentabilidade e eficiência, cada vez mais presentes e exigidas para a produção de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTAFINI, D.L. **Percepção Química de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera; Tortricidae) ao feromônio sexual de plantas hospedeiras.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 77 p., 2008.
- ALTAFINI, D. L.; SANT'ANA, J.; REDAELLI, L. R.. Efeito de Fatores Endógenos na Percepção Química de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) ao Feromônio Sexual. **Neotropical Entomology**, v. 39, p. 330-337, 2010.
- ARIOLI, C. J.; MOLINARI, F.; BOTTON, M.; GARCIA, M. S. **Técnica de criação de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) em laboratório utilizando dieta artificial para a produção de insetos visando estudos de comportamento e controle.** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Bento Gonçalves, Embrapa Uva e Vinho, 14p, 2007.
- ATKINS, M. D. **Introduction to insect behavior.** New York: Macmillan Publishing, 237 p., 1980.
- BOECKH, J. **Neurophysiological aspects of insect olfaction.** In: LEWS, T. (ed.) Insect communication. London: Academic Press, p.83-194, 1984.
- BOTTON, M., ARIOLI, C.; COLLETTA, V.D. **Monitoramento da mariposa oriental *Grapholita molesta* (Busck, 1996) na cultura do pessegueiro.** Embrapa – CNPUV. Comunicado Técnico, 38. Bento Gonçalves – RS, 4 p., 2001.
- BOTTON, M.; NAVA, E. N.; ARIOLI, C. J.; GRUTZMACHER, A. D.; GARCIA, M. S. **Bioecologia, monitoramento e controle da mariposa-oriental na cultura do pessegueiro no Rio Grande do Sul.** Embrapa – CNPUV. Circular Técnica, 86. Bento Gonçalves – RS, 11 p., 2011.
- BOUDRIOT, U.; GOETZ, B.; DERSCH, R.; GREINER, A.; WENDORFF, J. H. Role of electrospin nanofibers in stem cell technologies and tissue engineering. **Macromolecular Symposia**, v. 225, p. 09-16, 2005.
- CARVALHO, R. P. L. **Manejo integrado de pragas de pessegueiro.** In: CROCOMO, W. B. Manejo integrado de pragas. São Paulo: UNESP, p. 325-358. 1990.
- CIENTEC. Institucional. Fundação de ciência e tecnologia. **A Cientec.** Disponível em: <<http://www.cientec.rs.gov.br/?model=conteudo&menu=188>>. Acesso em: 17 jul. de 2014.
- CORRÊA, A. G.; SANT'ANA, J. **Fundamentos da comunicação química de insetos.** In: FERREIRA, J. T. B. et al. Produtos naturais no controle de insetos. São Carlos: Holos, p. 9-22. 2001.
- EVERSHED, R. P. **Insect Olfaction and Molecular Structure.** In: Mandava, N.B. (ed.) CRC Handbook of Natural Pesticides, vol. IV: Pheromones, Part A, Springer-Verlag, Basel, p.1-33. 1986.

- FAUCHEUX, M. J. Morphology and distribution of sensilla on the cephalic appendages, tarsi and ovipositor of the European sunflower moth, *Homoeosoma nebulella* Den. & Fschiff. (Lepidoptera: Pyralidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, Oxford, v. 20, n.6, p.291-307. 1991.
- GONZALEZ, R. H. Fenologia de la grapholita o polilia oriental del durazno. **Aconex**, Melbourne, v. 12, 5-12 p., 1989.
- GRELLMANN, E. O.; LOECK, A. E. Necessidades termicas e estimativa do numero de gerações de *Grapholita molesta* (Busck 1916) (Lepidoptera: Olethreutidae) em Pelotas, **RS. Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 7, 999-1004 p., 1992.
- HELLMANN, C.; GREINER, A.; WENDORFF, J. H. **Design of pheromone releasing nanofibers for plant protection**. Polymers for Advances Technologies. 2009. Disponível em: < www.interscience.wiley.com/journal/pat. > Acesso em 30 de jul. de 2014.
- HOHMANN, M.; SHIN, M; RUTHLEDGE, G.; BRENNER, M. Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability Theorie. **Physics of Fluids**, v. 13, p. 2201-20, 2001.
- ISCA. **Ferramentas e soluções para manejo de pragas**. Products. SPLAT GRAFO. 2014a Disponível em: <<http://www.isca.com.br/pt/produtos/p/ea7862d4-0d35-4a3a-8dba-1d72fa66fc09/splat-grafo>>. Acesso em 20 de julho de 2014.
- ISCA. **Ferramentas e soluções para manejo de pragas**. Manual do Usuário Splat Cida Grapho Bona®. 2014b. Disponível em <<http://www.isca.com.br/pt/produtos/p/d7105f3d-d3cf-4a52-96c2-d46690ebc11c/splat-cida-grafo-bona>>. Acesso em 4 de set. de 2014.
- JANNESARI, M.; VARSHOSAZ; MORSHED, M.; ZAMANI, M. Composite poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl acetate) electrospun nanofibrous mats as a novel wound dressing matrix for controlled release of drugs. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 993 - 1003, 2011.
- KOVALESKI, A.; RIBEIRO, L.G. **Manejo de pragas na produção integrada de maçãs**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 8p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 34). 2002.
- LIPP, J.P.; SECHI, V. A. Ensacamento de frutos: uma antiga prática ecológica para controle de moscas-das-frutas. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, Porto Alegre - RS, v. 3, n.4, 53-58 p., 2002.
- LUNET, N.; SEVERO, M.; BARROS, H. Desvio padrão ou erro padrão. *Arq Med* [online]. vol.20, n.1-2, . ISSN 0871-3413. p. 55-59. 2006.
- MELLO, L. M. R. **Produção de mercado brasileiro de maçã**. Bento Gonçalves: Embrapa-CNPUV , 2004. 4 p. (Embrapa-CNPUV. Comunicado Técnico, 50).
- MOLINARI F.; CRAVEDI, P.; RAMA, F.; REGGIORI, F.; DAL PANE, M.; GALASSI T. L'uso dei feromoni secondo il metodo del "disorientamento" nella difesa del pesco da *Cydia molesta* e *Anarsia lineatella*. **Atti dele Giornate Fitopatologiche**. v. 1, p. 341-348. 2000
- MONTEIRO, L. B.; HICKEL, E. **Introdução à fruteiras de caroço**. In: MONTEIRO, L. B. **Fruteiras de caroço: Uma visão ecológica**. Curitiba: UFPR, 309 p. 2004.

MORAIS, R. M.; REDAELLI, L. R.; SANT'ANA, J. Anatomia comparada dos órgãos internos de reprodução de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae). **Biotemas** (UFSC), v. 22, p. 59-67. 2007.

MORAIS, R. M. **Uso da nanotecnologia em dispersores com feromônio**. Relatório Técnico-Científico E De Atividades PRODOC-CAPES. Programa de Pós-Graduação Fitotecnia. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2012.

PERESIN, M.; HABIBI, Y.; ZOPPE, J.; PAWLAK.; ROJAS, O. Nanofiber Composites of Polyvinyl Alcohol and Cellulose Nanocrystals: Manufacture and Characterization. **Biomacromolecules**, v.11, p. 674–681, 2010.

POLTRONIERI, A. S.; MONTEIRO, L. B.; MAY de MIO, L. L. Flutuação populacional e danos de *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) em dois sistemas de produção de pessegueiros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, p. 628-633. 2008.

ROSA, D. S.; PENTEADO, D. F.; CALIL, M. R. Propriedades Térmicas e Biodegradabilidade de PCL e PHB em um Pool de Fungos. **Revista de ciência & tecnologia**, v. 15, p. 75-80, 2000.

SALLES, L. A. B. **Principais pragas e seu controle**. In: MEDEIROS, C. A. B.; RASEIRA, M. do C. B. A cultura do pessegueiro. Brasília: Embrapa- CPACT, 351 p. 1998.

STELINSKI, L. L.; VOGEL, K. J.; MILLER, J. R.; and GUT, L. J. Seconds-long preexposures to pheromone from rubber septum or polyethylene-tube dispensers alters subsequent behavioral responses of male *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) in a sustained-flight tunnel. **Environmental Entomology**. 34: p. 696–704. 2005.

STERN, V.M.; SMITH, R.F.; VAN DEN BOSH, R.; HAGEN, K.S. The integrated control concept. **Hilgardia**, Berkeley, v.29, n.2, p. 81-101, 1959.

TECNANO - **Nanotecnologia para Agricultura**, 2014. Disponível em: <<http://www.tecnano.com.br/tecnano/>>. Acesso em: 16 de jul. de 2014.

THOMSON, D.; BRUNNER, J.; GUT, L.; JUDD, G. & KNIGHT, A. **Ten years implementing codling moth mating disruption in the orchards of Washington and British Columbia: Starting right and managing for success**. IOBC/WPRS Bull, 24, 23-30p., 2001.

TRIMBLE, R. M.; MARSHALL, D. B. Quantitative method for pheromone delivery in studies of sensory of moth antennae. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 32p, p.388-393, 2007.

VILELA, E. F. Adoção de feromônios no manejo integrado de pragas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, 1992.