



Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical
Mestrado e Doutorado
UNIFAP / EMBRAPA-AP / IEPA / CI-Brasil



IGOR ANDREY PINHEIRO SIDÔNIO

AVALIAÇÃO DO EFEITO LETAL DA NANOEMULSÃO DE *Rosmarinus officinalis* L. SOBRE *Bactrocera carambolae* Drew e Hancock (DIPTERA: TEPHRITIDAE)

MACAPÁ, AP

2017

IGOR ANDREY PINHEIRO SIDÔNIO

AVALIAÇÃO DO EFEITO LETAL DA NANOEMULSÃO DE *Rosmarinus officinalis* L. SOBRE *Bactrocera carambolae* Drew e Hancock (DIPTERA: TEPHRITIDAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO) da Universidade Federal do Amapá, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical.

Orientador: Dr. Caio Pinho Fernandes

Co-orientador: Dr. Ricardo Adaime da Silva

MACAPÁ, AP

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

620.4

S569a Sidônio, Igor Andrey Pinheiro.

A avaliação do efeito letal da nanoemulsão de *Rosmarinus officinalis* L. sobre *Bactrocera carambolae* Drew e Hancock (Diptera: Tephritidae) / Igor Andrey Pinheiro Sidônio; orientador, Caio Pinho Fernandes; coorientador, Ricardo Adaime da Silva. – Macapá, 2017.

50 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical.

IGOR ANDREY PINHEIRO SIDÔNIO

AVALIAÇÃO DO EFEITO LETAL DA NANOEMULSÃO DE *Rosmarinus officinalis* L. SOBRE *Bactrocera carambolae* Drew e Hancock (DIPTERA: TEPHRITIDAE)



Dr. Caio Pinho Fernandes

Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)

Dr. Ricardo Adaime

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)



Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto

Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)

Dra. Anna Eliza Maciel de Faria Mota Oliveira

Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)

Aprovada em 24 de fevereiro de 2017, Macapá, AP, Brasil

*Dedico esta dissertação a minha
esposa e aos meus pais, por
serem exemplos de persistência.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir que eu seguisse obstinado, mesmo nos momentos mais difíceis.

A minha amada esposa Taires, por compartilhar os sonhos comigo e vê-los tornarem realidade.

Aos meus pais (Alberto e Elizilda) por nunca medirem esforços para que eu buscasse conhecimento.

A minha irmã Anna Clara pelos momentos de alegria.

Aos amigos (Keison e Telma) pelos momentos de mais risos e menos lamentações que compartilhamos.

Aos novos amigos que conheci no Nanofito (Franklin, Ícaro, Fernanda, Jonatas, Jessinha, Jéssica, Antônio), obrigado por terem compartilhado o conhecimento de vocês comigo. Em destaque ao Jonatas, o rei da nanoemulsão.

Aos Amigos que conheci na Embrapa (Valéria, Paulo, Maria, Leonardo, Kennedy, Bruna, Jairo, Joel, Lia, Edirlon) por terem feito parte desta dissertação.

Ao Dr. Caio, por ter me recebido no Nanofito e compartilhado o seu vasto conhecimento comigo, permitindo a realização desse sonho.

Ao Dr. Ricardo Adaime por aceitar me co-orientar e contribuir para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Dr. Rodrigo por ter me explicado todas as vezes que tinha dúvidas de algum assunto. E pelos momentos de risos no laboratório.

À Dra. Cristiane pelas sugestões dadas.

.

“O que sabemos é uma gota; o que desconhecemos é um oceano.”

Isaac Newton

RESUMO

Sidônio, Igor. Avaliação do efeito letal da nanoemulsão de *Rosmarinus officinalis* L. sobre *Bactrocera carambolae* Drew e Hancock (Diptera: Tephritidae). Macapá, 2017. Dissertação (Mestre em Biodiversidade Tropical) – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Federal do Amapá.

Bactrocera carambolae Drew e Hancock é uma praga quarentenária restrita aos estados do Amapá e Roraima, sua disseminação provocaria danos irreparáveis na fruticultura brasileira. Os óleos essenciais são misturas complexas de metabólitos secundários voláteis. Diversos óleos essenciais se mostraram potentes agentes inseticidas, incluindo para controle de pragas agrícolas. *Rosmarinus officinalis* L., popularmente conhecida como alecrim, é uma espécie rica em óleo essencial reconhecida e com potencial atividade inseticida. Neste contexto, nanoemulsões do tipo óleo em água são consideradas formulações promissoras para a geração de produtos aquosos viáveis. O presente estudo objetivou avaliar a atividade inseticida da nanoemulsão preparada com o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* contra adultos de *Bactrocera carambolae*. Os testes inseticidas foram realizados por via tópica e contato. A nanoemulsão foi preparada pelo método de baixo aporte de energia para 50000 e 100000 ppm (expresso como teor do óleo essencial) e apresentou aparência transparente homogênea. O tamanho médio das micelas foi em torno de 10nm. A maior porcentagem de mortalidade (37.78%) observada após 120h no tratamento do ensaio tópico foi induzida pela nanoemulsão com maior concentração do óleo essencial (200 µg/inseto). Diferença significativa entre a nanoemulsão com maior concentração do óleo essencial foi observada, quando comparada ao grupo controle e a nanomulsão com menor concentração do óleo (F = 9.8773, P = 0.0003, df = 2.42). Não houve diferença significativa na mortalidade de machos e fêmeas dentro dos tratamentos e controle. O bioensaio por contato induziu a maior mortalidade (57.78%) após 120h, apresentando diferença estatística significativa (F = 39.3611, P < 0.0001, df = 1.28) quando comparado ao grupo controle, o qual induziu 12,22% de mortalidade. Diferença estatística significativa foi observada na porcentagem de mortalidade nos machos (77,78%), quando comparado com fêmeas (37.78%) (F = 12.4090, P = 0.004, df = 1.28). Assim, nossos resultados mostram pela primeira vez a atividade inseticida de um sistema nanoestruturado contendo óleo essencial de *R. officinalis*, mostrando o potencial deste novo produto no manejo integrado de pragas para o controle de *B. carambolae*.

Palavras-chave: Mosca-das-frutas; Controle de pragas; inseticidas botânicos; Lamiaceae; Alecrim, Nanoformulação.

ABSTRACT

Sidônio, Igor. Evaluation of lethal effect of the nanoemulsion prepared with *Rosmarinus officinalis* L. essential oil against *Bactrocera carambolae* Drew and Hancock (Diptera: Tephritidae) Macapá, 2017. Dissertação (Mestre em Biodiversidade Tropical) – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Federal do Amapá.

Essential oils are complex volatile mixtures of secondary metabolites and several of them are considered potential insecticidal agents, including for agricultural pest control. On this context, nanoemulsions are considered promising delivery systems for novel aqueous pesticide products. *Bactrocera carambolae* Drew and Hancock is a quarentenary pest restrict that is found in the of Amapá and Roraima States (Brazil) and its dissemination through this country would lead to irreparable damage to brazilian fruticulture. *Rosmarinus officinalis* L., popularly known as rosemary, is an essential oil-rich plant and recognized as a promising insecticidal agent. The present study aims to evaluate insecticidal activity of the nanoemulsion prepared with *R. officinalis* essential oil against adults of *Bactrocera carambolae*. It was performed topical and contact bioassays. The nanoemulsions were prepared by low energy method at 50000 and 100000 ppm (expressed as essential oil content) and presented a fine transparent homogeneous appearance. Droplet size measured by dynamic light scattering was around 10 nm. Higher percentage of mortality (37.78 %) observed after 120 h of treatment on topical assay was induced by nanoemulsion with higher essential oil content (200 µg per insect). Significant difference between the nanoemulsion with higher content of essential oil was observed, when compared to control group and nanoemulsion with lower content of essential oil ($F = 9.8773$, $P = 0.0003$, $df = 2.42$). No statistical significant difference on mortality was observed by comparison of male with female. Contact bioassay of this nanoemulsion induced higher mortality (57.78 %) after 120 h, presenting statistical significant difference ($F = 39.3611$, $P < 0.0001$, $df = 1.28$) when compared to control group, which induced 12.22% of mortality. Statistical significant difference was observed on percentage of mortality on male (77.78%), when compared to female (37.78%) ($F = 12.4090$, $P = 0.004$, $df = 1.28$). Thus, ours results shows the first time the insecticidal activity a nanostructured system containing essential oil from *R. officinalis*, showing the potential of this novel nanoprodut on integrated practices of *B. carambolae* control.

Keywords

Fruit Fly; Pest Control; Botanical Insecticides; Toxicity; Lamiaceae; Rosemary, Nanoformulation.

ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>Bactrocera carambolae</i> . A, ovos. B, Imaturo de <i>B. carambolae</i> no terceiro instar larval. C, Pupas. D, indivíduos adultos.	14
Figura 2 – Prancha botânica da espécie <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	18
Figura 3 – Óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	19

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1 Diptera: Tephritidae (Moscas- das-Frutas)	12
1.1.1 <i>Bactrocera carambolae</i> (Diptera: Tephritidae)	13
1.2 Utilização de inseticidas botânicos para o controle de insetos	15
1.2.1 Óleos Essenciais	16
1.2.1.1 Óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Lamiaceae)	17
1.3. Nanoemulsões	19
2.HIPÓTESES	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 GERAL	22
3.2 ESPECÍFICOS	22
4. REFERÊNCIAS	23
5.CAPÍTULO 1 – EVALUATION OF LETHAL EFFECT OF THE NANOEMULSION PREPARED WITH <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ESSENTIAL OIL AGAINST <i>Bactrocera carambolae</i> Drew and Hancock (DIPTERA: TEPHRITIDAE)	28
Abstract	29
Introduction	31
Materials and Methods	33
<i>Rosmarinus officinalis</i> essential oil	33
Preparation of <i>R. officinalis</i> nanoemulsions	33
Characterization of <i>R. officinalis</i> nanoemulsions	33
Bioassays	33
<i>Bactrocera carambolae</i> colonies	33
Topical assay	34
Contact assay	34
Statistical analysis	34
Results	34
Background chemical composition of <i>R. officinalis</i> essential oil	34
<i>R. officinalis</i> nanoemulsion	36
Topical assay	36
Contact assay	38
Discussion	39
References	42
6. CONCLUSÕES	49

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Diptera: Tephritidae (Moscas- das-Frutas)

As moscas-das-frutas pertencem à ordem Diptera e estão contidas na Família Tephritidae. São moscas pequenas que se caracterizam por manchas ou faixas nas asas. As suas larvas são fitófagas, constituindo pragas para a fruticultura (Triplehorn and Jonnson. 2011). As fêmeas adultas depositam os ovos em seus hospedeiros levando em consideração diversas características dos frutos, tais como, tamanho, cor, penetrabilidade, estágio de maturidade e presença de feromônios marcadores. Portanto, a escolha dos frutos ocorre através de percepções olfativas e visuais. Quando encontram o seu alvo, caminham na superfície do pericarpo, esfregando sua cabeça nele para possivelmente reconhecerem substâncias químicas presentes e posteriormente inserem seu ovipositor para deposição dos ovos. Finalizam o processo arrastando o aparelho ovipositor, onde irão liberar o feromônio marcador para sinalizar a outras moscas que os seus ovos já estão presentes naquele hospedeiro (Aluja and Mangan 2008).

Diversas ações e estratégias são desenvolvidas visando o controle desses insetos. Dentre elas, destaca-se o Manejo Integrado de Pragas (MIP), que planeja o combate dessas moscas de forma sustentável, com menos danos ao meio ambiente (Vargas et al. 2015). Entretanto, pesticidas que foram sintetizados entre os anos de 1950 e 1989, potencialmente causadores de inúmeros danos ao meio ambiente ainda são frequentemente utilizados para o controle desses dípteros. Esse fato deve-se, principalmente, por sua eficiência no combate a pragas, baixo custo comparativo e pela facilidade de adoção. No entanto, o seu uso inadequado provoca diversos danos ao meio ambiente, pressionando a substituição deles por inseticidas considerados mais “limpos”, como alternativa a serem utilizados no manejo integrado de pragas (Dayan et al. 2009).

No Brasil, as espécies associadas a danos econômicos estão presentes nos gêneros *Anastrepha*, *Ceratitis* e *Bactrocera*. *Anastrepha* possuem 115 espécies (Zucchi 2008) e dentre essas, seis são consideradas pragas (Uramoto and Zucchi 2009). No país, os dois últimos gêneros são representados por apenas uma espécie cada, respectivamente *Ceratitis capitata* (Wiedemann) e *Bactrocera carambolae* (Drew e Hancock) (Zucchi 2001, Silva 2011). Os tefritídeos possuem grande diversidade de plantas hospedeiras. No estado do

Amapá são catalogados aproximadamente 33 espécies de vegetais hospedeiros (Silva 2011). Além disso, estudos atuais revelam primeiros registros de espécies vegetais como novos hospedeiros (Jesus et al. 2010, Adaime et al. 2012, Dutra et al. 2013, Savaris et al. 2013).

1.1.1 *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae)

O gênero *Bactrocera* possui 651 espécies, das quais mais de 50 são consideradas pragas importantes, entre elas a espécie *B. carambolae* que é conhecida popularmente como mosca-da-carambola. Ela é uma espécie polífaga e que se estabeleceu como invasora de regiões climaticamente semelhante ao seu local de origem, a exemplo da América do Sul (Vargas et al. 2015, Marchioro 2016). Os ovos de *B. carambolae* são alongados, brancos e com coloração leitosa próximo da eclosão. Os imaturos têm menos de 10 mm de comprimento com coloração branco-amarelada, apresentando a parte anterior do corpo afilada e no terceiro instar as larvas são saltadoras, podendo saltar distâncias maiores que 10 cm. As pupas são cilíndricas de coloração marrom escuro (Malavasi 2009). Os adultos possuem comprimento de cinco a dez milímetro com as asas sem faixas transversais (Jordão and Silva 2006). Esta espécie apresenta uma faixa apical mais larga nas asas e o órgão sexual masculino e o aparelho ovipositor feminino mais curto, quando comparada com outras espécies do gênero *Bactrocera*. Possui o abdômen amarelado, com uma faixa preta longitudinal medial no terço abdominal III-V (Schutze et al. 2015), sendo essas faixas negras sob a forma da letra T (Figura 1).

Em relação ao ciclo de vida da mosca-da-carambola, as fêmeas introduzem seu aparelho ovipositor no fruto e depositam os ovos. Posteriormente, as larvas eclodem e fazem galerias na polpa do fruto. Quando elas atingem o terceiro instar, se enterram no solo para a pupação (Vilela et al. 2001). Fatores abióticos como umidade relativa, luminosidade e temperatura afetam a abundância, sobrevivência, tempo de desenvolvimento e comportamento sexual dessas moscas (Bateman 1972). Estudos apontam que a sobrevivência de *B. carambolae* é maior em temperaturas mais elevadas (média de 27 °C) e o tempo para completar um estágio de desenvolvimento diminui com aumento da temperatura, conseqüentemente, reduzindo o período necessário para completar o seu ciclo

de vida (Danjuma et al. 2014). Após emergirem, os adultos necessitam de nutrientes como carboidratos, água e proteínas para alcançar a maturidade sexual (Bateman 1972). A mosca-da-carambola é bem adaptada a regiões tropicais, onde as temperaturas são elevadas e se estabelecendo como uma espécie invasora de vários países incluindo o Brasil.



Figura 1 – *Bactrocera carambolae*. A, ovos. B, Imaturo de *B. carambolae* no terceiro instar larval. C, Pupas. D, indivíduos adultos.

Fonte: Joel Pasinato

A mosca-da-carambola é uma espécie nativa da Indonésia, Malásia e sul da Tailândia e foi introduzida no continente americano. Esta mosca foi registrada pela primeira vez na América do Sul no ano de 1986, em Paramaribo, Suriname. Em 1989 foi detectada na Guiana Francesa e em 1996, foi detectada oficialmente no Brasil, especificamente no Município do Oiapoque, estado do Amapá (Godoy et al. 2011a).

No ano de 1996 foi criado um subprograma para a erradicação da mosca-da-carambola, afim de evitar sua disseminação para outras regiões (Silva et al. 2011). Apesar do nome mosca-da-carambola, ela possui outros frutos como hospedeiros. No Amapá, 14 espécies de plantas são consideradas suas hospedeiras: *Mangifera indica* (L.), *Malpighia emarginata* (DC.), *Eugenia stipitata* (MC. Vaugh.), *Psidium guajava* (L.), *Syzygium malaccense* (L.), *Averrhoa carambola* (L.), *Manilkara zapota* (L.), *Pouteria macrophylla* (Lam.), *Capsicum chinense* (Jacq.), *Byrsonima crassifolia* (L.), *Spondias mombim* (L.), *Rollinia mucosa* (Jacq.), *Pouteria caimito* (Ruiz e Pav.) e *Artocarpus integrifolia* (L.) (Silva 2011, Lemos et al. 2014, Jesus-Barros et al. 2015).

Portanto, essa praga poderia provocar riscos a produção de frutos produzidos em larga escala, como caju, mamão, tangerina, goiaba, limão, laranja, manga e abacate que são economicamente importante para o país (Marchioro 2016). *B. carambolae* é classificada

como uma praga quarentenária presente no Brasil, o que significa que são insetos pragas de potencial expressão econômica para um determinado local, onde ainda não ocorrem (Lemos et al. 2014). Entretanto, essa praga encontra-se presente nos estados do Amapá e Roraima (Brasil 2013). Por isso, é evidente a importância do controle dessa espécie, para evitar danos maiores à fruticultura brasileira.

1.2 Utilização de inseticidas botânicos para o controle de insetos

A base da utilização de inseticidas naturais está na relação das plantas com os insetos. Ela envolve a utilização dos componentes do metabolismo secundário como defesa aos ataques. Conseqüentemente, essa defesa pode interferir no comportamento, crescimento ou desenvolvimento do inseto (Simmonds 1998). A interação das plantas com o ambiente circundante faz com que elas produzam substâncias que podem causar diversos efeitos nos insetos, como inibições na produção da cutícula, no crescimento, na alimentação, rompimento de mudas e aumento ou diminuição do tempo de desenvolvimento. Diversos mecanismos de ação podem estar envolvidos, como inibição do sistema octopamenérgico, mitocondrial, GABA e o colinérgico, inibindo a enzimas acetilcolinesterase, provocando atáxia que consiste na descoordenação neuromuscular e ocasionando a morte dos insetos (Rattan 2010). Portanto, com base na defesa química das plantas, a busca por bioinseticidas eficazes e com menos impactos negativos para o meio ambiente mostram-se extremamente promissores (Alarcón and Cespedes 2015).

Com a conscientização da humanidade em relação à qualidade de vida e a proteção ambiental, ficou inevitável a substituição de pesticidas sintéticos por inseticidas considerados biodegradáveis. Eles são considerados menos agressivos ao meio ambiente, porém mantendo uma alta eficiência no controle de pragas. Foi observado que o uso de inseticidas sintéticos, como organofosforados, tem resultado em pragas resistentes, atingem outros organismos que não são alvo, deixam resíduos nos alimentos consumidos pelos seres humanos, além de outros danos ambientais (Desneux et al. 2007).

As consideráveis publicações em relação a grupos de metabólitos vegetais bioativos têm fornecido informações valiosas para a produção de inseticidas naturais (Isman 2014, Miresmailli and Isman 2014). O primeiro inseticida botânico comercializado foi a base de

Azadirachta indica A. Juss (Meliaceae), comumente chamada de Nim, sendo sua utilização aprovada nos Estados Unidos, União Europeia e Canadá. Outros inseticidas botânicos são encontrados no mercado, como o Requem[®] (com extratos de *Dysphania ambrosioides*) Captiva[®] (extrato *Capsicum* sp), rev-Am[®] (óleo de *Citrus* sp). Neste contexto, especialistas preveem o crescimento de 4 a 5% desses inseticidas no mercado mundial de agroquímicos, podendo chegar a 20% até 2025 (Isman 2015).

1.2.1 Óleos Essenciais

Espécies aromáticas e seus óleos essenciais estão entre os mais efetivos inseticidas de origem natural, sendo potencialmente úteis para o controle de diversas pragas. Dentre essas espécies, podemos citar como *Rosmarinus officinalis* (Alecrim), *Mentha spp* (hortelã) e *Lavandula spp* (lavanda) (Regnault-Roger 1997). Oficialmente, óleos essenciais são definidos como Produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d' água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. Segundo Simões and Spitzer (2010), os óleos essenciais apresentam-se sob a forma de um líquido de consistência oleosa sob temperatura ambiente, que evaporam rapidamente quando aquecidos Seus constituintes voláteis são responsáveis pelo forte odor exalado por plantas aromáticas. Segundo Bakkali et al. (2008), eles são líquidos, voláteis, geralmente transparentes, apolares e solúveis em lipídios e solventes orgânicos. Variações ambientais, na composição do solo, órgão vegetal, fase do seu desenvolvimento, entre outras, podem afetar a composição e a qualidade dos óleos de uma mesma espécie (Simões e Spitzer 2010). Isso demonstra a importância de se avaliar o óleo de uma espécie, mesmo que ele já tenha sido anteriormente estudado.

Estes óleos voláteis são constituídos em sua grande maioria por terpenos, principalmente monoterpenos (duas unidades isoprênicas) e sesquiterpenos (três unidades isoprênicas). Além do potencial inseticida, são amplamente utilizados como fragrância para perfumes e na indústria farmacêutica (Waksmundzka-Hajnos 2008). Estudos em relação aos efeitos de repelência ou atividade inseticida do óleo essencial de diversas espécies vegetais tem avançado de maneira considerável, buscando controlar insetos que afetam a agricultura e a saúde pública. Muitos desses óleos apresentam alta toxicidade e repelência nos insetos (Rattan 2010). Além disso, podem causar mudanças comportamentais em

insetos sociais, que causam danos econômicos no ambiente agrícola e urbano (Bacci et al. 2015).

O óleo de *Mentha piperita*, na Índia, é potencialmente bioativo contra imaturos de *Aedes aegypti* (Kumar et al. 2011). Óleos essenciais de plantas também possuem atividade ovicida em culicídeos (Diptera), de importância médica e veterinária, que são principais vetores de patógenos causadores de doenças (Benelli 2015). O óleo essencial de *Myrciaria floribunda* foi testado por Tietbohl et al. (2014) e mostrou-se efetivo ao induzir a mortalidade em duas espécies de hemípteros (*Oncopeltus fasciatus* e *Dysdercus peruvianus*), que são pragas agrícolas no Brasil. A toxicidade de quatro óleos essenciais da família Lamiaceae, provenientes das espécies *Lavandula angustifolia*, *Hyptis suaveolens*, *Tuja occidentalis* e *Rosmarinus officinalis* foi observado contra indivíduos adultos de *Ceratitis capitata* (mosca-do-mediterrâneo) (Benelli et al. 2012). Portanto, cada vez mais trabalhos referentes aos efeitos biológicos de óleos essenciais em insetos evidenciam a sua utilização como uma alternativa eficiente no manejo de insetos considerados pragas ou prejudiciais à saúde pública no mundo.

1.2.1.1 Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae)

A espécie *Rosmarinus officinalis* é conhecida popularmente como Alecrim, sendo originária do mediterrâneo. Atualmente, é amplamente distribuída no mundo (Angioni et al. 2004), incluindo o Brasil. É uma planta aromática arbustiva, com folhas simples, lineares, opostas cruzadas, coriáceas, verde na parte superior e esbranquiçada na inferior. Suas flores são pequenas, azuladas, hermafroditas e pentâmeras (Capasso 2011) (Figura 2). Esta espécie possui alto valor econômico por sua utilização na culinária e na medicina popular. É uma das plantas medicinais mais utilizadas pela população, como por exemplo, para tratamento de depressão, ansiedade, diabetes, dor de cabeça, gripe e pressão alta (Liporacci and Simão 2013). Além disso, possui efeitos antioxidantes (Kazimierczak et al. 2015) e é utilizada no combate a doenças gastro-intestinais (Jamila and Mostafa 2014).

O óleo essencial de *R. officinallis* (Figura 3) se mostra promissor contra infecção bacteriana, potencializando o efeito de antibióticos (Barreto et al. 2014) e no controle de bactérias causadoras de infecção urinária (Boas Petrolini et al. 2013). O óleo essencial de *R.*

officinalis se mostrou tóxico para espécies de Lepdoptera (*Trichoplusia ni*, *Ectropis obliqua*; *Pseudaletia unipuncta*) (Isman et al. 2008, Zhang et al. 2013, Tak and Isman 2017), Diptera (*Campyatomyia corticalis*) (Kim et al. 2012) e Coleoptera (*Tribolium confusum*, *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*) (Demirel et al. 2009, Kiran and Prakash 2015), todos considerados pragas agrícolas. Além disso, segundo Benelli et al. (2012), esse óleo se mostrou tóxico após 24 horas contra a mosca da fruta *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) e seus principais constituintes foram 1,8- cineol, α -pineno e terpinoleno. De acordo com Angioni et al. (2004), mais de 30 componentes foram caracterizados no óleo essencial do alecrim. Dentre eles podemos citar o α -pineno, borneol, canfora e verbenona.

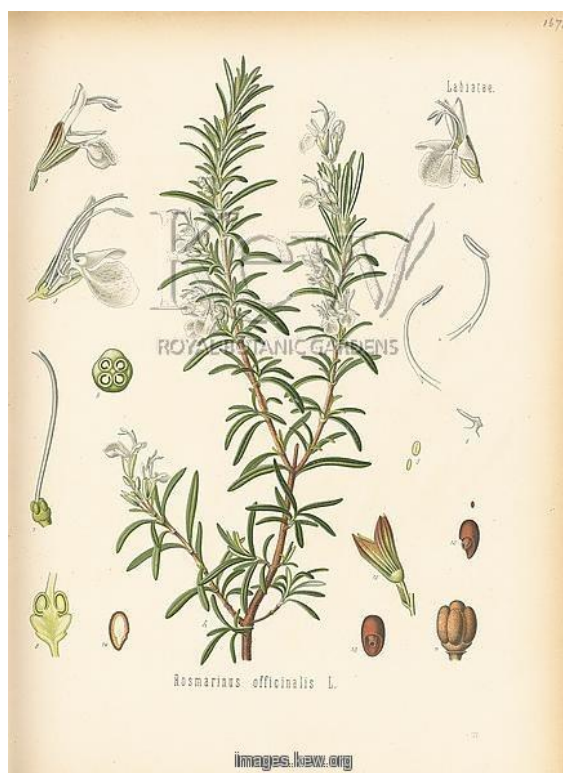


Figura 2 – Prancha botânica da espécie *Rosmarinus officinalis* L.

Fonte: Royal Botanic Gardens

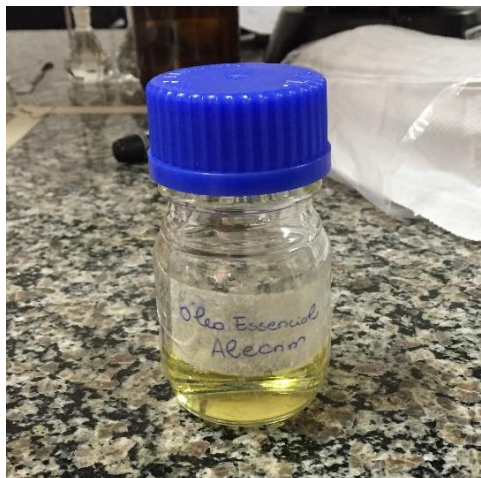


Figura 3 – Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.

Fonte: Igor sidônio

1.3. Nanoemulsões

A nanotecnologia se caracteriza pela organização funcional de materiais e dispositivos que se encontram em escala nanométrica (Silva 2004). A maior vantagem dos nanoproductos produzidos são a possibilidade de se atingir estabilidade cinética, características organolépticas favoráveis, maior poder de penetração e/ou absorção, maior biodisponibilidade, incremento da solubilidade em água para substâncias pouco solúveis e a liberação controlada de substâncias (Irache et al. 2011).

As nanoemulsões são sistemas dispersos entre dois líquidos imiscíveis, cujas gotículas encontram-se com tamanho médio inferior a 200 nm (Ostertag et al. 2012). Frequentemente é necessário o uso de tensoativos para a obtenção de nanoemulsões. Eles são fundamentais para a estabilização e manutenção de diminutas gotículas (Aulton 2005, Surassmo et al. 2010). Métodos de alta energia (gerando forças disruptivas, capazes de diminuir o tamanho das micelas) e baixo aporte de energia (pequenas micelas formadas de forma espontânea, utilizando a energia química do próprio sistema) são utilizados para a preparação de nanoemulsões (Solans et al. 2005, Solans and Sole 2012, Gupta et al. 2016). Uma das grandes vantagens das nanoemulsões, de óleo em água, é permitir que se incorpore em água substâncias lipofílicas e/ou de baixa solubilidade nesse meio (Solans et al. 2005), como os óleos essenciais. Neste contexto, considerando-se o potencial inseticida

dos óleos essenciais e sua imiscibilidade em água (Rehman et al. 2014), a obtenção de nanoemulsões para essa finalidade é extremamente promissora. Outra vantagem é que as nanoemulsões podem potencializar, em alguns casos, uma determinada atividade biológica (Vianna Santos et al. 2014).

Nanoemulsões a base de óleos de origem natural tem sido alvo de diversos estudos. Por exemplo, a nanoemulsão dos óleos de andiroba e copaíba foram considerados efetivos no controle de bactérias do gênero *Paenibacillus*, que causam doenças em abelhas. Os atuais produtos utilizados no combate a esse patógeno provocam a sua resistência e resíduos são encontrados em colônias de abelhas que são benéficas à agricultura. Entretanto, abelhas que são submetidas aos tratamentos com as nanoemulsões apresentam taxas de mortalidade menor, quando comparada com as taxas dos atuais produtos utilizados no controle dessas bactérias (Vaucher et al. 2015). As nanoemulsões também provocam diminuição no total de proteínas e a redução nos níveis da enzima acetilcolinesterase. Isto foi evidenciado em larvas de *Culex quinquefasciatus* que tiveram seu desenvolvimento afetado pelo efeito da nanoemulsão (Sugumar et al. 2014). Este inseto é vetor do nematoide causador da filariose no Brasil.

Neste contexto, destaca-se a pesquisa realizada por (Duarte et al. (2015)), no Amapá, que avaliaram a atividade larvicida da nanoemulsão de *Rosmarinus officinalis* (Alecrim) em *Aedes aegypti*, um inseto vetor de doenças como a dengue, chikungunya e zika vírus, obtendo resultados eficazes que podem ser utilizados em programas de controle integrado. Além disso, pesquisas que visam avaliar a atividade inseticida das nanoemulsões buscam aplicar o efeito tóxico dos constituintes dos óleos botânicos no controle de adultos ou imaturos de insetos que causam danos, diretos ou indiretos aos seres humanos, incluindo pragas agrícolas (Pant et al. 2014, Rodrigues et al. 2014). Entretanto, ainda não se sabe os efeitos da nanoemulsão de óleos essenciais sobre a mosca-da-carambola, uma praga que pode colocar em risco a fruticultura brasileira. Portanto, conhecer esses efeitos pode ser uma alternativa mais “limpa”, utilizando produtos naturais de forma consciente, para o controle desses insetos, buscando minimizar os efeitos negativos na biodiversidade, que é afetada pela acumulação de pesticidas sintéticos.

2. HIPÓTESES

H1: A nanoemulsão do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* influencia na mortalidade dos indivíduos adultos de *Bactrocera carambolae*.

H2: A nanoemulsão do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* afeta a mortalidade de machos e fêmeas de modo desigual.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o efeito letal da nanoemulsão do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* sobre *Bactrocera carambolae* (mosca-da-carambola).

3.2 ESPECÍFICOS

- Preparar e caracterizar a nanoemulsão do óleo essencial de *R. officinalis*;
- Avaliar a mortalidade de adultos de *B. carambolae* induzida pela nanoemulsão do óleo essencial de *R. officinalis*;
- Avaliar se há diferenças na mortalidade entre machos e fêmeas de *B. carambolae* após o contato com a nanoemulsão de *R. officinalis*.

4. REFERÊNCIAS

- Adaime, R., A. L. Marsaro Junior, M. F. Souza-Filho, E. A. Chagas, and C. G. B. Lima. 2012. New host of *Anastrepha parishi* Stone (Diptera: Tephritidae) reported in Brazil. *Brazilian Journal of Biology* **72**:227-227.
- Alarcón, J., and C. L. Cespedes. 2015. Chemical constituents and biological activities of South American Rhamnaceae. *Phytochemistry Reviews* **14**:389-401.
- Aluja, M., and R. L. Mangan. 2008. Fruit fly (Diptera : tephritidae) host status determination: Critical conceptual, methodological, and regulatory considerations. Pages 473-502 *Annual review of entomology*.
- Angioni, A., A. Barra, E. Cereti, D. Barile, J. D. Coisson, M. Arlorio, S. Dessi, V. Coroneo, and P. Cabras. 2004. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**:3530-3535.
- Aulton, M. E. 2005. Delineamento de formas farmacêuticas. Artmed, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Bacci, L., J. K. A. Lima, A. P. A. Araujo, A. F. Blank, I. M. A. Silva, A. A. Santos, A. C. C. Santos, P. B. Alves, and M. C. Picanco. 2015. Toxicity, behavior impairment, and repellence of essential oils from *pepper-rosmarin* and patchouli to termites. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **156**:66-76.
- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck, and M. Waomar. 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology* **46**:446-475.
- Barreto, H. M., E. C. Silva Filho, E. d. O. Lima, H. D. M. Coutinho, M. F. B. Morais-Braga, C. C. A. Tavares, S. R. Tintino, J. V. Rego, A. P. L. de Abreu, M. d. C. Gomes Lustosa, R. W. Guimaraes Oliveira, A. M. G. L. Cito, and J. A. Dantas Lopes. 2014. Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Industrial Crops and Products* **59**:290-294.
- Bateman, M. A. 1972. The ecology of fruit flies. *Annual review of entomology* **17**:493-518
- Benelli, G. 2015. Plant-borne ovicides in the fight against mosquito vectors of medical and veterinary importance: a systematic review. *Parasitol Res* **114**:3201-3212.
- Benelli, G., G. Flamini, A. Canale, P. L. Cioni, and B. Conti. 2012. Toxicity of some essential oil formulations against the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae). *Crop Protection* **42**:223-229.
- Boas Petrolini, F. V., R. Lucarini, M. G. Mendes de Souza, R. H. Pires, W. R. Cunha, and C. H. Gomes Martins. 2013. Evaluation of the antibacterial potential of *Petroselinum crispum* and *Rosmarinus officinalis* against bacteria that cause urinary tract infections. *Brazilian Journal of Microbiology* **44**:829-834.
- Brasil. 2013. Instrução Normativa n. 59.in d. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, editor. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 18 dez. 2013 Brasília, Distrito federal, Brasil.
- Capasso, F., R. Pasquale, G. Granddini. 2011. *Farmacognosia: Botanica, chimica e farmacologia delle piante medicinali*. Springer, Milão, Itália.
- Danjuma, S., N. Thaochan, S. Permkam, and C. Satasook. 2014. Effect of temperature on the development and survival of immature stages of the carambola fruit fly,

- Bactrocera carambolae*, and the Asian papaya fruit fly, *Bactrocera papayae*, reared on guava diet. *Journal of Insect Science* **14**.
- Dayan, F. E., C. L. Cantrell, and S. O. Duke. 2009. Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **17**:4022-4034.
- Demirel, N., O. Sener, M. Arslan, I. Uremis, F. T. Uluc, and F. Cabuk. 2009. Toxicological Responses of Confused Flour Beetle, *Tribolium confusum* du Val (Coleoptera: Tenebrinoidea) to Various Plant Essential Oils. *Asian Journal of Chemistry* **21**:6403-6410.
- Desneux, N., A. Decourtye, and J.-M. Delpuech. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. Pages 81-106 *Annual review of entomology*.
- Duarte, J. L., J. R. R. Amado, A. E. M. F. M. Oliveira, R. A. S. Cruz, A. M. Ferreira, R. N. P. Souto, D. Q. Falcao, J. C. T. Carvalho, and C. P. Fernandes. 2015. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy* **25**:189-192.
- Dutra, V. S., B. Ronchi-Teles, M. V. Bastos Garcia, R. Adaime, and J. G. Silva. 2013. Native Hosts And Parasitoids Associated With *Anastrepha Fractura* And Other *Anastrepha* Species (Diptera: Tephritidae) In The Brazilian Amazon. *Florida Entomologist* **96**:270-273.
- Godoy, M., w. Pacheco, and A. Malavasi. 2011. Moscas-das-frutas quarentenárias para o Brasil. Pages 113-131 *in* R. Silva, W. Lemos, and R. Zucchi, editors. *Moscas-das-frutas na Amazônia brasileira: diversidade, hospedeiros e inimigos naturais*. EMBRAPA, Macapá, Amapá, Brasil.
- Gupta, A., H. B. Eral, T. A. Hatton, and P. S. Doyle. 2016. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter* **12**:2826-2841.
- Irache, J. M., I. Esparza, C. Gamazo, M. Agueeros, and S. Espuelas. 2011. Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics. *Veterinary Parasitology* **180**:47-71.
- Isman, M. B. 2014. Botanical Insecticides: A Global Perspective. Pages 21-30 *in* A. D. Gross, J. R. Coats, S. O. Duke, and J. N. Seiber, editors. *Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities*.
- Isman, M. B. 2015. A renaissance for botanical insecticides? *Pest Management Science* **71**:1587-1590.
- Isman, M. B., J. A. Wilson, and R. Bradbury. 2008. Insecticidal activities of commercial rosemary oils (*Rosmarinus officinalis*) against larvae of *Pseudaletia unipuncta* and *Trichoplusia ni* in relation to their chemical compositions. *Pharmaceutical Biology* **46**:82-87.
- Jamila, F., and E. Mostafa. 2014. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. *Journal of Ethnopharmacology* **154**:76-87.
- Jesus-Barros, C. R., O. M. Cruz, and R. Adaime. 2015. *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae): new alternate host to carambola fruit fly in Brazil. *biota amazonia* **5**:117-118.
- Jesus, C. R., R. A. Silva, M. F. Souza Filho, E. G. Deus, and R. A. Zucchi. 2010. First Record of *Anastrepha pseudanomala* Norrbom (Diptera: Tephritidae) and its Host in Brazil. *Neotropical Entomology* **39**:1059-1060.

- Jordão, A. L., and R. A. Silva. 2006. Guia de pragas agrícolas para o manejo integrado no Estado do Amapá. Holos Editora, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.
- Kazimierczak, R., E. Hallmann, and E. Rembalkowska. 2015. Effects of organic and conventional production systems on the content of bioactive substances in four species of medicinal plants. *Biological Agriculture & Horticulture* **31**:118-127.
- Kim, J. R., P. Haribalan, B. K. Son, and Y. J. Ahn. 2012. Fumigant Toxicity of Plant Essential Oils Against *Camptomyia corticalis* (Diptera: Cecidomyiidae). *Journal of Economic Entomology* **105**:1329-1334.
- Kiran, S., and B. Prakash. 2015. Toxicity and biochemical efficacy of chemically characterized *Rosmarinus officinalis* essential oil against *Sitophilus oryzae* and *Oryzaephilus surinamensis*. *Industrial Crops and Products* **74**:817-823.
- Kumar, S., N. Wahab, and R. Warikoo. 2011. Bioefficacy of *Mentha piperita* essential oil against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **1**:85-88.
- Lemos, L. D. N., R. Adaime, C. R. De Jesus-Barros, and E. D. G. De Deus. 2014. New hosts of *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae) in Brazil. *Florida Entomologist* **97**:841-843.
- Liporacci, H. S. N., and D. G. Simão. 2013. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais nos quintais do Bairro Novo Horizonte, Ituiutaba, MG. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* **15**:529-540.
- Malavasi, A. 2009. Biologia, Ciclo de Vida, Relação com o Hospedeiro, Espécies Importantes e Biogeografia de Tefritídeos. *in* A. Malavasi and J. Virginio, editors. *Biologia, Monitoramento e controle de Moscas-das-Frutas*. Moscamed Brasil, Juazeiro, Bahia, Brasil.
- Marchioro, C. A. 2016. Global Potential Distribution of *Bactrocera carambolae* and the Risks for Fruit Production in Brazil. *PLoS One* **11**.
- Miresmailli, S., and M. B. Isman. 2014. Botanical insecticides inspired by plant-herbivore chemical interactions. *Trends in Plant Science* **19**:29-35.
- Ostertag, F., J. Weiss, and D. J. McClements. 2012. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *Journal of Colloid and Interface Science* **388**:95-102.
- Pant, M., S. Dubey, P. K. Patanjali, S. N. Naik, and S. Sharma. 2014. Insecticidal activity of *eucalyptus* oil nanoemulsion with karanja and jatropha aqueous filtrates. *International Biodeterioration & Biodegradation* **91**:119-127.
- Rattan, R. S. 2010. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection* **29**:913-920.
- Regnault-Roger, C. 1997. - The potential of botanical essential oils for insect pest control. - **2**.
- Rehman, J. U., A. Ali, and I. A. Khan. 2014. Plant based products: Use and development as repellents against mosquitoes: A review. *Fitoterapia* **95**:65-74.
- Savaris, M., S. Lampert, A. L. Marsaro-Junior, R. Adaime, and M. F. De Souza-Filho. 2013. First record of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae) on arecaceae in Brazil. *Florida Entomologist* **96**:1597-1599.
- Schutze, M. K., N. Aketarawong, W. Amornsak, K. F. Armstrong, A. A. Augustinos, N. Barr, W. Bo, K. Bourtzis, L. M. Boykin, C. Caceres, S. L. Cameron, T. A. Chapman, S. Chinvinijkul, A. Chomic, M. De Meyer, E. Drosopoulou, A.

- Englezou, S. Ekesi, A. Gariou-Papalexiou, S. M. Geib, D. Hailstones, M. Hasanuzzaman, D. Haymer, A. K. W. Hee, J. Hendrichs, A. Jessup, Q. Ji, F. M. Khamis, M. N. Krosch, L. Leblanc, K. Mahmood, A. R. Malacrida, P. Mavragani-Tsipidou, M. Mwatawala, R. Nishida, H. Ono, J. Reyes, D. Rubinoff, M. San Jose, T. E. Shelly, S. Srikachar, K. H. Tan, S. Thanaphum, I. Haq, S. Vijaysegaran, S. L. Wee, F. Yesmin, A. Zacharopoulou, and A. R. Clarke. 2015. Synonymization of key pest species within the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae): taxonomic changes based on a review of 20 years of integrative morphological, molecular, cytogenetic, behavioural and chemoeological data. *Systematic Entomology* **40**:456-471.
- Silva, G. A. 2004. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surgical Neurology* **61**:216-220.
- Silva, R. A., E. G. Deus, J. D. B. Pereira, C. R. Jesus, M. F. Souza-Filho, and R. A. Zucchi. 2011. Conhecimento sobre moscas-das-frutas no Estado do Amapá. Pages 225-236 in R. Silva, P. Lemos, and R. Zucchi, editors. *Moscas-das-frutas na Amazônia brasileira: diversidade, hospedeiros e inimigos naturais*. Embrapa, Macapá, Amapá, Brasil.
- Simmonds, M. S. J. 1998. Chemoecology: The legacy left by Tony Swain. *Phytochemistry* **49**:1183-1190.
- Simões, C. O., and V. Spitzer. 2010. Óleos Voláteis. in E. P. S. C. O. Simões, G. Gosmann, J. P. Mello, L. A. Mentz, and P. R. Petrovick, editor. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. .
- Solans, C., P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar, and M. J. Garcia-Celma. 2005. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **10**:102-110.
- Solans, C., and I. Sole. 2012. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **17**:246-254.
- Sugumar, S., S. K. Clarke, M. J. Nirmala, B. K. Tyagi, A. Mukherjee, and N. Chandrasekaran. 2014. Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus* - CORRIGENDUM. *Bulletin of Entomological Research* **104**:403-403.
- Surassmo, S., S.-G. Min, P. Bejrapha, and M.-J. Choi. 2010. Effects of surfactants on the physical properties of capsicum oleoresin-loaded nanocapsules formulated through the emulsion-diffusion method. *Food Research International* **43**:8-17.
- Tak, J. H., and M. B. Isman. 2017. Penetration-enhancement underlies synergy of plant essential oil terpenoids as insecticides in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Scientific Reports* **7**.
- Tietbohl, L. A. C., T. Barbosa, C. P. Fernandes, M. G. Santos, F. P. Machado, K. T. Santos, C. B. Mello, H. P. Araujo, M. S. Gonzalez, D. Feder, and L. Rocha. 2014. Laboratory evaluation of the effects of essential oil of *Myrciaria floribunda* leaves on the development of *Dysdercus peruvianus* and *Oncopeltus fasciatus*. *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy* **24**:316-321.
- Triplehorn, C. A., and N. F. Jonnson. 2011. *Estudo dos insetos*. Learning, São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Uramoto, K., and R. A. Zucchi. 2009. Taxonomia de Espécies de *Anastrepha* (Diptera, Tephritidae). in A. Filho, M and J. f. Virginio, editors. *Biologia, Monitoramento e controle de Moscas-das-Frutas*. Moscamed Brasil, Juazeiro, Bahia, Brasil.

- Vargas, R. I., J. C. Pinero, and L. Leblanc. 2015. An Overview of Pest Species of *Bactrocera* Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) and the Integration of Biopesticides with Other Biological Approaches for Their Management with a Focus on the Pacific Region. *Insects* **6**:297-318.
- Vaucher, R. d. A., J. L. Giongo, L. P. Bolzan, M. S. Correa, V. P. Fausto, C. F. dos Santos Alves, L. Q. Soares Lopes, A. A. Boligon, M. L. Athayde, A. P. Moreira, A. Brandelli, R. P. Raffin, and R. C. Vianna Santos. 2015. Antimicrobial activity of nanostructured Amazonian oils against *Paenibacillus* species and their toxicity on larvae and adult worker bees. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **18**:205-210.
- Vianna Santos, R. C., L. Q. Soares Lopes, C. F. Dos Santos Alves, V. P. Fausto, K. Pizzutti, V. Barboza, M. E. De Souza, R. P. Raffin, P. Gomes, D. Takamatsu, Y. Morinaga, A. A. Boligon, M. L. Athayde, C. C. Felippi, and R. D. A. Vaucher. 2014. Antimicrobial activity of tea tree oil nanoparticles against American and European foulbrood diseases agents. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **17**:343-347.
- Vilela, E. F., R. Zucchi, and F. Cantor. 2001. *Históricos e Impactos Das Pragas Introduzidas no Brasil*. Holos, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.
- Waksmundzka-Hajnos, M., J. Sherma, and T. Kowalska. 2008. *Thin layer chromatography in phitochemistry*. CRC Press, New York, New York, EUA.
- Zhang, Z. Q., X. L. Sun, Z. J. Xin, Z. X. Luo, Y. Gao, L. Bian, and Z. M. Chen. 2013. Identification and Field Evaluation of Non-Host Volatiles Disturbing Host Location by the Tea Geometrid, *Ectropis obliqua*. *Journal of Chemical Ecology* **39**:1284-1296.
- Zucchi, R. A. 2001. Mosca-do-mediterrâneo, *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae).in E. F. Vilela, R. A. Zucchi, and F. Cantor, editors. *Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil*. Holos, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.
- Zucchi, R. A. 2008. Fruit flies in Brazil - *Anastrepha* species their host plants and parasitoids. Page

5. CAPÍTULO 1 – EVALUATION OF LETHAL EFFECT OF THE NANOEMULSION PREPARED WITH *Rosmarinus officinalis* L. ESSENTIAL OIL AGAINST *Bactrocera carambolae* Drew and Hancock (DIPTERA: TEPHRITIDAE)

Artigo submetido ao Journal of Pest Science.

Evaluation of lethal effect of the nanoemulsion prepared with *Rosmarinus officinalis* L. essential oil against *Bactrocera carambolae* Drew and Hancock (Diptera: Tephritidae)

Igor Andrey Pinheiro Sidônio¹·Jonatas Lobato Duarte¹·Taires Peniche¹·José Francisco Pereira²·Paulo Rogério Nascimento Lima²·Cristiane Ramos de Jesus-Barros²·Anna Eliza Maciel de Faria Mota Oliveira¹·Rodrigo Alves Soares Cruz¹·José Carlos Tavares Carvalho³·Ricardo Adaime²·Caio Pinho Fernandes¹

¹ Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica, Colegiado de Farmácia, Universidade Federal do Amapá, Campus Universitário Marco Zero do Equador, Rodovia Juscelino Kubitschek, KM, 02 Jardim Marco Zero, Macapá, AP, 68902–280, Brazil.

² Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agroflorestal do Amapá
Rodovia Juscelino Kubitschek, km 5, n. 2600 Universidade 68903-419 - Macapá, AP - Brazil.

³ Laboratório de Pesquisa em Fármacos, Colegiado de Farmácia, Universidade Federal do Amapá, Campus Universitário Marco Zero do Equador, Rodovia Juscelino Kubitschek de Oliveira, KM, 02 Jardim Marco Zero, Macapá, AP, 68902–280, Brazil.

E-mail: caiofernandes@unifap.br

Abstract

Essential oils are complex volatile mixtures of secondary metabolites and several of them are considered potential insecticidal agents, including for agricultural pest control. On this context, nanoemulsions are considered promising delivery systems for novel aqueous pesticide products. *Bactrocera carambolae* is a quarentenary pest and its dissemination through this country would lead to irreparable damage to Brazilian fruticulture. *Rosmarinus officinalis* is an essential oil-rich plant that is commonly known as rosemary and is recognized as a promising insecticidal agent. The present study aims to evaluate insecticidal activity of the nanoemulsion prepared with *R. officinalis* essential oil against adults of *Bactrocera carambolae* by topical and contact bioassays. The nanoemulsions were prepared by low energy method and presented a fine transparent homogeneous appearance. Droplet size measured by dynamic light scattering was around 10 nm. Higher percentage of mortality on topical assay was observed after 120 h of treatment with the more concentrated nanoemulsion (200 µg per insect). It also induced higher mortality after 120 h on the contact bioassay and statistical significant difference was observed on percentage of mortality on male (77.78%), when compared to female (37.78%). Thus, our results shows, for the first time, the insecticidal activity a nanostructured system containing

essential oil from *R. officinalis*, showing the potential of this novel nanoparticle on integrated practices of *B. carambolae* control.

Keywords

Fruit Fly; Pest Control; Botanical Insecticides; Toxicity; Lamiaceae; Rosemary, Nanoformulation.

Key message

- Essential oils are considered potential eco-friendly natural products.
- Nanoemulsions allow better water dispersability and prevent volatilization of essential oils.
- *Bactrocera carambolae* may induce irreparable economic damage to Brazilian fruticulture if it spreads through this country.
- Nanoemulsion prepared with *Rosmarinus officinalis* induced mortality on *B. carambolae* adults.
- Integrated practices of carambola fruit fly control may use dispersed systems containing essential oils, such as rosemary essential oil-based nanoemulsion.

Author contribution statement

IAPS contributed to all laboratory work and paper preparation. JLD and TP contributed to nanoemulsion preparation and characterization. JFP analyzed the data. PRNL contributed to laboratory work. CRJB contributed to design of the study. AEMFMO and RASC contributed to nanoemulsion development. JCTC contributed to critical revision of the manuscript. RA and CPF designed and supervised the study.

Introduction

Carambola fruit fly (*Bactrocera carambolae* Drew and Hancock) is native from Asiatic countries (Sauers-Muller 1991) and it is considered an invador species on Brazil. The common name is associated to star fruit (“carambola”), but other fruits serve as host plants, including guava, mango and others. On this country, it is considered a quarentenary pest, due to the fact that it is not found in all states and therefore offers a risk to fruticulture of Brazil. In case of distribution and adaptation to other regions that export fruits (Godoy et al. 2011a), it would result on severe socioeconomical damage to fruticulture (Barreto et al. 2011). The presence of carambola fruit fly on two Brazilian states, Amapá and Roraima (Brasil 2013), is responsible by commercial restriction imposed by world market that import fruits and care about quality and safety against pest invasion on their countries (Godoy et al. 2011b). Chemical control is one of main strategies for carambola fruit fly control. It involves utilization of traps containing methyl-eugenol (male attractant parapheformone) and malation (organophosphorus), aiming to annihilate the males. Utilization of feed attractant with synthetic pesticides placed on host plants is also an alternative (Silva 2011). However, synthetic insecticide induce severe damage to non-target organism (Desneux et al. 2007). This fact is highlighted by the severe metabolic dysfunction due to oxidative stress on liver and kidney cells induced by malation, that may contribute to further emergence of carcinogenic cells or even increase of cardiovascular diseases (Selmi et al. 2015).

Natural pesticides comprise substances from the secondary metabolism of plants and they are very promising as alternative to synthetic pesticides (Miresmailli and Isman 2014). A main advantage of these natural compounds rely on the fact that they are biodegradable and efficient (Harmouzi et al. 2016). Terpenoids are the group of secondary metabolites found on essential oil from plants. These volatile mixtures has compounds that are important on chemical interaction between plants and insects. Considering their potential toxic, repellent, antifeedant and antioviposition effects, they are interesting on integrative control practices against pest insects (Silva et al. 2008, Benelli 2015, Camara et al. 2015, Ebadollahi et al. 2016). *Rosmarinus officinalis* L. is an essential oil producer plant that have 1.8-cineole, camphor, α -pinene and β -pinene as main constituents (Barreto et al. 2014) at varying amounts, according to different chemotypes (Li et al. 2016). The lethal effect of

rosemary essential oil on different species of pest insects which impair human health or agriculture has been evaluated (Isman et al. 2008, Freitas et al. 2010, Kim et al. 2012). This effect may be associated to synergic effects of the natural products of the essential oil (Tak et al. 2016).

Nanotechnology is the science involved on manipulation of materials on nanometric scale and is on the spotlight of novelty on several areas (Satalkar et al. 2016). It is promising to develop novel delivery systems of lipophilic bioactive compounds on pharmacy, cosmetics, food, remediation of polluted water, agrochemical industry and others (Feng et al. 2016, He and Hwang 2016, Jackman et al. 2016, Santhosh et al. 2016). Nanoemulsions are a type of nanostructured system stabilized by emulsifier (s) that have fine droplets of a liquid, often with diameter lower than 100 nm, dispersed through an immiscible liquid, often water (McClements 2012). They are kinetic stable systems with transparent or translucent appearance. The great stability of nanoemulsions make them very promising for improved availability of compounds (Gupta et al. 2016), including pesticides (Du et al. 2016). Incorporation of lipophilic compounds on water (Solans et al. 2005) opens possible applications for utilization of essential oils on bioactive nanoemulsions with great activity than non-nanoemulsified essential oils (Vianna Santos et al. 2014). Moreover, nanoemulsions may prevent prompt loss of essential oil compounds, offering an additional advantage for field application on agriculture (Dayan et al. 2009).

Insecticidal action of nanoemulsions that encapsulate natural oils have been assayed as potential larvicidal products against vectors of disease (Anjali et al. 2012). Moreover, some of them have been considered potentially safe for non-target organism (Oliveira et al. 2016). A nanoemulsion prepared with rosemary essential oil was assayed for this purpose, being potentially toxic to *Aedes aegypti* larvae (Duarte et al. 2015). However, to our knowledge, essential oil-based nanoemulsions was not previously evaluate against Tephritidae (Diptera), which are considered fruticulture pest. On this context, the aim of the present study was to evaluate the insecticidal activity of a nanoemulsion prepared with *R. officinalis* essential oil against adults of *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae).

Materials and Methods

Rosmarinus officinalis essential oil

Dry leaves of *Rosmarinus officinalis* was previously extracted by hydrodistillation and analyzed using a gas chromatograph (Shimadzu) coupled to mass spectrometer detector for identification of flame detector for relative quantification. Essential oil was stored at 4°C until utilization (Fernandes et al. 2013).

Preparation of *R. officinalis* nanoemulsions

Nanoemulsions containing *Rosmarinus officinalis* essential oil were prepared according to the titration method described by Ostertag et al. (2012). The essential oil and polysorbate 20 were pooled together and homogenized under magnetic stirring for 30 minutes under room temperature. Then, water was added through constant flow and the system was homogenized using a magnetic stirrer for 60 min under room temperature. Two nanoemulsions were prepared by ranging the essential oil concentration (50000 ppm or 100000 ppm). Surfactant to oil ratio was 1:1 and therefore, total compositions of nanoemulsions were: Nanoemulsion_{50000 ppm} = 5% (w/w) of essential oil, 5% (w/w) of polysorbate 20 and 90% (w/w) of water / Nanoemulsion_{100000 ppm} = 10% (w/w) of essential oil, 10% (w/w) of polysorbate 20 and 80% (w/w) of water. Both nanoemulsions were prepared at a final mass of 10g.

Characterization of *R. officinalis* nanoemulsions

The nanoemulsions were characterized using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) equipped with a 10 mW “red” laser ($\lambda = 632.8$ nm) and samples were measured at a 90° scattering detector angle for size measurements. They were diluted with distilled water (1:25, v/v) prior to measurements. Average particle size, polydispersity index and zeta potential were measured in triplicate and results are expressed as mean \pm standard deviation.

Bioassays

***Bactrocera carambolae* colonies**

The insects were established in the Laboratory of Plant Protection of the Agroforestry Research Center of Amapá (Brazilian Agricultural Research Corporation - Embrapa). *B. carambolae* at 26 ± 2 °C; 12: 12 h light: dark cycle; 60% - 80% relative

humidity. They were fed with yeast extract and sugar. Oviposition was stimulated using pots containing guava (*Psidium guajava* L.). Eggs were separated and put into petri dishes containing sugarcane bagasse, yeast, soy flour, methylparaben, sugar, citric acid, sodium benzoate and distilled water. Pupae were incubated at 26 ± 2 °C until emergence of adults. The bioassays were performed with 10-12 days adults.

Topical assay

Transparent plastic recipient (750 mL) containing cellulose filter papers were used for fruit flies accommodation. They had free access to food (yeast extract and sugar) and water, which was disposed on a small glass containing strips of absorbent sponge. Each group was constituted by 15 replicate, being each replicated constituted by 3 male and 3 female (n = 90 flies; 45 female and 45 male). The fruit flies were topically applied, on the thorax, with 2 μ l of each nanoemulsion (treated groups) or distilled water (control group). Mortality levels were evaluated daily during 5 days. Topical application on treated groups corresponded to 100 μ g or 200 μ g per insect.

Contact assay

The most efficient nanoemulsion evaluated on the topical assay was chosen for contact assay. Same experimental design was used (n = 90 fruit flies; 45 female and 45 male) under same experimental conditions and 100 μ l of the nanoemulsion (100000 ppm) was applied on the center of a filter paper. On the control group, the nanoemulsion was substituted by distilled water. Mortality levels were evaluated daily during 5 days.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Minitab v.17 and mortality levels were analyzed by Shapiro-Wilk test, posteriorly transformed to arcsen (square root (x/100) and submitted to variance analysis (Anova), being the means compared by Tukey's test (5% of probability).

Results

Background chemical composition of *R. officinalis* essential oil

As described earlier, gas-chromatographic analysis of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* revealed the presence of 22 identified compounds (Tabela.1), representing 93.34%. Major compounds were 1,8-cineole (44%), camphor (16.1%), β -Myrcene (11.7%) and α -Pinene (9.4%) (Fernandes et al. 2013).

Table 1 Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil (Fernandes et al., 2013)

Constituents	RI	%
α -Pinene	930	9.4
Camphene	943	3.3
β -Myrcene	972	11.7
β -Pinene	991	1.0
α -Phellandrene	1001	0.2
α -Terpinene	1014	0.4
p-Cymene	1022	2.4
1,8-cineole	1030	44.0
γ -Terpinene	1057	0.3
Terpinolene	1086	0.2
Fenchol	1110	0.1
Camphor	1141	16.1
Isopulegol	1152	0.1
Borneol	1162	3.5
Terpinen-4-ol	1174	1.2
Verbenone	1188	4.1
Bornyl acetate	1283	0.5
Thymol	1289	0.1
E-Caryophyllene	1414	0.6
α -Himachalene	1448	0.1
Curcumene	1481	0.1
14-hydroxy-z-caryophyllene	1668	0.1
TOTAL		93.34

- Gas chromatographic conditions - injector temperature (200 °C); detector temperature (240 °C); carrier gas (Helium), flow rate (1 mL min⁻¹); split injection ratio (1:40); oven temperature: 50 °C (isothermal for 10 min) with an increase of 2 °C min⁻¹, to 200 °C, ending with a 25 min isothermal at 200 °C.

- Mass spectrometry (MS) conditions - voltage (70 eV); scan rate (1 scan s⁻¹).

- Retention indices (RI) were calculated by interpolation to the retention times of a mixture of aliphatic hydrocarbons (C9-C30) analyzed in the same conditions.

- Quantitative analysis (%) of the chemical constituents was performed by flame ionization gas chromatography (GC/FID), under same conditions of GC/MS analysis and percentages obtained by FID peak-area normalization method.

***R. officinalis* nanoemulsion**

The nanoemulsions prepared with *R. officinalis* essential oil presented transparent aspect and low mean droplet size (around 10 nm). Higher polydispersity index was observed on droplet size distribution of nanoemulsion prepared at 50000 ppm. Low negative (in module) zeta potential values were observed for both nanoemulsions. All the analyzed parameters are shown on (Table 2).

Table 2. Particle size distribution (droplet size and polydispersity index) and zeta potential values of nanoemulsions prepared with *Rosmarinus officinalis* essential oil. Each result represents mean \pm standard deviation.

Essential oil content	Size (nm)	Polydispersity Index	Zeta potential
50000 ppm	9.36 \pm 0.24	0.324 \pm 0.015	-4.06 \pm 1.75
100000 ppm	10.1 \pm 0.1	0.191 \pm 0.001	-8.31 \pm 1.01

Topical assay

Percentage of mortality from each group recorded at different period are shown in Table 3. Higher mortality observed for the group treated with nanoemulsion containing essential oil at 50000 ppm (17.78%, 120 h) was lower than the lower mortality observed for the group treated with nanoemulsion containing essential oil at 100000 ppm (18.89%, 24 h). After 120 h of application of nanoemulsions containing *R. officinalis* essential oil, it was observed that higher percentage of mortality was observed for groups treated with nanoemulsion containing essential oil at 100000 ppm (200 μ g per insect, expressed as essential oil content). This treatment induced 37.78% of mortality on adults after 120 h, while treatment with nanoemulsion containing essential oil at 50000 ppm (100 μ g per insect, expressed as essential oil content) induced 17.78% of death after the same period. Mortality on control group after this period was 7.78%. Significant difference between the nanoemulsion with higher content of essential oil was observed, when compared to control group and nanoemulsion with lower content of essential oil ($F = 9.8773$, $P = 0.0003$, $df = 2.42$).

Table 3. Percentage of mortality on adults of *Bactrocera carambolae* after topical application with nanoemulsions prepared with *Rosmarinus officinalis* essential oil. Each result represents mean \pm standard deviation

Period	Groups			F value(2, 42)	p-value
	Control	100 μ g per insect	200 μ g per insect		
24 h	1.11 \pm 1.11 b	6.67 \pm 3.17 b	18.89 \pm 4.56 a	8.5644	0.0007
48 h	2.22 \pm 1.51 b	7.78 \pm 3.59 b	20.00 \pm 4.93 a	6.6584	0.0030
72 h	2.22 \pm 1.51 b	10.00 \pm 3.92 ab	20.00 \pm 4.93 a	5.9715	0.0052
96 h	4.44 \pm 1.97 b	12.22 \pm 3.80 ab	26.67 \pm 7.05 a	5.4595	0.0078
120 h	7.78 \pm 3.59 b	17.78 \pm 5.97 b	37.78 \pm 6.80 a	9.8773	0.0003

Means with the same letter do not present statistical significant difference (Tukey's-test at the level 5% of probability).

100 μ g per insect represents topical application of 2 μ L of nanoemulsion containing 50000 ppm of rosemary essential oil

200 μ g per insect represents topical application of 2 μ L of nanoemulsion containing 100000 ppm of rosemary essential oil

Table 4 shows percentage of mortality according to different gender. Higher percentage of mortality on male was observed on control group (11.11%) and group treated with nanoemulsion containing essential oil at 100000 ppm (46.67%) (200 μ g per insect, expressed as essential oil content). Higher percentage of mortality on female was observed after treatment with nanoemulsion containing essential oil at 50000 ppm (20.00%) (100 μ g per insect, expressed as essential oil content). However, no statistical significant difference was observed between male and female on control group (F = 1.0552, P = 0.3130, df = 1.28), group treated with nanoemulsion containing essential oil at 50000 ppm (F = 0.1717, P = 0.6817, df = 1.28) and group treated with nanoemulsion containing essential oil at 100000 ppm (F = 2.3236, P = 0.1386, df = 1.28).

Table 4. Percentage of mortality on female and male adults of *Bactrocera carambolae* after topical application with nanoemulsions prepared with *Rosmarinus officinalis* essential oil. Each result represents mean \pm standard deviation

Groups	Gender		F value(1, 28)	p-value
	Female	Male		
Control	4.44 \pm 3.03 a	11.11 \pm 5.31 a	1.0552 ^{ns}	0.3130
100 μ g per insect	20.00 \pm 7.83 a	15.55 \pm 5.51 a	0.1717 ^{ns}	0.6817
200 μ g per insect	28.89 \pm 9.12 a	46.67 \pm 8.48 a	2.3236 ^{ns}	0.1386

ns: Means with the same letter do not present statistical significant difference (F test de 5% of probability).

100 µg per insect represents topical application of 2 µL of nanoemulsion containing 50000 ppm of rosemary essential oil

200 µg per insect represents topical application of 2 µL of nanoemulsion containing 100000 ppm of rosemary essential oil

Contact assay

The nanoemulsion prepared with essential oil at 100000 ppm was considered more active on the topical assay and therefore was chosen for contact assay. It induced high mortality (57.78%) after 120 h, while percentage of mortality on control group after this same period was 12.22% (Table 5). Significant difference between treated and control groups was observed ($F = 39.3611$, $P < 0.0001$, $df = 1.28$). Moreover, almost 50% of the flies died on the first 24 hours, while less than 5% of adults died on the control group after this period. This significant difference ($F = 31.1371$, $P < 0.0001$, $df = 1.28$) suggests prominent effect of the nanoemulsion of *R. officinalis*.

Table 5. Percentage of mortality on adults of *Bactrocera carambolae* after contact assay with nanoemulsion prepared with *Rosmarinus officinalis* essential oil. Each result represents mean \pm standard deviation

Period	Groups		F value _(1, 28)	p-value
	Control	200 µg per insect		
24 h	4.44 \pm 1.97 b	45.55 \pm 7.71 a	31.1371	<0.0001
48 h	5.55 \pm 2.10 b	50.00 \pm 6.90 a	43.8379	<0.0001
72 h	6.67 \pm 2.18 b	54.44 \pm 6.19 a	52.0736	<0.0001
96 h	10.00 \pm 3.17 b	55.55 \pm 6.01 a	41.0895	<0.0001
120 h	12.22 \pm 3.80 b	57.78 \pm 5.60 a	39.3611	<0.0001

Means with the same letter do not present statistical significant difference ((Tukey's-test at the level 5% of probability)).

200 µg per insect represents topical application of 2 µL of nanoemulsion containing 100000 ppm of rosemary essential oil

Table 6 shows that mortality on male was higher both on control or treated group. No significant difference was observed between male and female of the control group ($F = 0.8126$, $P = 0.3750$, $df = 1.28$) (Table 6). However, on treated group, significant difference was observed ($F = 12.4090$, $P = 0.0014$, $df = 1.28$) and higher percentage of mortality was observed on male (77.78%), when compared to female (37.78%).

Table 6. Percentage of mortality on female and male adults of *Bactrocera carambolae* after contact assay with nanoemulsion prepared with *Rosmarinus officinalis* essential oil. Each result represents mean \pm standard deviation

Groups	Gender		F value _(1, 28)	p-value
	Female	Male		
Control	8.89 \pm 3.94 a	15.55 \pm 5.51 a	0.8126 ^{ns}	0.3750
200 μ g per insect	37.78 \pm 7.18 b	77.78 \pm 7.03 a	12.4090	0.0014 [*]

ns: Means with the same letter do not present statistical significant difference (F test de 5% of probability).

* Means with the same letter do not present statistical significant difference (Tukey's-test at the level 5% of probability).

Discussion

We had previously prepared nanoemulsions with *R. officinalis* essential oil. On the first investigation, a heating step was performed and allowed achievement of droplets with mean diameter around 100 nm (Fernandes et al. 2013). However, it is worth mentioning that this heating step may induce some loss of volatiles of the essential oil during the nanoemulsification process, when compared to non-heating methods. Some strategies of non-heating emulsification processes rely on utilization of high-energy devices, which are able to induce disruptive forces able to generate fine droplets. High pressure homogenization was the chosen method for obtainment of nanoemulsions with orange essential oil or limonene (Kourniatis et al. 2010). However, elevated costs of these devices should encourage development of viable process of nanoemulsification by low cost methods. A low energy and non-heating titration method proved to successfully generate a *R. officinalis* nanoemulsions with larvicidal activity. Droplets with diameter below 200 nm were achieved, however, a polymodal distribution (pdi around 0.500) with droplets populations around 10 nm and 100 nm were observed after preparation, with further maintenance of population around 100 nm (Duarte et al. 2015).

The formulation of *R. officinalis* essential oil as an oil in water disperse system is considered a good strategy to minimize evaporation of bioactive volatile on field, to protect the essential oil from degradation and even increase the shelf life of the pesticide essential oil (Rodriguez-Rojo et al. 2012). However, to our knowledge, no study was carried out using rosemary essential oil-based nanostructured systems, including nanoemulsions,

against *B. carambolae*. Nanoemulsions prepared with eucalyptus essential oil, which has great content of 1.8-cineole (66.28 %), and herbal aqueous filtrates were prepared and assayed against a secondary pest of stored grain (*Tribolium castaneum*). Contact assay revealed that the nanoemulsion with mean droplet diameter around 77 nm and polydispersity index around 0.280 induced 88% of mortality when nanoemulsion containing 300 ppm was applied (Pant et al. 2014).

Fumigant evaluation of three nanoemulsions prepared by high pressure homogenization with different essential oils (*Ageratum conyzoides*, *Achillea fragrantissima* and *Tagetes minuta*) showed the potential of these nanostructured systems against the cowpea beetle *Callosobruchus maculatus*, due to improved activity of the nanoemulsified oils when compared to pure non-nanoemulsified oils (Nenaah et al. 2015). The nanostructured system containing essential oil of *Zanthoxylum rhoifolium* was considered efficient against whitefly (*Bemisia tabaci*), reducing the number of eggs and nymphs (Christofoli et al. 2015). The nanoemulsion prepared with extract rich on terpenoids (pentacyclic triterpenes from α - and β -amyryn series) was topically applied to the cotton pest *Dysdercus peruvianus*. It induced around 25% of mortality after 5 days of experiment (Fernandes et al. 2014). Our results are in accordance with previous literature data of nanoencapsulated essential oils of terpenes, suggesting the potential of this strategy for pest control. Biological control of *B. carambolae* was also previously evaluated. Treatment of substrate with *Metarhizium anisopliae* induced around 54% of mortality (Silva et al. 2016). Thus, our results are also in accordance with another strategies that have been considered promising in integrated practices of *B. carambolae* control.

After the begging of the topical experiment, it was observed that carambola flies treated with the nanoemulsion were agitated and aggressive. Some female were fighting and avoiding approximation of male. This behavior was not observed on the control group. Despite lower mortality was observed on female, this aggressiveness may interfere negatively on the populations. This was suggested on termite colonies that had behavioral changes (enhanced aggressiveness) after application of a botanical insecticide (Bacci et al. 2015). Moreover, it is well known that male and female may present differences on

behavior to volatiles (Aluja and Norrbom 1999). Changes on behavior was not observed during the contact bioassay. This may be explained due to the fact that lethal effect was faster. However, difficult on flight, circular movement around itself and frequent contraction of abdomen was observed. Several mechanism of action of secondary metabolites from plant origin have been related, including influence on octopamenergic, mitochondrial, GABA and cholinergic systems. Probably the insecticidal activity of complex mixtures involve a multitarget approach and neurotoxic effects may be involved resulting on hyperactivity and tremor, besides other effects (Rattan 2010). Higher percentage of mortality on contact bioassay may be related to contact of the nanoemulsion with their tarsus during the movement of the insects. This morphological structure of Diptera have chemoreceptive sensilla, responsible by the perception of palate (Buzzi 2010, Triplehorn and Jonnson. 2011). However, considering that monoterpenoids promptly permeate inside the insects due to their volatility and lipophilicity and may act by different pathways, elucidation of mechanism of action may be difficulted (Lopez and Pascual-Villalobos 2010). Therefore, further studies aiming to better investigate these unclear mechanisms should be performed for better understanding of mortality of *B. carambolae* after treatment with the nanoemulsion prepared with *R. officinalis* essential oil.

Despite the wide range of essential oil compounds, mainly monoterpene and sesquiterpenes, *B. carambolae* control is almost restricted to utilization of methyleugenol, a phenylpropanoid, combined to classical synthetic pesticides that are dangerous to the environment. On this context, our study provides a new alternative based on essential oil of *R. officinalis*, which is an essential oil plant cultivated worldwide and that can attend a further demand. Moreover, we propose the utilization of this essential oil as a nanostructured prepared by a simple low energy, low cost and solvent-free method, being a true ecofriendly nanoproduct. Considering the economical importance of *B. carambolae* control and its possible negative impair worldwide, we believe that this study opens perspective for new insecticidal agents against this pest, which may be very important for fruticulture.

References

- Adaime, R., A. L. Marsaro Junior, M. F. Souza-Filho, E. A. Chagas, and C. G. B. Lima. 2012. New host of *Anastrepha parishi* Stone (Diptera: Tephritidae) reported in Brazil. *Brazilian Journal of Biology* **72**:227-227.
- Alarcón, J., and C. L. Cespedes. 2015. Chemical constituents and biological activities of South American Rhamnaceae. *Phytochemistry Reviews* **14**:389-401.
- Aluja, M., and R. L. Mangan. 2008. Fruit fly (Diptera : tephritidae) host status determination: Critical conceptual, methodological, and regulatory considerations. Pages 473-502 *Annual review of entomology*.
- Aluja, M., and A. L. Norrbom. 1999. *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*. CRC Press, New York, United States of America.
- Angioni, A., A. Barra, E. Cereti, D. Barile, J. D. Coisson, M. Arlorio, S. Dessi, V. Coroneo, and P. Cabras. 2004. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**:3530-3535.
- Anjali, C. H., Y. Sharma, A. Mukherjee, and N. Chandrasekaran. 2012. Neem oil (*Azadirachta indica*) nanoemulsion-a potent larvicidal agent against *Culex quinquefasciatus*. *Pest Management Science* **68**:158-163.
- Aulton, M. E. 2005. *Delineamento de formas farmacêuticas*. Artmed, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Bacci, L., J. K. A. Lima, A. P. A. Araujo, A. F. Blank, I. M. A. Silva, A. A. Santos, A. C. C. Santos, P. B. Alves, and M. C. Picanco. 2015. Toxicity, behavior impairment, and repellence of essential oils from pepper-rosmarin and patchouli to termites. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **156**:66-76.
- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck, and M. Waomar. 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology* **46**:446-475.
- Barreto, H. M., E. C. Silva Filho, E. d. O. Lima, H. D. M. Coutinho, M. F. B. Morais-Braga, C. C. A. Tavares, S. R. Tintino, J. V. Rego, A. P. L. de Abreu, M. d. C. Gomes Lustosa, R. W. Guimaraes Oliveira, A. M. G. L. Cito, and J. A. Dantas Lopes. 2014. Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Industrial Crops and Products* **59**:290-294.
- Barreto, M., P. C. Silva, A. C. Carvalho, C. Almeida, and A. Wander. 2011. Impactos Socioeconômicos da dispersão da mosca-da-carambola (*Bactrocera carambolae*) à fruticultura nacional. *in* R. Silva, W. Lemos, and R. Zucchi, editors. *MOSCAS-DAS-FRUTAS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA DIVERSIDADE, HOSPEDEIRO E INIMIGOS NATURAIS*. Embrapa, Macapá, Amapá.
- Bateman, M. A. 1972. The ecology of fruit flies. *Annual review of entomology* **17**:493-518
- Benelli, G. 2015. Plant-borne ovicides in the fight against mosquito vectors of medical and veterinary importance: a systematic review. *Parasitol Res* **114**:3201-3212.
- Benelli, G., G. Flamini, A. Canale, P. L. Cioni, and B. Conti. 2012. Toxicity of some essential oil formulations against the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae). *Crop Protection* **42**:223-229.
- Boas Petrolini, F. V., R. Lucarini, M. G. Mendes de Souza, R. H. Pires, W. R. Cunha, and C. H. Gomes Martins. 2013. Evaluation of the antibacterial potential of

- Petroselinum crispum and Rosmarinus officinalis against bacteria that cause urinary tract infections. *Brazilian Journal of Microbiology* **44**:829-834.
- Brasil. 2013. Instrução Normativa n. 59. *in* d. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, editor. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 18 dez. 2013 Brasília, Distrito federal, Brasil
- Buzzi, Z. J. 2010. Entomologia didática. Ed. da UFPR, Curitiba, Paraná, Brasil.
- Camara, C. A. G., Y. Akhtar, M. B. Isman, R. C. Seffrin, and F. S. Born. 2015. Repellent activity of essential oils from two species of Citrus against Tetranychus urticae in the laboratory and greenhouse. *Crop Protection* **74**:110-115.
- Capasso, F., R. Pasquale, G. Granddini. 2011. Farmacognosia: Botanica, chimica e farmacologia delle piante medicinali. Springer, Milão, Itália.
- Christofoli, M., E. C. C. Costa, K. U. Bicalho, V. D. Domingues, M. F. Peixoto, C. C. F. Alves, W. L. Araujo, and C. D. Casal. 2015. Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from Zanthoxylum rhoifolium (Rutaceae) in Bemisia tabaci populations. *Industrial Crops and Products* **70**:301-308.
- Danjuma, S., N. Thaochan, S. Permkam, and C. Satasook. 2014. Effect of temperature on the development and survival of immature stages of the carambola fruit fly, Bactrocera carambolae, and the Asian papaya fruit fly, Bactrocera papayae, reared on guava diet. *Journal of Insect Science* **14**.
- Dayan, F. E., C. L. Cantrell, and S. O. Duke. 2009. Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **17**:4022-4034.
- Desneux, N., A. Decourtye, and J.-M. Delpuech. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. Pages 81-106 *Annual review of entomology*.
- Du, Z. P., C. X. Wang, X. M. Tai, G. Y. Wang, and X. Y. Liu. 2016. Optimization and Characterization of Biocompatible Oil-in-Water Nanoemulsion for Pesticide Delivery. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering* **4**:983-991.
- Duarte, J. L., J. R. R. Amado, A. E. M. F. M. Oliveira, R. A. S. Cruz, A. M. Ferreira, R. N. P. Souto, D. Q. Falcao, J. C. T. Carvalho, and C. P. Fernandes. 2015. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of Rosmarinus officinalis essential oil. *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy* **25**:189-192.
- Dutra, V. S., B. Ronchi-Teles, M. V. Bastos Garcia, R. Adaime, and J. G. Silva. 2013. Native Hosts And Parasitoids Associated With Anastrepha Fractura And Other Anastrepha Species (Diptera: Tephritidae) In The Brazilian Amazon. *Florida Entomologist* **96**:270-273.
- Ebadollahi, A., R. A. Parchin, and M. Farjaminezhad. 2016. Phytochemistry, toxicity and feeding inhibitory activity of Melissa officinalis L. essential oil against a cosmopolitan insect pest; Tribolium castaneum Herbst. *Toxin Reviews* **35**:77-82.
- Feng, J. G., Y. L. Shi, Q. Y. Yu, C. C. Sun, and G. T. Yang. 2016. Effect of emulsifying process on stability of pesticide nanoemulsions. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **497**:286-292.
- Fernandes, C. P., F. B. de Almeida, A. N. Silveira, M. S. Gonzalez, C. B. Mello, D. Feder, R. Apolinario, M. G. Santos, J. C. Tavares Carvalho, L. A. Candido Tietbohl, L. Rocha, and D. Q. Falcao. 2014. Development of an insecticidal nanoemulsion with Manilkara subsericea (Sapotaceae) extract. *Journal of Nanobiotechnology* **12**.

- Fernandes, C. P., M. P. Mascarenhas, F. M. Zibetti, B. G. Lima, R. P. R. F. Oliveira, L. Rocha, and D. Q. Falcao. 2013. HLB value, an important parameter for the development of essential oil phytopharmaceuticals. *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy* **23**:108-114.
- Freitas, F. P., S. P. Freitas, G. C. S. Lemos, I. J. C. Vieira, G. A. Gravina, and F. J. A. Lemos. 2010. Comparative Larvicidal Activity of Essential Oils from Three Medicinal Plants against *Aedes aegypti* L. *Chemistry & Biodiversity* **7**:2801-2807.
- Godoy, M., w. Pacheco, and A. Malavasi. 2011a. Moscas-das-frutas quarentenárias para o Brasil. Pages 113-131 in R. Silva, W. Lemos, and R. Zucchi, editors. *Moscas-das-frutas na Amazônia brasileira: diversidade, hospedeiros e inimigos naturais*. EMBRAPA, Macapá, Amapá, Brasil.
- Godoy, M., W. Pacheco, R. Portal, J. Filho, and L. Moraes. 2011b. Programa Nacional de Erradicação da Mosca-da-Carambola in R. Silva, W. Lemos, and R. Zucchi, editors. *Moscas-das-Frutas na Amazônia Brasileira Diversidade, Hospedeiros e Inimigos Naturais*. Embrapa, Macapá, Amapá.
- Harmouzi, A., A. Boughdad, Y. El Ammari, and A. Chaouch. 2016. Chemical composition and toxicity of Moroccan *Tetraclinis articulata* and *Juniperus phoenicea* essential oils against *Aphis citricola* Goot, 1912 (Homoptera, Aphididae). *Research on Chemical Intermediates* **42**:7185-7197.
- He, X. J., and H. M. Hwang. 2016. Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. *Journal of Food and Drug Analysis* **24**:671-681.
- Irache, J. M., I. Esparza, C. Gamazo, M. Agueeros, and S. Espuelas. 2011. Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics. *Veterinary Parasitology* **180**:47-71.
- Isman, M. B. 2014. Botanical Insecticides: A Global Perspective. Pages 21-30 in A. D. Gross, J. R. Coats, S. O. Duke, and J. N. Seiber, editors. *Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities*.
- Isman, M. B. 2015. A renaissance for botanical insecticides? *Pest Management Science* **71**:1587-1590.
- Jackman, J. A., B. K. Yoon, D. L. Li, and N. J. Cho. 2016. Nanotechnology Formulations for Antibacterial Free Fatty Acids and Monoglycerides. *Molecules* **21**.
- Jamila, F., and E. Mostafa. 2014. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. *Journal of Ethnopharmacology* **154**:76-87.
- Jesus-Barros, C. R., O. M. Cruz, and R. Adaime. 2015. *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae): new alternate host to carambola fruit fly in Brazil. *biota amazonia* **5**:117-118.
- Jesus, C. R., R. A. Silva, M. F. Souza Filho, E. G. Deus, and R. A. Zucchi. 2010. First Record of *Anastrepha pseudanomala* Norrbom (Diptera: Tephritidae) and its Host in Brazil. *Neotropical Entomology* **39**:1059-1060.
- Jordão, A. L., and R. A. Silva. 2006. *Guia de pragas agrícolas para o manejo integrado no Estado do Amapá*. Holos Editora, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

- Kazmierczak, R., E. Hallmann, and E. Rembalkowska. 2015. Effects of organic and conventional production systems on the content of bioactive substances in four species of medicinal plants. *Biological Agriculture & Horticulture* **31**:118-127.
- Kourniatis, L. R., L. S. Spinelli, C. R. Piombini, and C. R. E. Mansur. 2010. Formation of orange oil-in-water nanoemulsions using nonionic surfactant mixtures by high pressure homogenizer. *Colloid Journal* **72**:396-402.
- Kumar, S., N. Wahab, and R. Warikoo. 2011. Bioefficacy of *Mentha piperita* essential oil against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **1**:85-88.
- Lemos, L. D. N., R. Adaime, C. R. De Jesus-Barros, and E. D. G. De Deus. 2014. New hosts of *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae) in Brazil. *Florida Entomologist* **97**:841-843.
- Li, G. P., C. Cervelli, B. Ruffoni, A. Shachter, and N. Dudai. 2016. Volatile diversity in wild populations of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from the Tyrrhenian Sea vicinity cultivated under homogeneous environmental conditions. *Industrial Crops and Products* **84**:381-390.
- Liporacci, H. S. N., and D. G. Simão. 2013. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais nos quintais do Bairro Novo Horizonte, Ituiutaba, MG. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* **15**:529-540.
- Lopez, M. D., and M. J. Pascual-Villalobos. 2010. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Industrial Crops and Products* **31**:284-288.
- Malavasi, A. 2009. *Biologia, Ciclo de Vida, Relação com o Hospedeiro, Espécies Importantes e Biogeografia de Tefritídeos*. In A. Malavasi and J. Virginio, editors. *Biologia, Monitoramento e controle de Moscas-das-Frutas*. Moscamed Brasil, Juazeiro, Bahia, Brasil.
- Marchioro, C. A. 2016. Global Potential Distribution of *Bactrocera carambolae* and the Risks for Fruit Production in Brazil. *PLoS One* **11**.
- McClements, D. J. 2012. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* **8**:1719-1729.
- Miresmailli, S., and M. B. Isman. 2014. Botanical insecticides inspired by plant-herbivore chemical interactions. *Trends in Plant Science* **19**:29-35.
- Nenaah, G. E., S. I. A. Ibrahim, and B. A. Al-Assiuty. 2015. Chemical composition, insecticidal activity and persistence of three Asteraceae essential oils and their nanoemulsions against *Callosobruchus maculatus* (F.). *Journal of Stored Products Research* **61**:9-16.
- Oliveira, A. E. M. F. M., J. L. Duarte, J. R. R. Amado, R. A. S. Cruz, C. F. Rocha, R. N. P. Souto, R. M. A. Ferreira, K. Santos, E. C. da Conceição, L. A. R. de Oliveira, A. Kelecom, C. P. Fernandes, and J. C. T. Carvalho. 2016. Development of a Larvicidal Nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* Vogel Oil. *PLoS One* **11**.
- Ostertag, F., J. Weiss, and D. J. McClements. 2012. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *Journal of Colloid and Interface Science* **388**:95-102.
- Pant, M., S. Dubey, P. K. Patanjali, S. N. Naik, and S. Sharma. 2014. Insecticidal activity of eucalyptus oil nanoemulsion with karanja and jatropha aqueous filtrates. *International Biodeterioration & Biodegradation* **91**:119-127.

- Rattan, R. S. 2010. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection* **29**:913-920.
- Regnault-Roger, C. 1997. - The potential of botanical essential oils for insect pest control. - **2**.
- Rehman, J. U., A. Ali, and I. A. Khan. 2014. Plant based products: Use and development as repellents against mosquitoes: A review. *Fitoterapia* **95**:65-74.
- Rodrigues, E. d. C. R., A. M. Ferreira, J. C. E. Vilhena, F. B. Almeida, R. A. S. Cruz, A. C. Florentino, R. N. P. Souto, J. C. T. Carvalho, and C. P. Fernandes. 2014. Development of a larvicidal nanoemulsion with Copaiba (*Copaifera duckei*) oleoresin. *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy* **24**:699-705.
- Rodriguez-Rojo, S., S. Varona, M. Nunez, and M. J. Cocero. 2012. Characterization of rosemary essential oil for biodegradable emulsions. *Industrial Crops and Products* **37**:137-140.
- Santhosh, C., V. Velmurugan, G. Jacob, S. K. Jeong, A. N. Grace, and A. Bhatnagar. 2016. Role of nanomaterials in water treatment applications: A review. *Chemical Engineering Journal* **306**:1116-1137.
- Satalkar, P., B. S. Elger, and D. M. Shaw. 2016. Defining Nano, Nanotechnology and Nanomedicine: Why Should It Matter? *Science and Engineering Ethics* **22**:1255-1276.
- Sauers-Muller, A. 1991. AN OVERVIEW OF THE CARAMBOLA FRUIT-FLY BACTROCERA SPECIES (DIPTERA, TEPHRITIDAE), FOUND RECENTLY IN SURINAM. *Florida Entomologist* **74**:432-440.
- Savaris, M., S. Lampert, A. L. Marsaro-Junior, R. Adaime, and M. F. De Souza-Filho. 2013. First record of anastrepha fraterculus and ceratitis capitata (diptera, tephritidae) on arecaceae in brazil. *Florida Entomologist* **96**:1597-1599.
- Schutze, M. K., N. Aketarawong, W. Amornsak, K. F. Armstrong, A. A. Augustinos, N. Barr, W. Bo, K. Bourtzis, L. M. Boykin, C. Caceres, S. L. Cameron, T. A. Chapman, S. Chinvinijkul, A. Chomic, M. De Meyer, E. Drosopoulou, A. Englezou, S. Ekesi, A. Gariou-Papalexidou, S. M. Geib, D. Hailstones, M. Hasanuzzaman, D. Haymer, A. K. W. Hee, J. Hendrichs, A. Jessup, Q. Ji, F. M. Khamis, M. N. Krosch, L. Leblanc, K. Mahmood, A. R. Malacrida, P. Mavragani-Tsipidou, M. Mwatawala, R. Nishida, H. Ono, J. Reyes, D. Rubinoff, M. San Jose, T. E. Shelly, S. Srikachar, K. H. Tan, S. Thanaphum, I. Haq, S. Vijayasegaran, S. L. Wee, F. Yesmin, A. Zacharopoulou, and A. R. Clarke. 2015. Synonymization of key pest species within the Bactrocera dorsalis species complex (Diptera: Tephritidae): taxonomic changes based on a review of 20 years of integrative morphological, molecular, cytogenetic, behavioural and chemoeological data. *Systematic Entomology* **40**:456-471.
- Selmi, S., S. El-Fazaa, and N. Gharbi. 2015. Oxidative stress and alteration of biochemical markers in liver and kidney by malathion in rat pups. *Toxicology and Industrial Health* **31**:783-788.
- Silva, G. A. 2004. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surgical Neurology* **61**:216-220.
- Silva, R. A., E. G. Deus, J. D. B. Pereira, C. R. Jesus, M. F. Souza-Filho, and R. A. Zucchi. 2011. Conhecimento sobre moscas-das-frutas no Estado do Amapá. Pages

- 225-236 in R. Silva, P. Lemos, and R. Zucchi, editors. *Moscas-das-frutas na Amazônia brasileira: diversidade, hospedeiros e inimigos naturais*. Embrapa, Macapá, Amapá, Brasil.
- Silva, T. d. L., A. L. Lima, M. d. S. M. d. Sousa, C. R. d. Jesus-Barros, A. Bariani, J. F. Pereira, and R. Adaime. 2016. Potential of Amazonian Isolates of *Metarhizium* to Control Immatures of *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist* **99**:788-789.
- Silva, W. J., G. A. A. Doria, R. T. Maia, R. S. Nunes, G. A. Carvalho, A. F. Blank, P. B. Alves, R. M. Marcal, and S. C. H. Cavalcanti. 2008. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresource Technology* **99**:3251-3255.
- Simmonds, M. S. J. 1998. Chemoecology: The legacy left by Tony Swain. *Phytochemistry* **49**:1183-1190.
- Simões, C. O., and V. Spitzer. 2010. Óleos Voláteis. in E. P. S. C. O. Simões, G. Gosmann, J. P. Mello, L. A. Mentz, and P. R. Petrovick, editor. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. .
- Solans, C., P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar, and M. J. Garcia-Celma. 2005. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **10**:102-110.
- Sugumar, S., S. K. Clarke, M. J. Nirmala, B. K. Tyagi, A. Mukherjee, and N. Chandrasekaran. 2014. Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus* - CORRIGENDUM. *Bulletin of Entomological Research* **104**:403-403.
- Surassmo, S., S.-G. Min, P. Bejrappa, and M.-J. Choi. 2010. Effects of surfactants on the physical properties of capsicum oleoresin-loaded nanocapsules formulated through the emulsion-diffusion method. *Food Research International* **43**:8-17.
- Tak, J. H., E. Jovel, and M. B. Isman. 2016. Comparative and synergistic activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil constituents against the larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science* **72**:474-480.
- Tietbohl, L. A. C., T. Barbosa, C. P. Fernandes, M. G. Santos, F. P. Machado, K. T. Santos, C. B. Mello, H. P. Araujo, M. S. Gonzalez, D. Feder, and L. Rocha. 2014. Laboratory evaluation of the effects of essential oil of *Myrciaria floribunda* leaves on the development of *Dysdercus peruvianus* and *Oncopeltus fasciatus*. *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy* **24**:316-321.
- Triplehorn, C. A., and N. F. Jonnson. 2011. *Estudo dos insetos*. Learning, São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Uramoto, K., and R. A. Zucchi. 2009. Taxonomia de Espécies de *Anastrepha* (Diptera, Tephritidae). in A. Filho, M and J. f. Virginio, editors. *Biologia, Monitoramento e controle de Moscas-das-Frutas*. Moscamed Brasil, Juazeiro, Bahia, Brasil.
- Vargas, R. I., J. C. Pinero, and L. Leblanc. 2015. An Overview of Pest Species of *Bactrocera* Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) and the Integration of Biopesticides with Other Biological Approaches for Their Management with a Focus on the Pacific Region. *Insects* **6**:297-318.
- Vaucher, R. d. A., J. L. Giongo, L. P. Bolzan, M. S. Correa, V. P. Fausto, C. F. dos Santos Alves, L. Q. Soares Lopes, A. A. Boligon, M. L. Athayde, A. P. Moreira, A. Brandelli, R. P. Raffin, and R. C. Vianna Santos. 2015. Antimicrobial activity of

- nanostructured Amazonian oils against *Paenibacillus* species and their toxicity on larvae and adult worker bees. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **18**:205-210.
- Vianna Santos, R. C., L. Q. Soares Lopes, C. F. Dos Santos Alves, V. P. Fausto, K. Pizzutt, V. Barboza, M. E. De Souza, R. P. Raffin, P. Gomes, D. Takamatsu, Y. Morinaga, A. A. Boligon, M. L. Athayde, C. C. Felippi, and R. D. A. Vaucher. 2014. Antimicrobial activity of tea tree oil nanoparticles against American and European foulbrood diseases agents. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **17**:343-347.
- Vilela, E. F., R. Zucchi, and F. Cantor. 2001. *Históricos e Impactos Das Pragas Introduzidas no Brasil*. Holos, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.
- Waksmundzka-Hajnos, M., J. Sherma, and T. Kowalska. 2008. *Thin layer chromatography in phitochemistry*. CRC Press, New York, New York, EUA.
- Zucchi, R. A. 2001. Mosca-do-mediterrâneo, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae).in E. F. Vilela, R. A. Zucchi, and F. Cantor, editors. *Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil*. Holos, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.
- Zucchi, R. A. 2008. Fruit flies in Brazil - *Anastrepha* species their host plants and parasitoids. Page

6. CONCLUSÕES

- A nanoemulsão do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. apresenta atividade inseticida contra adultos de *Bactrocera carambolae*;
- Machos de *B.carambolae* são mais vulneráveis à ação inseticida da nanoemulsão do óleo essencial de *R. officinalis*
- O nosso estudo fornece uma nova alternativa baseada no óleo essencial de *R. officinalis*, que é uma planta de óleo essencial cultivada em todo o mundo e que pode atender a uma grande demanda. Além disso, propomos a utilização deste óleo essencial como um nanoestruturado preparado por um método simples de baixa energia, baixo custo e sem solventes, sendo um verdadeiro nanoproduto “ecofriendly”. Considerando a importância econômica do controle de *B. carambolae* e seu possível efeito negativo ao longo do mundo, acreditamos que este estudo abre perspectivas para novos agentes inseticidas contra esta praga, o que pode ser muito importante para a fruticultura.

ANEXO 1. Submission Confirmation for Journal of Pest Science

14/02/2017

PEST-D-17-00086: "Evaluation of lethal effect of the nanoemulsion prepared with Rosmarinus officinalis L. essential oil against Bactrocera carambolae Drew and Hancock (Diptera: Tephritidae)" - igor andrej pinheiro sidonio

PEST-D-17-00086: "Evaluation of lethal effect of the nanoemulsion prepared with Rosmarinus officinalis L. essential oil against Bactrocera carambolae Drew and Hancock (Diptera: Tephritidae)"

Journal of Pest Science (PEST) <em@editorialmanager.com>

14/02/2017 01:29

Para: Igor Andrej Pinheiro Sidônio <igor.sidonio@hotmail.com>:

13 Feb 2017

Submission ID: PEST-D-17-00086

Dear Mr Sidônio,

The submission entitled "Evaluation of lethal effect of the nanoemulsion prepared with Rosmarinus officinalis L. essential oil against Bactrocera carambolae Drew and Hancock (Diptera: Tephritidae)" submitted by Dr. Caio Fernandes has been received by the Editorial Office of Journal of Pest Science. You are listed as a co-author.

The paper has been submitted to the journal by Dr. Caio Fernandes who will be able to track the status of the paper through his/her login.

Thank you very much.

Kind regards,
Springer Journals Editorial Office
Journal of Pest Science

