



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

ATIVIDADE INSETICIDA DE QUIMIOTIPOS DE *Lippia gracilis* SOBRE *Diaphania hyalinata* E *Cryptolestes ferrugineus*

CARLISSON RAMOS MELO

2014



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

CARLISSON RAMOS MELO

ATIVIDADE INSETICIDA DE QUIMIOTIPOS DE *Lippia gracilis* SOBRE *Diaphania hyalinata* E *Cryptolestes ferrugineus*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

Orientador
Prof. Dr. Leandro Bacci

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2014

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

M528a Melo, Carlisson Ramos
Atividade inseticida de quimiotipos de *Lippia gracilis* sobre *Diaphania hyalinata* e *Cryptolestes ferrugíneus* / Carlisson Ramos Melo ; orientador Leandro Bacci. – São Cristóvão, 2014.
49 f. : il.

Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade) –
Universidade Federal de Sergipe, 2014.

1. Agrobiodiversidade. 2. Alecrim-da-chapada. 3.
Crambidae. 4. *Cucujidae*. 5. *Apis mellifera*. 6. *Polybia micans*. I.
Bacci, Leandro, orient. II. Título

CDU: 635.71:582.929.3

CARLISSON RAMOS MELO

ATIVIDADE INSETICIDA DE QUIMIOTIPOS DE *Lippia gracilis* SOBRE *Diaphania hyalinata* E *Cryptolestes ferrugineus*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

APROVADA em 30 de setembro de 20 14.

Prof. Dr. Vinícius Albano Araújo
UFV

Profa. Dra. Ana Paula Albano Araújo
UFS

Prof. Dr. Leandro Bacci
UFS
(Orientador)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

*A meus pais, Carlos Robison e Maria Tereza Melo, que nunca pouparam esforços e carinho
para tornar minha vida plena.*
Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado o dom da vida.

À Universidade Federal de Sergipe pela oportunidade de realização deste mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa.

Ao professor Dr. Leandro Bacci, pelos ensinamentos, dedicação, paciência, conselhos, puxões de orelha e pela amizade construída nestes anos de pesquisa; sem a sua orientação este trabalho não seria possível.

A professora Dr^a. Ana Paula Araújo pela dedicação, apoio e grande orientação.

Ao professor Dr. Marcelo Picanço pelo valioso conhecimento transmitido, dedicação, paciência e grande apoio na realização deste trabalho.

Ao comitê de Orientação pelo apoio e contribuição na dissertação.

A todos os professores do curso pelos grandes ensinamentos.

À minha família por toda estrutura e apoio que me deram ao longo da minha vida.

Aos meus pais que sempre foram a base de tudo que construí até hoje.

À minha irmã, que por mais que esteja longe sempre me enche de carinho.

Aos meus companheiros de laboratório, que ao longo desses dois anos se tornaram grandes amigos: Abraão, Alexandre, Alisson, Anderson, Ane, Bia, Bruna, Morgana e Lazara.

Ao grupo do laboratório de MIP da UFV que me recebeu de braços abertos e me auxiliou no desenvolvimento de parte deste estudo, em especial a Iza, Mirian, Júlia, Tânia, Tamires, Mayara e Elizeu.

Aos amigos Juliana, Albérico e Deise por sempre estarem ao meu lado.

BIOGRAFIA

CARLISSON RAMOS MELO, filho de Carlos Robison Meneses Melo e Maria Tereza Vieira Ramos Melo, nasceu na cidade de Aracaju, no estado de Sergipe, em 25 de dezembro de 1988.

Em Janeiro de 2012, graduou-se em Ciências Biológicas Bacharelado pela Universidade Federal de Sergipe, em São Cristóvão, Sergipe, onde foi bolsista de extensão no laboratório de Ecologia Vegetal entre os anos de 2008 e 2009. Posteriormente também foi bolsista de extensão no laboratório de Bacteriologia entre os anos de 2010 e 2011.

Em 2012, iniciou o mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais, na Universidade Federal de Sergipe, onde em 2014 fez a migração para o programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO GERAL	5
2. REFERENCIAL TEÓRICO	6
2.1. Perdas ocasionadas por pragas	6
2.1.1. <i>Diaphania hyalinata</i> – pragas de hortaliças	6
2.1.2. <i>Cryptolestes ferrugineus</i> – pragas de grãos armazenados	7
2.2. Óleos essenciais	7
2.3. Composição dos óleos essenciais e quimiotipos	8
2.4. <i>Lippia gracilis</i>	9
2.5. Óleo essencial de <i>L. gracilis</i>	9
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
4. ARTIGO 1: TOXICIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE DOIS QUIMIOTIPOS DE <i>Lippia gracilis</i> E SEUS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS SOBRE <i>Diaphania hyalinata</i> E ORGANISMOS NÃO-ALVO	15
Resumo.....	15
Abstract	16
4.1. Introdução	17
4.2. Material e Métodos	17
4.3. Resultados e Discussão	20
4.4. Conclusões	23
4.5. Referências Bibliográficas	24
Figuras e Tabelas	26
5. ARTIGO 2: ÓLEOS ESSENCIAIS DE QUIMIOTIPOS DE <i>Lippia gracilis</i> E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS: TOXIDADE E EFEITOS COMPORTAMENTAIS EM <i>Cryptolestes ferrugineus</i>	32
Resumo.....	32
Abstract	33
5.1. Introdução	34
5.2. Material e Métodos	34
5.3. Resultados e Discussão	37
5.4. Conclusões	39
5.5. Referências	40
Figuras e Tabelas	42
6. CONCLUSÕES GERAIS	49

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.1 Cromatogramas dos óleos essenciais dos genótipos LG-106 (quimiotipo timol) (A) e LG-109 (quimiotipo carvacrol) (B) de <i>L. gracilis</i>	44
1.2 Curvas de sobrevivência de dois óleos essenciais dos quimiotipos de <i>L. gracilis</i> e seus compostos majoritários sobre lagartas de segundo instar de <i>D. hyalinata</i> na DL ₉₀ dos biosensaio de toxicidade. TL ₅₀ = tempo letal para matar 50% da população (Teste de Log-rank: P < 0,001).....	45
1.3 Mortalidade de adultos de <i>A. mellifera</i> e <i>P. micans</i> expostos a DL ₈₀ para <i>D. hyalinata</i> de dois óleos essenciais dos quimiotipos de <i>L. gracilis</i> e seus compostos majoritários.....	46
1.4 Curvas de sobrevivência de dois óleos essenciais dos quimiotipos de <i>L. gracilis</i> e seus compostos majoritários sobre adultos de <i>A. mellifera</i> (A) e <i>P. micans</i> (B) na DL ₈₀ dos biosensaio de toxicidade de <i>D. hyalinata</i> . TL ₅₀ = tempo letal para matar 50% da população (Teste de Log-rank: P < 0,001).....	47
2.1 Toxicidade de óleos essenciais de dois quimiotipos de <i>L. gracilis</i> e seus compostos majoritários sobre adultos de <i>C. ferrugineus</i> por aplicação tópica (30 µg mg ⁻¹) e fumigação (54,32 µL L ⁻¹)	68
2.2 Curvas de sobrevivência de dois óleos essenciais dos quimiotipos de <i>L. gracilis</i> e seus compostos majoritários sobre adultos de <i>C. ferrugineus</i> na DL ₉₀ dos biosensaio de toxicidade. TL ₅₀ = tempo letal para matar 50% da população (Teste de Log-rank: $\chi^2 = 326,43$; gl = 4; p < 0,001)	69
2.3 Repelência de adultos de <i>C. ferrugineus</i> expostos durante 10min aos óleos essenciais de dois quimiotipos de <i>L. gracilis</i> e seus compostos majoritários em arenas de papel de filtro (6 cm de diâmetro). Histograma com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Wilcoxon (p < 0,05)	70
2.4 Irritabilidade de adultos de <i>C. ferrugineus</i> expostos durante 10min aos óleos essenciais de dois quimiotipos de <i>L. gracilis</i> e seus compostos majoritários em arenas de papel de filtro (6 cm de diâmetro). Histograma com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Wilcoxon (p < 0,01). * indica diferença significativa entre a área tratada e não tratada da arena (Teste de Wilcoxon, p < 0,05)	71

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1.1	Toxicidade (DL ₅₀ e DL ₉₀) dos óleos essenciais de dois quimiotipos de <i>L. gracilis</i> e seus compostos majoritários sobre lagartas de segundo ínstar de <i>D. hyalinata</i>	43
2.1	Composição dos óleos essenciais de dois genótipos de <i>L. gracilis</i> (LG-108 e LG-109) caracterizado por GC/MS e GC/FID	66
2.2	Toxicidade (DL ₅₀ e DL ₉₀) dos óleos essenciais de dois quimiotipos de <i>L. gracilis</i> e seus compostos majoritários sobre adultos de <i>C. ferrugineus</i>	67

RESUMO

MELO, Carlisson Ramos. **Atividade inseticida de quimiotipos de *Lippia gracilis* sobre *Diaphania hyalinata* e *Cryptolestes ferrugineus***. São Cristóvão: UFS, 2014. 72p. (Dissertação – Mestrado em Agricultura e Biodiversidade).*

Inseticidas organossintéticos são amplamente utilizados no controle de pragas em lavouras e em produtos armazenados. O uso abusivo destes produtos é responsável por diversos problemas econômicos e ambientais, o que tem gerado uma demanda crescente por métodos alternativos de controle. Os óleos essenciais de plantas têm sido estudados como uma alternativa viável ao manejo de pragas. Trabalhos recentes apontam que o óleo essencial do alecrim-de-tabuleiro *Lippia gracilis* apresenta grande potencial para bioprospecção de compostos inseticidas. Desta forma, objetivou-se neste trabalho estudar os óleos essenciais de dois quimiotipos de *L. gracilis* e seus compostos majoritários timol e carvacrol, avaliando: i) a toxicidade destes compostos sobre *Diaphania hyalinata* e a seletividade sobre os organismos não-alvos *Apis mellifera* e *Polybia micans*; e ii) a toxicidade e os efeitos comportamentais destes compostos sobre *Cryptolestes ferrugineus*. Os óleos essenciais de ambos quimiotipos de *L. gracilis* se mostraram tóxicos a *D. hyalinata*, sendo o quimiotipo carvacrol 29% mais tóxico do que o quimiotipo timol. Os monoterpenos timol e carvacrol quando aplicados isoladamente foram cerca de duas e cinco vezes mais tóxicos que seus quimiotipos, respectivamente. Os óleos essenciais atuaram de forma rápida causando mortalidade na metade da população de *D. hyalinata* em menos de três horas. Todos os tratamentos não foram seletivos à *A. mellifera* e *P. micans*. Os óleos essenciais e os compostos majoritários foram altamente tóxicos por fumigação aos adultos de *C. ferrugineus*. As concentrações dos óleos essenciais dos quimiotipos timol e carvacrol necessárias para causar 50% de mortalidade a *C. ferrugineus* foram 20,7 e 25,1 $\mu\text{L L}^{-1}$, respectivamente. O timol e o carvacrol isolados foram 1,7 e 1,9 vezes mais tóxicos a *C. ferrugineus*. Os óleos essenciais dos quimiotipos timol e carvacrol causaram mortalidade em metade da população de *C. ferrugineus* em 63,3 e 83,1 horas. Todos os tratamentos causaram repelência e irritabilidade em adultos de *C. ferrugineus*. Assim, nossos resultados mostram o grande potencial dos óleos essenciais de *L. gracilis* e seus compostos majoritários para o desenvolvimento de novos produtos a serem utilizados no controle de pragas em campo e nos produtos armazenados.

Palavras-chave: Alecrim-da-chapada, Crambidae, Cucujidae, *Apis mellifera*, *Polybia micans*.

* Comitê Orientador: Leandro Bacci – UFS (Orientador), Ana Paula Albano Araújo – UFS e Marcelo Coutinho Picanço – UFV.

ABSTRACT

MELO, Carlisson Ramos. **Insecticidal activity of *Lippia gracilis* chemotypes against *Diaphania hyalinata* and *Cryptolestes ferrugineus***. São Cristóvão: UFS, 2014. 72p. (Thesis - Master of Science in Agriculture and Biodiversity).*

Organo-synthetic insecticides are widely used to control pests in crops and stored products. The indiscriminate use of these products are responsible for many economic and environmental problems, which has been generating a growing demand for alternative control methods. The essential oils of plants have been studied as a viable alternative to pest management. Recent jobs indicate that the essential oil of alecrim-de-tabuleiro *Lippia gracilis* presents great potential for bioprospection insecticide compounds. Thus, the aim of the present work was study the essential oils of two chemotypes of *L. gracilis* and their major compounds thymol and carvacrol, evaluating: i) the toxicity of these compounds against *Diaphania hyalinata* and selectivity over non-target organisms *Apis mellifera* and *Polybia micans* ii) the toxicity and behavioral effects of these compounds over *Cryptolestes ferrugineus*. The essential oils of both chemotypes of *L. gracilis* were toxic to *D. hyalinata*. The carvacrol chemotype was 29% more toxic than thymol chemotype. The monoterpenes thymol and carvacrol when applied alone, were about two and five times more toxic than their respective chemotypes. Essential oils acted very quickly causing mortality in half the population of *D. hyalinata* in less than three hours. All treatments were not selective in favor of *A. mellifera* and *P. micans*. The essential oils and the major compounds were highly toxic by fumigation to adults of *C. ferrugineus*. The concentrations of the thymol and carvacrol chemotypes required to cause 50% mortality of *C. ferrugineus* were 20.7 and 25.1 $\mu\text{L L}^{-1}$, respectively. The isolated thymol and carvacrol were 1.7 and 1.9 times more toxic to *C. ferrugineus*. Essential oils thymol and carvacrol chemotypes caused a mortality half the population of *C. ferrugineus* in 63.3 and 83.1 hours. All treatments caused repellency and irritability in adult *C. ferrugineus*. Thus, our results show the great potential of essential oils of *L. gracilis* and their major compounds for the development of new products to be used in the pest control field and in stored products.

Keywords: Alecrim-da-chapada, Crambidae, Cucujidae, *Apis mellifera*, *Polybia micans*.

* Supervising Committee: Leandro Bacci – UFS (Orientador), Ana Paula Albano Araújo – UFS e Marcelo Coutinho Picanço – UFV.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A descoberta, síntese e utilização em larga escala de moléculas inseticidas foi um marco importante para o desenvolvimento da agricultura. Contudo, o uso inadequado desses produtos têm gerado ao longo dos anos inúmeros impactos negativos ao meio ambiente e aos organismos não alvo (VAZ JÚNIOR, 2013). Apesar das desvantagens do uso dos inseticidas sintéticos serem amplamente difundidas, a venda no Brasil vem crescendo nos últimos anos. Somente de 2012 a 2013 houve um aumento de 26% na comercialização destes produtos (MAPA, 2014). Alternativas para a redução dos impactos negativos vêm sendo estudadas, sendo o manejo integrado de pragas e o uso de produtos de origem botânica os que apresentam maior relevância.

Os inseticidas botânicos vêm sendo estudados com o intuito de se descobrir novas moléculas com atividade inseticida que possam ser utilizadas no manejo de pragas. As vantagens desses produtos, quando comparado aos inseticidas sintéticos, incluem rápida ação e degradação, seletividade a organismos não alvo e baixo custo (EMBRAPA, 2005). Estudos desenvolvidos recentemente demonstraram que alguns óleos essenciais de plantas são altamente tóxicos aos insetos (ALBUQUERQUE et al. 2013; LIMA et al. 2013), reforçando a importância da busca sobre a identidade dos compostos responsáveis pela bioatividade destes óleos.

A composição química dos óleos essenciais pode ser determinada por diversos fatores que interferem no metabolismo secundários das plantas. Dentre estes fatores, pode-se ressaltar as interações entre planta-microorganismos planta-insetos, planta-planta, e as condições edafoclimáticas como: temperatura; altitude; disponibilidade de luz, água e nutrientes (MORAIS, 2009). Estas diferentes pressões ambientais podem resultar no surgimento de plantas da mesma espécie com diferentes composições químicas, os chamados quimiotipos.

Dentre as plantas que tem seus óleos essenciais estudados, *Lippia gracilis* Schauer, conhecida como alecrim – da – chapada, apresenta grande potencial para bioprospecção de compostos farmacológicos e pesticidas (PEREIRA et al., 2008; SILVA et al., 2008; CRUZ et al., 2013; MELO, et al., 2013). *L. gracilis* é uma planta da família Verbenaceae nativa do nordeste brasileiro, encontrada principalmente nos estados da Bahia, Sergipe e Piauí. Inúmeras propriedades medicinais são atribuídas a ela, com destaque para o tratamento de bronquites, congestões nasais, dores de cabeça, doenças cutâneas e ação antimicrobiana (GUILHON et al., 2011). Suas folhas são ricas em óleo essencial de odor forte e normalmente agradável. Monoterpenos e sesquiterpenos compõem em quase sua totalidade o óleo essencial de *L. gracilis*, dos quais o timol, carvacrol, metil timol, o-cimeno, p-cimeno, γ -terpeno e β -cariofileno apresentam-se em maior proporção (TELES et al., 2010).

Tendo em vista o potencial de utilização desta planta, nesta dissertação objetivou-se estudar os óleos essenciais de dois quimiotipos de *L. gracilis* e seus compostos majoritários timol e carvacrol, avaliando: i) a toxicidade destes compostos sobre *Diaphania hyalinata* e a seletividade sobre os organismos não alvos *Apis mellifera* e *Polybia micans* e ii) a toxicidade e os efeitos destes compostos sobre o comportamento de *Cryptolestes ferrugineus*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Perdas ocasionadas por pragas

Os insetos são os organismos mais abundantes e diversos na natureza. Ocupam uma ampla variedade de hábitos e nichos ecológicos ao longo das cadeias tróficas apresentando grande relevância para o funcionamento dos ecossistemas. Por outro lado, muitos destes organismos apresentam ampla importância econômica por causarem danos em diversas culturas agrícolas, tanto no campo como no armazenamento. Por isso, ao longo do tempo, o homem vem buscando formas de combater insetos-praga a fim de minimizar os danos causados pelos mesmos (GALLO et al., 2002).

Durante a Segunda Guerra Mundial, com o advento dos inseticidas sintéticos, o controle de pragas passou a ser realizado quase que exclusivamente por meio do controle químico. Inicialmente, os inseticidas sintéticos foram caracterizados por sua alta eficiência, facilidade de obtenção e aplicação no campo. Estas características contribuíram por priorizar o uso dos inseticidas sintéticos em detrimento dos produtos naturais. No entanto, a falta de conhecimento e/ou acompanhamento técnico sobre o manuseio adequado dos inseticidas sintéticos têm ocasionado um elevado número de aplicações, uso de dosagens acima das recomendadas e desrespeito ao período de carência (LOPES, 2012). O uso intensivo e inadequado destes produtos tem ocasionado uma série de problemas econômicos, sociais, ecológicos e ambientais.

Dentre tais problemas destacam-se a indução de resistência dos insetos a diversas classes de inseticidas, contaminação ambiental, intoxicação de aplicadores e consumidores, efeitos indesejados em organismos não alvo e persistência ao longo da cadeia trófica (MENEZES, 2005). Apesar disso, os inseticidas organossintéticos ainda consistem no método mais utilizado no controle de insetos (LIMA, 2012). Desta forma, a intensificação de pesquisas visando à obtenção de métodos de controle alternativos que se enquadrem nos princípios do manejo integrado de pragas, torna-se uma necessidade crescente para o controle de pragas no campo e nos produtos armazenados (COITINHO et al., 2010).

2.1.1 *Diaphania hyalinata* – pragas de hortaliças

A produção de hortaliças abrange cerca de 2,2 milhões de hectares plantados anualmente em todo o mundo tendo grande importância econômica e social devido ao elevado número de plantas utilizadas na alimentação humana (LOPES, 2012).

A família Curcubitaceae apresenta inúmeros insetos fitófagos associados que podem causar danos diretos e indiretos comprometendo a produtividade dessas culturas. Dentre as principais pragas que atacam plantas esta família está a broca-das-curcubitáceas *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Pyralidae). Este inseto oligófago que causa danos que podem chegar, em algumas situações, a perda total da produção dos frutos de pepino, abóboras e chuchu (PICANÇO & MARQUINI, 1999; GUEDES, 2010; PICANÇO et al., 2000 apud. GONRING, 2000). Além dos frutos, as lagartas desse inseto podem atacar ramos, brotos novos, folhas e flores (GONRING, 2000).

As lagartas possuem coloração verde com duas listras brancas ao longo do dorso. A fase larval dura de 9 a 14 dias, passando por cinco instares. As pupas são de coloração amarronzada e normalmente encontram-se sobre as folhas secas ou solo. Esta fase tem duração de seis a oito dias. Na fase adulta este inseto é uma mariposa de 30 mm de envergadura, 15 mm de comprimento e coloração marrom. As asas são semi-transparentes com área central branca e faixas retilíneas escuras no bordo. A longevidade dura de 3 a 16 dias e todo o ciclo de vida entre 27 e 34 dias (HERNÁNDEZ et al., 1995). A postura é realizada principalmente nas faces abaxial e adaxial das folhas (ANTÔNIO, et al., 2002).

O controle da broca das curcubitáceas é efetuado basicamente com a pulverização de inseticida piretróides, organofosforados e carbamatos (BARBOSA et al., 2006).

2.1.2 *Cryptolestes ferrugineus* – pragas de grãos armazenados

Após a colheita muitos produtos agrícolas especialmente grãos, sementes e produtos processados, são frequentemente atacados por pragas primárias e secundárias (LORINI et al., 2009). A extensão dos danos em pós-colheita causados por insetos é de difícil quantificação. A perda pode-se dar por meio da redução do peso, da qualidade nutricional e da viabilidade da semente ou, ainda, pela contaminação por microrganismos e por exigências de países importadores (FARONI & SILVA, 2008).

Dentre os insetos que atacam produtos armazenados, o besouro *Cryptolestes ferrugineus* (Steohens, 1831) (Coleoptera: Cucujidae) é a praga secundária de maior importância no armazenamento de soja, milho, trigo, arroz, cevada, aveia, frutos secos e nozes (CAMPO et al., 2012). A ocorrência de *C. ferrugineus* nestes produtos normalmente acontece em associação ou após infestação por *Sitophilus* sp. e *Rhyzopertha* sp. *C. ferrugineus* apresenta distribuição cosmopolita, sendo encontrado em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (EVANS, 1981 apud. ATHIÉ & DE PAULA, 2002). No Brasil, este inseto ocorre em todas as regiões produtoras de grãos e sementes (CAMPO et al., 2012). Além de infestar estes produtos também encontra-se em estruturas de armazenamento como moegas, moinhos, máquinas de limpeza, elevadores, secadores, túneis, fundos de silos e caixas de expedição (BOOTH et al., 1990). *C. ferrugineus* normalmente aparece em grandes quantidades em armazéns logo após o tratamento químico, visto que esta praga é resistente a diversas classes de inseticidas (CAMPO et al., 2012).

Os adultos são pequenos besouros de aproximadamente 2,5 mm de comprimento, de corpo achatado e antenas longas. Têm cor marrom-avermelhada e grande facilidade de deslocamento. As posturas são realizadas na superfície ou no interior da massa de grãos, onde cada fêmea pode ovopositar de 300 a 400 ovos (CAMPO et al., 2012). As larvas se alimentam preferencialmente do germe do grão, passando por 4 ínstaes (BISHOP, 1959). A fase de pupa ocorre em um casulo gelatinoso, o qual é usualmente coberto por partículas de alimento ou fixo entre dois grãos (ATHIÉ & DE PAULA, 2002). O ciclo de vida deste inseto pode variar de 17 a 100 dias a depender da temperatura e umidade da massa de grãos, possuindo um alto potencial reprodutivo em comparação com outras pragas de grãos armazenados (LORINI, 2008).

2.2 Óleos essenciais

As plantas são ricas em compostos com potencial uso para o controle de pragas no campo e no armazenamento. Dentre estes compostos destacam-se os óleos essenciais que têm demonstrado efeitos letais por diversas vias de exposição, além de efeitos subletais com alterações no comportamento dos insetos (MENEZES, 2005; CORRÊA & SALGADO, 2011).

Há cerca de dezesseis séculos, os óleos essenciais são conhecidos e estudados pelo homem. Sua finalidade é diversificada e tem evoluído através dos tempos (DONELIAN, 2004). Os óleos essenciais apresentam grande importância nas indústrias de perfumes, cosméticos e alimentos devido às suas propriedades aromáticas. Alguns óleos possuem atividade biológica, podendo ser utilizados no desenvolvimento de produtos farmacêuticos e inseticidas (BICK, 1985; SILVA et al., 2001; BAKKALI et al., 2008; SOUZA et al., 2010).

Alguns trabalhos vêm demonstrando que certos óleos essenciais apresentam grande potencial inseticida (CORRÊA & SALGADO, 2011). Kim *et al.* (2003) relatam atividade inseticida de cinco óleos essenciais de plantas aromáticas sobre os carunchos de feijão *Callosobruchus chinensis* (L.) e de arroz *Sitophilus oryzae* (L.). Os óleos essenciais de alho (*Allium scorodoprasm*), pimenta (*Capsicum annum*), rabanete (*Cochleria aroracia*), mostarda (*Brassica juncea*) e de canela (*Cinnamomum cassia*) foram testados através de contato direto sobre insetos, causando 100% de mortalidade ao caruncho de arroz. Resultado semelhante foi observado para o caruncho do feijão com os óleos de alho, mostarda e canela (KIM et al., 2003).

Apesar das vantagens declaradas, como a ação e degradação rápidas, toxicidade baixa a moderada para mamíferos, maior seletividade e baixa fitotoxicidade, os inseticidas botânicos apresentam algumas desvantagens que impedem sua pronta utilização em larga escala no campo. Dentre estas pode-se citar a utilização de composto sinergista, baixa persistência, carência de pesquisas, escassez do recurso natural, necessidade de padronização química e controle de qualidade, dificuldade de registro e custo (ISMAN, 2000; COSTA et al., 2004; MENEZES, 2005; CORRÊA & SALGADO, 2011). Tais desvantagens, no entanto, podem ser facilmente contornadas com a intensificação de mais pesquisas sobre o assunto.

2.3 Composição dos óleos essenciais e quimiotipos

Os óleos essenciais encontram-se armazenados dentro de organelas celulares das plantas chamadas vacúolos (DONELIAN, 2004). Estes podem estar difundidos por toda a planta ou localizados em regiões específicas, tais como flores, frutos, folhas, caules, raízes e sementes; tendo importante função na adaptação das plantas ao meio ambiente (SOUZA et al., 2010). Em temperatura ambiente apresentam aspecto oleoso, tendo como principal característica a volatilidade. Isto os diferencia dos óleos fixos, que são misturas de substâncias lipídicas, geralmente provenientes de sementes (MORAIS, 2009). Tais substâncias são frequentemente isoladas por hidrodestilação e arraste a vapor d'água (MORAIS, 2009; SONWA, 2000).

Os óleos essenciais são misturas complexas que podem conter 100 ou mais compostos orgânicos. Seus constituintes podem pertencer às mais diversas classes de compostos, sendo classificados em terpenos, compostos terpenóides oxigenados, compostos benzenóides e compostos contendo nitrogênio e/ou enxofre (CASTRO et al., 2004; DONELIAN, 2004; SONWA, 2000). Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (SIMÕES et al., 2007).

Os terpenos constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo este termo empregado para designar as estruturas químicas derivadas da fusão de unidades de isopreno (C_5H_8)_n (DONELIAN, 2004; SIMÕES et al., 2007). Quimicamente, a maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados de fenilpropenóides e de terpenóides, sendo que esses últimos são a classe de compostos mais preponderante. Os terpenos encontrados com maior frequência nos óleos essenciais são os monoterpenos e sesquiterpenos (CASTRO et al., 2004; BAKKALI et al., 2008). No entanto, apesar dos hidrocarbonetos serem quantitativamente significantes na composição de muitos destes óleos, eles possuem pouco valor odorizante e saborizante. Já os terpenos oxigenados, que compreendem álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, ésteres e óxidos; ocorrem nos diferentes óleos essenciais e são os maiores contribuintes dos seus distintos odores e sabores (MAGALHÃES, 1985).

Variações na composição química dos óleos essenciais entre plantas da mesma espécie podem resultar de diversos fatores, incluindo aspectos técnicos, genéticos e ambientais. Os vegetais, por não possuírem a capacidade de fuga imediata tiveram mecanismos de defesa selecionados que lhes permitiram maior capacidade de sobrevivência (LOVATTO et al., 2012) incluindo proteção contra condições ambientais adversas (PINTO-ZEVALLOS et al., 2013) e contra herbivoria. A produção de metabólitos secundários tóxicos (aleloquímicos) é amplamente conhecida como defesa contra herbivoria, com efeito tóxico, letais ou subletais. (ZHENG & DICKE, 2008; SCHOONHOVEN et al., 2006 apud. PINTO-ZEVALLOS et al., 2013). A composição química dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos, entretanto, outros fatores (exemplo interação planta – ambiente) podem provocar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários. Os estímulos provenientes do ambiente, no qual a planta está inserida, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos (MORAIS, 2009; SIMÕES et al., 2007). Estas diferentes pressões ambientais podem resultar no surgimento de quimiotipos, ou seja, plantas da mesma espécie que apresentam diferentes composições químicas. Segundo Magalhães (1985), a

alteração dos compostos majoritários pode influenciar diretamente na qualidade e, conseqüentemente, nos efeitos biológicos dos óleos essenciais.

Normalmente as defesas químicas das plantas é possível perceber que estas normalmente apresentam-se como misturas complexas de compostos, e não como substâncias individualizadas. Acredita-se que os constituintes menores encontrados em baixas percentagens podem estar atuando como agentes sinérgicos, melhorando a eficácia dos constituintes majoritários através de uma variedade de mecanismos (BERENBAUM, 1985 apud. LAURIN & MURRAY, 2001). Além disso, as misturas complexas também são menos susceptíveis à resistência e adaptação comportamental por parte dos insetos (BOMFORD & ISMAN, 1996; FENG & ISMAN, 1995 apud. LAURIN & MURRAY, 2001). Assim, as misturas complexas dos óleos essenciais podem ser mais eficientes do que os constituintes purificados, uma vez que seus diferentes constituintes podem apresentar relação de sinergia entre si (LAURIN & MURRAY, 2001).

Estudos demonstram que misturas binárias de compostos de óleos essenciais apresentam maior potencial inseticida quando comparado com os compostos puros (SINGH et al. 2009, LAURIN & MURRAY 2001). No entanto, alguns estudos também mostram que para *Litsea pungens* e *Litsea cubeba*, os compostos majoritários apresentavam atividade inseticida semelhante a dos óleos essenciais puros (JIANG et al 2009).

2.4. *Lippia gracilis*

A família Verbanaceae compreende cerca de 100 gêneros e 2000 espécies distribuídas mundialmente, com predominância nas regiões tropicais e subtropicais (PRADO; et al., 2012). O Brasil abriga aproximadamente 17 gêneros e 250 espécies desta família (SANTOS et. al, 2009). O gênero *Lippia* é o segundo maior da família, possuindo aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores. Os maiores centros de distribuição desse gênero se encontram em países das Américas Central e do Sul, assim como em territórios da África tropical. Aproximadamente 120 espécies do gênero são encontradas no Brasil, distribuídas no Cerrado e na Caatinga (GOMES, et al., 2011).

L. gracilis Schauer é uma planta nativa do nordeste brasileiro encontrada, principalmente, nos estados da Bahia, Sergipe e Piauí. No sertão nordestino esta espécie é popularmente conhecida como cidreira da serra, enquanto no agreste é conhecida por alecrim-da-chapada ou alecrim-de-tabuleiro (PRADO; et al., 2012). *L. gracilis* apresenta-se como um arbusto de aproximadamente 25 cm de altura, bem ramificada, de folhas pequenas e flores brancas, sendo ambas bastante odoríferas (GOMES et al.; 2011).

2.5. Óleo essencial de *L. gracilis*

As folhas de *L. gracilis* são ricas em óleo essencial. A composição química de seu óleo é basicamente constituída por substâncias voláteis, onde 80% corresponde a monoterpenos e 18% de sesquiterpenos (SILVA, et al., 2008). Esta espécie produz um óleo essencial que contém grandes quantidades de timol, carvacrol, metil timol, o-cimeno, p-cimeno, γ -terpeno e β -cariofileno (TELES et al., 2010; GUILHON et al., 2011).

O óleo de *L. gracilis* já é bastante conhecido pelas suas propriedades antimicrobiana e para o tratamento de doenças cutâneas, queimaduras, feridas e úlceras (PASCUAL et al., 2001; NETO et al., 2010; RIELLA et al., 2012). Mendes et al. (2010) demonstraram que este óleo apresenta características analgésicas e antiinflamatória, enquanto que Ferraz et al. (2013) mostraram seu potencial contra o câncer. Estudos recentes vêm apontando que o óleo essencial de *L. gracilis* também apresenta efeito tóxico sobre carrapatos e protozoários (CRUZ et al., 2013; MELO, et al., 2013). Além disso, atividade larvicida e inseticida vem sendo registrada, com destaque ao controle de pragas como o *Aedes aegypti* (PEREIRA et al., 2008; SILVA et al., 2008).

O timol, um dos compostos majoritários do óleo de *L. gracilis*, é uma substância que tem chamado atenção devido a suas diversas propriedades inseticidas, repelente e

fago-inibidoras (HUMMELBRUNNER & ISMAN, 2001; LIMA et al., 2011; LOPES, 2012). No entanto, a atividade inseticida dos óleos essenciais não pode ser atribuída somente ao composto majoritário, mas sim, as diversas interações entre estes e os compostos minoritários (LOPES, 2012).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, E.D.; LIMA, J.K.A.; SOUZA, F.H.O; SILVA, I.M.A.; SANTOS, A. A.; ARAÚJO, A.P.A.; BLANK A.F.; LIMA, R.N.; ALVES, P.B.; BACCI, L. Insecticidal and repellence activity of the essential oil of *Pogostemon cablin* against urban ants species. **Acta Tropical**. v. 127, p.181-186, 2013.
- ALBUQUERQUE, U.; MEDEIROS, P.; ALMEIDA, A.; MONTEIRO, J.; LINS NETO, E.; MELO, J.; SANTOS, J.; Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a qualitative approach. **Journal Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354, 2007.
- ANTÔNIO, A.; PICANÇO, M.; GONRING, A.; SEMEÃO, A.; GONTIJO, L.; GUERRA SOBRINHO, T. Ovoposição de *Diaphania hyalinata* L. (Lepidoptera, Pyralidae) afetada pela face foliar e tricomas. **Acta Scientiarum**. V. 24, n. 2, p. 359-362, 2002.
- ATHIÉ, I.; DE PAULA, D. **Insetos de grãos armazenados: aspectos biológicos e identificação**. 2ª ed., livraria Varela; São Paulo, 2002.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BARBOSA, G.; DIAS, R.; SILVA, C.; HAJI, F. Avaliação preliminar de tolerância de acessos de *Curcubita spp.* a *Diaphania hyalinata* no Vale do São Francisco. **Anais da I jornada de iniciação científica da Embrapa Semi-árido**, Embrapa Semi-árido, p. 127-131, 2006.
- BERENBAUM, M. Brementown revisited: allelochemical interactions in plants. **Recent Advances In Phytochem**, v. 19, p. 139-169, 1985.
- BICK, L. F. Os óleos essenciais e sua aplicação na indústria alimentícia. **I Simpósio de óleos essenciais**; São Paulo, p.111-117, 1985.
- BISHOP, G. The comparative bionomics of american *Cryptolestes* (Coleoptera: Cucujidae) that infest stored grain. **Annals of the entomological society of America**, College Park, v. 52, n. 6, p. 657 – 665, 1959.
- BOMFORD, M. K.; ISMAN, M. B. Desensitization of fifth instar *Spodoptera litura* to azadirachtin and neem. **Entomologia Experimentalis Applicata**, v. 81, p. 307-313, 1996.
- BOOTH, R.; COX, M.; MADGE, R. IIE guides to insects of importance to man. **C.A.B. International**, 1990.
- CAMPO, C.; FERREIRA, B.; MOSCARDI, F. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. EMBRAPA, p. 859, Brasília-DF, 2012.
- CASTRO, H. G.; OLIVEIRA, L. O.; BARBOSA, L. C. A.; FERREIRA, F. A.; DA SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R.; NASCIMENTO, E. A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Química Nova**, Vol. 27, p. 55-57, 2004
- COITINHO, R.; OLIVEIRA, J.; GONDIM JUNIOR, M.; CÂMARA, C. Persistência de óleos essenciais em milho armazenado, submetido à infestação de gorgulho do milho. **Ciência Rural**, v. 40, n. 7, p. 1492-1496, 2010.
- CORRÊA, J.C.R.; SALGADO, H.R.N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, p. 500-506, 2011.
- COSTA, E.L.N.; SILVA, R.F.P.; FIUZA, L.M. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. **Acta Biologica Leopoldensia**, v.26, p.173-85, 2004.
- CRUZ, E.; COSTA-JUNIOR, L.; PINTO, J.; SANTOS, D.; ARAUJO, S.; ARRIGONI-BLANK, M.; BACCI, L.; ALVES, P.; CAVALCANTI, S.; BLANK, A. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 195, p. 198-202, 2013.
- DOBIE, P.; HAINES, C.; HODGES, R.; PREVETT, P. Insects and arachnids of tropical stored products, their biology and identification: a training manual. **Tropical Development and Research Institute**, 1984.

- DONELIAN, A. **Extração de óleo essencial de patchouli *Pogostemon cablin* (blanco) Benth utilizando dióxido de carbono supercrítico.** Tese de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.
- EMBRAPA. **Inseticidas Botânicos: Seus Princípios Ativos, Modo de Ação, Uso Agrícola.** Seropédica – RJ, 2005.
- EVANS, D. The biology of stored products Coleoptera. In: Proc. **Aust. Dev. Asst.** Course on preservation of Stored Cereals, p. 149 – 185, 1981.
- FARONI, L.; SILVA, J. Manejo de pragas no ecossistema de grãos armazenados. Em: SILVA, J. Manejo de pragas no ecossistema de grãos armazenados. **Aprenda fácil**, ed. 2, 2008.
- FENG, R.; ISMAN, M. B. Selection for resistance to azadirachtin in the green peach aphid, *Myzus persicae*. **Experientia**, v. 51, p. 831-833, 1995.
- FERRAZ, R.; BOMFIM, D.; CARVALHO, N.; SOARES, M.; SILVA, T.; MACHADO, W.; PRATA, A.; COSTA, E.; MORAES, V.; NOGUEIRA, P.; BEZERRA, D. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine**, v. 20, p. 615-621, 2013.
- GALLO, D.; NAKANO, O. SILVEIRA NETO, S. CARVALHO, R.; BAPTISTA, G.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.; ZUCCHI, R.; ALVES, S.; VENDRAMIN, J.; MARCHINI, L.; LOPES, J.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola.** FEALQ, 2002.
- GOMES, S.; NOGUEIRA, P.; MORAES, V. Aspéctos químicos e biológicos do gênero *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.
- GONRING, A. **Controle biológico natural de *Diaphania hyalinata* e *Diaphania nitidalis* em pepino.** Tese de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2000.
- GUEDES, C.; SILVA, V.; CRUZ, G.; LÔBO, A.; TEIXEIRA, A.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V. Preferência de ovoposição e sua relação com desempenho de *Diaphania hyalinata* (L. 1758) (Lepidoptera: Crambidae) em curcubitáceas. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 77, n. 4, p. 643-649, 2010.
- GUILHON, C.; RAYMUNDO, L.; ALVIANO, D.; BLANK, A.; ARRIGONI-BLANK, M.; MATHEUS, E.; CAVALCANTI, S.; ALVIANO, C.; FERNANDES, P. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities and the mechanism of the action of *Lippia gracilis* essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 406-413, 2011.
- HERNÁNDEZ, Y.; SURÍS, M.; LÓPEZ, M. Ciclo de vida y reproducción de *Diaphania hyalinata* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) em condiciones de laboratorio. **Revista Protección Vegetal**, v.10, n. 1, p. 241-246, 1995.
- HUMMELBRUNNER, L.; ISMAN, M. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Agricultural and Food Chemical**, v. 49, p. 715-720, 2001.
- ISMAN, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v. 19, p. 603-608, 2000.
- JIANG, Z.; AKHTAR, Y.; BRADBURY, R.; ZHANG, X.; ISMAN, M. Comparative toxicity of essential oils of *Listsea pungens* and *Litsea cubeba* and blends of their major constituents against the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**; v. 57, p. 4833 – 4837, 2009.
- KIM, S.I. *et al.* Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Stored Products Research**, v.39, p.293-303, 2003.
- LAURIN A. H.; MURRAY B. I. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 49, p. 715-720, 2001.

- LIMA, C. **Impacto de sistemas de controle de pragas sobre a comunidade de artrópodes na cultura da melancia**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2012.
- LIMA, J.K.; ALBUQUERQUE, E.L.; SANTOS, A.C.C.; OLIVEIRA, A.P. Biototoxicity of some plant essential oils against the termite *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). **Industrial Crops and Products**, v. 47, p 246– 251, 2013.
- LIMA, R.; CARDOSO, M.; MORAES, J.; CARVALHO, S.; RODRIGUES, V.; GUIMARAES, L.. Chemical composition and fumigant effect of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Ciência e Agroecologia**, v. 35, n. 4, p. 664-671, 2011.
- LOPES, F. **Inseticidas botânicos no manejo de lepdópteros-praga de hortaliças**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2012.
- LORINI, I. Manejo integrado de pragas de grãos de cereais armazenados. **Embrapa Trigo**; Passo Fundo, 2008.
- LORINI, I.; KRZYŻANOWSKI, F.; HENNING, A. Principais pragas e métodos de controle em sementes durante o armazenamento. **Informativo ABRATES**, v. 19, n. 1, p. 21 – 28, 2009.
- LOVATTO, P. B.; SCHIEDECK, G.; GARCIA, F. R. M. A interação co-evolutiva entre insetos e plantas como estratégia ao manejo agro-ecológico em agroecossistemas sustentáveis. **Interciência**, v. 37, n. 9, p. 657 - 663, 2012.
- MAGALHÃES, M. T. Composição química de óleos essenciais. **I Simpósio de óleos essenciais**; São Paulo, p. 21-25, 1985.
- MAPA. Dados básicos de economia agrícola julho 2014. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/Pasta%20de%20Julho%20-%202014_.pdf. Acesso em: 26 de Agosto de 2014.
- MELO, J.; BITENCOURT, A.; FACHIN, A.; CRUZ, E.; JESUS, H.; ALVES, P.; ARRIGONI-BLANK, F.; FRANCA, S.; BELEBONI, R.; FERNANDES, R.; BLANK, A.; SCHER, R. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. **Acta tropica**, v. 128, p. 110-115, 2013.
- MENDES, S.; BOMFIM, R.; JESUS, H.; ALVES, P.; BLANK, A.; ESTEVAM, C.; ANTONIOLLI, A.; THOMAZZI, S. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 391-397, 2010.
- MENEZES, E.L.A. **Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola**. Seropédica, Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, p. 58, 2005.
- MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, 2009.
- NETO, R.; MATOS, F.; ANDRADE, V.; MELO, M.; CARVALHO, C.; GUIMARÃES, S.; PESSOA, O.; SILVA, S.; SILVA, S.; VASCONCELOS, P. The essential oil from *Lippia gracilis* Schauer, Verbanaceae, in diabetic rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 2, p. 261-266, 2010.
- PASCUAL, M.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SANCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201–214, 2001.
- PEREIRA, A.; OLIVEIRA, J.; GONDIM JUNIOR, M.; CAMARA, C. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (FABR., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]. **Ciência agrotecnica**, v. 32, n. 3, p. 717-724, 2008.
- PICANÇO, M.; GUSMÃO, M.R.; GALVAN, T.L. Manejo integrado de pragas de hortaliças. In: ZAMBOLIM, L. (Ed). **Manejo integrado: doenças, pragas e plantas daninhas**. Viçosa, MG: UFV, 2000. P. 275-324.

- PICANÇO, M.; MARQUINI, F. Manejo integrado de pragas de hortaliças em ambiente protegido. **Informe Agropecuário**, v.20, n.200/201, p. 126-133, 1999.
- PINTO-ZEVALLOS, D. M.; MARTINS, C. B. C.; PELLEGRINO, A. C.; ZARBIN, P. H. G. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Química Nova**, v. 36, n. 9, p. 1395 – 1405, 2013.
- PRADO, V.; MORAES, V.; NOGUEIRA, P.; CRUZ, E.; BLANK, A.; PEREIRA-FILHO, E.; MARTINS, L. Caracterização de chá de genótipos de *Lippia gracilis* Schauer através de perfil cromatográfico por CLAE-DAD combinado com análise quimiométricas. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1814-1818, 2012.
- RIELLA, K.; MARINHO, R.; SANTOS, J.; PEREIRA-FILHO, R.; CARDOSO, J.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R.; THOMAZZI, S. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 656-663, 2012.
- SANTOS, J.; MELO, I.; ABREU, M.; SALES, M. Verbenaceae sensu stricto na região de Xingó: Alagoas e Sergipe, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n. 4, p. 985-998, 2009.
- SCHOONHOVEN, L. M.; VAN LOON, J. J.; DICKE, M.; **Insect-Plant Biology**, ed. 2, Oxford University Press: Oxford, 2006.
- SILVA, M. G. V.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; HOLANDA, F. M. T.; SILVA, F. O.; ALBUQUERQUE, J. C. Comparison between steam, microwave distillation and supercritical CO₂ extraction of essential oil of two species of *Ocimum*. In: **IV Encontro Brasileiro de Fluidos Supercríticos**; p. 439 – 442, 2001.
- SILVA, W.; DÓRIA, G.; MAIA, R.; NUNES, R.; CARVALHO, G.; BLANK, A.; ALVES, P.; MARÇAL, R.; CAVALCANTI, S. Effects of essencial oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3251-3255, 2008.
- SIMÕES C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. – Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.
- SINGH, R.; KOUL, O.; RUP, P. J.; JINDAL, J. Toxicity of some essential oil constituents and their binary mixtures against *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). **International journal of tropical insect science**, v. 29, n. 2, p. 93 - 101, 2009.
- SONWA, M. M. **Isolation and structure elucidation of essential oil constituents: Comparative study of oils of *Cyperus alopecuroides*, *Cyperuspapyrus*, and *Cyperusrotundus***. Tese de Doutorado, University of Hamburg, Hamburg, 2000.
- SOUZA, S. A. M. S.; MEIRA, M. R.; DE FIGUEIREDO, L. S.; MARTINS, E. R. Óleos essenciais: Aspectos econômicos e sustentáveis. **Enciclopédia Biosfera**, vol. 6, Goiânia, 2010.
- TELES, T.; BONFIM, R.; ALVES, P.; BLANK, A.; JESUS, H.; QUINTANS-JUNIOR, L.; SERAFINI, M.; BONJARDIM, L.; ARAÚJO, A. Composition and evaluation of the lethality of *Lippia gracilis* essential oil to adults of *Biomphalaria glabrata* and larvae of *Artemia salina*. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 22, 2010.
- VAZ JÚNIOR, S. Química analítica ambiental. **Embrapa**, Brasília, p. 13-14, 2013.
- ZHENG, S.; DICKE, M. Ecological genomics of plant-insect interactions: From gene to community. **Plant physiology**, v. 146, p. 812-817, 2008.

4. ARTIGO 1: TOXICIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE DOIS QUIMIOTIPOS DE *Lippia gracilis* E SEUS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS SOBRE *Diaphania hyalinata* E ORGANISMOS NÃO-ALVO.

Periódico a ser submetido: Industrial Crops and Products

RESUMO

Óleos essenciais de plantas têm sido considerados uma alternativa viável ao uso de inseticidas sintéticos. Contudo, a existência de quimiotipos pode resultar em diferentes respostas biológicas e ter grandes implicações no manejo de pragas. Assim, neste trabalho foi analisada a toxicidade dos óleos essenciais de dois quimiotipos de *Lippia gracilis* e seus compostos majoritários sobre *Dyaphania hyalinata* e a seletividade destes sobre o polinizador *Apis mellifera* e a vespa predadora *Polybia micans*. Os bioensaios de toxicidade e de tempo letal foram conduzidos usando lagartas de segundo instar de *D. hyalinata* e adultos de *A. mellifera* e *P. micans*. Os tratamentos foram os óleos essenciais dos quimiotipos timol e carvacrol de *L. gracilis* e os compostos majoritários timol e carvacrol isolados. Os óleos essenciais de ambos quimiotipos de *L. gracilis* se mostraram tóxicos a *D. hyalinata*. Foram necessários apenas 5,90 e 4,56 $\mu\text{g mg}^{-1}$ para causar 50% de mortalidade das lagartas. O óleo essencial do quimiotipo carvacrol foi 29% mais tóxico do que o quimiotipo timol. Os monoterpenos timol e carvacrol quando aplicados isoladamente foram cerca de duas e cinco vezes mais tóxicos que seus respectivos quimiotipos. Os óleos essenciais atuaram de forma muito rápida causando mortalidade na metade da população de *D. hyalinata* em menos de três horas. Todos os tratamentos não foram seletivos em favor de *A. mellifera* e *P. micans*. Assim, os óleos essenciais dos quimiotipos de *L. gracilis* podem consistir em fontes promissoras para a síntese de novas moléculas inseticidas.

Palavras-chave: Verbenaceae, broca-das-cucurbitáceas, *Apis mellifera*, *Polybia micans*.

ABSTRACT**Toxicity of essential oils from two genotypes of *Lippia gracilis* and their major constituents over *Diaphania hyalinata* and non-target organisms**

Essential oils of plants have been considered a viable alternative to the use of synthetic insecticides. However, the existence of chemotypes may result in different biological responses and have high implications for pest management. In this work we analyzed the toxicity of the essential oils of two chemotypes of *Lippia gracilis* and their major compounds against *Dyaphania hyalinata* and selectivity over the pollinator *Apis mellifera* and the wasp predator *Polybia micans*. Toxicity and survival bioassays were conducted using second instar larvae of *D. hyalinata* and adults of *A. mellifera* and *P. micans*. The treatments were the thymol and carvacrol chemotypes essential oils of *L. gracilis* and the major compounds, thymol and carvacrol isolated. The essential oils of both chemotypes of *L. gracilis* proved toxicity over *D. hyalinata*. Just 5,90 and 4,56 $\mu\text{g mg}^{-1}$ were required to cause 50% mortality of second instar larvae of *D. hyalinata*. The carvacrol chemotype was 29% less toxic than chemotype thymol against this pest. The monoterpenes thymol and carvacrol when applied alone, were about two and five times more toxic than their respective chemotypes. Essential oils acted very quickly causing mortality in half the population of *D. hyalinata* in less than three hours. All treatments were not selective in favor of *A. mellifera* and *P. micans*. Thus, the essential oils of chemotypes of *L. gracilis* may consist promising sources for synthesis of new insecticides molecules.

Palavras-chave: Verbenaceae; pickleworm, *Apis mellifera*, *Polybia micans*.

4.1. Introdução

Apesar da grande relevância ecológica dos insetos para o funcionamento dos ecossistemas, muitas espécies apresentam ampla importância econômica por causarem danos em diversas culturas. Na tentativa de controlar pragas agrícolas, o homem vem causando prejuízos ambientais como contaminação e morte de espécies não-alvo (ex.: polinizadores e inimigos naturais) comprometendo o funcionamento dos ecossistemas.

Algumas pragas de hortaliças, como a broca-das-cucurbitáceas *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Pyralidae) pode comprometer totalmente a produção de frutos (Picanço e Marquini, 1999). Este inseto oligófago é considerado praga-chave de culturas de pepino, abóbora e chuchu (Guedes, 2010) e sua fase imatura ataca brotos novos, ramos, frutos e preferencialmente as folhas das plantas (Gonring et al., 2003). O controle de *D. hyalinata* é efetuado basicamente com o uso de inseticidas organossintéticos. Contudo, o uso inadequado destes produtos têm provocado impactos negativos sobre o meio ambiente e a saúde humana.

Diante deste contexto, inseticidas botânicos podem ser uma alternativa viável para o manejo das pragas em relação aos inseticidas sintéticos. Alguns óleos essenciais de plantas têm apresentando efeitos tóxicos e importantes efeitos subletais, podendo ser utilizados como modelo para o desenvolvimento de novos inseticidas (Bick, 1985; Silva et al., 2001; Bakkali et al., 2008; Souza et al., 2010).

Estudos recentes apontam que o óleo essencial do alecrim-da-chapada *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) apresenta grande potencial para bioprospecção de compostos farmacológicos e pesticidas (Pereira et al., 2008; Silva et al., 2008; Cruz et al., 2013; Melo, et al., 2013). Suas folhas são ricas em óleo essencial que possuem monoterpenos e serquiterpenos, dos quais o timol e o carvacrol apresentam-se em grande proporção (Teles et al., 2010). Pressões ambientais diferenciais podem resultar no surgimento de plantas da mesma espécie com diferentes proporções de compostos secundários, os chamados quimiotipos. Estas variações podem ter grandes implicações nas atividades biológicas dos óleos essenciais estudados.

O potencial de substâncias bioativas deve considerar não apenas sua toxicidade sobre as pragas-alvo, como também a seletividades destas sobre organismos benéficos aos agroecossistema. Assim, neste trabalho foi analisado o potencial de toxicidade dos óleos essenciais de dois quimiotipos de *L. gracilis* e seus compostos majoritários timol e carvacrol sobre *D. hyalinata* e a seletividade destes sobre os organismos não-alvos, o polinizador *Apis mellifera* e a vespa predadora *Polybia micans*.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. *Diaphania hyalinata*

Para realização dos bioensaios a espécie *D. hyalinata* foi criada no laboratório por 30 gerações, sendo mantida em temperatura e umidade ambiente e período de fotofase de 14h. Os adultos foram acondicionados em gaiolas de madeira (50 x 50 x 50 cm) revestidas por tecido de organza. Nestas foram mantidos cerca de 30 indivíduos alimentados com mel. Para ovoposição, folhas de abóbora *Cucurbita* sp. fixadas a um frasco com água por algodão hidrofóbico foram introduzidas nas gaiolas por 24h. Em seguida as folhas foram acomodadas em bacias (40 x 30cm) até o momento da eclosão dos ovos. Após a eclosão, folhas de chuchu *Sechium edule* foram depositadas sobre as folhas de abóbora para a alimentação das lagartas de primeiro instar. A folha contendo as lagartas foram então uma bacia limpa e fechada com tampa de organza.

Indivíduos na fase de pré-pupa foram transferidos para bacias e deslocadas para bacias contendo folhas de papel toalha como substrato para a pupação. Os adultos emergidos foram utilizados para início de novos ciclos.

4.2.2. Quimiotipos e extração dos óleos essenciais

Foram selecionados dois genótipos (LG-106 = quimiotipo timol e LG-109 = quimiotipo carvacrol) de *L. gracillis* que pertencem ao Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal de Sergipe (UFS), localizada na estação experimental "Campus Rural da UFS", no município de São Cristóvão, Estado de Sergipe, Brasil (11°00' S, 37°12' W). Os espécimens estão depositados no herbário da UFS.

As folhas das plantas foram colhidas e secas a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ por 4 dias em estufa de secagem (Sant'ana et al., 2010). O óleo essencial foi obtido através da hidrodestilação do pó das folhas, em aparelho do tipo Clevenger. Posteriormente, os óleos essenciais foram separados da fase aquosa e mantidos em frascos de vidro âmbar no freezer até sua utilização.

4.2.3. Análise química dos óleos essenciais

As análises dos componentes dos óleos essenciais foram realizadas utilizando CG-EM/CG-DIC (GC-2010 Plus; GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com um amostrador automático AOC-20i (Shimadzu). As separações foram realizadas usando uma coluna capilar de sílica fundida Rtx®-5MS Restek (polissiloxano 5%-difenil-95%-dimetil) de 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno (d.i.), 0,25- μm de espessura de filme, em um fluxo constante de Hélio (99,999%) com taxa de 1,2 mL.min⁻¹. Foi utilizado um volume de injeção de 0,5 μL (5 mg.mL⁻¹), com uma razão de *split* de 1:10. A programação de temperatura do forno utilizada foi a partir de 50°C (isoterma durante 1,5 min), com um aumento de 4°C / min, à 200°C, em seguida, a 10°C / min até 250°C, terminando com uma isoterma de 5 min a 250 °C.

Os dados de CG-EM e CG-DIC foram simultaneamente adquiridos empregando um sistema de separação de detector; a razão de separação de escoamento foi de 4:1 (EM: FID). Um tubo restritor de 0,62 m x 0,15 mm d.i. (coluna capilar) foi utilizado para ligar o divisor para o detector do EM; um tubo restritor de 0,74 m x 0,22 mm d.i. foi usado para ligar o divisor para o detector do DIC. A temperatura do injetor foi de 250°C e a temperatura da fonte de íons de 200°C. Os íons foram gerados à 70 eV; a uma velocidade de varredura de 0,3 fragmentos (scans) s⁻¹ detectados no intervalo de 40-350 Da. A temperatura do DIC foi ajustada para 250°C, e os suprimentos de gás para o DIC foram ar sintético, hidrogênio, hélio em taxas de fluxo de 30, 300 e 30 mL.min⁻¹, respectivamente. A quantificação de cada constituinte foi estimada por normalização área do pico gerado no DIC (%). As concentrações dos compostos foram calculados a partir das áreas dos picos de CG e foram dispostos por ordem de eluição do CG.

A identificação dos constituintes foi realizada com base na comparação dos índices de retenção da literatura. Para o índice de retenção será utilizado a equação de Van den Dool e Kratzamo em relação a uma série homóloga de *n*-alcanos (*n*C₉-*n*C₁₈). Foram utilizadas três bibliotecas do equipamento WILEY8, NIST107 e NIST21 que permite a comparação dos dados dos espectros com aqueles constantes das bibliotecas utilizando um índice de similaridade de 80%.

4.2.4. Compostos majoritários

Os constituintes em maior proporção nos óleos essenciais em estudo, o timol e o carvacrol, foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) e utilizados em bioensaios posteriores.

4.2.5. Bioensaios

Os diferentes bioensaios foram conduzidos usando lagartas de segundo instar de *D. hyalinata* e adultos da abelha *A. mellifera* e da vespa predadora *P. micans*. Todos os tratamentos (óleos essenciais dos quimiotipos timol e carvacrol de *L. gracillis* e os compostos majoritários timol e carvacrol isolados) foram diluídos no solvente acetona (Panreac, UV-IR-HPLC-GPC PAI-ACS, 99.9% purity). Testes preliminares com acetona mostraram que este

solvente não afetou a sobrevivência dos insetos.

Para cálculo das dosagens a massa média dos insetos foram obtida medindo-se a massa de 10 indivíduos utilizando uma balança analítica de precisão de 0,01mg (Shimadzu, AUW220D). Nos bioensaios os indivíduos foram considerados mortos se permaneceram imóveis aos estímulos feitos com pincel.

4.2.5.1. Toxicidade à *D. hyalinata*

Para obtenção das curvas dose-mortalidade inicialmente foi utilizada a dose de 30µg dos tratamentos / mg do inseto. Posteriormente, foram utilizadas de quatro a seis doses que correspondessem a mortalidades superiores a zero e inferiores a 100%.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 6 repetições. Cada unidade experimental foi composta por um grupo de 10 lagartas de *D. hyalinata* em potes plásticos de poliestireno de 120mL. Foram aplicados 0,5µL das concentrações da solução dos óleos essenciais e dos compostos majoritários na região dorsal do inseto, com o uso de uma microseringa (Hamilton®). Para o controle foi aplicado 0,5µL do solvente (acetona) sobre as lagartas. Um pedaço de folha de chuchu (*Secchium edule*) com área de aproximadamente 16 cm² foi adicionado a cada pote para a alimentação dos indivíduos. Os potes foram revestidos por organza para evitar a saída dos insetos e permitir a entrada de oxigênio.

Os recipientes foram acondicionados e mantidos a 25±0,5°C, U.R.=75±5% e fotofase de 12 horas. A toxicidade das substâncias foi avaliada pela contagem de indivíduos mortos após 24 horas da exposição.

4.2.5.2. Tempo letal em *D. hyalinata*

Para determinar o tempo letal dos tratamentos sobre *D. hyalinata* foram utilizadas as DL₉₀ determinadas nos bioensaios de toxicidade.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 50 repetições. Cada unidade experimental foi composta por um grupo de duas lagartas de *D. hyalinata* alocados em potes plásticos de poliestireno de 120mL, totalizando 100 lagartas por tratamento. Os tratamentos e demais procedimentos foram semelhantes aos utilizados nos bioensaios de toxicidade.

A mortalidade foi avaliada continuamente nos primeiros 10min, e posteriormente por avaliações com intervalos de 30min até 2h. Em seguida as avaliações foram feitas de hora em hora até completar 6h desde o início do experimento. As avaliações seguintes foram feitas a cada duas horas até completar o período de 24h.

4.2.5.3. Seletividade a organismos não alvo

Para determinar a seletividade dos tratamentos sobre a abelha *A. mellifera* e a vespa predadora *P. micans* foram utilizadas as DL₈₀ determinadas nos bioensaios de toxicidade para *D. hyalinata*. A mortalidade de 80% foi usada como referência porque este é o nível mínimo de eficácia necessário para o registro de um composto inseticida no Brasil pelo Ministério da Agricultura (Silva et al. 2011).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 repetições. Cada unidade experimental foi composta por um grupo de 10 adultos em placas de Petri de 9x2cm. Foram aplicados 1µL das concentrações da solução dos óleos essenciais e dos compostos majoritários na região dorsal de cada inseto com uma microseringa (Hamilton®). Para o controle foi aplicado 1µL do solvente (acetona) sobre os insetos. Para possibilitar a aplicação, os insetos foram acondicionados em uma câmara com temperatura de -8°C durante o período de 2 min para reduzir o metabolismo e a movimentação dos mesmos. Testes preliminares indicaram que este procedimento não afetou a sobrevivência dos insetos. As placas foram forradas com papel filtro nos quais foram adicionados 0,3mL de água destilada para a manutenção da umidade no interior da placa. Foi adicionada solução de mel e açúcar para a alimentação dos insetos. As placas foram revestidas por organza para evitar a saída dos

insetos e permitir a entrada de oxigênio.

Os recipientes foram acondicionados e mantidos a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, U.R. = $75 \pm 5\%$ e fotofase de 12 horas. A toxicidade das substâncias foi avaliada pela contagem de indivíduos mortos após 48 horas de exposição.

4.2.5.4. Tempo letal em organismos não alvo

Para determinar o tempo letal para *A. mellifera* e *P. micans* o delineamento experimental foi semelhante ao utilizado no biensaio de seletividade.

A mortalidade foi avaliada conforme descrito para o bioensaio de TL para a *D. hyalinata*.

4.2.6. Análises estatísticas

Os resultados de mortalidade obtidos para todos os bioensaios de toxicidade foram corrigidos em relação à mortalidade ocorrida na testemunha usando-se a fórmula de Abbott (1925). Análises de Próbit foram realizadas para determinar as curvas de dose-mortalidade dos óleos essenciais e de seus compostos majoritários. Foram aceitas as curvas cuja probabilidade de aceitação da hipótese de nulidade (de que os dados possuem distribuição de Próbit) pelo teste χ^2 fosse maior que 0,05. Por meio destas curvas foram estimadas as doses letais para mortalidade de 50, 80 e 90% das populações (DL_{50} , DL_{80} e DL_{90}) e seus respectivos intervalos de confiança a 95% de probabilidade usando o software SAS (PROC PROBIT; SAS, 2001). As DLs foram comparadas pelo critério da não-sobreposição dos intervalos de confiança (IC95) com a origem do intervalo. Análises de sobrevivência foram realizadas utilizando-se o teste de Log-rank, no programa estatístico Sigmaplot (versão 11.0).

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Caracterização do óleo essencial

Foram identificados 20 e 26 compostos nos óleos essenciais dos genótipos LG-106 e LG-109 de *L. gracilis*, representando 100% dos óleos (Fig. 1).

Os monoterpenos timol e carvacrol foram os componentes majoritários encontrados nos óleos essenciais dos genótipos LG-106 (43,8%) e LG-109 (50,7%), respectivamente (Fig. 1). Os compostos ρ -cimeno (6,4 e 9,3%), γ -terpineno (6,9 e 10,3%), metil timol (8,0 e 5,3%), β -cariofileno (6,5 e 6,1%) foram encontrados em concentrações intermediárias nos genótipos LG-106 e LG-109, respectivamente. Os demais compostos estiveram presentes nos óleos essenciais em concentrações inferiores a 4%.

Outros estudos verificaram variações nas concentrações dos compostos majoritários no óleo essencial de *L. gracilis* (Teles et al., 2010). Tais variações são resultantes de diversos fatores, como genética da planta; técnica de coleta, processamento e destilação; técnicas de cultivo e área geográfica de origem (David & Boaro, 2009; Moraes, 2009; Sant'ana et al., 2010). Contudo, os genótipos usados aqui, foram mantidos nas mesmas condições e todos os procedimentos utilizados no cultivo, colheita e extração dos óleos essenciais foram os mesmos, indicando se tratar de quimiotipos diferentes. Segundo Bakkali et al. (2008), a alteração na composição dos óleos essenciais, seja por fatores genéticos, técnicos, bióticos ou abióticos, pode influenciar diretamente nos resultados de testes biológicos; uma vez que sua complexa combinação de compostos pode apresentar efeitos sinérgicos.

4.3.2. Toxicidade sobre *D. hyalinata*

Os óleos essenciais de ambos quimiotipos de *L. gracilis* se mostraram tóxicos a *D. hyalinata*. Foram necessários apenas 5,90 e 4,56 $\mu\text{g mg}^{-1}$ para causar 50% de mortalidade das lagartas de segundo instar de *D. hyalinata*. O óleo essencial do quimiotipo carvacrol foi 29% mais tóxico do que o quimiotipo timol (Tabela 1).

Alguns estudos têm demonstrado que óleos essenciais são eficientes para o controle de lagartas (Hummelbrunner & Isman, 2001; Jiang et al. 2009). Entretanto, os valores de DL_{50}

obtidos no presente estudo foram inferiores aos reportados nestes trabalhos, o que demonstra o potencial dos óleos essenciais dos quimiotipos de *L. gracilis* para o manejo de *D. hyalinata*. Em estudo realizado por Jiang et al. (2009) os óleos essenciais de *Litsea pungens* e *Litsea cubeba* apresentaram DL₅₀ de 80 e 112 µg lagarta⁻¹ de *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), respectivamente. No nosso trabalho, considerando a massa das lagartas de *D. hyalinata*, as doses dos óleos essenciais necessárias para causar mortalidade em 50% da população de *D. hyalinata* foram até 49 vezes menor.

A eficiência do óleo essencial de *L. gracilis* também já foi verificada para outras pragas. Pereira et al. (2008) mostraram a eficiência deste óleo sobre *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (Coleoptera: Bruchidae), tanto na mortalidade de adultos como para a redução do número de ovos viáveis. Já Silva et al. (2008) demonstraram eficiência deste óleo na mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Atividade acaricida deste óleo essencial também foi verificada para o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Cruz et al., 2013).

Os monoterpenos timol e carvacrol quando aplicados isoladamente foram cerca de duas e cinco vezes mais tóxicos que seus respectivos quimiotipos (Tabela 1). Desta forma, a toxicidade dos óleos essenciais dos quimiotipos de *L. gracilis* é explicada, pela presença dos seus respectivos compostos majoritários, timol e carvacrol. Contudo, interações sinérgicas e de potenciação devem mediar à toxicidade dos óleos essenciais.

Ambos os monoterpenos são conhecidos por apresentarem efeitos tóxicos a diversos organismos. Estudos realizados por Hummelbrunner e Isman (2001), também apontaram efeito tóxico do timol e do carvacrol sobre lagartas de quarto ínstar de *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae).

A sobrevivência das lagartas de *D. hyalinata* expostas aos diferentes tratamentos foi significativamente reduzida ao longo do tempo, diferindo do controle (Teste de Log-rank: $\chi^2 = 280,05$; gl = 4, P < 0,001) (Fig. 2).

Os óleos essenciais atuaram de forma muito rápida causando mortalidade na metade da população de *D. hyalinata* em menos de três horas. Entretanto foram necessárias 6,2 e 12,2 horas para causar a mesma mortalidade em lagartas de *D. hyalinata* quando expostas ao timol e carvacrol (Fig. 2). Este fato pode indicar que componentes em menor proporção no óleo de ambos os quimiotipos estão atuando de forma a potencializar a ação dos monoterpenos timol e carvacrol; fazendo com que os mesmos tenham ação mais rápida.

Jiang et al. (2009) demonstraram que compostos minoritários e com toxicidade moderada ou baixa atuam junto aos compostos majoritários do óleo essencial potencializando seu efeito tóxico sobre a lagarta *T. ni*. Este resultado pode ser explicado pelos efeitos de aditismo e sinergismo entre monoterpenos de óleos essenciais (Hummelbrunner e Isman, 2001). Assim, é provável que a atividade de alguns compostos seja modulada por moléculas em menor proporção, visto que estes componentes desempenham papel principal em diversas características do óleo, tais como atração hipo ou hidrofílica, fixação (Bakkali et al., 2008) e penetração em células (Cal, 2006).

4.3.3. Seletividade a organismos não alvo

Os óleos essenciais dos quimiotipos timol e carvacrol de *L. gracilis* e os compostos majoritários timol e carvacrol isolados não foram seletivos à *A. mellifera* e a *P. micans*. Todos os tratamentos quando aplicados na DL₈₀ determinada para *D. hyalinata* causaram mortalidades de ambos os insetos superiores a 80% (Fig. 3).

As sobrevivências de adultos da abelha e da vespa expostas aos óleos essenciais e aos seus compostos majoritários na DL₈₀ (determinada para *D. hyalinata*) foram significativamente reduzidas ao longo do tempo (*A. mellifera*: Teste de Log-rank: $\chi^2 = 397,03$; gl = 4, P < 0,001 e *P. micans*: Teste de Log-rank: $\chi^2 = 444,4$; gl = 4, P < 0,001) (Fig. 4).

Os tratamentos atuaram de forma muito rápida sobre *A. mellifera* e *P. micans* causando mortalidade na metade das suas populações em menos de dez horas. O tempo médio gasto para os óleos essenciais causarem mortalidade em 50% destas espécies variou de 1,7 a 5,8 horas. Já para os compostos majoritários foram necessárias de 2,1 a 9,5 horas para causar a mesma mortalidade nestas espécies (Fig. 4).

Todos os tratamentos estudados não foram seletivos a *A. mellifera* e *P. micans*. Isso pode ser explicado uma vez que insetos sociais dificilmente apresentam algum tipo de resistência em relação ao uso de inseticidas sintéticos ou de origem botânica. As abelhas e as vespas têm menor contato direto com inseticidas sintéticos e compostos de origem botânica e por isso tendem a ser mais susceptíveis aos compostos quando comparados com a praga alvo (Scott et al., 1990). Desta forma, espera-se que herbívoros especialistas estejam sujeitos a maior contato com inseticidas sintéticos por serem os alvos das pulverizações e com metabólitos secundários das plantas por utilizarem estas como recurso alimentar. Assim, o aparato detoxificativo de *D. hyalinata* deve ser muito mais desenvolvido do que os de *A. mellifera* e *P. micans*.

Outra possível razão da alta sensibilidade de *A. mellifera* e *P. micans* aos tratamentos é o fato destas espécies serem organismos eussociais (Schmickl & Crailsheim, 2004) e possuírem haplodiploidia como mecanismo de determinação do sexo (Carriere, 2003). Os Hymenoptera sociais geralmente produzem baixa diversidade de enzimas detoxificadoras devido à divisão de trabalho nas colônias reduzir a exposição das castas reprodutoras (rainhas e zangões) às substâncias tóxicas, diminuindo assim a seleção de insetos resistentes. Já os indivíduos que tem a função de forrageamento nas colônias e entram em contato com os inseticidas botânicos são estéreis e dificilmente poderão transmitir genes de resistência para outros indivíduos. Por outro lado, os machos dos Hymenoptera (zangões), por serem haplóides, geralmente produzem maior diversidade de enzimas detoxificadoras do que indivíduos diplóides (Carriere, 2003).

A ausência de seletividade fisiológica dos óleos essenciais dos quimiotipos testados de *L. gracilis* e seus compostos majoritários, embora não desejada, não impede a continuidade dos estudos dessas substâncias como potenciais inseticidas. A seletividade ecológica deve ser melhor estudada para este caso, uma vez que se baseia no emprego de técnicas de utilização dos inseticidas que minimizem a exposição aos organismos não alvos (Pedigo, 1999). Ainda, embora os óleos essenciais sejam tóxicos a *A. mellifera* e *P. micans*, em situações naturais as chances destes organismos entrarem em contato com tais substâncias podem ser reduzidas.

4.5. Conclusões

Os óleos essenciais dos quimiotipos timol e carvacrol de *L. gracilis* são tóxicos a *D. hyalinata*. Os compostos majoritários destes óleos essenciais quando aplicados isoladamente são ainda mais tóxicos. A sobrevivência das lagartas de *D. hyalinata* expostas aos óleos essenciais de *L. gracilis* e aos compostos majoritários reduz rapidamente ao longo do tempo. Todos os compostos testados não são seletivos a *A. mellifera* e *P. micans*. Dessa forma, são necessários novos estudos visando a utilização da seletividade ecológica de forma a evitar ou diminuir o contato dos organismos benéficos com estes compostos. Assim, os óleos essenciais dos quimiotipos de *L. gracilis*, especialmente o quimiotipo carvacrol, podem consistir em fontes promissoras para a síntese de novas moléculas inseticidas.

4.6. Referências Bibliográficas

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and chem. toxicol.* 46, 446 – 475.
- Bick, L.F., 1985. Os óleos essenciais e sua aplicação na indústria alimentícia. I Simp. de óleos essenc., São Paulo, pp. 111 – 117.
- Cal, K., 2006. Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. *Planta medica.* 72, 311 – 316.
- Carriere, Y., 2003. Haplodiploidy sex and evolution of pesticide resistance. *J. of Econ. Entomol.* 96, 1626 – 1640.
- Cruz, E.M.O.; Costa-Junior, L.M., Pinto, J.A.O., Santos, D.A., Araujo, S.A., Arrigoni-Blank, M.F., Bacci, L., Alves, P.B., Cavalcanti, S.C.H., Blank, A.F., 2013. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol.* 195, 198 – 202.
- David, E.F.S., Boaro, C.S.F., 2009. Translocação orgânica, produtividade e rendimento de óleo essencial de *Mentha piperita* L. cultivada em soluções nutritivas com variações dos níveis de N, P, K e Mg. *Rev. bras. de plant. med.* 11, 236 – 246.
- Gonring, A.H.R., Picanço, M.C., Guedes, R., Silva, E., 2003. Natural control and key mortality factors of *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Pyralidae) in cucumber. *Biocontrol sci. and technol.* 13, 361 – 366.
- Guedes, C.A., Silva, V.F., Cruz, G.S., Lôbo, A.P., Teixeira, A.A.C., Wanderley-Teixeira, V., 2010. Preferência de ovoposição e sua relação com desempenho de *Diaphania hyalinata* (L. 1758) (Lepdoptera: Crambidae) em curcubitáceas. *Arq. Inst. Biol.* 77, 643 – 649.
- Hummelbrunner, L.A., Isman, M.B., 2001. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Agric. and Food Chem.* 49, 715 – 720.
- Jiang, Z., Akhtar, Y., Bradbury, R., Zhang, X., Isman, M.B., 2009. Comparative toxicity of essential oils of *Listsea pungens* and *Listsea cubeba* and blends of their major constituents against the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *J. of Agric. and Food Chem.* 57, 4833 – 4837.
- Melo, J.O., Bitencourt, T.A., Fachin, A.L., Cruz, E.M.O., Jesus, H.C.R., Alves, P.B., Arrigoni-Blank, M.F., Franca, S.C., Beleboni, R.O., Fernandes, R.P.M., Blank, A.F., Scher, R., 2013. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. *Acta tropica* 128, 110 – 115.
- Morais, L.A.S., 2009. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Hortic. Bras.* 27.
- Pedigo, L.P., 1999. *Entomology and pest management*. Upper Saddle River: Prentice Hall.
- Pereira, A.C.R.L., Oliveira, J.V., Gondim Junior, M.G., Câmara, C.A.G., 2008. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (FABR., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]. *Ciênc. Agrotec.* 32, 717 – 724.
- Picanço, M., Marquini, F., 1999. Manejo integrado de pragas de hortaliças em ambiente protegido. *Inf. Agropecu.* 20, 126 – 133.
- Sant'ana, T.C.P., Blank, A.F., Vieira, S.D., Arrigoni-Blank, M.F., Jesus, H.C.R., Alves, P.B., 2010. Influencia do armazenamento de folhas secas no óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin* BENTH.). *Quím. Nova* 33, 1263 – 1265.
- Schmickl, T., Crailsheim, K., 2004. Inner nest homeostasis in a changing environment with special emphasis on honey bee brood nursing and pollen supply. *Apidologie* 35, 249 – 263.
- Scott, J.G., Dong, K., Geden, C.J., Rutz, D.A., 1990. Evaluation of the biochemical basis of insecticide selectivity between host and parasitoid species. *Environ. Entomol.* 19, 1722 – 1725.

- Silva, G.A., Picanço, M.C., Bacci, L., Crespo, A.L.B., Rosado, J.F., Guedes, R.N.C., 2011. Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. *Pest Manag. Sci.* 67, 913 – 920.
- Silva, M.G.V., Matos, F.J.A., Machado, M.I.L., Holanda, F.M.T., Silva, F.O., Albuquerque, J.C., 2001. Comparison between steam, microwave distillation and supercritical CO₂ extraction of essential oil of two species of *Ocimum*. In: IV Encontro bras. de Fluidos Supercríticos, Arkat USA, pp. 439 – 442.
- Silva, W.J., Dória, G.A.A., Maia, R.T., Nunes, R.S., Carvalho, G.A., Blank, A.F., Alves, P.B., Marçal, R.M., Cavalcanti, S.C.H., 2008. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresour. Technol.* 99, 3251 – 3255.
- Souza, S.A.M.S., Meira, M.R., Figueiredo, L.S., Martins, E.R., 2010. Óleos essenciais: Aspectos econômicos e sustentáveis. *Encicl. Biosf.* 6, 1 – 11.
- Teles, T.V., Bonfim, R.R., Alves, P.B., Blank, A.F., Jesus, H.C.R., Quintans-Junior, L.J., Serafini, M.R., Bonjardim, L.R., Araújo, A.A.S., 2010. Composition and evaluation of the lethality of *Lippia gracilis* essential oil to adults of *Biomphalaria glabrata* and larvae of *Artemia salina*. *Afr. J. of Biotechnol.* 9.

Legendas das figuras

Fig. 1. Cromatogramas dos óleos essenciais dos genótipos LG-106 (quimiotipo timol) (A) e LG-109 (quimiotipo carvacrol) (B) de *L. gracilis*.

Fig. 2. Curvas de sobrevivência de dois óleos essenciais dos quimiotipos de *L. gracilis* e seus compostos majoritários sobre lagartas de segundo instar de *D. hyalinata* na DL₉₀ dos biosensaio de toxicidade. TL₅₀ = tempo letal para matar 50% da população (Teste de Log-rank: P < 0,001).

Fig. 3. Mortalidade de adultos de *A. mellifera* e *P. micans* expostos a DL₈₀ para *D. hyalinata* de dois óleos essenciais dos quimiotipos de *L. gracilis* e seus compostos majoritários.

Fig. 4. Curvas de sobrevivência de dois óleos essenciais dos quimiotipos de *L. gracilis* e seus compostos majoritários sobre adultos de *A. mellifera* (A) e *P. micans* (B) na DL₈₀ dos biosensaio de toxicidade de *D. hyalinata*. TL₅₀ = tempo letal para matar 50% da população (Teste de Log-rank: P < 0,001).

Tabela 1

Toxicidade (DL₅₀ e DL₉₀) dos óleos essenciais de dois quimiotipos de *L. gracilis* e seus compostos majoritários sobre lagartas de segundo ínstar de *D. hyalinata*.

Tratamento	Nº insetos	DL ₅₀ (95% IC) (µg mg ⁻¹)	DL ₉₀ (95% IC) (µg mg ⁻¹)	β	χ^2	<i>P</i> -valor
Quimiotipo timol	834	5,90 (5,07–6,81)	18,43 (15,14–23,86)	2,6	1,18	0,559
Quimiotipo carvacrol	831	4,56 (3,91–5,38)	16,72 (12,85–23,92)	2,3	0,72	0,702
Timol	932	2,99 (2,64–3,33)	6,89 (6,05– 8,10)	3,5	3,60	0,163
Carvacrol	707	0,94 (0,69–1,22)	6,12 (4,67–8,44)	1,6	1,05	0,597

β = inclinação.

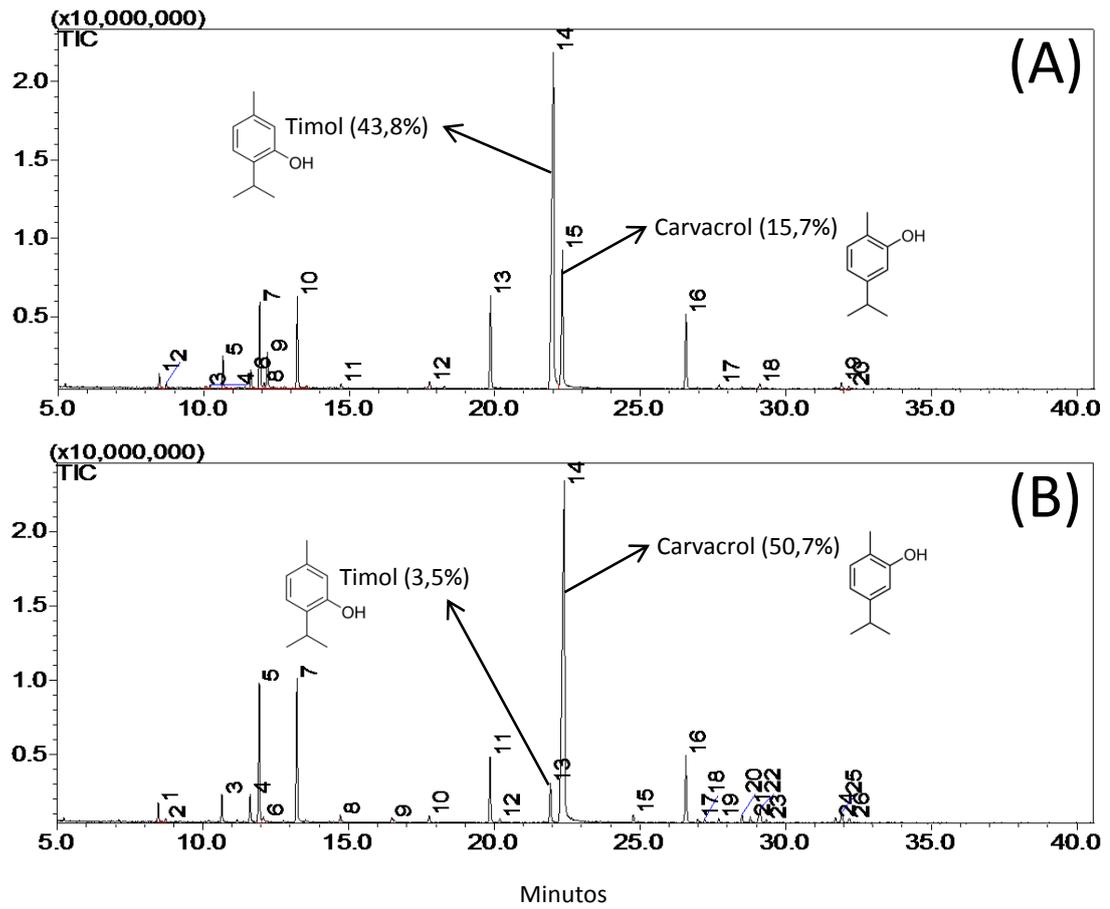


Fig. 1. Cromatogramas dos óleos essenciais dos genótipos LG-106 (quimiotipo timol) (A) e LG-109 (quimiotipo carvacrol) (B) de *L. gracilis*.

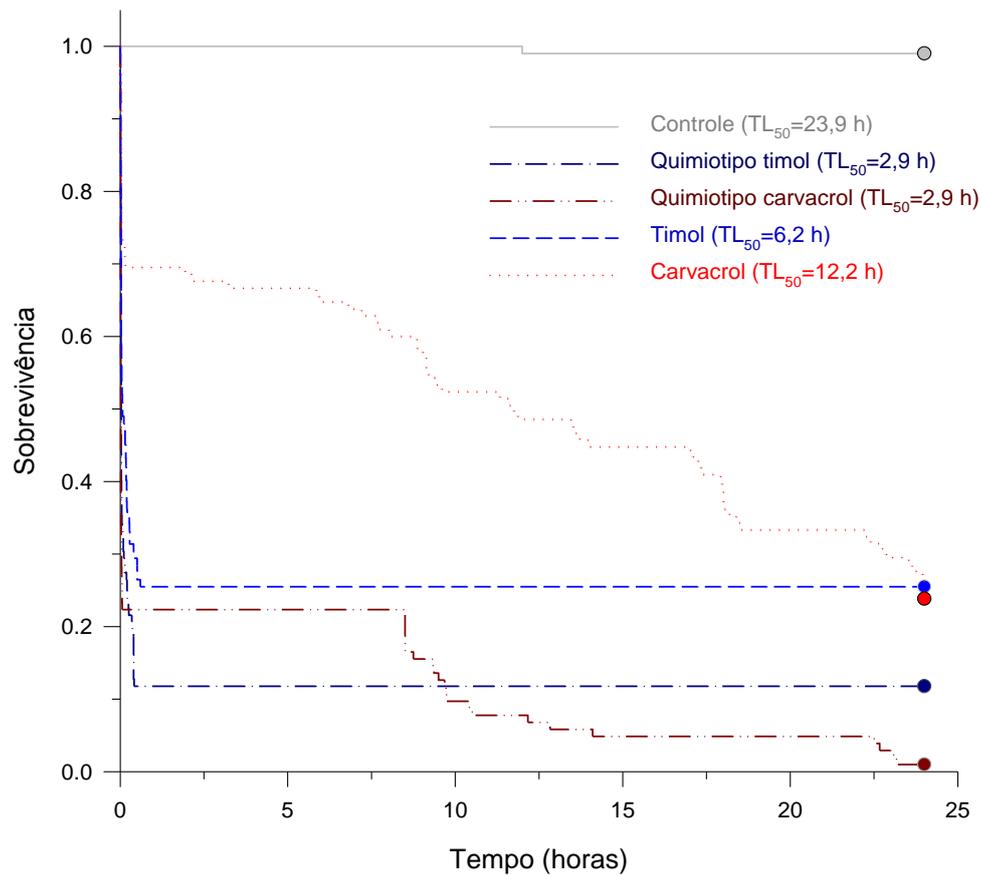


Fig. 2. Curvas de sobrevivência de dois óleos essenciais dos quimiotipos de *L. gracilis* e seus compostos majoritários sobre lagartas de segundo instar de *D. hyalinata* na DL₉₀ dos biosensaio de toxicidade. TL₅₀ = tempo letal para matar 50% da população (Teste de Log-rank: P < 0,001).

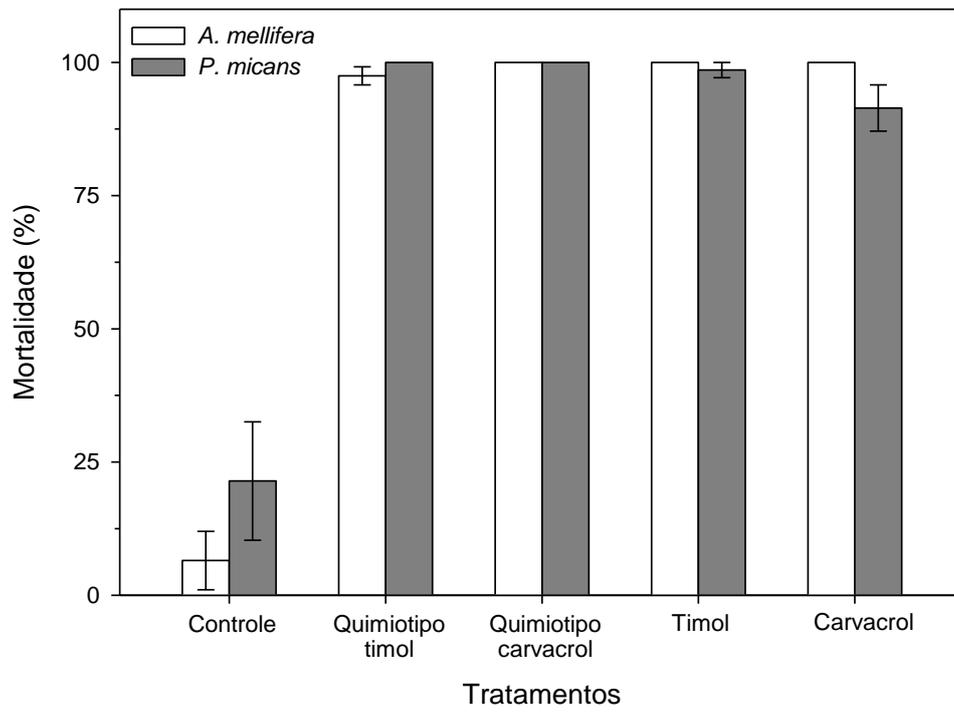


Fig. 3. Mortalidade de adultos de *A. mellifera* e *P. micans* expostos a DL_{80} para *D. hyalinata* de dois óleos essenciais dos quimiotipos de *L. gracilis* e seus compostos majoritários.

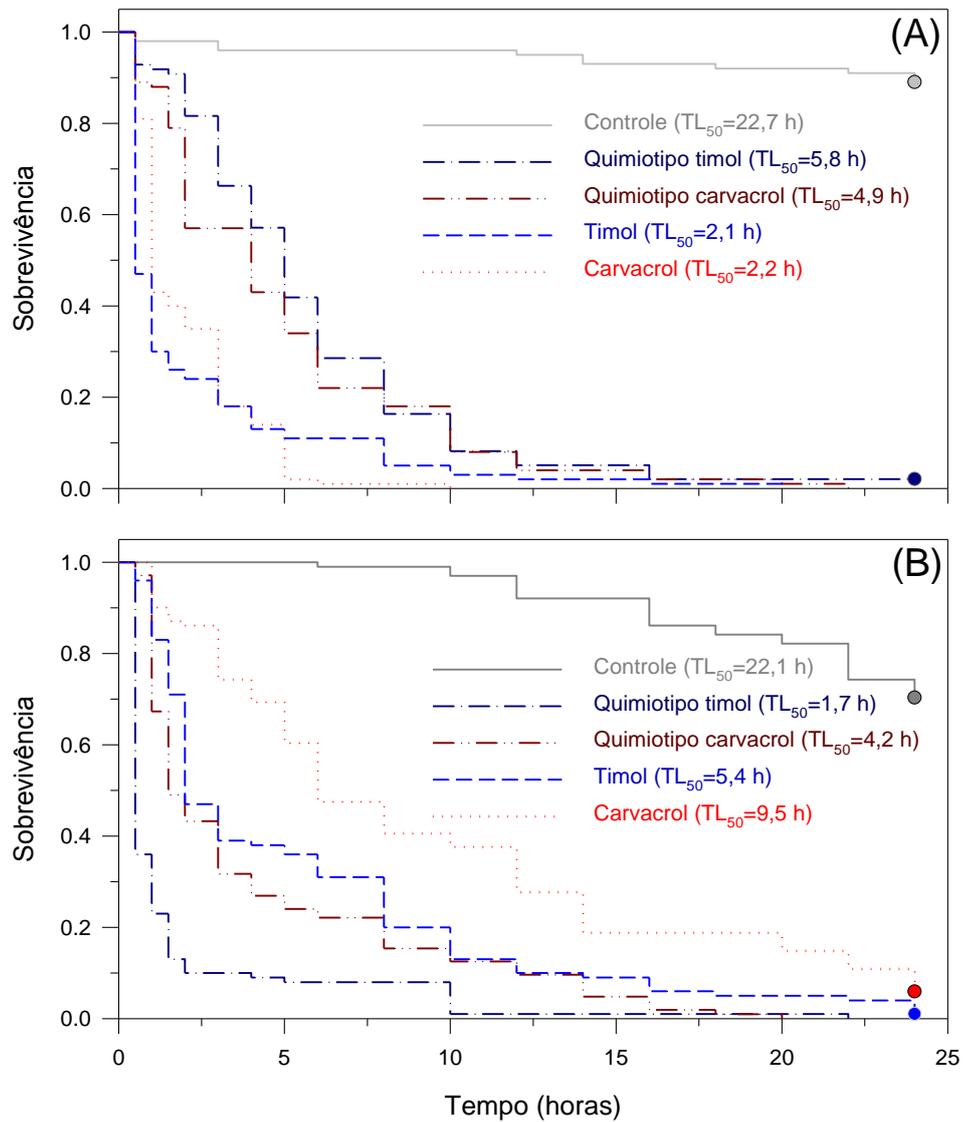


Fig. 4. Curvas de sobrevivência de dois óleos essenciais dos quimiotipos de *L. gracilis* e seus compostos majoritários sobre adultos de *A. mellifera* (A) e *P. micans* (B) na DL₈₀ dos biosensaís de toxicidade de *D. hyalinata*. TL₅₀ = tempo letal para matar 50% da população (Teste de Log-rank: P < 0,001).

5. ARTIGO 2: ÓLEOS ESSENCIAIS DE QUIMIOTIPOS DE *Lippia gracilis* E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS: TOXIDADE E EFEITOS COMPORTAMENTAIS EM *Cryptolestes ferrugineus*.

Periódico a ser submetido: **Journal of Stored Products Research**

RESUMO

O besouro *Cryptolestes ferrugineus* é a praga secundária de maior importância no armazenamento de soja, milho, trigo, arroz, cevada, aveia, frutos secos e nozes. Devido ao surgimento de populações resistentes aos inseticidas convencionais alternativas para seu controle vem sendo estudadas. Assim, objetivou-se avaliar a toxicidade e os efeitos comportamentais dos óleos essenciais de dois genótipos (LG-106 e LG-109) de *Lippia gracilis* e seus compostos majoritários sobre *C. ferrugineus*. Foram realizados bioensaios de aplicação tópica, fumigação, repelência e irritabilidade com os óleos essenciais e seus compostos majoritários. Os monoterpênicos timol e carvacrol foram os componentes majoritários encontrados nos óleos essenciais dos genótipos LG-106 (43,8%) e LG-109 (50,7%), respectivamente. Os óleos essenciais e os compostos majoritários foram altamente tóxicos por fumigação. As concentrações dos óleos essenciais dos quimiotipos timol e carvacrol necessárias para causar 50% de mortalidade a *C. ferrugineus* foram 20,7 e 25,1 $\mu\text{L L}^{-1}$, respectivamente. O timol e o carvacrol isolados foram 1,7 e 1,9 vezes mais tóxicos a *C. ferrugineus*. Os óleos essenciais dos quimiotipos timol e carvacrol causaram mortalidade em metade da população de *C. ferrugineus* em 63,3 e 83,1 horas. Entretanto, foram necessárias 26,6 e 31,5 horas para causar a mesma mortalidade em adultos de *C. ferrugineus* quando expostos ao timol e carvacrol. Todos os tratamentos causaram repelência e irritabilidade em adultos de *C. ferrugineus*. Assim, nossos resultados mostram o grande potencial dos óleos essenciais de *L. gracilis* e seus compostos majoritários para o desenvolvimento de novos produtos a serem utilizados no controle de pragas de grãos armazenados.

Palavras-chave: Cucujidae, inseticidas botânicos, timol, carvacrol.

ABSTRACT**Toxicity and behavioral effects of essential oils from chemotypes of *Lippia gracilis* and their major compounds against *Cryptolestes ferrugineus*.**

The *Cryptolestes ferrugineus* beetle is a secondary pest of major importance in the storage of soybeans, corn, wheat, rice, barley, oats, dried fruit and nuts. Due to the emergence of resistant populations to conventional insecticides, alternatives for controlling this insect have been studied. Thus, the objective of this work was to evaluate the toxicity and behavioral effects of essential oils of two genotypes (LG-106 and LG-109) of *Lippia gracilis* and their major compounds against *C. ferrugineus*. Bioassays of topical application, fumigation, repellency and irritability with essential oils and their major compounds were performed. The monoterpenes thymol and carvacrol were the major components found in the essential oils of genotypes LG-106 (43.8%) and LG-109 (50.7%), respectively. The essential oils and the major compounds were highly toxic by fumigation. The concentrations of the thymol and carvacrol chemotypes required to cause 50% mortality over *C. ferrugineus* were 20.7 and 25.1 $\mu\text{L L}^{-1}$, respectively. The isolated thymol and carvacrol were 1.7 and 1.9 times more toxic to *C. ferrugineus*. Thymol and carvacrol chemotypes of essential oils caused a mortality half the population of *C. ferrugineus* in 63,3 and 83,1 hours. However, it took 26.6 and 31.5 hours to cause the same mortality in adult of *C. ferrugineus* when exposed to thymol and carvacrol. All treatments caused repellency and irritability in adult of *C. ferrugineus*. Thus, our results show the great potential of essential oils of *L. gracilis* and their major compounds for the development of new products to be used in the control of stored grain pests.

Keywords: Cucujidae, botanical insecticides, thymol, carvacrol.

5.1. Introdução

Dentre os insetos que atacam produtos armazenados, o besouro *Cryptolestes ferrugineus* (Steohens, 1831) (Coleoptera: Cucujidae) é a praga secundária de maior importância no armazenamento de soja, milho, trigo, arroz, cevada, aveia, frutos secos e nozes (Campo et al., 2012). A ocorrência nestes produtos normalmente acontece em associação ou após infestação por *Sitophilus* sp. e *Rhyzopertha* sp. *C. ferrugineus* apresenta distribuição cosmopolita, sendo encontrado em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (Evans, 1981 apud. Athié & De Paula, 2002). No Brasil, este inseto pode ser encontrado em todas as regiões produtoras de grãos (Campo et al., 2012). Devido ao uso indiscriminado de inseticidas organossintéticos algumas populações de *C. ferrugineus* tornaram-se resistentes (Campo et al., 2012), o que tem dificultado o controle desse inseto-praga.

Substâncias de origem botânica têm sido apontadas como alternativas viáveis ao manejo de pragas por apresentarem vantagens como rápida ação, degradação e seletividade a organismos não alvo. O arbusto *Lippia gracilis* Schauer é nativo do nordeste brasileiro e apresenta folhas odoríferas (Gomes et al.; 2011) ricas em óleo essencial. A composição química do óleo essencial desta planta baseia-se principalmente em monoterpenos e sesquiterpenos (Silva, et al., 2008), apresentando diversas propriedades medicinais, sobretudo ação antimicrobiana, cicatrizante e para o tratamento de doenças cutâneas (Mendes et al., 2010; Neto et al., 2010; Riella et al., 2012; Ferraz et al., 2013). Estudos recentes apontam que o óleo essencial de *L. gracilis* também apresenta efeito tóxico sobre protozoários e artrópodes (Pereira et al., 2008; Silva et al., 2008; Cruz et al., 2013; Melo, et al., 2013).

Neste estudo foi avaliada a toxicidade e os efeitos comportamentais de *C. ferrugineus* expostos aos óleos essenciais de dois genótipos de *L. gracilis* e seus compostos majoritários.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1. *Cryptolestes ferrugineus*

A criação de *C. ferrugineus* foi mantida em frascos plásticos de 1L, contendo milho triturado como alimento, fechados com tampa de tela fina. Os grãos de milho foram previamente lavados, secos e congelados para eliminar qualquer resíduo de inseticida e infestação por pragas de grãos armazenados. A criação foi mantida em temperatura e umidade ambiente e foram replicadas periodicamente para manutenção.

5.2.2. Extração dos óleos essenciais

Os genótipos de *L. gracilis* (LG-106 = quimiotipo timol e LG-109 = quimiotipo carvacrol) foram cultivados no Campus Rural da Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão-SE, Brasil. Os espécimens foram depositados no Herbário da Universidade Federal de Sergipe, CCBS, Departamento de Biologia, São Cristóvão, Sergipe, Brasil.

As folhas das plantas foram colhidas e secas a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ por 4 dias em estufa de secagem (Sant`Ana et al., 2010). O óleo essencial foi obtido através da hidrodestilação do pó das folhas, em aparelho do tipo Clevenger. Posteriormente, o óleo foi separado da fase aquosa e mantido em freezer até sua utilização.

5.2.3. Análise química dos óleos essenciais

As análises dos componentes dos óleos essenciais foram realizadas utilizando CG-EM/CG-DIC (GC-2010 Plus; GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com um amostrador automático AOC-20i (Shimadzu). As separações foram realizadas usando uma coluna capilar de sílica fundida Rtx®-5MS Restek (polissiloxano 5%-difenil-95%-dimetil) de 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno (d.i.), 0,25- μm de espessura de filme, em um fluxo constante de Hélio (99,999%) com taxa de 1,2 mL.min⁻¹. Foi utilizado um volume de injeção de 0,5 μL (5 mg.mL⁻¹), com uma razão de *split* de 1:10. A programação

de temperatura do forno utilizada foi a partir de 50°C (isoterma durante 1,5 min), com um aumento de 4°C / min, à 200°C, em seguida, a 10°C / min até 250°C, terminando com uma isoterma de 5 min a 250 °C.

Os dados de CG-EM e CG-DIC foram simultaneamente adquiridos empregando um sistema de separação de detector; a razão de separação de escoamento foi de 4:1 (EM: FID). Um tubo restritor de 0,62 m x 0,15 mm d.i. (coluna capilar) foi utilizado para ligar o divisor para o detector do EM; um tubo restritor de 0,74 m x 0,22 mm d.i. foi usado para ligar o divisor para o detector do DIC. A temperatura do injetor foi de 250°C e a temperatura da fonte de íons de 200°C. Os íons foram gerados à 70 eV; a uma velocidade de varredura de 0,3 fragmentos (scans) s⁻¹ detectados no intervalo de 40-350 Da. A temperatura do DIC foi ajustada para 250°C, e os suprimentos de gás para o DIC foram ar sintético, hidrogênio, hélio em taxas de fluxo de 30, 300 e 30 mL.min⁻¹, respectivamente. A quantificação de cada constituinte foi estimada por normalização área do pico gerado no DIC (-%). As concentrações dos compostos foram calculados a partir das áreas dos picos de CG e foram dispostos por ordem de eluição do CG.

A identificação dos constituintes foi realizada com base na comparação dos índices de retenção da literatura. Para o índice de retenção será utilizado a equação de Van den Dool e Kratzamo em relação a uma série homóloga de *n*-alcanos (*n*C₉-*n*C₁₈). Foram utilizadas três bibliotecas do equipamento WILEY8, NIST107 e NIST21 que permite a comparação dos dados dos espectros com aqueles constantes das bibliotecas utilizando um índice de similaridade de 80%.

5.2.4. Compostos majoritários

Os constituintes majoritários dos óleos essenciais de *L. gracillis*, utilizados nos bioensaios, foram adquiridos através de padrões comercializados pela empresa SIGMA-ALDRICH.

5.2.5. Bioensaios

A toxicidade dos óleos essenciais dos quimiotipos de *L. gracilis* e os monoterpenos timol e carvacrol foram avaliados por duas vias de exposição: aplicação tópica e fumigação. Inicialmente foram utilizadas a dose de 30 µg mg⁻¹ no bioensaio de aplicação tópica e a concentração de 54,32 µL L⁻¹ no bioensaio de fumigação para determinar a eficiência dos tratamentos por estas vias de exposição. Testes posteriores foram realizados com a via de exposição mais eficiente.

Os óleos essenciais dos quimiotipos timol e carvacrol de *L. gracilis* e os compostos majoritários foram diluídos no solvente acetona (Panreac, UV-IR-HPLC-GPC PAI-ACS, 99.9% pureza). Testes preliminares com acetona mostraram que este solvente não afetou a sobrevivência de *C. ferrugineus*. Em todas as avaliações de toxicidade, os insetos foram considerados mortos quando se apresentaram imóveis.

5.2.5.1. Bioensaio de aplicação tópica

A massa média de *C. ferrugineus* utilizada nos cálculos das dosagens foi obtida medindo-se a massa de dez adultos não sexados utilizando uma balança analítica de precisão com 0,01 mg de sensibilidade (Shimadzu, AUW220D).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 6 repetições. Cada unidade experimental foi composta por um grupo de 10 adultos não sexados de *C. ferrugineus* colocados em potes plásticos de poliestireno de 120mL. Inicialmente foi utilizada a dose de 30 µg mg⁻¹. Não foram utilizadas outras doses devido a baixa mortalidade de *C. ferrugineus* na dose discriminatória. Foram aplicados 0,5µL da concentração da solução dos óleos essenciais e dos compostos majoritários na região dorsal de cada inseto, utilizando-se microseringa Hamilton®. Para o controle foi aplicado 0,5µL do solvente. Os potes foram revestidos por organza para evitar a saída dos insetos e permitir a entrada de oxigênio. Os recipientes foram mantidos em sala climatizada a 25±0,5°C, U.R.=75±5% e fotofase de 12

horas. A toxicidade das substâncias foi avaliada pela contagem de indivíduos mortos após 24 horas de exposição.

5.2.5.2. Bioensaio de fumigação

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 6 repetições. Cada unidade experimental foi composta por um grupo de 10 insetos adultos não sexados de *C. ferrugineus* mantidos em um recipiente de acrílico de 22,08 cm³ hermeticamente fechado. Inicialmente foi utilizada a concentração discriminatória de 54,32 µL L⁻¹. Adicionalmente foram utilizadas de quatro a sete concentrações para a construção de curvas dose-resposta. Foram aplicados 0,5 µL das concentrações das soluções dos óleos essenciais e dos compostos majoritários em papel filtro de 1cm² utilizando-se microseringa Hamilton®. Os papéis tratados foram acomodados nas tampas dos potes e recobertos com um tecido de organza, de forma a evitar o contato direto dos insetos com as substâncias. Os recipientes foram mantidos em sala climatizada a 25±0,5°C, U.R.=75±5% e fotofase de 12 horas. A toxicidade das substâncias foi avaliada pela contagem de indivíduos mortos após 24 horas de exposição.

5.2.5.3. Bioensaios de tempo letal

O tempo letal para *C. ferrugineus* foi determinado utilizando-se a DL₉₀ estabelecida nos bioensaios de toxicidade por fumigação. O procedimento empregado foi semelhante ao utilizado no bioensaio de fumigação, com 10 repetições, totalizando 100 insetos. A mortalidade foi avaliada a cada duas horas durante as primeiras 16 horas, seguida por intervalos de quatro horas até 24 horas. Posteriormente as avaliações foram realizadas de seis em seis horas até completar 120 horas do início do experimento.

5.2.5.4. Bioensaios comportamentais

Os bioensaios comportamentais foram realizados seguindo metodologia descrita por Cordeiro et al. (2010), com adaptações. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 20 repetições. Cada unidade experimental foi composta por um adulto não sexado de *C. ferrugineus* inserido em uma arena (placa de Petri de 6x2 cm) com papel filtro. Foram utilizadas soluções dos óleos essenciais a 1% para os quimiotipos de *L. gracilis* e os monoterpenos timol e carvacrol. O papel filtro foi cortado ao meio, sendo metade tratada com 0,2mL dos tratamentos e a outra metade tratada com 0,2 ml de acetona (controle). Após secagem, metades tratada e não-tratada foram coladas no fundo das placas com fita dupla face. Os insetos foram aclimatados em placas de Petri durante 30 minutos, antes de serem transferidos e posicionados no centro das arenas.

O comportamento dos indivíduos foi avaliado por dez minutos contínuos, sendo registrado o tempo de permanência em cada lado da placa. Quando o inseto entrou em contato com o lado tratado por menos de 1 segundo, o comportamento foi definido como repelência. Quando o inseto passou menos de 50% do tempo no lado tratado, o comportamento foi considerado como irritabilidade.

5.2.6. Análises estatísticas

Os resultados de mortalidade obtidos para todos os bioensaios de toxicidade foram corrigidos em relação à mortalidade ocorrida na testemunha usando-se a fórmula de Abbott (1925). Análises de Próbit foram realizadas para determinar as curvas de concentração-mortalidade dos óleos essenciais e dos seus compostos majoritários. Foram aceitas curvas cuja probabilidade de aceitação da hipótese de nulidade (de que os dados possuem distribuição de Próbit) pelo teste χ^2 foram maior que 0,05. Por meio destas curvas foram estimadas as concentrações letais para 50 e 90% das populações (CL₅₀ e CL₉₀) e seus respectivos intervalos de confiança a 95% de probabilidade. Análises de sobrevivência foram realizadas utilizando-se o teste de Log-rank, no programa Sigmaplot versão 11.0. Os dados dos bioensaios de comportamento foram testados para verificar a normalidade.

Posteriormente, foi realizado o teste não paramétrico de Wilcoxon rank sum para testar a diferenças entre os tratamentos. A distinção entre repelência e irritabilidade foi realizada por meio de regressão logística (PROC LOGISTIC, SAS Institute, 2001).

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Caracterização do óleo essencial

Foram identificados 100% dos constituintes dos óleos essenciais dos genótipos LG-106 e LG-109 de *L. gracilis*, totalizando 20 e 26 compostos, respectivamente (Tabela 1). O timol (43,8%) foi o composto majoritário do genótipo LG-106, caracterizando-o como quimiotipo timol. Já o genótipo LG-109 teve o carvacrol (50,67%) em maior proporção, o que caracterizou o óleo essencial deste genótipo como quimiotipo carvacrol (Tabela 1).

No óleo essencial do quimiotipo timol, o carvacrol representou 15,73% do total do óleo, seguido pelo metil timol (8,08%), γ -terpineno (6,90%), β -cariofileno (6,46%) e p -cimeno (6,40%). Três compostos foram encontrados variando entre 1 e 5% e dez compostos foram identificados em uma proporção inferior a 1%. No óleo essencial do quimiotipo carvacrol quatro compostos estiveram em proporções intermediárias: γ -terpineno (10,33%), p -cimeno (9,25%), β -cariofileno (6,14%) e metil timol (5,27%). Outros seis compostos foram encontrados variando entre os percentuais 1 e 5%, e dezessete em uma proporção inferior a 1% (Tabela 1).

A alteração na composição dos óleos essenciais pode influenciar diretamente nos resultados de testes biológicos. A combinação complexa dos compostos presentes no óleo essencial pode apresentar efeitos sinérgicos e atuar em aspectos distintos a nível celular (Cristani et al., 2007; Bakkali et al., 2008).

5.3.2. Bioensaios preliminares

Os óleos essenciais dos quimiotipos timol e carvacrol e seus compostos majoritários isolados foram eficientes contra *C. ferrugineus* quando a via de exposição foi por fumigação. Os óleos essenciais de ambos os quimiotipos assim como seus compostos majoritários causaram 100% de mortalidade por fumigação após 96 horas de exposição. Já na aplicação tópica a mortalidade foi inferior a 25 % (Fig. 1).

A eficiência da via de exposição está relacionada às características dos produtos utilizados, bem como à capacidade de penetração destas pelo tecido externo do animal. Para bactérias, tem-se sugerido que a toxicidade dos monoterpenoides timol e carvacrol está relacionada à perturbação na porção lipídica da membrana plasmática, possibilitando assim a penetração dos compostos na célula e a interação com sítios intracelulares (Cristani *et al.* 2007). No caso dos insetos, a penetração pelos espiráculos provavelmente seja a rota mais viável de penetração desses compostos.

5.3.3. Toxicidade por bioensaio de fumigação

Embora os óleos essenciais de ambos os quimiotipos tenham apresentado toxicidade a *C. ferrugineus* (Tabela 2), os compostos majoritários foram ainda mais tóxicos.

As substâncias utilizadas para o controle de pragas primárias de grãos armazenados muitas vezes não apresentam ação sobre pragas secundárias. Aumentos da população de *C. ferrugineus* nos silos de armazenamento são registradas quando inseticidas organossintéticos são utilizados no controle de pragas primárias, indicando resistência a estes produtos (Campo et al., 2012). Rajendran *et al.* (2004) mostraram que dose igual a 0,5 mg/L de fosfina foi necessária para causar 60,71% de mortalidade a cepas de *C. ferrugineus* susceptível. Por outro lado, Nayak *et al.* (2013) mostraram o uso de doses de 0,005 a 0,003 mg/L de fosfina para causar 50% de mortalidade em populações susceptíveis deste inseto com exposição entre 48 e 144 horas.

O óleo essencial do quimiotipo timol de *L. gracilis* apresentou uma toxicidade 1,6 vezes menor que o timol, que teve CL_{50} de $13,29\mu\text{L L}^{-1}$. Já o óleo do quimiotipo carvacrol foi 1,9 vezes menos eficiente do que o carvacrol, que apresentou CL_{50} de $12,53\mu\text{L L}^{-1}$ (Tabela 2). Assim, tais dados sugerem que a toxicidade dos óleos dos quimiotipos testados estão relacionadas à alta toxicidade de seus compostos majoritários. A ação de inseticida de inúmeros terpenos já é bastante conhecida (Cristani et al., 2007; Marangoni et al., 2012). Em trabalho desenvolvido por Hummelbrunner & Isman (2001) foi possível observar que os monoterpênicos timol e carvacrol apresentam alta toxicidade sobre *Spodoptera litura*.

5.3.4. Análise de sobrevivência de *C. ferrugineus*

A análise de sobrevivência mostra que tanto os óleos essenciais quanto seus compostos majoritários reduziram significativamente a sobrevivência de *C. ferrugineus* ao longo do tempo (Teste de Log-rank: $\chi^2=326,43$; gl = 4; $p < 0,001$). Todavia, o timol e carvacrol mostraram ação duas vezes mais rápida quando comparados com os óleos essenciais dos quimiotipos timol e carvacrol, respectivamente (Fig. 2).

Em todos os casos, só houve mortalidade a partir de 4 horas de exposição (Fig. 2). O timol foi o mais rápido em iniciar a mortalidade; seguido pelo óleo do quimiotipo timol (6 horas), carvacrol (8 horas) e o óleo do genótipo carvacrol (14 horas). O óleo essencial do quimiotipo carvacrol foi o que apresentou ação mais retardada, necessitando de 83,1 horas para matar 50% da população; enquanto que o majoritário timol foi a substância de ação mais rápida, causando a mesma mortalidade em 26,6 horas.

5.3.5. Bioensaio de comportamento

Ação repelente sobre *C. ferrugineus* foi observada para os óleos essenciais de ambos os quimiotipos assim como para os compostos majoritários timol e carvacrol a 1% (Fig. 3). O timol foi a substância menos repelente, com taxa de repelência de 52,53%. De forma contrária ao seu isômero, o carvacrol apresentou alta taxa de repelência, atingindo 86,28%. Não houve diferenças significativas na repelência observada entre os óleos essenciais de ambos os quimiotipos.

Diversos estudos tem mostrado o potencial repelente de metabólitos secundários de inúmeras famílias de plantas sobre as mais variadas ordens de insetos (Nerio et al., 2010; Zoubiri & Baaliouamer, 2011). Esta atividade deve-se basicamente aos monoterpênicos. A atividade repelente do timol e do carvacrol a artrópodes vem sendo registrada em estudos realizados desde o século XX (Lwande et al., 1999; Odalo et al., 2005; Pandey et al.; 2009). No entanto, devido à alta volatilidade dos óleos essenciais e de seus componentes, a ação repelente dos mesmos é relativamente rápida, agindo por curto período de tempo (Trongtokit et al., 2005). Entretanto o desenvolvimento de formulações pode ser utilizado para aumento do período de ação e para manutenção dos compostos ativos por maior tempo sobre as pragas (Nerio et al., 2010).

Todas as substâncias testadas também causaram irritabilidade em *C. ferrugineus* (Fig. 4). De forma geral, os insetos passaram mais que 85% do tempo total (10min) no lado não tratado. O óleo do quimiotipo carvacrol de *L. gracilis* demonstrou maior irritabilidade a *C. ferrugineus*, o qual passou 96,1% do tempo total na área da arena não tratada com esta substância. O comportamento de evitar estas substâncias pode ter um impacto na ação dos óleos essenciais e de seus compostos sobre *C. ferrugineus*, visto que isto impede maior exposição, favorecendo assim a sobrevivência do inseto (Cordeiro et al., 2010).

5.4. Conclusão

Os óleos essenciais de *L. gracilis* dos quimiotipos timol e carvacrol e seus compostos majoritários são tóxicos via fumigação aos adultos *C. ferrugineus*. O timol e carvacrol isolados são mais tóxicos do que os óleos essenciais dos quimiotipos de *L. gracilis*. Os óleos essenciais de *L. gracilis* dos quimiotipos timol e carvacrol e seus compostos majoritários são repelentes e causam irritabilidade a adultos *C. ferrugineus*.

5.5. Referências

- Athié, I., Paula, D.C., 2002. Insetos de grãos armazenados: aspectos biológicos e identificação. Varela, São Paulo, pp. 244.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. Food and chemical toxicology, 46, 446 – 475.
- Booth, R.G., Cox, M.L., Madge, R.B., 1990. IIE guides to insects of importance to man. C.A.B. International, 1990.
- Campo, C., Ferreira, B., Moscardi, F., 2012. Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. EMBRAPA, pp. 859, Brasília.
- Cordeiro, E.M.G., Corrêa, A.S., Venzon, M., Guedes, R.N.C., 2010. Insecticide survival and behavioral avoidance in the lacewings *Chrysoperla externa* and *Ceraeochrysa cubana*. Chemosphere, 81, 1352 – 1357.
- Cristani, M., D'arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Micieli, D., Venuti, V., Bisignano, G., Saija, A., Trombetta, D., 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 6300 – 6308.
- Cruz, E.M.O., Costa-Junior, L.M., Pinto, J.A.O., Santos, D.A., Araujo, S.A., Arrigoni-Blank, M.F., Bacci, L., Alves, P.B., Cavalcanti, S.C.H., Blank, A.F., 2013. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Veterinary Parasitology, 195, 198 – 202.
- David, E.F.S., Boaro, C.S.F., 2009. Translocação orgânica, produtividade e rendimento de óleo essencial de *Mentha piperita* L. cultivada em soluções nutritivas com variações dos níveis de N, P, K e Mg. Revista brasileira de plantas medicinais, 11, 236 – 246.
- Evans, D., 1981. The biology of stored products Coleoptera. In: Proc. Aust. Dev. Asst. Course on preservation of Stored Cereals, p. 149 – 185.
- Ferraz, R.P.C., Bomfim, D.S., Carvalho, N.C., Soares, M.B.P., Silva, T.B., Machado, W.J., Prata, A.N.P., Costa, E.V., Moraes, V.R.S., Nogueira, P.C., Bezerra, D.P., 2013. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). Phytomedicine, 20, 615 – 621.
- Gomes, S.V.F., Nogueira, P.C.L., Moraes, V.R.S., 2011. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia gracilis* Schauer. Eclética Química, 36, 64 – 77.
- Hummelbrunner, L.A., Isman, M.B., 2001. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal Agricultural and Food Chemical, 49, 715 – 720.
- Lwande, W., Ndakala, A.J., Hassanali, A., Moreka, L., Nyandat, E., Ndungu, M., Amiani, H., Gitu, P.M., Malonza, M.M., Punyua, D.K., 1999. *Gynandropsis gynandra* essential oil and its constituents as tick (*Rhipicephalus appendiculatus*) repellents. Phytochemistry, 50, 401 – 405.
- Marangoni, C., Moura, N.F., Garcia, F.R.M., 2012. Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. Revista de ciências ambientais, 6, 95 – 112.
- Melo, J.O., Bitencourt, T.A., Fachin, A.L., Cruz, E.M.O., Jesus, H.C.R., Alves, P.B., Arrigoni-Blank, M.F., Franca, S.C., Beleboni, R.O., Fernandes, R.P.M., Blank, A.F., Scher, R., 2013. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. Acta tropica, 128, 110 – 115.
- Mendes, S.S., Bomfim, R.R., Jesus, H.C.R., Alves, P.B., Blank, A.F., Estevam, C.S., Antonioli, A.R., Thomazzi, S.M., 2010. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. Journal of Ethnopharmacology, 129, 391 – 397.
- Nayak, M.K., Holloway, J.C., Emery, R.N., Pavic, H., Bartlet, J., Collins, P.J., 2013. Strong resistance to phosphine in the rusty grain beetle, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) (Coleoptera: Laemophloeidae): its characterization, a rapid assay for diagnosis and its distribution in Australia. Pest Management Science, 69, 48 – 53.

- Nerio, L.S., Olivero-Verbel, J., Stashenko, E., 2010. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, 101, 372 – 378.
- Neto, R.M., Matos, F.J.A., Andrade, V.S., Melo, M.C.N., Carvalho, C.B.M., Guimarães, S.B., Pessoa, O.D.L., Silva, S.S.L., Silva, S.F.R., Vasconcelos, P.R.L., 2010. The essential oil from *Lippia gracilis* Schauer, Verbanaceae, in diabetic rats. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20, 261 – 266.
- Odalo, J.O., Omolo, M.O., Malebo, H., Angira, J., Njeru, P.M., Ndiege, I.O., Hassanali, A., 2005. Repellency of essential oils of some plants from the Kenyan coast against *Anopheles gambiae*. *Acta tropica*, 95, 210 – 218.
- Pandey, S.k., Upadhyay, S., Tripathi, A.k., 2009. Insecticidal and repellent activities of thymol from the essential oil of *Trachyspermum ammi* (Linn) Sprague seeds against *Anopheles stephensi*. *Parasitology research*, 105, 507 – 512.
- Pereira, A.C.R.L., Oliveira, J.V., Gondim Junior, M.G.C., Câmara, C.A.G., 2008. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (FABR., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]. *Ciência agrotecnica*, 32, 717 – 724.
- Rajendran, S., Parveen, H., Begum, K., Chethana, R., 2004. Influence of phosphine on hatching of *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera: Cucujidae), *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae) and *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae). *Pest management science*, 60, 1114 – 1118.
- Riella, K.R., Marinho, R.R., Santos, J.S., Pereira-Filho, R.N., Cardoso, J.C., Albuquerque-Junior, R.L.C., Thomazzi, S.M., 2012. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 656 – 663.
- Sant'ana, T.C.P., Blank, A.F., Vieira, S.D., Arrigoni-Blank, M.F., Jesus, H.C.R., Alves, P.B., 2010. Influencia do armazenamento de folhas secas no óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin* BENTH.). *Química Nova*, 33, 1263 – 1265.
- Silva, W.J., Dória, G.A., Maia, R.T., Nunes, R.S., Carvalho, G.A., Blank, A.F., Alves, P.B., Marçal, R.M., Cavalcanti, S.C., 2008. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresource Tecnology*, 99, 3251 – 3255.
- Trongtokit, Y., Rongsriyam, Y., Komalamisra, N., Apiwathnasorn, C. 2005. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. *Phytotherapy research*, 19, 303 – 309.
- Zoubiri, S., Baaliouamer, A., 2011. Potentiality of plants as source of insecticide principles. *Journal of Saudi Chemical Society*.

Legendas das figuras

Fig. 1. Toxicidade de óleos essenciais de dois quimiotipos de *L. gracilis* e seus compostos majoritários sobre adultos de *C. ferrugineus* por aplicação tópica ($30 \mu\text{g mg}^{-1}$) e fumigação ($54,32 \mu\text{L L}^{-1}$).

Fig. 2. Curvas de sobrevivência de dois óleos essenciais dos quimiotipos de *L. gracilis* e seus compostos majoritários sobre adultos de *C. ferrugineus* na DL_{90} dos biosensaio de toxicidade. TL_{50} = tempo letal para matar 50% da população (Teste de Log-rank: $\chi^2 = 326,43$; $\text{gl} = 4$; $p < 0,001$).

Fig. 3. Repelência de adultos de *C. ferrugineus* expostos durante 10min aos óleos essenciais de dois quimiotipos de *L. gracilis* e seus compostos majoritários em arenas de papel de filtro (6 cm de diâmetro). Histograma com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Wilcoxon ($p < 0,05$).

Fig. 4. Irritabilidade de adultos de *C. ferrugineus* expostos durante 10min aos óleos essenciais de dois quimiotipos de *L. gracilis* e seus compostos majoritários em arenas de papel de filtro (6 cm de diâmetro). Histograma com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Wilcoxon ($p < 0,01$). * indica diferença significativa entre a área tratada e não tratada da arena (Teste de Wilcoxon, $p < 0,05$).

Tabela 1

Composição dos óleos essenciais de dois genótipos de *L. gracilis* (LG-108 e LG-109) caracterizado por GC/MS e GC/FID.

Composto	Índice de retenção	Concentração do composto (%)	
		LG-106	LG-109
a-Thujeno	930	1,00	1,23
a-Pineno	939	0,44	0,30
Sabineno	975	0,27	0,00
b-Pineno	979	0,29	0,00
Mirceno	990	2,45	1,84
a Terpineno	1017	1,42	1,93
p-Cimeno	1024	6,40	9,25
Limoneno	1029	0,29	0,58
1,8 Cineole	1031	3,08	0,00
g-Terpineno	1059	6,90	10,33
Linalol	1096	0,48	0,57
Ipsdienol	1145	0,00	0,48
Terpinen-4-ol	1177	0,66	0,69
Metil timol	1235	8,08	5,27
Metil carvacrol	1244	0,00	0,31
Timol	1290	43,80	3,52
Carvacrol	1298	15,73	50,67
Acetato de carvacrol	1372	0,00	0,64
b-Cariofileno	1419	6,46	6,14
α -trans Bergamoteno	1434	0,00	0,33
Aromadendreno	1441	0,00	0,26
a-Humuleno	1454	0,47	0,38
2,4-Dimetoxiacetofenona	1486	0,00	0,70
2,5-Dimetoxiacetofenona	1494	0,00	0,51
Biciclogermacreno	1500	0,60	1,65
b-Bisaboleno	1505	0,00	0,35
Espatuleno	1578	0,00	0,55
Oxido de Cariofileno	1583	0,78	1,02
Viridiflorol	1592	0,40	0,50
Total detectado (%)		100,00	100,00

Tabela 2

Toxicidade (DL₅₀ e DL₉₀) dos óleos essenciais de dois quimiotipos de *L. gracilis* e seus compostos majoritários por fumigação sobre adultos de *C. ferrugineus*.

Tratamento	Nº insetos	DL ₅₀ (95% IC) (µL L ⁻¹)	DL ₉₀ (95% IC) (µL L ⁻¹)	β	χ^2	<i>P</i> -valor
Quimiotipo timol (LG-106)	519	20,70 (20,31-21,09)	23,67 (23,08-24,47)	22,0	0,375	0,830
Timol	439	12,53 (12,00-13,07)	16,70 (15,82-17,91)	10,3	0,011	0,994
Quimiotipo carvacrol (LG-109)	544	25,14 (24,02-26,10)	30,78 (29,70-32,12)	14,5	2,991	0,222
Carvacrol	437	13,29 (12,45-14,24)	21,24 (19,17-24,50)	6,3	0,006	0,997

β = inclinação.

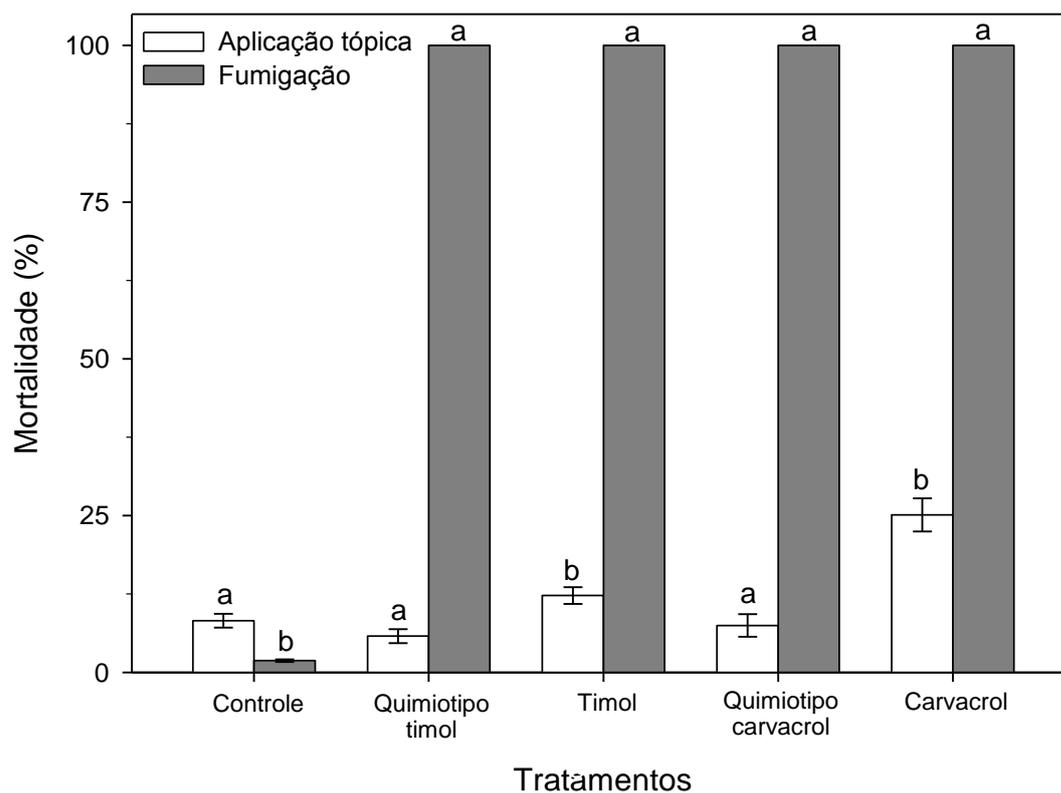


Fig. 1. Toxicidade de óleos essenciais de dois quimiotipos de *L. gracilis* e seus compostos majoritários sobre adultos de *C. ferrugineus* por aplicação tópica ($30 \mu\text{g mg}^{-1}$) e fumigação ($54,32 \mu\text{L L}^{-1}$). Histograma com a mesma letra, para cada via de exposição, não diferem significativamente pelo teste de Wilcoxon ($p < 0,05$).

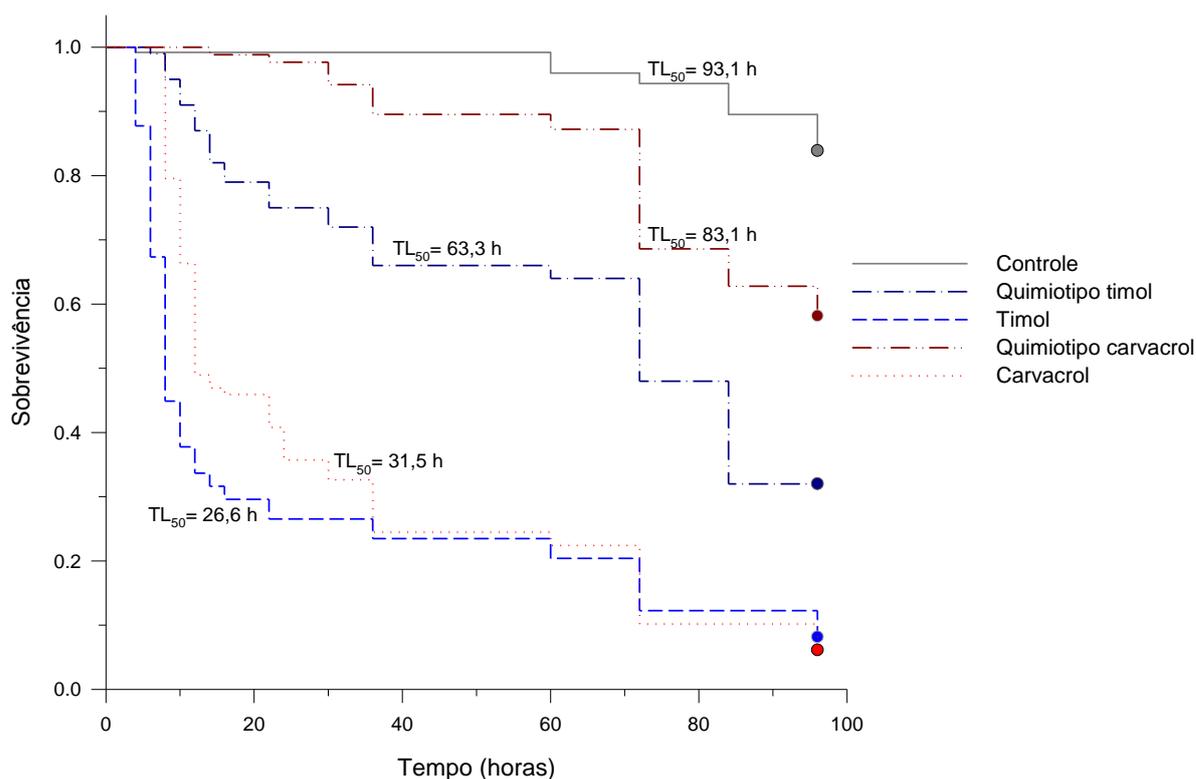


Fig. 2. Curvas de sobrevivência de dois óleos essenciais dos quimiotipos de *L. gracilis* e seus compostos majoritários sobre adultos de *C. ferrugineus* na DL₉₀ dos biosensaio de toxicidade. TL₅₀ = tempo letal para matar 50% da população (Teste de Log-rank: $\chi^2 = 326,43$; gl = 4; p < 0,001).

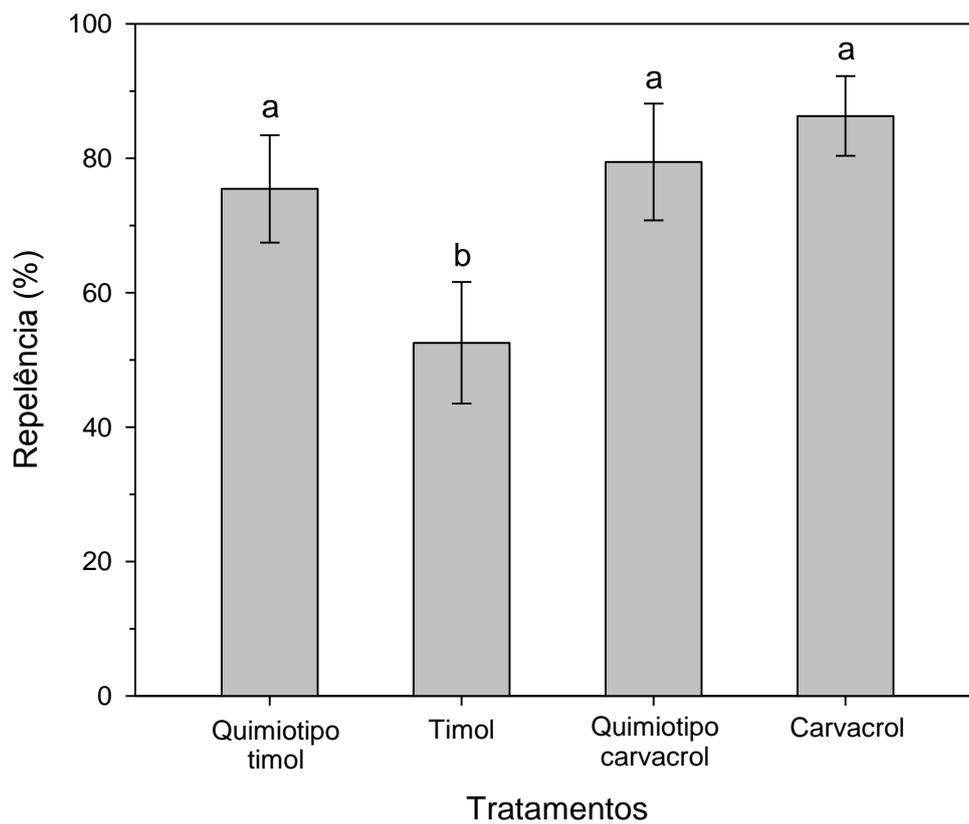


Fig. 3. Repelência de adultos de *C. ferrugineus* expostos durante 10min aos óleos essenciais de dois quimiotipos de *L. gracilis* e seus compostos majoritários em arenas de papel de filtro (6 cm de diâmetro). Histograma com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Wilcoxon ($p < 0,05$).

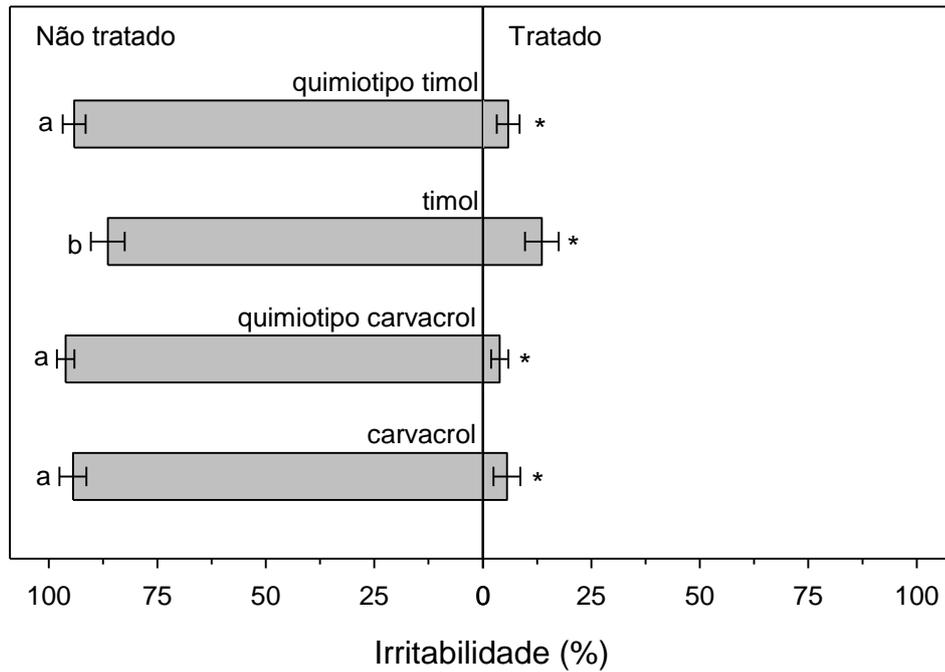


Fig. 4. Irritabilidade de adultos de *C. ferrugineus* expostos durante 10min aos óleos essenciais de dois quimiotipos de *L. gracilis* e seus compostos majoritários em arenas de papel de filtro (6 cm de diâmetro). Histograma com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Wilcoxon ($p < 0,01$). * indica diferença significativa entre a área tratada e não tratada da arena (Teste de Wilcoxon, $p < 0,05$).

6. CONCLUSÕES GERAIS

Os óleos essenciais dos quimiotipos timol e carvacrol de *L. gracilis* são tóxicos a lagartas de *D. hyalinata* e a adultos de *C. ferrugineus*. Os compostos majoritários destes óleos essenciais quando aplicados isoladamente são ainda mais tóxicos a estas espécies. Os óleos essenciais de *L. gracilis* e os compostos majoritários não são seletivos a *A. mellifera* e *P. micans*. Os óleos essenciais de *L. gracilis* dos quimiotipos timol e carvacrol e seus compostos majoritários são repelentes e causam irritabilidade a adultos *C. ferrugineus*. Assim, os óleos essenciais dos quimiotipos de *L. gracilis*, especialmente o quimiotipo carvacrol, podem consistir em fontes promissoras para a síntese de novas moléculas inseticidas para pragas de campo e produtos armazenados.