UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS NATURAIS

ANÁLISE QUÍMICA E EFEITOS LETAIS E SUB-LETAIS DO ÓLEO ESSENCIAL DE PATCHOULI E SUA NANOEMULSÃO EM POPULAÇÕES DE *Sithopilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)

ÁLVARO MARCIO DE OLIVEIRA SANTOS

SÃO CRISTOVÃO-SE
2013

ÁLVARO MARCIO DE OLIVEIRA SANTOS

ANÁLISE QUÍMICA E EFEITOS LETAIS E SUB-LETAIS DO ÓLEO ESSENCIAL DE PATCHOULI E SUA NANOEMULSÃO EM POPULAÇÕES DE *Sithopilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais na área de concentração Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador
Prof. Dr. Leandro Bacci

SÃO CRISTÓVÃO-SE
2013

ÁLVARO MARCIO DE OLIVEIRA SANTOS

ANÁLISE QUÍMICA E EFEITOS LETAIS E SUB-LETAIS DO ÓLEO ESSENCIAL DE PATCHOULI E SUA NANOEMULSÃO EM POPULAÇÕES DE *Sithopilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais na área de concentração Biotecnologia de Recursos Naturais.

Aprovada em 27 de Fevereiro de 2013.

Prof. Dr. Vinícius Albano Araújo

Prof. Dr. Arie Fitzgerald Blank

Prof. Dr. Leandro Bacci-UFS
(Orientador)

SÃO CRISTÓVÃO-SE
2013

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me iluminado e me guiado ao longo destes dois anos.

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

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

Aos órgãos de fomento CNPq e Fapitec pelo financiamento.

Ao Professor Dr. Leandro Bacci, pelos ensinamentos, dedicação, paciência e pela amizade construída destes anos de pesquisa.

Ao Comitê de Orientação pelo apoio na realização da dissertação.

A todos os professores e do PROBIOTEC pelos valiosos ensinamentos.

À minha esposa pelos anos de paciência, apoio e amor demonstrado a mim.

À minha filha querida Alice pelo carinho e amor.

À minha mãe pelo seu amor e carinho, por toda atenção e esforços que até hoje vem fazendo, sendo peça fundamental para o meu sucesso.

Ao meu irmão Anderson pelo companheirismo.

Aos colegas da turma de mestrado pelas palavras de incentivo e pelo carinho.

Aos amigos Lenoir, Thales, Diego, Lazara e Tamires que foram fundamentais no auxílio da parte prática deste trabalho.

Aos amigos Clinica Fitossanitária: Abrãao, Anne, Bia, Morgana, Felipe e Roseane.

À todas as pessoas que me apoiaram e ajudaram a atingir este objetivo.

BIOGRAFIA

ÀLVARO MARCIO DE OLIVEIRA SANTOS, filho de José Bonifácio Vieira e Auristela de Oliveira, esposo de Andressa Rodrigues de Santana, nasceu na cidade de Aracaju, no Estado de Sergipe, em 09 de novembro de 1985.

Em maio de 2009, graduou-se em Química Licenciatura pela Universidade Federal de Sergipe, em São Cristóvão, Sergipe, onde foi bolsista de iniciação cientifica, pela Fapitec, de abril de 2006 a março de 2009.

No período de maio de 2009 até fevereiro de 2011, foi bolsista DTI, pela Fapitec, no Instituto de Pesquisas e Tecnologia do Estado de Sergipe ITPS, data de ingresso no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais na Universidade Federal de Sergipe.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS i
LISTA DE TABELAS ii
RESUMO iii
ABSTRACT iv

1. INTRODUÇÃO 10

2. REFERENCIAL TEÓRICO 12
2.1 Problemas de resistência de insetos aos inseticidas organossintéticos 12
2.1.1 Pragas de grãos armazenados 12
2.1.2 Populações de *S. zeamais* 13
2.2 Mecanismos de resistência de insetos 14
2.2.1 Mecanismos bioquímicos 14
2.2.2 Mecanismos fisiológicos 15
2.2.3 Mecanismos comportamentais 16
2.3 Compostos botânicos no controle de insetos-praga 16

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 19

4. CAPÍTULO:Análise química e efeitos letais e sub-letais do óleo essencial de patchouli e sua nanoemulsão em populações de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)... 23
Resumo 24
Abstract 25
1. Introdução 26
2. Materiais e métodos 28
2.1. Populações de *S. zeamais* 28
2.2. Material vegetal 28
2.2.1. Extração do óleo essencial (OE) de *P. cablin* 28
2.2.2. Análise química do OE de *P. cablin* 28
2.3. Formulação de OE de *P. cablin* 29
2.3.1. Preparo da formulação 29
2.3.2. Caracterização da formulação 29
2.4. Bioensaios com as populações de *S. zeamais* 30
2.4.1. Aplicação tópica 30
2.4.2. Toxicidade por contato do OE de *P. cablin e* da sua nanoemulsão..... 31
2.4.3. Toxicidade por fumigação do OE de *P. cablin e* da sua nanoemulsão... 31
2.4.4. Bioensaios de repelência do OE de *P. cablin e* da sua nanoemulsão... 32
2.4.5. Bioensaios de taxa instantânea de crescimento (ri) e consumo dos grãos (g) 32
2.5. Análises estatísticas 33
3. Resultados 34
3.1. Caracterização do OE de *P. cablin* 34
3.2. Toxicidade por aplicação tópica 34
3.3. Caracterização da nanoemulsão de OE de *P. cablin* 35
3.4. Toxicidade por contato e fumigação do OE e da nanoemulsão de *P. cablin* .. 35
3.5. Bioensaios de repelência do OE e da nanoemulsão de *P. cablin* 36
3.6. Bioensaios de taxa instantânea de crescimento (ri) e consumo dos grãos (g) 36
4. Discussão 37
5. Conclusões 41
6. Referências 42

5. CONCLUSÕES GERAIS 53

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO

FIGURA 1. Locais de coleta de nove populações do gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Cucurlionidade) em sete estados brasileiros [Acre (AC), Mato Grosso do Sul (MS), Minas Gerais (MG), Paraná (PR), Pernambuco (PE), São Paulo (SP) e Sergipe (SE)].

FIGURA 2. Imagem obtida por microscopia de luz polarizada, tamanho das gotas, índice de polidispersão e condutividade elétrica da nanoemulsão do OE de *Pogostemon cablin* a 14%.

FIGURA 3. Repelência do OE de *Pogostemon cablin* e da nanoemulsão do OE de *P. cablin* (14%), nas CL_{50} e CL_{70} (µl ml^{-1}), sobre duas populações do gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* após sete tempos de exposição. * Diferença significativa entre o número de indivíduos nas metades tratadas e não tratadas, utilizando o teste t pareado (P <0,05). n.s. = não significativo.

FIGURA 4. Taxa instantânea de crescimento (ri) (A) e consumo de massa de grãos de milho (g) (B) de duas populações do gorgulho do milho *S. zeamais* após 60 dias de exposição a nanoemulsão do OE de *P. cablin* (14%) em diferentes concentrações. I = erro padrão da média.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO

TABELA 1. Composição do óleo essencial (OE) de *Pogostemon cablin* caracterizado por GC/MS e GC/FID.

TABELA 2. Tempo letal (TL_{50} e TL_{90}) do OE de *Pogostemon cablin* aplicado topicamente em populações do gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* na dose de 15 µl mg^{-1}.

TABELA 3. Atividade inseticida (DL_{50} e DL_{90}) do OE de *Pogostemon cablin* aplicado topicamente em populações do gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* após 48 e 72 horas de exposição.

TABELA 4. Toxicidade por contato (papel de filtro) e por fumigação do OE e da nanoemulsão (14%) de *Pogostemon cablin* sobre duas populações do gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* após 48 e 72 horas de exposição.

RESUMO

SANTOS, Álvaro Marcio de Oliveira. **Análise química e efeitos letais e sub-letais do óleo essencial de patchouli e sua nanoemulsão em populações de *Sithopilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)** São Cristóvão: UFS, 2013. 54 p. (Dissertação – Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais).

O gorgulho do milho (*Sitophilus zeamais*) é uma das pragas de grãos armazenados de maior importância no mundo. O uso indiscriminado de inseticidas convencionais tem levado à seleção de populações de *S. zeamais* resistentes. Apesar dos óleos essenciais (OE) de plantas serem considerados uma alternativa ao uso de inseticidas convencionais, sua amplitude de utilização frente às populações de insetos com capacidades distintas de resistência ainda não foi determinada. Neste trabalho analisamos a toxicidade do OE de *Pogostemon cablin* e da nanoemulsão à base desse OE sobre nove populações de *S. zeamais* provenientes de diferentes regiões do Brasil. Para isso foram realizados bioensaios de aplicação tópica, contato, fumigação, repelência e efeitos sobre o crescimento populacional. Foram identificados quinze compostos no OE de *P. cablin*, sendo o patchoulol o componente majoritário (55,04%). O OE de *P. cablin* demonstrou atividade inseticida sobre as nove populações de *S. zeamais* quando aplicado topicamente. O tempo necessário para causar 50% de mortalidade das populações foi em média 33,4 horas. As nove populações de *S. zeamais* responderam de modo semelhante ao OE de *P. cablin*. As doses letais para matar 50% das populações resultaram em baixas razões de toxicidade (<2). A população de Viçosa-MG foi a mais susceptível ao OE de *P. cablin*, com DL_{50} de 9,17 e 8,01 µg mg^{-1} após 48 e 72 horas de exposição, respectivamente. A maior tolerância ao OE de *P. cablin* foi detectada na população de Sete Lagoas-MG, que apresentou aumento na DL_{50} de 1,77 e 1,53 vezes. A concentração do OE de *P. cablin* necessária para causar 50% de mortalidade das populações por contato e fumigação variou de 0,34 a 0,43 µl ml^{-1} e 28,6 a 33,5 µl l^{-1}, respectivamente. Já a nanoemulsão de *P. cablin* apresentou CL_{50} que variaram de 1,28 a 8,84 µl ml^{-1} e 32,7 a 39,5 µl l^{-1}. Houve aumento da toxicidade por contato e fumigação (CL_{50}) da nanoemulsão de *P. cablin* de 48 para 72 horas de exposição. A toxicidade (CL_{50}) por contato e fumigação sobre as populações de Viçosa-MG e Sete Lagoas-MG após 48 e 72 horas de exposição ao OE de *P. cablin* foi, na maioria das vezes, maior do que a toxicidade causada pela nanoemulsão de *P. cablin*. O OE e a nanoemulsão de *P. cablin* foram repelentes nas CL_{50} e CL_{70} em todos os tempos de exposição para a população de Viçosa-MG. O mesmo ocorreu com a população de Sete Lagoas-MG, exceção para a CL_{50} após 4, 6 e 8 horas de exposição e para a CL_{70} após 24 horas de exposição à nanoemulsão de *P. cablin*. Para a população de Viçosa-MG, não houve diferença na repelência causada pelo OE e nanoemulsão de *P. cablin*. Já para a população de Sete Lagoas-MG, o OE de *P. cablin* causou maior repelência a esta população se comparado a nanoemulsão deste OE. Concentrações crescentes da nanoemulsão de *P. cablin* resultaram em redução do r_i e do consumo de grãos das duas populações. As populações de Viçosa-MG e Sete Lagoas-MG entraram em declínio (r_i<0) a partir das concentrações de 50,15 e 67,29 µl kg^{-1}, respectivamente.

Palavras-chave: *Pogostemon cablin*; fumigação, repelência, nanoemulsão; resistência; taxa de crescimento instantânea.

---

* Comitê Orientador: Leandro Bacci – UFS (Orientador), Arie Fitzgerald Blank – UFS e Vinicius Albano Araújo – UFV.

ABSTRACT

SANTOS, Álvaro Marcio de Oliveira. **Chemical analysis and lethal and sub-lethal patchouli essential oil and its nanoemulsion in populations *Sithopilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)** São Cristóvão: UFS, 2013. 54 p. (Dissertation - Master of Biotechnology of Natural Resources)

The maize weevil (*Sitophilus zeamais*) is one of the stored grain pests of major importance in the world. The indiscriminate use of conventional insecticides has led to the selection of populations of resistant S. zeamais. Although the essential oils (EO) of plants are considered an alternative to conventional insecticides, their range of use due to insect populations with different capacities resistance has not been determined. We examined the toxicity of the EO of *Pogostemon cablin* and its nanoemulsion on nine populations of *S. zeamais* from different regions of Brazil. For that were performed bioassays topical application, contact, fumigation, and repellency effects on population growth. Fifteen compounds were identified the EO of *P. cablin*, and patchoulol was major component (55.04%). The EO of *P. cablin* showed average activity against the nine populations of *S. zeamais* when applied topically. The time required to cause 50% mortality of the population was 33.4 hours. The nine populations of *S. zeamais* responded similarly to EO of *P. cablin*. The lethal dose to kill 50% of the population resulted in low toxicity index (<2). The population of Viçosa-MG was more susceptible the EO of *P. cablin*, with LD_{50} of 9.17 and 8.01 µg mg^{-1} after 48 and 72 hours exposure respectively. The greater tolerance of EO *P. cablin* was detected in the population of Sete Lagoas, Minas Gerais, which increased the LD_{50} of 1.77 and 1.53 times. The concentration the EO of *P. cablin* required to cause 50% mortality of the population by contact and fumigation ranged from 0.34 to 0.43 µl ml^{-1} and from 28.6 to 33.5 µl l^{-1}, respectively. Already the nanoemulsion *P. cablin* showed LC_{50} ranging from 1.28 to 8.84 µl ml^{-1} and from 32.7 to 39.5 µl l^{-1}. There was an increase in toxicity by contact and fumigation (LC_{50}) of the nanoemulsion of *P. cablin* from 48 to 72 hours of exposure. Toxicity (LC_{50}) for contact and fumigation on populations of Viçosa-MG and Sete Lagoas-MG after 48 and 72 hours of exposure to EO *P. cablin* was in most cases greater than the toxicity caused by nanoemulsion of *P. cablin*. The EO and the nanoemulsion of *P. cablin* were LC_{50} and LC_{70} repellents in at all times of exposure for the population of Viçosa-MG. The same occurred with the population of Sete Lagoas, Minas Gerais, except for LC_{50} after 4, 6 and 8 hours of exposure and the LC_{70} after 24 hours of exposure to nanoemulsion of *P. cablin*. For the population of Viçosa-MG, there was no difference in repellency caused by EO and nanoemulsion of *P. cablin*. As for the population of Sete Lagoas, Minas Gerais, EO *P. cablin* caused greater repellency to this population compared to this oil nanoemulsion. Increasing concentrations of nanoemulsion of *P. cablin* resulted in reduction and consumption of grains of the two populations. Populations of Viçosa-MG and Sete Lagoas-MG entered decline (ri <0) using concentrations of 50.15 and 67.29 µl kg^{-1}, respectively.

Keywords: *Pogostemon cablin*; fumigation; repellency; nanoemulsion; resistance; instantaneous rate of population growth.

---

* Guidance Committee: Leandro Bacci – UFS (Orientador), Arie Fitzgerald Blank – UFS e Vinicius Albano Araújo – UFV.

1. INTRODUÇÃO

O gorgulho do milho (*Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855) (Coleoptera: Curculionidae) é uma das mais importantes pragas de grãos armazenados em regiões tropicais e subtropicais do mundo. No Brasil, esta espécie é a principal praga de grãos armazenados de milho, podendo também atacar o sorgo, trigo, arroz e cevada (LORINI et al., 2008), além de alguns produtos alimentícios secos e industrializados como o macarrão. O ataque desta praga ocorre nos grãos de milho intactos (praga primária) causando redução nos pesos e na qualidade dos mesmos (TAVARES et al., 2005).

O controle químico é a forma mais utilizada de manejo de *S. zeamais*, o que se deve à rapidez de ação, baixo custo e facilidade de aplicação destes produtos. No entanto, o uso indiscriminado de inseticidas organossintéticos ao longo do tempo favoreceu o surgimento de populações de *S. zeamais* resistentes, inclusive no Brasil. A resistência consiste na habilidade de indivíduos de uma espécie suportar doses de substâncias tóxicas que seriam letais para a maioria dos indivíduos da população. Assim, a resistência aos inseticidas é o resultado de alterações na frequência de alelos na população que capacitam os indivíduos a sobreviver em frente a uma pressão seletiva do ambiente. A seleção de resistência em populações de insetos tem sido um dos grandes entraves ao sucesso dos programas de manejo de pragas de grãos armazenados (GUEDES et al., 1995; MCKENZIE et al., 1996). Uma vez que o Brasil apresenta grande extensão territorial, as estratégias de manejo e as pressões seletivas sobre *S. zeamais* podem diferir marcadamente entre as regiões, resultando em níveis distintos de resistência aos pesticidas.

Os principais mecanismos pelos quais os insetos expressam a resistência podem ser comportamentais, fisiológicos e bioquímicos. Os mecanismos comportamentais se resumem em alterações nos órgãos sensoriais e na capacidade de aprendizado do indivíduo, que os permitem maior habilidade em evitar os efeitos letais de uma substância tóxica (GUEDES et al.,1995; RIBEIRO et al., 2003; FRAGOSO et al., 2005). Já os mecanismos fisiológicos de resistência compreendem: i) maior dificuldade de penetração do inseticida no organismo e; ii) isolamento das moléculas inseticidas em estruturas inertes no interior do corpo do inseto (LIU et al., 2002). Por sua vez, os mecanismos bioquímicos são os mais importantes e podem ocorrer por dois processos: i) insensibilidade do sítio de ação e, ii) aumento da destoxificação metabólica. A ação de enzimas destoxificativas tem a função de aumentar a polaridade das moléculas inseticida, o que acarreta em maior excreção dessas substâncias pelo organismo. Os principais grupos enzimáticos destoxificadores são as esterases, as glutationas-S-transferases e o complexo das oxidases microssomais. O mecanismo bioquímico é o mais comum de resistência de insetos a inseticidas (RIBEIRO et al., 2003).

Uma das alternativas ao manejo de pragas resulta da utilização de plantas com atividade inseticida. A evolução das defesas químicas nas plantas está ligada ao surgimento dos metabólitos secundários que por sua vez estão, em grande parte, relacionados ao impacto seletivo da fitofagia. Plantas com ação inseticida têm sido utilizadas como método alternativo de controle de pragas de grãos armazenados por meio de produtos com formulação em pó, extratos e óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008).

A planta *Pogostemon cablin* (Lamiaceae) é amplamente cultivada no mundo para extração de seu óleo essencial (SANTOS et al., 2010), que apresenta propriedades medicinais incluindo ação antifúngica, anti-helmintica, antitripanossoma (BETTONI et al., 2010), antieméticas, antibacteriana (BLANK et al., 2011) e atividade inseticida (BAKKALI et al., 2008). Ainda são escassos os levantamentos de ocorrência da resistência de populações de *S. zeamais* às plantas inseticidas e seus constituintes, uma vez que os trabalhos relacionados ao assunto abordam apenas a atividade inseticida destas plantas (SANTOS et al., 2010).

Assim, frente à importância econômica de *S. zeamais* para grãos armazenados e a necessidade de utilização de métodos alternativos mais seguros sob o ponto de vista ecológico e ambiental é justificável a realização de estudos que avaliem a ação inseticida de óleos essenciais no controle dessa praga. Neste sentido, existe a possibilidade dos óleos essenciais serem usados como fontes de moléculas para a síntese de novos inseticidas. No entanto, o potencial para utilização dos óleos essenciais de plantas deve levar em consideração não apenas sua toxicidade, como também sua amplitude de utilização considerando-se populações provenientes de diferentes regiões geográficas.

O presente trabalho foi realizado com o intuito de analisar a bioatividade do óleo essencial de *P. cablin* e seu potencial de utilização para manejo de diferentes populações de *S. zeamais* provenientes de todas as regiões do Brasil. Para isso, foram realizadas: (i) a identificação dos compostos presentes no óleo essencial de *P. cablin*; (ii) a avaliação da toxicidade por aplicação tópica, contato e fumigação do óleo essencial de *P. cablin* e de sua nanoemulsão em adultos de *S. zeamais*; (iii) a avaliação do efeito repelente deste óleo essencial em adultos; e (iv) análise do efeito deste óleo sobre o crescimento populacional de *S. zeamais*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Problemas de resistência de insetos aos inseticidas organossintéticos

Inseticidas químicos desempenham um papel fundamental em programas de controle de pragas desde o início do século 20. No entanto, a resistência aos inseticidas químicos já se encontra documentada em mais de 540 espécies de artrópodes (WHALON et al., 2008). Infelizmente, a grande maioria desses registros foi realizada após falhas de controle e não como um estudo prévio antecipando-se a tais erros.

Os insetos apresentam grande habilidade para desenvolver resistência aos inseticidas. Os métodos de controle provocam a seleção de indivíduos com maior aptidão causando evolução das populações de pragas resistentes, e desta forma, limitando sua própria eficiência e viabilidade em longo prazo (OLIVEIRA et al., 2003). Os casos de resistência a inseticidas e acaricidas sintéticos estão aumentando mundialmente e se constituem em um dos mais complexos problemas de controle de pragas na atualidade. Pode-se citar como exemplo, a resistência de populações de *Alabama argillacea* (Lepidoptera: Noctuidae) a vários princípios ativos de inseticidas utilizados comumente em seu controle (MIRANDA et al., 2006), especialmente piretróides. Outros noctuídeos como *Heliothis virescens* (Fabricius) e *Helicoverpa armigera* também apresentam, há muitos anos, resistência a diversos piretróides (TAN et al., 1999).

Os casos de resistência de insetos de diferentes ordens também têm sido relatados para ampla gama de produtos naturais, incluindo reguladores de crescimento e agentes de controle biológico. Formulações contendo a toxina de *Bacillus thuringiensis* foram usadas por mais de quarenta anos como inseticidas. O primeiro relato de falhas das formulações de *B. thuringiensis* ocorreu no controle da traça das crucíferas (*Plutella xylostella* L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) (FERRÉ et al., 2002) nas Filipinas. Atualmente, populações de várias espécies de lepidópteros, coleópteros e dípteros têm desenvolvido resistência à toxina de *B. thuringiensis* em diversas partes do mundo (NEPPL et al., 2001).

2.1.1 Pragas de grãos armazenados

A resistência aos inseticidas em pragas de grãos armazenados tem sido registrada com frequência em diversos países como Arábia Saudita, Argentina, Austrália, Brasil, Canadá, Chile, Estados Unidos, Grécia, Índia, Japão, México, Síria, dentre outros (COLLINS et al., 2005).

No Brasil, as principais pragas de grãos armazenados já apresentam populações resistentes aos inseticidas organossintéticos utilizados no mercado. Dentre os insetos que possuem populações resistentes, pode-se citar: *Sitophilus zeamais* e *S. oryzae* (Coleoptera:

Curculionidae), *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae), *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) (PIMENTEL et al., 2007). Foi verificado que a população de *R. dominica* (BR7) reduziu significativamente seu hábito de deslocamento em situações de contato com o inseticida deltametrina em laboratório. Desta forma, a resistência de *R. dominica* é explicada por alterações no comportamento de forma a reduzir o contato com o inseticida (LORINI et al., 1998) Por outro lado, algumas espécies de coleópteros pragas de produtos armazenados apresentam mecanismo de resistência bioquímica. Linhagens de *T. castaneum* em campo mostraram maior habilidade para destoxificar o inseticida através da ação das carboxilesterases (GIGLIOLLI et al., 2011). Populações de *O. surinamensis* mostraram diferentes níveis de resistência ao fenitrotion e ao clorpirifós-metil, as quais foram associadas à alta atividade de monoxigenases e esterases, respectivamente (CONYERS et al., 1998). Em populações brasileiras resistentes e suscetíveis de *R. dominica,* ocorre diferença significativa em relação à atividade específica de acetilcolinesterase, indicando que o aumento da atividade desta enzima estaria associada com a resistência aos organofosforados (GUEDES et al.,1997).

2.1.2 Populações de *S. zeamais*

Em virtude do uso indiscriminado de inseticidas no controle de pragas de grãos armazenados, a resistência em populações de *S. zeamais* tem sido apontada como um dos principais fatores responsáveis pelo aparecimento de falhas no controle desta praga (ZHU et al., 2003). No início dos anos noventa, já havia relatos de resistência ao DDT e aos piretróides em populações de *S. zeamais* provenientes de cinco estados brasileiros. Posteriormente, a resistência aos piretróides também foi detecta em populações de *S. zeamais* de diferentes localidades do Brasil (FRAGOSO et al., 2007).

Guedes et al (2005) correlacionaram a quantidade de moléculas de reserva armazenadas em células trofocíticas com a massa corpórea média de indivíduos de *S. zeamais* resistentes aos piretróides. A maior quantidade de moléculas de reserva armazenadas pode prover energia adicional para produção dos aparatos destoxificativos, sem interferir na energia utilizada para os processos fisiológicos de manutenção e reprodução. Já o aumento da síntese de enzimas destoxificativas geralmente resulta em elevação das taxas metabólicas (maior consumo de O_2), o que geralmente ocasiona desbalanço nas trocas gasosas, resultando em desvantagens adaptativas aos insetos resistentes por alterar diversos outros processos fisiológicos.

Estudos dos mecanismos de resistência de *S. zeamais* aos piretróides indicaram o envolvimento das glutationas S-transferases (GSTs) (FRAGOSO et al., 2007), ocorrendo

aumento de cerca de duas vezes na atividade deste grupo de enzimas. Além disso, também existe uma correlação significativa entre a resistência aos piretróides e a atividade das GST (FRAGOSO et al., 2007).

2.2 Mecanismos de resistência de insetos

2.2.1 Mecanismos bioquímicos

A base molecular da resistência tem sido estudada em diferentes espécies de artrópodes, principalmente em insetos. Artrópodes em geral possuem um curto período de tempo entre gerações, o que favorece o surgimento de populações com diferentes características genéticas. As características genéticas associadas à resistência dos insetos podem ser relacionadas à redução do poder de penetração do pesticida, aumento da capacidade sequestrante de moléculas tóxicas, insensibilidade aos compostos tóxicos e aumento da destoxificação celular (CASIDA et al., 1998; RANSON et al., 2002; OAKSHOTT et al., 2003). O surgimento de populações com estas características torna os pesticidas ineficientes em um curto espaço de tempo resultando em aumento da frequência de uso, utilização de doses mais elevadas, mudança do princípio ativo utilizado no controle ou adoção de combinação entre princípios ativos (NERIO et al., 2010).

As bases moleculares da resistência podem ser resumidas em 3 tipos: i) aumento da expressão de genes; ii) aumento da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos; ou iii) mutações em neurorreceptores e em canais de sódio (MARTIN et al., 2003; OAKSHOTT et al., 2003). Três famílias de proteínas são as principais responsáveis pelo metabolismo de inseticidas: as monooxigenases dependentes de citocromo P450, as esterases e as glutationas S-transferases (RANSON, 2002). As proteínas destas famílias também estão envolvidas na síntese e na quebra de vários metabólitos endógenos, na proteção contra o estresse oxidativo, na transmissão de sinais nervosos e no transporte celular (HEMIGWAY et al., 2002).

Os citocromos P450 são uma superfamília ubíqüa de enzimas que catalisam uma grande variedade de reações químicas e agem sobre diferentes substratos (HEMIGWAY et al., 2002). Estas enzimas estão envolvidas no metabolismo de compostos endógenos como esteróides, ácidos graxos e colesterol e de compostos exógenos como drogas e pesticidas (DENHOLM et al., 2002). Desta forma, os citocromos P450 ligam-se aos compostos tóxicos oxidando-os, tornando-os mais solúveis e, portanto, mais fáceis de serem excretados (FRAGOSO et al., 2007). Os citocromos P450 são responsáveis pela destoxificação de piretróides e organofosforados em artrópodes, inclusive no carrapato *Boophilus microplus* (LEE et al., 2002). A resistência de *Drosophila melanogaster* ao DDT e a um organoclorado

foi relacionada à superexpressão de dois genes P450 (Cyp6g1 e Cyp12d1) (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2005).

Os organofosforados inibem esterases por fosforilação no sistema nervoso. No entanto, algumas esterases, são hábeis em remover, sem aparente efeito tóxico, as moléculas de organofosforado (SOGORB et al., 2002). As esterases, em especial as fosfotriesterases (PTEs), acetilcolinesterases (AChE) e as carboxilesterases, estão envolvidas na destoxificação dos inseticidas organofosforados, e possivelmente com a resistência aos piretróides (FRAGOSO et al., 2007). Mutações no sítio ativo da acetilcolinesterase e a superexpressão de genes de esterases para organofosforados e carbamatos têm sido recentemente relatados, principalmente em moscas domésticas e em outras espécies (RANSON et al., 2002)

As glutationas S-transferases (GSTs), outro grupo das principais enzimas envolvidas na metabolização de pesticidas, são uma família multifuncional de enzimas presentes em organismos aeróbicos, que participam do transporte intracelular, dos processos digestivos, da síntese de prostaglandinas e, principalmente, auxiliam na destoxificação de substâncias tóxicas e proteção contra estresse oxidativo (LEE et al., 2002; ROSA et al., 2002). O mecanismo de ação das GSTs deve-se à ligação destas enzimas aos agrupamentos eletrofílico, conjugando-os a uma molécula de glutationa reduzida. Ao ligar-se a tal grupamento eletrofílico este passa do estado reduzido para o estado oxidado, formando um composto mais solúvel e mais fácil de ser excretado (ENAYATI et al., 2005). Altos níveis de expressão das GST têm sido relacionados à resistência aos inseticidas em vários organismos (FRAGOSO et al.; 2007). Embora trabalhos tenham demonstrado o efeito in vitro de diferentes acaricidas sobre a atividade de GST, ainda não foram demonstradas evidências correlacionando a expressão de GST à resistência frente aos acaricidas (DA SILVA et al., 2004). Porém, em outros artrópodes já foi verificado um aumento de expressão e/ou da atividade das GSTs (ENAYATI et al., 2005) sobre organoclorados e organofosforados.

2.2.2 Mecanismos fisiológicos

Os mecanismos de resistência com base fisiológica são aqueles envolvidos na redução da penetração do inseticida na cutícula do inseto e no sequestro de substâncias tóxicas. Embora os mecanismos fisiológicos sejam considerados de importância secundária por conferir normalmente um baixo nível de resistência, estes podem contribuir para seu aumento quando combinados com outros mecanismos. A redução da penetração do inseticida pela cutícula ocorre devido às alterações fisiológicas e da estrutura química da exocutícula, além da fase de desenvolvimento do inseto e das próprias características

químicas da molécula inseticida. A base bioquímica da redução da taxa de penetração de um inseticida não está clara, embora tenha sido proposto que a composição protéica do tegumento tenha papel relevante (BADDI et al., 2007). Já o sequestro de moléculas inseticidas tem sido reportado em alguns insetos como *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) (SODERLUND et al., 2003).

2.2.3 Mecanismos comportamentais

A resistência comportamental aos inseticidas é geralmente considerada como o resultado de mecanismos fisiológicos e comportamentais, os quais frequentemente ocorrem concomitantemente (LOCKWOOD et al., 1984).

A resistência comportamental é determinada por ações que influenciam a resposta do organismo às pressões seletivas exercidas por um determinado inseticida, aumentando a capacidade de uma população de insetos de escaparem dos efeitos letais do composto, podendo estar relacionados à capacidade de aprendizagem do inseto (LOMONACO et al., 2001). Assim, a população conserva a sua susceptibilidade intrínseca ao inseticida, porém, muda o seu comportamento de forma a evitar o contato. Insetos com resistência comportamental respondem mais a baixas concentrações de inseticidas do que os insetos não resistentes, indicando que estes contêm receptores que detectam melhor o inseticida. Foi relatado um total de 154 casos de resistência por comportamento, para 45 espécies de insetos resistentes à 35 diferentes compostos químicos, sendo 11,4% dos casos da ordem Blattodea. (YU et al., 2008).

2.3 Compostos botânicos no controle de insetos-praga

Atualmente, o uso de produtos químicos sintéticos para o controle de artrópodes tem resultado em problemas de contaminação do ambiente e danos à saúde humana. Produtos naturais bioativos que sejam de boa eficácia e ecologicamente seguros consistem em alternativas promissoras ao controle de pragas. Os inseticidas botânicos normalmente apresentam baixo custo, diminuem o impacto ambiental e são de pequena toxicidade ao homem e a organismos não-alvo (BAGAVAN et al., 2009). Entre os produtos vegetais, os óleos essenciais de plantas aromáticas têm sido testados para avaliar suas propriedades pesticidas (NERIO et al., 2009).

Desde a Idade Média, os óleos essenciais têm sido usados como bactericidas, fungicidas, inseticidas e antiparasitários. Recentemente, os óleos essenciais têm sido empregados na indústria farmacêutica, alimentar, agrícola e de cosméticos (BAKKALI et al., 2008).

Óleos essenciais são oriundos do metabolismo secundário de plantas aromáticas, sendo caracterizados por misturas complexas de compostos orgânicos voláteis de baixo peso molecular, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides. Outros grupamentos que podem estar presentes nos óleos essenciais são os álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis e éteres de fenol (BIZZO et al., 2001). Os componentes que formam esses óleos podem se apresentar em diferentes concentrações. Os componentes majoritários refletem as características biofísicas e biológicas dos óleos essenciais. Na maioria das vezes a amplitude dos efeitos dos óleos depende da concentração desses componentes, porém é possível que a atividade dos componentes principais seja modulada por outros componentes de menor importância, através de sinergismo (MENDES et al., 2010).

Óleos essenciais de plantas têm mostrado toxicidade para *S. zeamais* e outras pragas de grãos armazenados de importância econômica. Os óleos fixos de palma (*Elaeis guineensis* Jacq. Arecaceae) reduziram a emergência de adultos de *S. zeamais* em grãos de milho durante seis meses de armazenamento (ABULUDE et al., 2007). Os óleos extraídos de côco (*Cocos nucifera* L. Arecaceae), amendoim (*Arachis hypogaea* L. Fabaceae) e soja (*Glycine max* (L.) Fabaceae), na concentração de 10 mL/kg de grãos de milho, causaram mortalidade de cerca de 100% dos adultos de *S. zeamais* (OBENG-OFORI et al, 2005). Já os óleos essenciais de pimenta de macaco (*Piper aduncum* L.) e pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C.DC.) (Piperaceae) foram tóxicos para adultos de *S. zeamais* através da aplicação tópica e fumigação (ESTRELA et al., 2006). Da mesma forma, o contato e ingestão dos óleos essenciais de folha amarga (*Vernonia amigdalyna* Del. Asteraceae) e pimenta da africa (*Xylopia aethiopica* (Dunal) Annonaceae) (ASAWALAM et al 2006; KOUNINKI et al., 2007) e a aplicação tópica e fumigação do óleo de Coribó *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) (Bignoneaceae) (FAZOLIN et al. 2007) foram tóxicos para *S. zeamais*.

No presente trabalho foi estudada a bioatividade do óleo essencial de *P. cablin* e nanoemulsão do OE de *P. cablin*, sobre diferentes populações de *S. zeamais* provenientes de distintas regiões do Brasil. O gênero *Pogostemon* (Lamiaceae) inclui diversas espécies conhecidas por suas propriedades medicinais e aromáticas. O patchouli *P. cablin* é uma espécie aromática indígena, que tem sido cultivada em muitas partes do mundo para a extração de seu óleo essencial (SANTOS et al., 2010). O patchouli é rico em terpenos, especificamente mono e sesquiterpenos, sendo estes últimos, a classe predominante. No entanto, essa composição pode variar de acordo com a origem do vegetal. Vários fatores podem influenciar a composição do óleo de patchouli, como qualidade das folhas, técnica de

destilação, envelhecimento das folhas secas e do óleo essencial, além das técnicas de cultivo (SANT'ANA et al., 2010).

Por apresentarem grande variabilidade química em seus óleos essenciais, plantas da família Lamiaceae podem ser idênticas fenotipicamente, porém quimicamente distintas, existindo quimiotipos. (SANT'ANA et al., 2010; BLANK et al., 2011.)

O patchouli apresenta propriedades medicinais como antifúngica, anti-helmintica, antitripanossoma (BETTONI et al., 2010), antieméticas e antibacteriana (BLANK et al., 2011). Historicamente, o óleo essencial de patchouli tem sido utilizado para repelir as traças da roupa. Tanto o óleo essencial de patchouli quanto o patchoulol, mostraram-se tóxicos quando aplicados topicamente em cupins subterrâneos, causando danos ao exoesqueleto (ZHU et al., 2003).

A busca por alternativas mais viáveis de controle desta praga de grãos armazenados é justificada pela crescente observação de resistência de populações (provenientes de diferentes regiões do Brasil) aos inseticidas organossintéticos. Assim, este estudo foi desenvolvido com o intuito de contribuir com formas de controle de *S. zeamais* e verificar a amplitude do potencial de ação dos óleos essenciais de *P. cablin* sobre distintas populações de *S. zeamais.*

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABULUDE, F.O., M.O. OGUNKOYAL, R.F. OGUNLEYE, A.O. AKINOLA & A.O. ADEYEMI. Effect of palm oil in protecting stored grains from *Sitophilus zeamais* and *Callosobruchus maculatus*. **Journal Entomology**, v. 4 p. 393-396, 2007.

ASAWALAM, E.F., HASSANALI, A.. Constituents of the essential oil of *Vernonia amygdalina* as maize weevil protectants. **Tropical Subtropical Agroecology**, v. 6, 95-102, 2006.

BADII, M.H.; ALMANZA, V.G. Resistencia en insectos, plantas y microorganismos. **Cultura Científica y Tecnológica,** v. 4, p 9-25 , 2007.

BAGAVAN, A.;KAMARAJ, C.; ELANGO, G.; ZAHIR, A. A.; RAHUMAN, A. A. Adulticidal and larvicidal efficacy of some medicinal plant extracts against tick, fluke and mosquitoes. **Veterinary Parasitology**, v. 166, p. 286–292, 2009.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 26, p. 446-475, 2008.

BETTONI, M. M.; STORCK, R. C.; PEÑUELA, L. F.; MORAES, C. P. Propagação vegetativa de patchouli por estaquia. **Scientia Agraria,** v.11, p. 417-420, 2010.

BIZZO, H.R., D. LOPES, R.V. ABDALA, F.A. PIMENTAL, J.A. DE SOUZA, M.V.G. PEREIRA, L. BERGTER & E.F. GUIMARÃES**.** Sarisan from leaves of *Piper hispidinervum* C.DC (long pepper). **Jounal Flavour,** v. 16, p. 113-115, 2001.

BLANK, A. F; SANTANA, T. C. P.; SANTOS, P. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; PRATA, A. P. N.; JESUS, H. C. R.; ALVES, P. B.; Chemical characterization of the essential oil from patchouli accessions harvested over four seasons. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p 831-837, 2011.

CASIDA, J.E.; QUISTAD G.B. Golden age of insecticide: Past, Present, or Future? **Annual Review of Entomology**, v. 43, p 1-16, 1998.

COLLINS, P.J.; DAGLISH, G.J.; PAVIC, H.; KOPITKE R.A. Response of mixed-age cultures of phosphine-rsistant ad susceptible stains of lesser grain borer, *Rhypertha dominica* to phosphine at a range concentrations and exposure periods. **Journal of Stored Products Research,** v.41 , p 373-385, 2005.

CONYERS, C.M.; MACNICOLL, A.D.; PRICE N.R. Purification and characterization of an esterase involved in resistance to organophosphorus insecticides in the sawtoothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae). Insect
Biochemistry and Molecular Biology, v. 28, n. 7, p. 435-448, 998.

DA SILVA, V.J.I; TORINO, L.T.; MICHELON, A.; SANCHEZ, F.C.A., FREITAS, D.R.; TERMIGNONI, C.; MASUDA, A.; Effect of acaricides on the activity of a *Boophilus microplus* glutathione S-transferase. **Veterinary Parasitology**, v. 119, p 237-245, 2004.

DENHOLM, I., DEVINE G.J., WILLIAMSON, M.S.. Evolutionary genetics. Insecticide resistance on the move. **Science,** v. 297, p. 2222-2223, 2002

ENAYATI, A.A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J.; Insect glutathione transferases and insecticide resistance**. Insect Molecular Biology**, v. 1, p. 3-8, 2005.

ESTRELA, J.L.V., M. FAZOLIN, V. CATANI, M.R. ALÉCIO & M.S. LIMA. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. **Pesquisa Agropecuria Brasileira,** v. 41, p. 217-222, 2006.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; CATANI, V.; ALÉCIO M.R.; Atividade inseticida do óleo de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e *K. Schum* (Bignoneaceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **Acta Amazonica,** v. 37,p. 599-604, 2007.

FESTUCCI, B.R.A.; DIAS, A.S.C.; DE ANDRADE, M.O.; NUNES, C.C.; LI H.M., STUART, J.J.; MUIR, W.; SCHARF, M.E.; PITTENDRIGH, B.R.. Expression of Cyp6g1 and Cyp12d1 in DDT resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. **Insect Molecular Biology**, v. 1,p. 69-77, 2005.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 501-533, 2002

FRAGOSO, D.B.; GUEDES, R. N. C; OLIVEIRA, M.G.A. Partial characterization of glutationa-S-transferases in pyrerthoid-resistant and susceptible populations of the maize weeil, *Sitophilus zemais*, Journal **of Stored Products Research,** v. 43, p. 167-170, 2007.

GIGLIOLLI, A. A. S.; LUCENA, A. L. M.; LAPENTA A. S. Identificação e caracterização das esterases em *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae).: **Revista de Saúde e Biologia**,v.6, n.1, p. 25-35, 2011.

GUEDES, R. N. C. **Detecção e herança de resistência ao DDT e piretróides em *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera:Curculionidae).** Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, 1993, Viçosa, 67 p.

GUEDES, R.N.C., B.A. DOVER & S. KAMBHAMPATI. Resistance to chlorpyriphos-methyl, pirimiphos-methyl, and malathion in Brazilian and U.S. population of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). **Journal of Economic Entomology,** v. 89, p. 27-32, 1995.

GUEDES, R. N. C.; S. KAMBHAMPATI; B. A. DOVER & K. Y. ZHU. Biochemical mechanisms of organophosphate resistance in *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) populations from the United State and Brazil. **Bulletin of Entomological Research,** v. 87, p. 581-586, 1997.

GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E.E; GUEDES, N.M.P., RIBEIRO, B.M. SERRÃO, J.E. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zemais.* **Chemosphere**, v. 69, p. 17-24, 2007.

HEMINGWAY, J.; HAWKES, N. J.; MCCARROLL, L; RANSON, H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 653-665, 2002.

KABEH, J.D.; JALINGO, M.G.D.S.S. Pesticidal effect of bitter leaf plant *Vernonia amygdalina* (Compositae) leaves and pirimiphos-methyl on larvae of *Callosobruchus maculates* (Coleoptera: Bruchidae) and *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 9, p. 452-454, 2007.

LEE, A.J.; HUNTLEY J., VAN DEN BROEK, A.; COATES, D.; ISAAC, R.E.; Expression and characterisation of a Psoroptes ovis glutathione S-transferase. **Veterinary Parasitology**, v. 105, p. 49-63, 2002.

LIU, Z.L.; GOH S.H. Screening of Chinese medicinal herbs for bioactivity against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**, v. 43, p. 290-296, 2007.

LOCKWOOD, J.A.; SPARKS, T.C.; STORY, R.N. Evollution of insect resistance to insecticides: a reevalution of the roles of physiology and behavior. Bulltin of the **Entomological Society of America,** v.30, p. 41-51, 1984

LORINI, I.; GALLEY, D. J. Relative effectiveness of topical, filter paper and grain applications of deltamethrin, and associated behaviour of *Rhyzopertha dominica* (F.) strains. **Journal of Stored Products Research,** v. 34, p. 377-383, 1998.

MARTIN, T., OCHOU, O.G., VAISSAYRE, M.; FOURNIER, D. Oxidases responsible for resistance to pyrethroids sensitize *Helicoverpa armigera* (Hubner) to triazophos in West Africa. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 9, p. 883-887, 2003.

MENDES, S.S.; BOMFIM, R.R., JESUS, H.C.R.; ALVES, P.B.; BLANK, A.F., ESTEVAM, C.S.; ATONIOLLI, A.R.; THOMAZZI, S.M.; 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.

MOREIRA, M.D.; PICANÇO, M.C.; BARBOSA, L.C.D.A.; GUEDES, R.N.C.; SILVA, E.M. Toxicity of leaf extracts of *Ageratum conyzoides* to Lepidoptera pests of horticultural crops. **Biological Agriculture and Horticulture**, Bicester, United Kingdom v. 22, p. 1-10, 2004.

NEPPL, C. C. Managing resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. Chicago. 35p. Thesis (B.A.) – University of Chicago, 2001.

OAKESHOTT, J.G.; HOME, I.; SUTHERLAND, T.D.; RUSSELL, R.J. The genomics of insecticide resistance. **Genome Biology,** v. 4, p. 202-204, 2003.

OBENG-OFORI, D.; AMITEYE, D. J.. Efficacy of mixing vegetable oils with pirimiphos-methyl against the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky in stored maize. **Journal of Stored Products Research,** v. 41,p. 57-66, 2005.

OLIVEIRA, E.E.; GUEDES, E.E.O.; GUEDES R.N.C.; TÓTOLA, M.R.; MARCO, P.D. Competition between insecticide susceptible and resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais* , **Chemosphere**, v. 60, p. 17-24, 2003

RANSON, H.; CLAUDIANOS, C.; ORTELLI, F.; ABGRALL, C.; HEMINGWAY, J.; SHARAKHOVA, M.V.; UNGER, M.F.; COLLINS, F.H.; FEYEREISEN, R. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. **Science**, v. 298, p. 179-181, 2002.

RIBEIRO, B. M.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E. E.; SANTOS, J. P. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research,** v. 39, p. 21-31, 2003.

ROSA, L.M.F.; SANCHEZ, F.C.A.; JOAQUIM, F.D.R.; VALENZUELA, J.G.; MASUDA A. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 747-754, 2002.

SANT'ANA, T. C. P.; BLANK, A. F.; VIEIRA, S. D.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; JESUS, H. C. R.; ALVES, P. B. Influência do armazenamento de folhas secas no óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin* BENTH.). **Química Nova*,*** v. 33, p. 1263-1265, 2010.

SANTOS, A. V.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F.; TAVARES, F. F.; FERNANDES, R. P. M.; JESUS, H. C. R.; ALVES, P. B. Mass multiplication of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth genotypes and increase of essential oil and patchoulol yield. **Industrial Crops and Products,** v. 32, p. 445-449, 2010.

SODERLUND, D.M.; KNIPPLE, D.C.. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 33, p. 563-577, 2003.

SOGORB, M.A.; VILANOVA, E; 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. **Toxicology Letters**, v. 128, p. 215-228, 2002.

TAVARES, M.A.G.C. 2005. Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae), em relação a *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (Col.: Curculionidae). 2005. 59f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

YOUNG, J.R & MCMILIAM, W.W.. Differential feeding by two strains of fall armyworm larvae on carabaryl treated surfaces, **Journal of Economic Entomology**, v. 72, p. 202-203, 1979.

YU, S.J. Principles of pesticide metabolism. **The toxicology and biochemistry of insecticides,** Nova York, CRC, 276 p., 2008.

ZHU, BCR, HENDERSON, G, YU, Y, LAINE, RA. A. Toxicity and repellency of patchouli oil and patchouli alcohol against formosan subterranean termites *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4585-4588, 2003.

4. CAPÍTULO

Análise química e efeitos letais e sub-letais do óleo essencial de patchouli e sua nanoemulsão em populações de *Sithopilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)

Será submetido para: *Chemosphere*

Resumo

Visando gerar alternativas para o manejo de populações de *Sitophilus zeamais* resistentes a inseticidas organossíntéticos, neste trabalho foi testada a toxicidade do óleo essencial (OE) de *Pogostemon cablin* e da nanoemulsão à base desse óleo sobre nove populações de *S. zeamais* provenientes de diferentes regiões do Brasil. Para isso foram realizados bioensaios de aplicação tópica, contato, fumigação, repelência e efeitos sobre o crescimento populacional. Foram identificados quinze compostos no OE de *P. cablin*, sendo o patchoulol o componente majoritário (55,04%). O OE de *P. cablin* demonstrou ação rápida e eficiente atividade inseticida sobre as nove populações de *S. zeamais* quando aplicado topicamente. O tempo necessário para causar 50% de mortalidade das populações foi em média 33,4 horas. As nove populações de *S. zeamais* responderam de modo semelhante ao OE de *P. cablin*. As doses letais para matar 50% das populações resultaram em baixas razões de toxicidade (<2). A população de Viçosa-MG foi a mais susceptível ao OE de *P. cablin*, com DL_{50} de 9,17 e 8,01 µg mg^{-1} após 48 e 72 horas de exposição, respectivamente. A maior tolerância ao OE de *P. cablin* foi detectada na população de Sete Lagoas-MG, que apresentou aumento na DL_{50} de 1,77 e 1,53 vezes. A concentração do OE de *P. cablin* necessária para causar 50% de mortalidade das populações por contato e fumigação variou de 0,34 a 0,43 µl ml^{-1} e 28,6 a 33,5 µl l^{-1}, respectivamente. Já a nanoemulsão de *P. cablin* apresentou CL_{50} que variaram de 1,28 a 8,84 µl ml^{-1} e 32,7 a 39,5 µl l^{-1}. Houve aumento da toxicidade por contato e fumigação (CL_{50}) da nanoemulsão de *P. cablin* de 48 para 72 horas de exposição. A toxicidade (CL_{50}) por contato e fumigação sobre as populações de Viçosa-MG e Sete Lagoas-MG após 48 e 72 horas de exposição ao OE de *P. cablin* foi, na maioria das vezes, maior do que a toxicidade causada pela nanoemulsão de *P. cablin*. O OE e a nanoemulsão de *P. cablin* foram repelentes nas CL_{50} e CL_{70} em todos os tempos de exposição para a população de Viçosa-MG. O mesmo ocorreu com a população de Sete Lagoas-MG, exceção para a CL_{50} após 4, 6 e 8 horas de exposição e para a CL_{70} após 24 horas de exposição à nanoemulsão de *P. cablin*. Para a população de Viçosa-MG, não houve diferença na repelência causada pelo OE e nanoemulsão de *P. cablin*. Já para a população de Sete Lagoas-MG, o OE de *P. cablin* causou maior repelência a esta população se comparado a nanoemulsão deste óleo. Concentrações crescentes da nanoemulsão de *P. cablin* resultaram em redução do r_i e do consumo de grãos das duas populações. As populações de Viçosa-MG e Sete Lagoas-MG entraram de declínio (r_i<0) a partir das concentrações de 50,15 e 67,29 µl kg^{-1}, respectivamente.

Palavras-chave: *Pogostemon cablin*; fumigação, repelência, nanoemulsão; resistência; taxa de crescimento instantânea.

Abstract

Aiming to generate alternatives for managing populations of *Sitophilus zeamais* resistant to insecticides synthetic organic, in this study we tested the toxicity of the essential oil (EO) of *Pogostemon* cablin and this oil nanoemulsion based on nine populations of *S. zeamais* from different regions of Brazil. For that were performed bioassays topical application, contact, fumigation, and repellency effects on population growth. Fifteen compounds were identified in EO *P. cablin*, with the patchoulol the major component (55.04%). The EO *P. cablin* showed rapid and efficient action insecticidal activity against the nine populations of S. *zeamais* when applied topically. The time required to cause 50% mortality of the population was 33.4 hours on average. The nine populations of *S. zeamais* responded similarly to EO of *P. cablin*. The lethal dose to kill 50% of the population resulted in low toxicity reasons (<2). The population of Viçosa-MG was more susceptible to EO *P. cablin*, with LD_{50} of 9.17 and 8.01 µg mg^{-1} after 48 and 72 hours exposure respectively. The greater tolerance of EO *P. cablin* was detected in the population of Sete Lagoas, Minas Gerais, which increased the LD_{50} of 1.77 and 1.53 times. The concentration of EO *P. cablin* required to cause 50% mortality of the population by contact and fumigation ranged from 0.34 to 0.43 µl ml^{-1} and from 28.6 to 33.5 µl l^{-1}, respectively. Already the nanoemulsion *P. cablin* showed LC_{50} ranging from 1.28 to 8.84 µl ml^{-1} and from 32.7 to 39.5 µl l^{-1}. There was an increase in toxicity by contact and fumigation (LC_{50}) of the nanoemulsion of *P. cablin* from 48 to 72 hours of exposure. Toxicity (LC_{50}) for contact and fumigation on populations of Viçosa-MG and Sete Lagoas-MG after 48 and 72 hours of exposure to EO *P. cablin* was in most cases greater than the toxicity caused by nanoemulsion of *P. cablin*. The OE and the nanoemulsion of *P. cablin* were LC_{50} and LC_{70} repellents in at all times of exposure for the population of Viçosa-MG. The same occurred with the population of Sete Lagoas, Minas Gerais, except for LC_{50} after 4, 6 and 8 hours of exposure and the LC_{70} after 24 hours of exposure to nanoemulsion of *P. cablin*. For the population of Viçosa-MG, there was no difference in repellency caused by EO and nanoemulsion of *P. cablin*. As for the population of Sete Lagoas, Minas Gerais, EO *P. cablin* caused greater repellency to this population compared to this oil nanoemulsion. Increasing concentrations of nanoemulsion of *P. cablin* resulted in reduction of laughs and consumption of grains of the two populations. Populations of Viçosa-MG and Sete Lagoas-MG entered decline (ri <0) from the concentrations of 50.15 and 67.29 µl kg^{-1}, respectively.

Keywords: *Pogostemon cablin*; fumigation; repellency; nanoemulsion; resistance; instantaneous rate of population growth.

1. Introdução

O entendimento da diversidade de resposta dos insetos às pressões químicas (p.ex. inseticidas e metabólitos secundários de plantas) representa um ponto chave no desenvolvimento de eficientes e duradouras estratégias de manejo de pragas (Després et al., 2007). O uso intensivo de inseticidas convencionais tem desencadeado a seleção de populações de insetos resistentes às diversas classes de inseticidas. Apesar da resistência cruzada entre inseticidas e metabólitos secundários de plantas ser um fenômeno reconhecido (Després et al., 2007), a descoberta de misturas complexas de compostos de plantas com diferentes mecanismos de ação pode ser uma boa opção para o manejo de populações resistentes aos inseticidas convencionais. Isso é possível já que as plantas produzem vários metabólitos secundários simultaneamente, enquanto inseticidas convencionais geralmente envolvem uma única molécula que age em um sítio de ação específico.

Compostos bioativos de plantas podem ainda apresentar vantagem como estratégias de manejo porque a evolução da resistência aos inseticidas convencionais normalmente está associada a um custo adaptativo, o que reduz a chance de desenvolvimento de outras estratégias de resistência por parte dos insetos. Populações resistentes tendem a apresentar desvantagem quando o inseticida não é utilizado ou quando são expostas a produtos com diferentes mecanismos de ação (Haubruge and Arnaud 2001). Além disso, a distribuição geográfica, a heterogeneidade espacial e o nível de especificidade da relação planta-fitófago podem interferir nas chances de populações de insetos apresentarem algum tipo de resistência aos metabólitos secundários de plantas (Després et al., 2007).

A resistência de pragas de grãos armazenados tem sido um dos grandes entraves ao sucesso dos programas de manejo (Guedes et al., 1995). O gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) é uma das pragas de maior importância mundial devido à sua elevada capacidade de destruição de grãos armazenados. No Brasil, populações de *S. zeamais* têm apresentado resistência a vários inseticidas organofosforados e piretróides (Guedes et al.,1994; Ribeiro et al., 2003; Fragoso et al., 2007). Uma vez que o Brasil apresenta grande extensão territorial, as estratégias de manejo e as pressões seletivas sobre *S. zeamais* podem diferir marcadamente entre as regiões, resultando em níveis distintos de resistência aos inseticidas.

Os prejuízos decorrentes da resistência aos inseticidas convencionais incluem o aumento das dosagens e da frequência de aplicação destes produtos. Tais práticas contribuem cada vez mais para o agravamento da dificuldade do controle de pragas e para o aumento da contaminação do ambiente. Assim, existe uma crescente busca por alternativas de manejo que sejam mais eficientes. Várias plantas têm sido intensivamente estudadas

para avaliação de seu potencial no controle de insetos pragas (Autran et al., 2009). O interesse na utilização das plantas como bioinseticidas, deve-se ao fato de seus compostos metabólitos secundários terem sido selecionados, ao longo do tempo evolutivo, como resposta das plantas ao impacto da fitofagia (Liu et al., 2009; Nerio et al., 2010). De fato, tais compostos têm apresentado uma grande diversidade de ações sobre os insetos, como: repelência, deterrência, redução do crescimento, do número de ovos, inibição da oviposição, do desenvolvimento e da alimentação (Knaak et al., 2010).

Dentre os inseticidas botânicos, os óleos essenciais de plantas têm mostrado resultados potenciais para o controle de pragas (Aguiar et al., 2005). A constituição dos óleos essenciais envolve misturas complexas de compostos estruturalmente diversos, principalmente orgânicos voláteis de baixo peso molecular como monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides (Bizzo et al., 2001). Componentes dos óleos essenciais podem apresentar-se em proporções majoritárias ou minoritárias, sendo possível a ocorrência de efeitos sinérgicos entre estes, o que aumenta seus mecanismos de ação e eficácia (Bizzo et al., 2001). Esta maior eficácia por sua vez contribui para redução das doses aplicadas minimizando a seleção de resistência nas populações de pragas (Isman et al., 2006).

O óleo essencial (OE) de patchouli *Pogostemon cablin* apresenta uma série de propriedades medicinais: antifúngica, anti-helmintica, antitripanossoma (Bettoni et al., 2010), antieméticas e antibacteriana (Blank et al., 2011). Esta planta aromática indígena tem sido cultivada em muitas partes do mundo para a extração de seu óleo essencial (Santos et al., 2010). Tanto o OE de patchouli como seu composto majoritário patchoulol já demonstraram toxicidade a insetos (ex. cupins, Zhu et al., 2003).

Apesar do potencial dos óleos essenciais para o controle de pragas, a amplitude de atividade destes compostos em relação às diferentes populações tem sido pouco abordada. Neste trabalho avaliamos o potencial de toxicidade do OE de *P. cablin* contra adultos de *S. zeamais* provenientes de diferentes populações do Brasil. Adicionalmente, emulsão do óleo essencial também foi formulada e avaliada em relação à toxicidade, repelência e crescimento populacional de *S. zeamais*.

2. Materiail e Métodos

2.1. Populações de S. zeamais

Nove populações de *S. zeamais* provenientes de todas as regiões do Brasil foram utilizadas nos bioensaios. Oito populações foram provenientes de criações do Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e uma população foi proveniente de Aracaju-SE (Figura 1). Estas populações foram coletadas em grãos de milho estocados em estados brasileiros das diferentes regiões: norte (Acre: município de Rio Branco), nordeste (Pernambuco: município de São João; e Sergipe: município de Aracaju), centro-oeste (Mato Grosso do Sul: município de Maracaju), sudeste (Minas Gerais: municípios de Juiz de Fora, Sete Lagoas e Viçosa; e São Paulo: município de Votoporanga) e sul (Paraná: município de Jacarezinho).

As populações de *S. zeamais* foram coletadas diretamente em grãos de milho armazenados. Para multiplicação das populações em laboratório foram fornececidos grãos de milho, previamente lavados e matindos em freezer (-10ºC) por trinta dias, a fim de eliminar possíveis resíduos de inseticidas e organismos presentes nos mesmos. As populações foram mantidas em frascos plásticos com capacidade de 1 litro, vedados com organza, na Clínica Fitossanitária da Universidade Federal de Sergipe (UFS), município de São Cristovão, estado de Sergipe. Grãos de milho foram renovados sempre que necessário.

2.2. Material vegetal

2.2.1. Extração do óleo essencial (OE) de P. cablin

A extração do OE de *P. cablin* cultivado comercialmente foi realizada pela empresa Raros Agroindustria de Produtos Aromaticos, situada no Rio Grande do Norte – Brasil e cedido a Universidade Federal de Sergipe-UFS.

2.2.2. Análise química do OE de P. cablin

Amostras do OE de *P. cablin* foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) (Shimadzu, modelo QP 5050A). As condições cromatográficas foram: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase estacionária Zebron ZB-5MS (0,25 µm de espessura de filme). O gás de arraste utilizado foi o hélio, com fluxo de 1,8 mL min^{-1}. A temperatura inicial programada foi 50°C por 2 min, seguida de um aumento de 4°C/min até atingir 200°C, posteriormente de 15°C até atingir 250°C mantendo constante esta temperatura por 15 min. A temperatura do detector (ou interface) foi mantida em 250°C, o volume de injeção foi de 0,5 µL em diclorometano; a taxa de partição do volume a ser injetado de 1:100 e a pressão na coluna de 166 kPa. As condições do espectrômetro de massa foram: detector de captura iônica operando por

impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/s e fragmentos detectados de 40 a 500 Da.

A análise quantitativa dos componentes do OE foi realizada em um cromatógrafo de fase gasosa equipado com um detector de ionização de chama (DIC), utilizando-se equipamento Shimadzu GC-17A, sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida ZB-5MS (5% dimetilpolisiloxano) com 30m × 0,25 milímetros, filme de 0,25 µm, utilizando-se as mesmas condições da GC-MS. A quantificação dos componentes foi obtida pela normalização da área dos picos (%). As concentrações dos compostos foram calculadas pela área e dispostos por ordem de eluição de GC.

Cada componente do OE de *P. cablin* foi identificado por meio da comparação de seu espectro de massas com espectros avaliados pelo banco de dados (NIST 21 e NIST 107) do equipamento, com espectros existentes na literatura e por comparação dos índices de retenção calculados com os da literatura. Os índices de retenções relativos (IRR) foram determinados utilizando-se uma curva de calibração de uma série de n-alcanos (C_8-C_{18}) injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras. A concentração dos constituintes foi calculada através da área integral de seus respectivos picos, relacionada com a área total de todos os constituintes da amostra.

2.3. Nanoemulsão do OE de *P. cablin*

2.3.1. Preparo da nanoemulsão

A nanoemulsão do OE de *P. cablin* foi preparada utilizando polioxietileno (20) sorbitano (Tween 80) (28%) como agente tensioactivo e etanol (Synth, Diadema, Brasil) (28%) como co-agente tensioactivo; óleo essencial de patchouli (14%) como fase oleosa, e água (W) como fase aquosa (30%). A mistura foi realizada por agitação magnética e preparada com Millipore Billerica, MA sistema Milli-Q mais purificação. A formulação, preparada 24 h antes da realização dos bioensaios, foi mantida à temperatura ambiente para permitir o equilíbrio completo do sistema.

2.3.2. Caracterização da nanoemulsão

Uma gota da formulação foi colocada em lâmina de vidro coberta com lamela para análise em microscópio de luz polarizada (Olympus Optical BX-51) acoplado à câmara de cor digital (Evolução LC). O tamanho das gotas e índice de polidispersão foram determinados por Zetasizer (Malvern Instruments, UK). A condutividade elétrica de sistemas isotrópicos (IONLAB CON-500) foi mensurada em escala até 2000 uΩ/cm com solução padrão de KCl de 1412 uΩ/cm à temperatura ambiente. Todas as análises foram realizadas a 25°C, em triplicata.

2.4. Bioensaios com as populações de S. zeamais

Os diferentes bioensaios foram conduzidos na Clínica Fitossanitária da UFS, São Cristóvão-SE, Brasil. Foram utilizados apenas insetos adultos não-sexados, com idade entre 0-10 dias de emergência (Coitinho et al., 2006). Todos os tratamentos foram diluídos no solvente acetona. Em todos os casos, os indivíduos foram considerados mortos se permaneceram imóveis aos estímulos feitos com pincel.

2.4.1. Aplicação tópica

Os bioensaios de aplicação tópica foram realizados para determinar o potencial tóxico do OE de *P. cablin* e selecionar a população mais susceptível e a mais tolerante para a realização de bioensaios de fumigação, contato, repelência, ingestão e efeito no crescimento populacional.

Os bioensaios foram realizados em placas de Petri (9 cm de diâmetro x 2cm de altura) forradas com papel filtro. Em cada placa foram inseridos 10 insetos de *S. zeamais*. Os tratamentos consistiram na aplicação de diferentes doses do OE de *P. cablin*; enquanto o tratamento controle consistiu na aplicação de acetona. Para aplicação tópica dos tratamentos as placas foram mantidas em freezer por 1 minuto para reduzir a atividade dos insetos. Foram aplicados 0,5 µl dos tratamentos na região do pronoto de cada inseto por meio de uma microseringa (Hamilton) de 10 µl.

Bioensaios preliminares foram realizados com a utilização de três doses: 1, 5 e 10 µg do OE de *P. cablin* mg de inseto^{-1}. A partir destes testes foram determinadas de seis a doze doses do OE de *P. cablin* para bioensaios posteriores, de forma a possibilitar a obtenção de curvas de dose-mortalidade. O número de doses variou entre as populações: Aracaju-SE 7 doses (0,1-15 µg mg^{-1}), Jacarezinho-PR 11 doses (0,1-15 µg mg^{-1}), Juiz de Fora-MG 7 doses (0,1-15 µg mg^{-1}), Maracajú-MS 8 doses (0,1-12 µg mg^{-1}), Rio Branco-AC 8 doses (0,1-15 µg mg^{-1}), São João-PE 7 doses (0,1-15 µg mg^{-1}) e Sete Lagoas-MG 8 doses (0,1-15 µg mg^{-1}), Viçosa-MG 8 doses (0,1-15 µg mg^{-1}) e Votoporanga-SP 9 doses (0,1-20 µg mg^{-1}).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições para cada combinação de tratamento x dose x tempo de exposição x população de *S. zeamais*.

As placas contendo os insetos tratados foram cobertas com filme plástico e acondicionadas em estufa tipo B.O.D., à temperatura de 25ºC ± 1ºC e umidade relativa >70%. Foram realizadas 10 avaliações da mortalidade dos insetos após a montagem dos bioensaios (2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 60 e 72 horas). De posse destes dados foi possível obter as curvas de tempo-mortalidade e dose-mortalidade para as nove populações de *S. zeamais* após 48 e 72 horas de exposição.

2.4.2. Toxicidade por contato do OE de *P. cablin e* da sua nanoemulsão

Nestes bioensaios foram utilizadas as populações de *S. zeamais* mais susceptível e mais tolerante ao OE de *P. cablin*, determinadas nos bioensaios de aplicação tópica.

Cada parcela experimental foi constituída por uma placa de Petri de vidro (6 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura), forrada com papel filtro tratado, contendo 10 insetos.

Foram utilizadas as seguintes concentrações de OE de *P. cablin*: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 5,0 µl ml^{-1} e da nanoemulsão do OE de *P. cablin*: 0,1; 1; 2,5; 5; 7, 5; 9; 10 e 12 µl ml^{-1}. A testemunha consistiu apenas na aplicação de solvente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições para cada tratamento x dose x população de *S. zeamais*. Avaliações da mortalidade foram realizadas 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 60 e 72h após a montagem dos experimentos. De posse destes dados foi possível obter as curvas de concentração-mortalidade para a população susceptível e tolerante de *S. zeamais* após 48 e 72 horas de exposição.

2.4.3. Toxicidade por fumigação do OE de *P. cablin e* da sua nanoemulsão

Nestes bioensaios foram utilizadas as populações de *S. zeamais* mais susceptível e mais tolerante ao OE de *P. cablin*, determinadas nos bioensaios de aplicação tópica.

Os bioensaios de fumigação foram conduzidos segundo metodologia adaptada de Aslan et al. (2004), com temperatura de 27 ± 1º C, umidade relativa de 70 ± 10% e fotofase de 12 h. As câmaras de fumigação consistiram em recipientes de acrílico (22,089 cm^3 de capacidade). Em cada câmara foram confinados 10 adultos de *S. zeamais.*

Os tratamentos consistiram em diferentes concentrações do OE e da nanoemulsão de *P. cablin*. Para ambos os tratamentos foram utilizadas as concentrações: 9,1; 18,2; 22,7; 27,3; 31,8; 36,4; 40,9; 68,2 µl l^{-1} de ar. Em todos os casos a acetona foi utilizada como solvente. Os tratamentos foram aplicados em papéis-filtro (1 cm^2) utilizando pipetador automático (Lanmate Pro, 10-100 µl). Os papéis tratados foram fixados na superfície inferior da tampa dos recipientes. Para evitar o contato direto dos insetos com o papel tratado, estes foram cobertos com tecido tipo organza. Para vedação completa, os recipientes foram envolvidos com filme de PVC.

Avaliações de mortalidade foram realizadas 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 60 e 72h após a montagem dos experimentos. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento x dose x população. De posse destes dados foi possível obter as curvas de concentração-mortalidade para a população susceptível e tolerante de *S. zeamais* após 48 e 72 horas de exposição.

2.4.4. Bioensaios de repelência do OE de *P. cablin e* da sua nanoemulsão

Nestes bioensaios foram utilizadas as populações de *S. zeamais* mais susceptível e mais tolerante ao OE de *P. cablin*, determinadas nos bioensaios de aplicação tópica.

A atividade de atração e/ou repelência do OE e da nanoemulsão de *P. cablin* foi testada em placas de Petri (9 x 2cm) forradas com papel filtro. As metades do papel filtro foram divididas em duas partes, sendo metade tratada com 0,2 ml das CL_{50} e CL_{70} do OE de *P. cablin* ou da nanoemulsão; e a outra metade tratada com o controle (solvente acetona). As CLs utilizadas nestes bioensaios foram determinadas nos bioensaios por contato do OE e da nanoemulsão de *P. cablin*.

Para isso, cada metade do papel filtro foi tratada separadamente. Após a evaporação do solvente, as duas metades foram coladas com fita adesiva dupla face afixada no centro de cada placa de Petri. O experimento foi inteiramente casualizado, com 10 repetições para cada tratamento x população de *S. zeamais*.

As avaliações foram realizados 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24h após a aplicação dos tratamentos. Foram registrados os números de indivíduos presentes em cada lado da placa (área tratada e não-tratada).

2.4.5. Bioensaios de taxa instantânea de crescimento (r_i) e consumo dos grãos (g)

Nestes bioensaios foram utilizadas as populações de *S. zeamais* mais susceptível e mais tolerante ao OE de *P. cablin*, determinadas nos bioensaios de aplicação tópica.

Estes bioensaios foram conduzidos para avaliar o efeito da nanoemulsão do OE de *P. cablin* sobre o crescimento das populações de *S. zeamais* e influência no consumo de grãos. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco de vidro com capacidade de 0,8 litros, contendo 250 g de grãos de milho (umidade 14%) isentos de pragas e inseticida.

Os grãos de milho foram submetidos aos tratamentos com a nanoemulsão (14%) do OE de *P. cablin* nas doses de 0; 2,8; 5,6; 11,2; 22,4; 44,8; 84; 140; 280 e 560 µl de OE de *P. cabli.* A nanoemulsão foi aplicada com uma micropipeta (Labmate Pro) diretamente sobre os grãos de milho que foram agitados para homogeneização por 30 segundos. No tratamento controle, os grãos não foram tratados. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições para cada combinação dose x população.

Trinta insetos adultos foram inseridos em cada frasco. Os frascos vedados foram armazenados em câmeras climáticas do tipo B.O.D. a 27 ± 2^{o}C, umidade relativa de 70 ± 10% e fotoperiodo de 12 horas. Após 60 dias foram avaliados o número de insetos vivos e mortos e determinada a massa dos grãos.

2.5. Análises estatísticas

Para todos os bioensaios de mortalidade (tempo, dose e concentrações letais) as mortalidades dos tratamentos foram corrigidas em relação à mortalidade ocorrida na testemunha usando-se a fórmula de Abbott (1925).

Análises de Próbit foram realizadas para determinação das curvas de tempo-, dose- e concentração-mortalidade. Foram aceitas curvas cuja probabilidade de aceitação da hipótese de nulidade (de que os dados possuem distribuição de próbite) pelo teste χ^2 seja maior que 0,05 (Young and Young, 1998). As curvas permitiram estimar os tempos letais (TL_{50} e TL_{90}) e as doses letais (DL_{50} e DL_{90}) no bioensaio por aplicação tópica; e as concentrações letais nos bioensaios por contato e fumigação (CL_{50}, CL_{70} e CL_{90}) e seus respectivos intervalos de confiança a 95% de probabilidade usando o software SAS (PROC PROBIT; SAS). As TLs, DLs e CLs foram comparados pelo critério dos intervalos de confiança (IC_{95}).

Nos bioensaios de aplicação tópica, as DL_{50} e DL_{90} foram utilizadas para calcular razão de toxicidade entre as populações (RT_{50} e RT_{90}) dividindo-se as DLs da população de interesse pela DL da população mais susceptível. A população mais susceptível e a mais tolerante foram utilizadas nos bioensaios posteriores.

Nos bioensaios de repelência/atração os dados de porcentagem de indivíduos presentes no lado não-tratado da placa de Petri foram submetidos a análise de variância (PROC MIXED, SAS) a fim de verificar diferenças entre o OE e a nanoemulsão de *P. cablin*, as populações susceptível e tolerante, as CL_{50} e CL_{70} e os tempo de exposição. A porcentagem de indivíduos presentes no lado tratado e não-tratado da placa de Petri foram submetidos aos teste t pareado (PROC TTEST, SAS).

A taxa instantânea de crescimento populacional (ri) foi caculada, utilizando a equação (Satrak and Bank, 2003):

$ri = \frac{\left[\ln\left(\frac{Nf}{No}\right)\right]}{\boldsymbol{\Delta t}}$, onde:

r_i = taxa de crescimento populacional;

N_f = número final de insetos vivos;

N_i = número inicial de insetos vivos; e

$\boldsymbol{\Delta}$T = variação de tempo (número de dias de realização do bioensaio).

O consumo de grãos (g) foi determinado pela subtração da massa inicial dos grãos pela massa de grãos no final do experimento.

Os valores de r_i e consumo de grãos foram submetidos à análise de variância (PROC MIXED, SAS) a fim de verificar diferenças entre as populações susceptível e tolerante e

concentrações da nanoemulsão de *P. cablin.* Regressões exponenciais foram ajustadas para os dados de r_i e consumo de grãos.

3. Resultados

3.1. Caracterização do óleo essencial (OE) de P. cablin

O OE de *P. cablin* obtido a partir da hidrodestilação das folhas secas teve seus constituintes identificados por CG/EM e CG/DIC. Quinze compostos representando 93,73% de sua composição foram identificados e divididos em sesquiterpenos não-oxigenados (33,53%) e sesquiterpenos oxigenados (60,20%) (Tabela 1).

O sesquiterpeno oxigenado patchoulol destacou-se por ser o componente majoritário no óleo essencial (55,04%). Um total de seis constituintes foram encontrados em concentrações inferiores a 1% e cinco compostos tiveram seus percentuais variando entre 1 e 5%. Acima desse valor estão os componentes detectados em maior proporção como o α-guaieno (7,05%), seicheeleno (7,40%) e α-bulneseno (9,11%) (Tabela 1).

3.2. Toxicidade por aplicação tópica

O OE de *P. cablin* demonstrou ação rápida e eficiente atividade inseticida sobre as nove populações de *S. zeamais* (Tabelas 2 e 3).

O tempo necessário para causar 50% de mortalidade das populações, na dose 15 µg mg^{-1}, foi em média 33,4 horas, variando de 12,8 a 60,4 horas entre as populações (Tabela 2). A ação tóxica do OE de *P. cablin* foi mais rápida nas populações de Jacarezinho-PR, Rio Branco-AC, Juiz de Fora-MG e Viçosa-MG, que levou em média menos de 20 horas para causar mortalidade na metade das populações. Para estes insetos, as inclinações das curvas de tempo-mortalidade foram baixas, o que resultou em maiores TL_{90} (Tabela 2).

As populações de *S. zeamais* de Aracaju-SE, Maracaju-MS, Votuporanga-SP, Sete Lagoas-MG e São João-PE responderam de forma mais homogênea em relação a velocidade de ação do OE de *P. cablin*, com inclinações que variaram de 3,13 a 5,55. O tempo médio para causar mortalidade de 50% destas populações foi de 45,09 horas (Tabela 2).

Para a maioria das populações não houve variações nas DL_{50} ao longo do tempo. Exceções ocorreram para as populações de Maracaju-MS, Rio Branco-AC e São João-PE que apresentaram aumento da toxicidade após 78h de exposição (Tabela 3).

As populações de *S. zeamais* responderam de modo semelhante ao OE de *P. cablin*. As doses letais para matar 50% das populações resultaram em baixas razões de toxicidade (<2). A população de Viçosa-MG foi a mais susceptível ao OE de *P. cablin*, com DL_{50} de

9,17 e 8,01 µg mg^{-1} após 48 e 72 horas de exposição, respectivamente. As populações de Juiz de Fora-MG e Votuporanga-SP mostraram suscetibilidade semelhante a esta população após 48 horas de exposição ao óleo (Tabela 3).

A maior tolerância ao OE de *P. cablin* foi detectada na população de Sete Lagoas-MG, que apresentou aumento na DL_{50} de 1,77 e 1,53 vezes. Razões de toxicidades (RT_{50}) entre 1,05 e 1,45 foram observadas para as demais populações de *S. zeamais* (Tabela 3).

O maior valor de inclinação das curvas de dose-mortalidade foi observado para a população de Maracaju-MS (β = 6,81) após 72 horas de exposição ao OE de *P. cablin*, resultando na menor dose letal necessária para matar 90% desta população (13,67 µg mg^{-1}) (Tabela 3).

3.3. Caracterização da nanoemulsão de OE de P. cablin

A imagem obtida por microscopia de luz polarizada da nanoemulsão de *P. cablin* a 14% mostra um campo escuro. A nanoemulsão caracterizou-se por apresentar um tamanho de gotas, índice polidispersão e condutividade elétrica de 24,74 nm; 0,6 e 25,5 µs.cm^{-1}, respectivamente (Figura 2).

3.4. Toxicidade por contato e fumigação do OE e da nanoemulsão de P. cablin

A toxicidade por contato e fumigação do OE e da nanoemulsão de *P. cablin* sobre as populações susceptível e tolerante de *S. zeamais* após 48 e 72 horas de exposição são mostradas na Tabela 4.

A concentração do OE de *P. cablin* necessária para causar 50% de mortalidade das populações por contato e fumigação variou de 0,34 a 0,43 µl ml^{-1} e 28,6 a 33,5 µl l^{-1}, respectivamente. Já a nanoemulsão de *P. cablin* apresentou CL_{50} que variaram de 1,28 a 8,84 µl ml^{-1} e 32,7 a 39,5 µl l^{-1} (Tabela 4).

Nós observamos, para as duas populações, aumento da toxicidade por contato e fumigação (CL_{50}) da nanoemulsão de *P. cablin* de 48 para 72 horas de exposição. O mesmo não ocorreu com o OE de *P. cablin* que exibiu seu efeito tóxico por estas duas vias de exposição (CL_{50}) já nas primeiras 48 horas.

Para a maioria dos casos, a população de Sete Lagoas-MG foi mais tolerante (> CL_{50}) se comparada com a população de Viçosa-MG. Considerando a média dos tempos de exposição, a população de Sete Lagoas-MG foi 1,3 e 1,1 vezes mais tolerante ao OE de *P. cablin* e 4,6 e 1,1 vezes mais tolerante a nanoemulsão de *P. cablin*, por contato e fumigação, respectivamente (Tabela 4).

A toxicidade (CL_{50}) por contato e fumigação sobre as duas populações após 48 e 72 horas de exposição ao OE de *P. cablin* foi, na maioria das vezes, maior do que a toxicidade

causada pela nanoemulsão de *P. cablin* (Tabela 4). O OE de *P. cablin* aplicado por contato foi 5,3 e 18,8 vezes mais tóxico, na média dos tempos de exposição, do que a nanoemulsão de *P. cablin* sobre populações de Viçosa-MG e Sete Lagoas-MG, respectivamente (Tabela 4). A redução da toxicidade da nanoemulsão foi menor quando as populações foram expostas por fumigação. Por esta via de exposição, o OE de *P. cablin* foi cerca de 1,11 e 1,14 vezes mais tóxico que a nanoemulsão de *P. cablin* às populações de Viçosa-MG e Sete Lagoas-MG, respectivamente (Tabela 4).

Curvas de concentração-mortalidade da nanoemulsão de *P. cablin* via fumigação apresentaram, na maioria dos casos, as maiores inclinações, resultando em menores concentrações letais necessárias para matar 90% das populações de *S. zeamais* (Tabela 4).

3.5. Bioensaios de repelência do OE e da nanoemulsão de P. cablin

Foram detectadas diferenças na porcentagem de indivíduos de *S. zeamais* presentes no lado não-tratado da placa entre o OE e a nanoemulsão de *P. cablin* ($F_{1;550}$=7,45; *P*=0,007). Entretanto, não houve diferença em relação às populações ($F_{1;550}$=0,09; *P*=0,765), concentrações ($F_{1;550}$=0,67; *P*=0,414) e tempo de exposição ($F_{1;550}$=2,10; *P*=0,051).

O OE e a nanoemulsão de *P. cablin* foram repelentes nas CL_{50} e CL_{70} em todos os tempos de exposição para a população de Viçosa-MG. O mesmo ocorreu com a população de Sete Lagoas-MG, exceção para a CL_{50} após 4, 6 e 8 horas de exposição e para a CL_{70} após 24 horas de exposição à nanoemulsão de *P. cablin* (Figura 3).

Para a população de Viçosa-MG, não houve diferença na repelência causada pelo OE e nanoemulsão de *P. cablin* ($F_{1;278}$=0,02; *P*=0,876). Em média, 84±1,6 e 81,8±1,6 dos indivíduos da população desta população permaneceram no lado não-tratado da placa com o OE e a nanoemulsão de *P. cablin*, respectivamente. Já para a população de Sete Lagoas-MG, diferenças foram observadas na repelência causada pelo OE e nanoemulsão de *P. cablin* ($F_{1;278}$=13,57; *P*=0,003). O OE de *P. cablin* (86±1,5) causou maior repelência a esta população se comparado a nanoemulsão (76±2,3) deste óleo (Figura 3).

3.6. Bioensaios de taxa instantânea de crescimento (r_i) e consumo dos grãos (g)

Foram detectadas diferenças no r_i entre as populações ($F_{1;60}$=9,68; *P*=0,003) e as concentrações da nanoemulsão de *P. cablin* ($F_{9;60}$=62,11; *P*<0,001). Entretanto, não houve diferença na interação população × concentração ($F_{9;60}$=1,57; *P*=0,146). Em relação ao consumo de grãos, foram detectadas diferenças entre as concentrações da nanoemulsão de *P. cablin* ($F_{9;60}$=5,99; *P*<0,001). Entretanto, não houve diferença em relação às populações ($F_{1;60}$=1,93; *P*=0,170) e interação população × concentração ($F_{9;60}$=0,37; *P*=0,950).

O potencial (0 µl kg^{-1}) de crescimento populacional ($F_{1;6}$=0,65; *P*=0,450) e o consumo de grãos ($F_{1;6}$=0,04; *P*=0,844) das populações de Viçosa-MG (0,0318±0,0023 e 30,55±4,04 g) e Sete Lagoas-MG (0,0338±0,001 e 31,67±3,64 g) não diferiram significativamente. Concentrações crescentes da nanoemulsão de *P. cablin* resultaram em redução do r_i e do consumo de grãos das duas populações (Figura 4).

As populações de Viçosa-MG e Sete Lagoas-MG entraram de declínio (r_i<0) a partir das concentrações de 50,15 e 67,29 µl kg^{-1}, respectivamente. Pelo IC 95% das curvas, verifica-se que o r_i da população de Viçosa-MG reduziu de forma mais acentuada a partir da concentração de 190,3 µl kg^{-1} (Figura 4A).

4. Discussão

Os óleos essenciais (OE) apresentam grande diversidade de compostos que desempenham importante papel na proteção das plantas contra insetos fitófagos. Tais substâncias podem constituir alternativas ao manejo de populações de pragas. Neste trabalho, o OE de *P. cablin* e a sua nanoemulsão mostraram atividade tóxica sobre populações de *S. zeamais* com diferentes níveis de resistência aos inseticidas convencionais, afetando significativamente a sobrevivência, o comportamento e a reprodução dos mesmos.

A proporção dos constituintes químicos do OE de *P. cablin* diferiu em relação ao observado em outros estudos. No entanto, as variações dos compostos majoritários estão dentro das faixas relatadas por Silva et al. (2004): patchoulol (32,88% - 70,74%), α-bulneseno (5,12% - 6,84%), α-guaieno (2,87% - 4,25%). Blank et al. (2011) também verificaram variação quantitativa nos constituintes de sete acessos de *P. cablin*, sendo que o componente majoritário patchoulol variou de 53,71 a 68,41%. As variações em tais concentrações podem resultar de fatores como qualidade e envelhecimento das folhas, técnica de destilação e de cultivo (Sant'ana et al., 2010).

Os valores das TL_{50} mostram que o OE de *P. cablin* apresenta rápida atividade inseticida sobre as nove populações de *S. zeamais*. As populações com os menores TLs_{50} tiveram curvas tempo-mortalidade com inclinações baixas, gerando assim altos valores de TL_{90}. Por outro lado, as populações com maiores TLs_{50} responderam de forma mais homogênea uma vez que as curvas mostraram inclinações mais altas, exigindo assim menos tempo para causar a mortalidade de 90% de seus indivíduos (menores TLs_{90}).

Os menores tempos letais foram observados justamente para as quatro populações (Jacarezinho-PR, Rio Branco-AC, Juiz de Fora e Viçosa-MG) consideradas mais resistentes aos inseticidas organossintéticos (Braga et al., 2008). Estas populações são mantidas há

mais de uma década sobre ausência de inseticidas, não sendo observada redução de suas expressões de resistência aos inseticidas convencionais (Guedes et al., 1994). A população oriunda de Jacarezinho-PR, que apresentou a menor TL_{50}, é considerada padrão de resistência aos piretróides (Guedes et al., 1994). Esta resistência se deve a uma alteração ocasionada por mutação estrutural nas proteínas dos canais de sódio localizadas no sistema nervoso destes insetos (Soderlund et al., 2003).

Por outro lado, os efeitos tóxicos dos mono- e sequisterpenos presentes em óleos essenciais de plantas estão possivelmente relacionado aos mecanismos: i) inibição da acetilcolinesterase através de suas ligações nos centros ativos desta enzima (Ryan et al., 1988); ii) interferência no neuromodulador octopamina, que é encontrado em todos os invertebrados (mas não em mamíferos); iii) inteferência nos canais de cálcio modulados pelo ácido gama-aminobutírico (GABA) (Isman et al., 2006); e iv) por atuarem sobre outros sítios vulneráveis, como citocromo P450 (Lee et al., 2001). Desta forma, devido aos diferentes modos de ação dos inseticidas convencionais e dos OEs, as populações mais resistentes aos piretróides foram as mais afetadas pela atividade do OE de *P. cablin*.

A toxicidade do OE de *P. cablin* às populações de *S. zeamais* não variou ao longo do tempo, mostrando o mesmo padrão após 48 e 72h de exposição. A população de Viçosa-MG foi a mais susceptível, enquanto a de Sete Lagoas-MG foi a mais tolerante. Vários estudos tem demonstrado que óleos essenciais são boas alternativas ao uso de inseticidas sintéticos para o controle de pragas de grãos armazenados (Ayvaz et al., 2010; Paes et al., 2012). Toxicidade dos OEs de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* (Estrela et al., 2006); *S. terebinthifolius, E. uniflora, M. leucadendron* e *C. zeylanicum* foram verificadas contra *S. zeamais* (Coitinho et al., 2006). Porém as CL_{50s} destes óleos foram maiores do que as encontradas no presente estudo, indicando maior eficiência do OE de *P. cablin* sobre *S. zeamais*.

A toxicidade de um composto aos insetos depende de sua capacidade de ultrapassar o tegumento e alcançar o sítio-alvo (Zhu et al., 2003). É provável que vários compostos dos óleos essenciais desempenhem um papel na penetração cuticular determinando a atração lipofílica e a distribuição celular (Bakkali et al., 2008). Assim, a alta toxicidade do OE de *P. cablin* observada por aplicação tópica neste estudo pode estar relacionada à ação sinérgica de seus constituintes. Este tipo de ação aumenta a eficiência dos OEs, permitindo a utilização de menores quantidades em uma mistura para atingir níveis satisfatórios de eficiência. Além disso, o desenvolvimento de resistência aos OEs deve ser menos provável, devido à complexidade de interação entre seus compostos.

As populações que mostraram respostas extremas em relação à susceptibilidade (Viçosa-MG) e tolerância (Sete Lagoas-MG) via aplicação tópica do OE, foram avaliadas por

outras vias de exposição ao OE de *P. cablin* e sua nanoemulsão. Tanto para a via de contato por papel filtro como por fumigação, o padrão de resposta destas populações se manteve o mesmo. A eficiência para as populações com extremos de tolerância/susceptibilidade indica que os produtos de *P. cablin* testados podem ser eficientes para uma ampla gama de populações provenientes de diferentes regiões do Brasil. O OE de *P. cablin* mostrou maior toxicidade (menores CLs_{50} e CLs_{90}) a ambas as populações quando comparado à sua nanoemulsão. No entanto, a toxicidade da nanoemulsão aumentou ao longo do tempo, efeito este desejável para um controle mais prolongado de *S. zeamais* em silos de grãos armazenados. Este resultado pode ser explicado pela presença de tensoativos na constituição química da nanoemulsão, os quais diminuem a volatilidade do OE prolongando sua permanência e afinidade lipofílica, com consequente aumento de sua penetração na cutícula dos insetos.

O índice de polidispersão da nanoemulsão do OE de *P. cablin* indica uma distribuição de tamanho de gotículas não uniforme, com fase heterogênea e homogênea. Estes resultados indicam que a nanoemulsão foi do tipo água-óleo (Sintov et al., 2004). Nanoemulsões com homogeneidade são altamente miscíveis em água com formação espontânea da suspensão coloidal, enquanto aquelas com heterogeneidade apresentam afinidade lipofílica (Schaffazick et al., 2003) e degradação mais rápida (Capek et al., 2004). Estas características podem acelerar tanto a ação tóxica sobre os insetos como também a degradação do produto no ambiente evitando assim efeitos indesejados em organismos não-alvo.

Coitinho et al. (2006) encontraram CLs_{50} dos óleos essenciais de *M. leucadendron* e *S. terebinthifolius* variando entre 75,8 a 98,8 µl l^{-1} de ar para *S. zeamais*, valores aproximadamente três vezes maiores do que os encontrados neste trabalho. O efeito de fumigação tem sido atribuído à inalação das substâncias químicas dos OE através dos espiráculos dos insetos (Yang et al., 2005).

Adicionalmente, o OE de *P. cablin* e sua nanoemulsão mostraram também propriedades repelentes contra *S. zeamais*. Adultos de *S. zeamais* são capazes de detectar óleos essenciais através do olfato, evitando-os quando tem chance de escolha (Jayasekara et al., 2005). Outros estudos também relataram repelência de OEs para *S. zeamais*, tais como: *Eucalyptus saligna*, *Cupressus sempervirens* (Tapondjou et al., 2005); *Lippia gracillis* Schaner (Verbenaceae), *Eucalyptus citriodora* (Myrtaceae), *Copaifera* sp. (Leguminosae) e *Piper guinense* (Piperaceae) (Asawalam et al., 2006).

Os efeitos letais e subletais da nanoemulsão *P. cablin* refletiu diretamente sobre taxa de crescimento (r_i) das populações de *S. zeamais*. Ambas as populações mostraram redução de crescimento com o aumento da concentração da nanoemulsão, sendo que esta

resposta foi mais acentuada para a população mais susceptível (Viçosa-MG). Doses consideradas baixas foram suficientes para o declínio do crescimento populacional, o que é indicado pelos valores negativos de r_i (Stark et al., 2003). A menor volatilidade e degradação da nanoemulsão em relação ao OE de *P. cablin* podem ter contribuído para permanência dos compostos junto à massa de grãos. O efeito na mortalidade de adultos de *S. zeamais* pode estar associado à ação por contato e fumigação da nanoemulsão do OE de *P. cablin*, provocando um efeito inibitório no crescimento populacional. Estes resultados corroboram estudos mostrando que OEs podem ocasionar redução da alimentação, inibição do crescimento e limitações no desenvolvimento e reprodução de diversos insetos (Coats et al.,1994). Extratos de algumas plantas e OE podem alterar o crescimento, impedir a muda, afetar a reprodução, causar mortalidade (Martinez et al., 2001), redução da fecundidade (Prajapati et al., 2005) e oviposição, deterrência na alimentação, e ainda afetar o crescimento dos insetos (Martinez et al., 2001).

Adicionalmente, os resultados mostram um padrão interessante do ponto de vista de manejo de populações de difícil controle. O intensivo uso de inseticidas no controle de pragas tem levado ao surgimento de diferentes mecanismos de resistência. Justamente as populações já relatadas como resistentes a determinados inseticidas convencionais, foram as mais susceptíveis ao OE de *P. cablin* e sua nanoemulsão. Tal padrão sugere que deve haver um custo adaptativo da resistência, elevando o gasto energético do inseto associado aos mecanismos destoxificativos, o que limita o desenvolvimento de novos mecanismos de resistência. Além disso, a distribuição geográfica das plantas hospedeiras e o nível de especificidade dos insetos determinam as chances de resistência aos metebólitos secundários de plantas inseticidas.

Assim, a nanoemulsão e o OE de *P. cablin* podem ser boas alternativas aos produtos utilizados no controle de pragas de grãos armazenados por fumigação (ex. fosfina), os quais podem apresentar efeitos indesejáveis a organismos não-alvo, ao ambiente e à saúde humana e, ainda induzir o desenvolvimento de populações de insetos resistentes (Subramanyam et al., 1996; Demirel et al., 2009).

5. Conclusões

Os resultados obtidos nesta pesquisa indicam que o óleo essencial de *P. cablin* e sua nanoemulsão são potencialmente tóxicos para as populações de *S. zeamais* por diferentes vias de exposição (contato, fumigação e repelência). A nanoemulsão do OE de *P. cablin* mostrou significativa ação por fumigação e por contato causando mortalidade, repelência, inibição do crescimento populacional e do consumo alimentar de grãos. Pelo fato de serem repelentes para as populações de *S. zeamais*, estas substâncias apresentam potencial para controle direto e proteção da biomassa de grãos de milho contra infestação. Este trabalho mostra ainda, que o OE de *P. cablin* e sua nanoemulsão têm ampla ação sobre populações com diferentes níveis de susceptibilidade aos inseticidas convencionais. De forma interessante, as populações mais resistentes aos produtos amplamente utilizados no mercado, foram as mais susceptíveis ao OE e sua nanoemulsão. Assim, conclui-se que o OE de *P. cablin* e sua nanoemulsão consistem em alternativas viáveis ao uso de inseticidas tradicionais e ao manejo de populações resistentes, além de representarem fontes promissoras para novas moléculas inseticidas. Adicionalmente, este trabalho auxilia no entendimento dos padrões de resposta de insetos aos produtos químicos sintéticos e oriundos do metabolismo secundário de plantas. Agradecimentos ao CNPq, CAPEM e Fapitec pelo auxílio financeiro e bolsas concedidas.

Referências

Aguiar-Menezes, E. L. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 58 p.

Autran, E. S.; Neves, I. A.; Silva, C. S. B.; Santos, G. K. N.; Câmara, C. A. G.; Navarro, D. M. A. F. ,2010. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). Bioresour. Technol,100, 2284-2288.

Ayvaz, A., Sagdic, O., Karaborklu, S., Ozturk, I., 2010. Insecticidal activity of the essential oils from different plants against three stored-product insects. J Inst Sci. 10, 1-13.

Bacci, L., Picanço, M.C., Silva, E.M., Martins, J.C., Chediak, M., Sena, M.E., 2009. Seletividade fisiológica de inseticidas aos inimigos naturais de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) em brássicas. Cienc. Agrotecnol. 33, 2045-2051.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. Food Chem. Toxicol. 46, 446-475.

Berenbaum, M., 1985. Allelochemical interactions in plants. Rec. Adv. Phytochem. 19, 139–169.

Blank, A. F; Santana, T. C. P.; Santos, P. S.; Arrigoni-Blank, M. F.; Prata, A. P. N.; Jesus, H. C. R.; Alves, P. B.; 2011. Chemical characterization of the essential oil from patchouli accessions harvested over four seasons, Ind. Crop. Prod., 34,831-837

Braga,L.S.;Corrêa, A.S.; Pereira, E.J.G; Guedes R.N.C.; 2011. Face or flee? Fenitrothion resistance and behavioral response in populations of the maize weevil, *it Sophilus zeamais*, J. Stored Prod. Res., 47,161-167

Buré, C. M.; Sellier, N. M., 2004. Analysis of the essential oil of Indonesian patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) using GC/MS (EI/CI). J. Essent. Oil Res, Carol Stream, 16,17-19.

Capek, I.,2004. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions, Adv. Colloid Interface Sci. 107, 125–155.

Coats, J.R., 1994. Risks form natural versus synthetic inseticides. Annu. Rev. Entomol, 39, 489-515.

Coitinho, R.L.B.C., J.V. Oliveira, M.G.C. Gondim Júnior & C.A.G. Câmara. 2006. Toxicidade de óleos para adultos de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera, Curculionidae) em grãos de milho armazenados. Rev. Bras. Armaz. 31: 29-34.

Côrrea, A.S; Santos, C.T; Oliveira, E.E.; Tolledo, J.S.; Cordeiro, E.M.G; Guedes R.N.C. 2008 Custo adaptativo da Resistência através da competição entre populações de *Sitophilus zemais* (Coleoptera:Curculionidae) e resistentes a Piretroides Rev. Bras. Armaz, 33,19-28.

Corrêa, J. C. R.; Salgado, H. R. N. 2011. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. Rev. Bras. Plant. Med., 13, 500-506.

Demirel, N., Kurt, S., Gunes, U., Uluc, F.T., Cabuk, F., 2009. Toxicological responses of confused flour beetle, *Tribolium confusum* du Val (Coleoptera: Tenebrionoidea) to various isothiocyanate compounds. Asian J. Chem. 21, 6411e6416.

Després, L.; David, J.P.; Gallet, C., 2007. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. Trends. Ecol. Evol., 22, 06, 298-307.

Estrela, J.LV., M. Fazolin, V. Catani, M.R. Alécio & M.S. Lima. 2006. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. Pesqu. Agropecu. Bras. 41: 217-222.

Fragoso, D.B.; Guedes, R. N. C; Oliveira, M.G.A. , 2007. Partial characterization of glutationa-S-transferases in pyrerthoid-resistant and susceptible populations of the maize weeil, *Sitophilus zemais*, J. Stored Prod. Res, 43, 167-170

Fragoso, D.B.; Guedes, R.N.C.;Peternelli, L.A., 2005. Developmental rates and population growth of insecticide-resistant and susceptible populations of Sitophilus zeamais. J. Stored Prod. Res. 41,271-281.

Guedes, R.N.C., J.O.L. Lima, J.P. Santos & C.D. Cruz. 1994.Inheritance of deltamethrin resistance in a Brazilian strain of maize weevil (*Sitophilus zeamais* Mots.). Int. J. Pest Manag. 40: 103-106.

Huang, Y.; Ho, S.H.; Kini, R.M. , 1999.Bioactivities of safrole and isosafrole on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). J. Econ. Entomol.,676-683, 1999.

Huang, Y.; Lam, S.L., 2000. Bioactivies of essential oil from *Ellateria cardamomum* (L.) Maton. to *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst), J. Stored Prod. Res,.36,107-117,

Isman, M.B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annu. Rev. Entomol. 51: 45-66.

Jayasekara, T.K., P.C. Stevenson, D.R. Hall & S.R. Belmain. 2005. Effect of volatile constituents from Securidaca longepedunculata on insect pests of stored grain. J. Chem. Ecol. 31:303-313.

Johnson, R.M., Mao, W., Pollock, H.S., Niu, G., Schuler, M., Berenbaum, M.R., 2012. Ecologically appropriate xenobiotics induce cytochrome P450s in *Apis mellifera*. PLoS One. 7, e31051.

Knaak, N.; Fiuza, L. M. , 2010. Potential of essential plant oils to control insects and microorganisms. Neot. Biol. Cons., 5, 120-132

Lee, S.; Peterson, C.J.; Coats, J.R. , 2003.Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects, J. Stored Prod. Res,39,77-85.

Liu, Z. L.; Chu, S. S.; Jiang, G. H. , 2009.Toxicity of *Schizonpeta multifida* essential oil and its constituent compounds towards two grain storage insects. J. Agric. Food Chem., 91,905-909

Liu, Z.L., Goh, S.H.;. Ho, H. 2007. Screening of Chinese medicinal herbs for bioactivity against *Sitophilus zea*mais Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). J. Stored Prod. Res. 43, 290-296.

Martinez, S.S. , Van Emden. H.F., 2001. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. Neotrop. Entomol. 30: 113-124.M

Martinez, S.S. 2002. O NIM – Azadirachta indica: natureza, usos múltiplos, produção. Instituto Agronômico do Paraná, Londrina. 142p.

Nerio, L. S.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E. , 2010.Repellent activity of essential oils: A review. Bioresour. Technol, 101, 372-378.

Obeng-Ofori, D., Reichmuth, C.H., Bekele, J., Hassanali, A., 1997. Biological activity of 1,8 cineole, a major component of essential oil of *Ocimum kenyense* (Ayobangira) against stored product beetles. J. Ap. Entomol. 121, 237–243.

Ojimelukwe, P.C., Adler, C., 1999. Potential of zimtaldehyde, 4-allyl-anisol, linalool, terpineol and other phytochemicals for the control of the confused flour beetle (*Tribolium confusum*) (Col., Tenebrionidae). J. Pest Sci. 72, 81–86.

Paes, J.L.. Faroni, L.R.D.'A, Dhingra O.D., Cecon P.R., Silva, T.A, 2012. Insecticidal fumigant action of mustard essential oil against *Sitophilus zeamais* in maize grains Crop Prot, 34, 56-58

Prajapati, V.; Tripathi, A.K.; Aggarwal, K.K.; Khanuja, S.P.S., 2005. Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against Anopheles stephensi, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Bioresour. Technol. 96: 1749-1757.

Rajendran, S.; Sriranjini. V., 2008. Plant products as fumigants for stored-product insect control. J. Stored Prod. Res. 44, 126-135.

Rattan, R.S., 2010. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. Crop Prot. 29, 913-920

Ribeiro, B. M.; Guedes, R. N. C.; Oliveira, E. E.; Santos, J. P., 2003. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). J. Stored Prod. Res. 39, 21-31.

Ryan, M.F., Byrne, O., 1988. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. J. Chemom. Ecol. 14, 1965–1975.

Sant`ana, T.C.P., Blank, A.F., Vieira, S.D., Arrigoni-Blank, M.F., Jesus, H.C.R., Alves, P.B., 2010. Influência do armazenamento de folhas secas no óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin* BENTH.). Quim. Nova. 33, 1263-1265.

Schaffazick, S. R.; GuterreS, S. S.; Freitas, L. L.; PohlmanN, A. R.;2003. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. ; Quim. Nova;.26, 726-737

Silva, M. A. S.; Ehlert, P. A. D.; Ming, L. C.; Marques, M. O. M.,2004. Composition and chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Pogostemon* patchouli pellet leaves. Acta Horticulturae, 629,145-147.

Sintov, A.C., Shapiro, L., 2004. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. J. Control. Release 95,173–183.

Stark, J.D.; Banks, J.E. 2003. Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. Annu. Rev. Entomol.48,.505-519,

Subramanyam, B.H.; Hagstrum, D.W. 1996.Resistance measurement and management. Integrated management of insects in stored products. New York: Marcel Dekker. p.331-397

Tapondjou, A.L.; Adler, C.; Fontem, D.A.; Bouda, H.;Reichmuth, C.,2005. Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Moutschulsky and *Tribolium confusum* du Val. J. Stored Prod. Res,41,91-102.

Yang, P., Yajun, M.A.; Zheng, S. 2005 Adulticidal activity of five essential oils against *Culex pipiens quinquefasciatus*. J. Pest. Sci.,30, 84-89.

Yu, S.J., 2004. Induction of detoxification enzymes by triazine herbicides in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Pestic. Biochem. Physiol. 80, 113-122.

Zhu, B.C.R., Henderson, G., Yu, Y., Laine, R.A., 2003. Toxicity and repellency of patchouli oil and patchouli alcohol against Formosan Subterranean termites *Coptotermes formosanus Shiraki* (Isoptera: Rhinotermitidae). J. Agric. Food Chem. 51, 4585-4588.

Tabela 1

Composição do óleo essencial (OE) de *Pogostemon cablin* caracterizado por CG/EM e CG/DIC.

Composto	Tempo de retenção (min)	Índice de retenção[a]	Área do pico (%)[b]
β−patchouleno	25,725	1387	0,99±0,01
β−elemeno	26,110	1396	0,42±0,02
cicloseicheleno	26,990	1416	0,50±0,03
E-cariofileno	27,390	1425	1,14±0,03
α-guaieno	28,190	1444	7,05±0,16
seicheleno	28,445	1450	7,40±0,14
α-humuleno	28,890	1460	0,30±0,00
α-patchouleno	29,025	1463	3,82±0,23
Allo-aromadendreno	29,175	1467	0,67±0,14
9-epi-E-cariofileno	29,260	1469	0,99±0,03
acifileno	30,800	1504	1,14±0,03
α-bulneseno	31,105	1512	9,11±0,29
óxido de cariofileno	34,360	1592	1,77±0,04
pogostol	37,200	1664	3,39±0,12
patchoulol	37,555	1673	55,04±0,29
Sesquiterpenos não-oxigenados(%)			33,53
Sesquiterpenos oxigenados (%)			60,20
Total (%)			93,73

[a] Índice de retenção calculado utilizando a equação de Van den Dool e Kratz 1963 em relação a uma série homóloga de *n*-alcanos (*n*C9- *n*C18).
[b] Valores (± EPM) do conteúdo dos compostos obtido pela média de três diferentes determinações e foram obtidas por GC/MS e GC/FID.

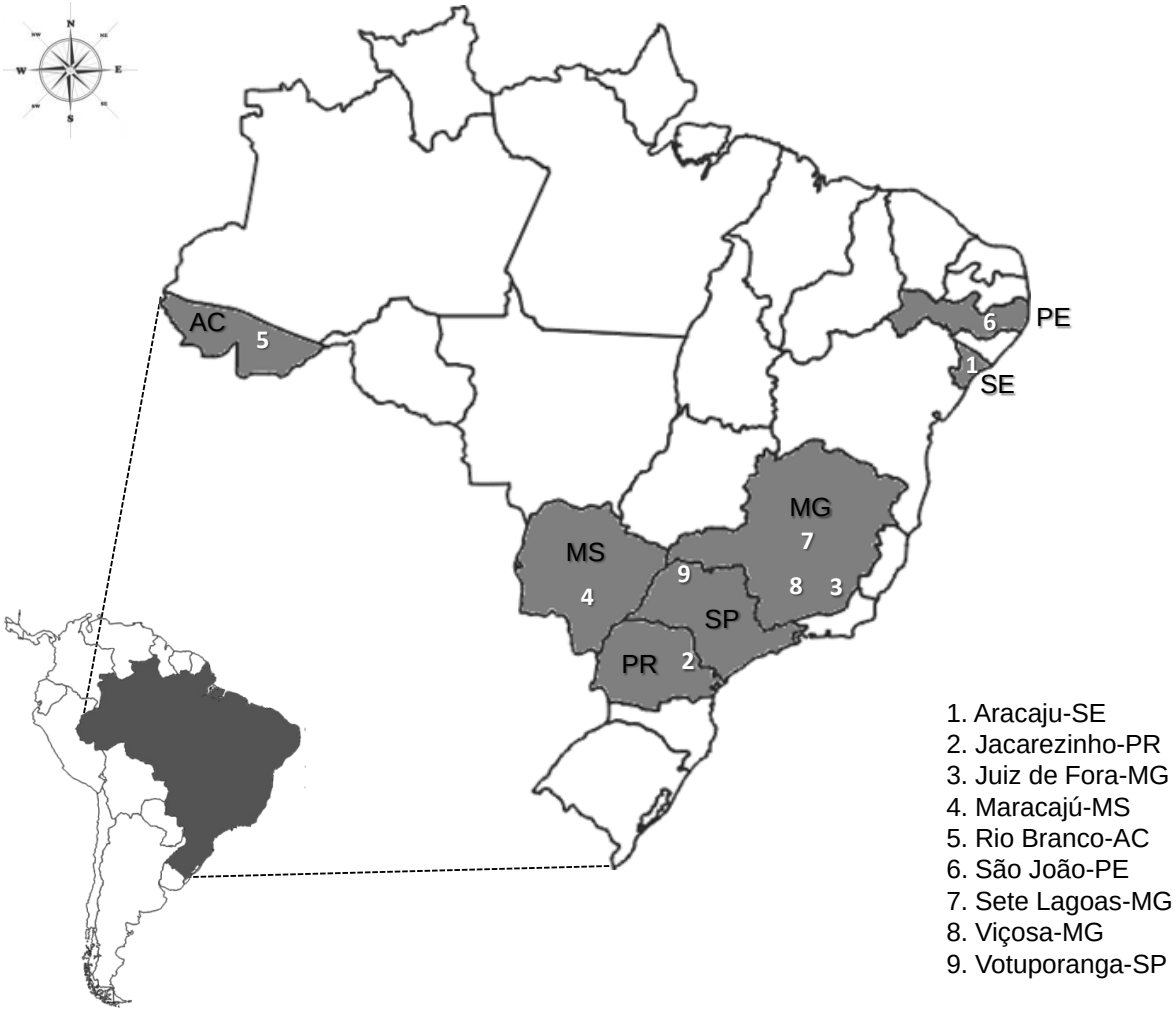

Fig. 1. Locais de coleta de nove populações do gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Cucurlionidade) em sete estados brasileiros [Acre (AC), Mato Grosso do Sul (MS), Minas Gerais (MG), Paraná (PR), Pernambuco (PE), São Paulo (SP) e Sergipe (SE)].

Tabela 2

Tempo letal (TL_{50} e TL_{90}) do OE de *Pogostemon cablin* aplicado topicamente em populações do gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* na dose de 15 µl mg^{-1}.

População	*N* [a]	TL_{50} (IC 95%) [b] (horas)	TL_{90} (IC 95%) [b] (horas)	β [c]	χ^2	*p*
Jacarezinho-PR	490	12,8 (9,7-16,2) A	118,4 (81,1-201,7)	1,32	0,70	0,708
Rio Branco-AC	370	15,2 (11,6-19,5) A	161,4 (106,3-293,6)	1,25	0,73	0,701
Juiz de Fora-MG	370	20,9 (16,5-25,5) B	128,5 (94,4-202,7)	1,62	2,43	0,297
Viçosa-MG	370	26,3 (13,0-35,7) B	327,0 (173,7-1846,9)	1,17	0,22	0,895
Aracaju-SE	370	39,0 (35,5-41,8) C	66,3 (61,2-74,6)	5,55	0,37	0,820
Maracaju-MS	370	39,9 (36,4-43,5) C	86,3 (76,1-102,0)	3,82	5,78	0,041
Votuporanga-SP	410	42,1 (38,3-46,6) C	107,8 (85,4-161,4)	3,13	0,60	0,746
Sete Lagoas-MG	410	44,0 (39,0-47,9) C	99,4 (84,8-129,9)	3,61	0,66	0,726
São João-PE	370	60,4 (51,8-65,6) D	114,0 (100,5-148,1)	4,64	0,85	0,658

[a] Número de insetos.
[b] TL: tempo letal (horas), IC: intervalo de confiança a 95%. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo IC 95%.
[c] β=inclinação da curva.

Tabela 3

Atividade inseticida (DL_{50} e DL_{90}) do OE de *Pogostemon cablin* aplicado topicamente em populações do gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* após 48 e 72 horas de exposição.

População	*N* [a]	DL_{50} (IC 95%) [b] (µg mg^{-1})	RT_{50} [c] (IC 95%)	DL_{90} (IC 95%) [b] (µg mg^{-1})	RT_{90} [c] (IC 95%)	β [d]	χ^2	*p*
48 horas de exposição								
Viçosa-MG	370	9,17 (7,52-11,20)	-	54,23 (32,84-127,44)	-	2,91	0,49	0,785
Juiz de Fora-MG	370	9,67 (9,10-10,36)	1,05	17,19 (15,11-20,89)	0,32	3,03	1,17	0,564
Votoporanga-SP	410	10,79 (9,07-13,06)	1,18	55,55 (39,03-93,15)	1,02	5,12	2,61	0,271
Aracaju-SE	370	11,36 (10,03-13,52)	1,24	31,20 (22,88-54,74)	0,58	3,77	1,23	0,545
Jacarezinho-PR	490	11,59 (10,44-13,33)	1,26	30,67 (23,37-48,96)	0,57	4,11	1,04	0,599
Maracaju-MS	370	12,82 (11,53-15,22)	1,40	28,03 (21,46-45,75)	0,52	4,39	2,38	0,305
Rio Branco-AC	370	13,20 (12,22-14,81)	1,44	27,06 (21,64-81,71)	0,50	1,57	0,90	0,643
São João-PE	370	15,67 (14,19-18,61)	1,71	30,69 (23,94-49,58)	0,57	1,66	1,24	0,544
Sete Lagoas-MG	410	16,25 (12,13-27,69)	1,77	106,49 (51,18-466,46)	1,96	1,80	0,09	0,955
72 horas de exposição								
Viçosa-MG	370	8,01 (7,10-9,24)	-	23,77 (17,88-38,60)	-	2,49	4,73	0,092
Juiz de Fora-MG	370	9,90 (9,25-10,60)	1,24	18,24 (16,29-21,28)	0,77	4,82	1,51	0,525
Votoporanga-SP	410	8,68 (7,22-11,08)	1,08	33,16 (22,26-65,03)	1,40	2,19	1,52	0,528
Aracaju-SE	370	10,98 (9,66-13,03)	1,37	31,92 (23,32-55,68)	1,34	2,74	2,69	0,260
Jacarezinho-PR	490	10,59 (9,67-11,72)	1,32	25,50 (20,90-34,56)	1,07	3,35	3,75	0,151
Maracaju-MS	370	8,87 (8,20-9,35)*	1,11	13,67 (12,72-15,37)	0,58	6,81	1,18	0,561
Rio Branco-AC	370	11,64 (11,00-12,40)*	1,45	20,29 (17,78-25,15)	0,85	5,31	2,88	0,236
São João-PE	370	10,10 (8,90-11,10)*	1,26	26,50 (20,19-50,13)	1,11	3,05	3,51	0,170
Sete Lagoas-MG	410	12,23 (9,86-17,18)	1,53	65,32 (37,55-179,31)	2,75	1,76	1,15	0,567

[a] Número de insetos.
[b] DL: dose letal (µg do óleo essencial/ mg do inseto), IC: intervalo de confiança a 95%.
[c] RT: Razão de toxicidade para as DL_{50} e DL_{90}.
[d] β=inclinação da curva.
* Para DL_{50}: indicam, pelo IC 95%, que houve aumento da toxicidade após 72 horas de exposição ao OE de *P. cablin*.

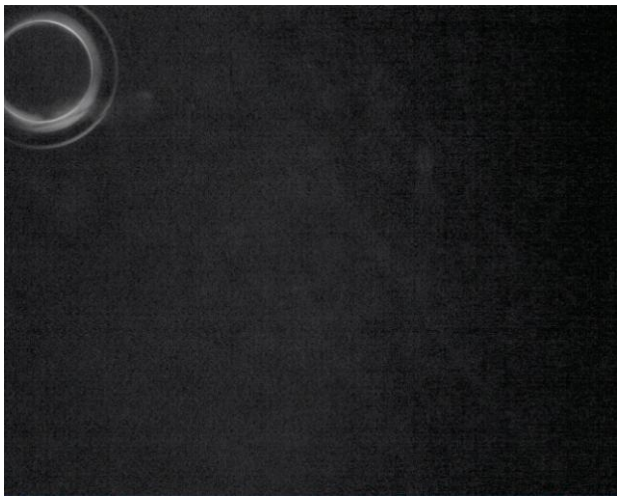

Imagem da nanoemulsão do OE de *P. cablin*
(*o objeto no canto superior esquerdo é uma bolha de ar)*

Tamanho das gotas	Índice de polidispersão	Condutividade elétrica
24,74 nm	0,6	25,5 μs cm^{-1}

Fig. 2. Imagem obtida por microscopia de luz polarizada, tamanho das gotas, índice de polidispersão e condutividade elétrica da microemulsão do OE de *Pogostemon cablin* a 14%.

Tabela 4

Toxicidade por contato (papel de filtro) e por fumigação do OE e da nanoemulsão (14%) de *Pogostemon cablin* sobre duas populações do gorgulho do milho *S. zeamais* após 48 e 72 horas de exposição.

(Contato em papel de filtro)

Tempo (horas)	OE de *P. cablin*						Nanoemulsão com OE de *P. cablin*					
	N [a]	CL_{50} (µl ml^{-1}) [b] (IC 95%)	CL_{90} (µl ml^{-1}) [b] (IC 95%)	β [c]	$\chi 2$	*p*	*N* [a]	CL_{50} (µl ml^{-1}) [b] (IC 95%)	CL_{90} (µl ml^{-1}) [b] (IC 95%)	β [c]	$\chi 2$	*p*
Viçosa-MG (população mais susceptível)												
48	330	0,34 (0,30-0,37)	0,74 (0,63-0,92)	3,7	1,44	0,509	290	2,13 (1,82-2,45)	7,86 (6,33-10,57)	2,3	0,14	0,932
72	330	0,30 (0,25-0,35)	1,01 (0,74-1,65)	2,4	2,46	0,293	290	1,28 (1,01-1,54)	4,89 (4,03-6,35)	2,2	3,99	0,132
Sete Lagoas-MG (população mais tolerante)												
48	330	0,43 (0,36-0,51)	1,39 (1,15-1,77)	2,5	0,92	0,637	370	8,84 (7,87-10,12)	28,47 (20,30-57,07)	2,5	0,88	0,651
72	330	0,37 (0,31-0,44)	1,04 (0,87-1,28)	2,9	0,08	0,956	370	6,37 (5,32-7,45)	30,15 (21,84-51,26)	1,9	3,06	0,220

(Fumigação)

Tempo (horas)	OE de *P. cablin*						Nanoemulsão com OE de *P. cablin*					
	N [a]	CL_{50} (µl l^{-1}) [d] (IC 95%)	CL_{90} (µl l^{-1}) [d] (IC 95%)	β [c]	$\chi 2$	*p*	*N* [a]	CL_{50} (µl l^{-1}) [d] (IC 95%)	CL_{90} (µl l^{-1}) [d] (IC 95%)	β [c]	$\chi 2$	*p*
Viçosa-MG (população mais susceptível)												
48	370	33,3 (28,6-38,3)	134,8 (93,5-278)	2,1	0,10	0,953	330	36,8 (35,1-38,7)	56,0 (51,5-62,8)	7,0	0,64	0,732
72	370	28,6 (25,4-31,8)	80,7 (65,7-111)	2,8	0,35	0,843	330	32,7 (31,1-34,2)	49,3 (45,5-55,4)	6,9	4,94	0,082
Sete Lagoas-MG (população mais tolerante)												
48	370	33,5 (26,7-40,5)	75,8 (57,4-123)	3,6	5,66	0,057	330	39,5 (36,9-42,6)	76,0 (67,0-90,4)	4,5	1,46	0,515
72	370	32,7 (31,6-33,9)	45,5 (42,7-50,3)	8,9	0,58	0,751	330	36,7 (34,7-38,8)	60,8 (55,2-69,8)	5,8	2,25	0,296

[a] Número de insetos.
[b] CL: concentração letal (µl do OE *P. cablin*/ ml do solvente), IC: intervalo de confiança a 95%.
[c] β=inclinação da curva.
[d] CL: concentração letal (µl do OE *P. cablin*/ l de ar), IC: intervalo de confiança a 95%.

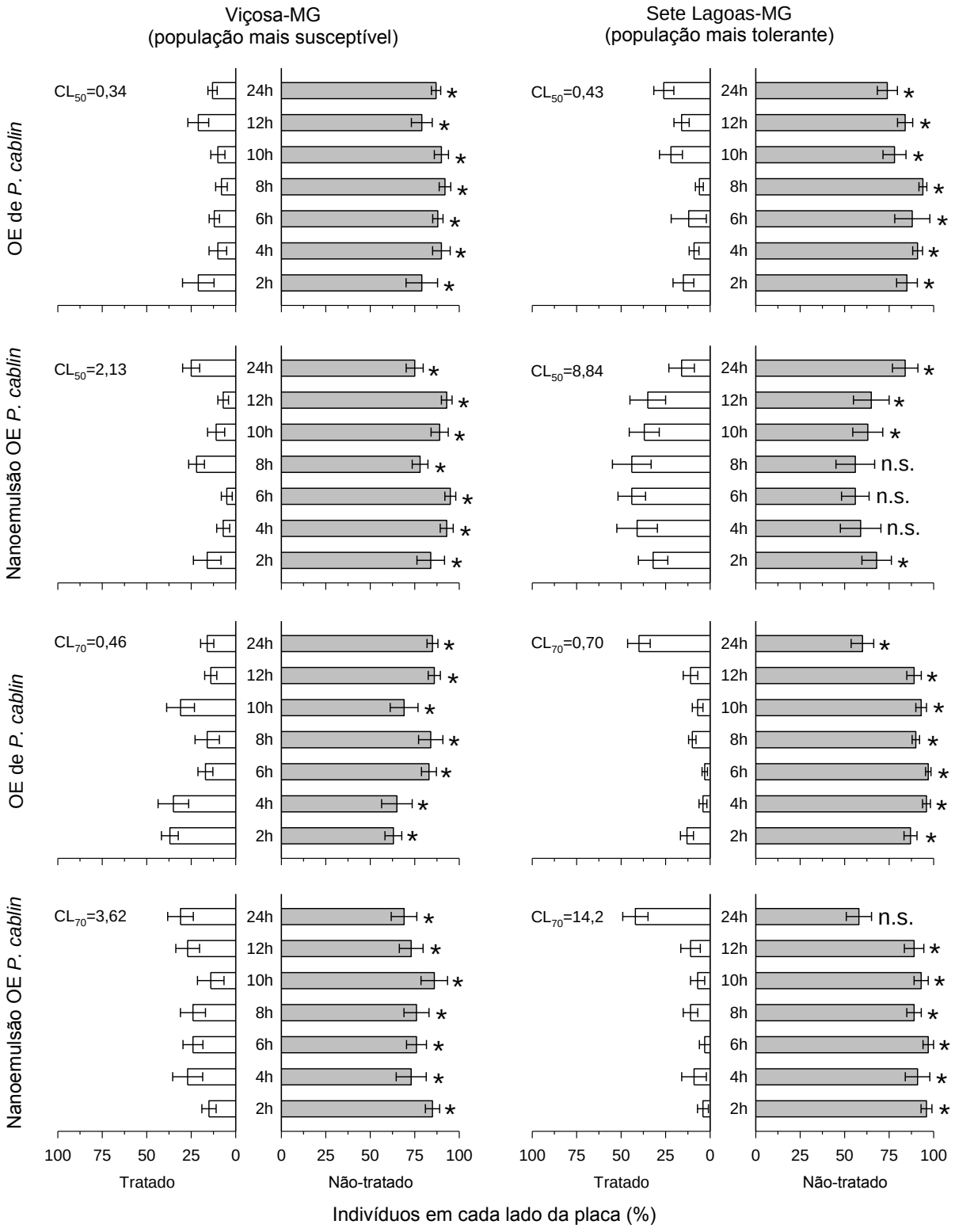

Fig. 3. Repelência do OE e da nanoemulsão (14%) de *Pogostemon cablin*, nas CL_{50} e CL_{70} (µl ml^{-1}), sobre duas populações do gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* após sete tempos de exposição. * Diferença significativa entre o número de indivíduos nas metades tratadas e não tratadas, utilizando o teste t pareado (P <0,05). n.s. = não significativo.

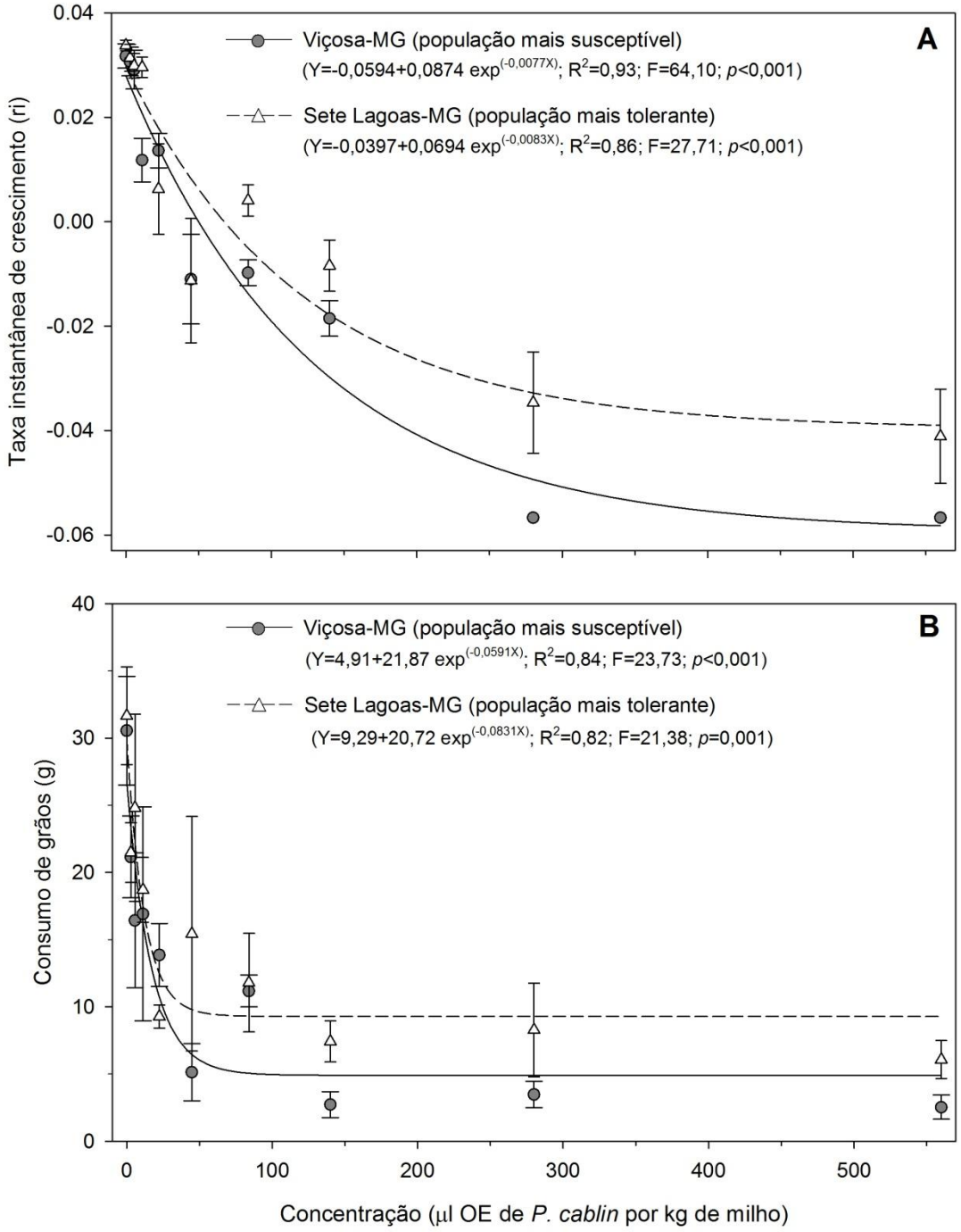

Fig.4. Taxa instantânea de crescimento (ri) (A) e consumo de grãos de milho (g) (B) de duas populações do gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* após 60 dias de exposição a nanoemulsão do OE de *P. cablin* (14%) em diferentes concentrações. I = erro padrão da média.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos nesta pesquisa indicam que o óleo essencial de *P. cablin* e sua nanoemulsão são potencialmente tóxicos para as populações de *S. zeamais* por diferentes vias de exposição (contato, fumigação e repelência). A nanoemulsão do OE de *P. cablin* mostrou significativa ação por fumigação e por contato causando mortalidade, repelência, inibição do crescimento populacional e do consumo alimentar de grãos. Pelo fato de serem repelentes para as populações de *S. zeamais*, estas substâncias apresentam potencial para controle direto e proteção da biomassa de grãos de milho contra infestação. Este trabalho mostra ainda, que o OE de *P. cablin* e sua nanoemulsão têm ampla ação sobre populações com diferentes níveis de susceptibilidade aos inseticidas convencionais. De forma interessante, as populações mais resistentes aos produtos amplamente utilizados no mercado, foram as mais susceptíveis ao OE e sua nanoemulsão. Assim, conclui-se que o OE de *P. cablin* e sua nanoemulsão consistem em alternativas viáveis ao uso de inseticidas tradicionais e ao manejo de populações resistentes, além de representarem fontes promissoras para novas moléculas inseticidas.