



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



**EFEITOS ABIÓTICOS NA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Lippia gracilis*: INFLUÊNCIA NA
MORTALIDADE E REPELÊNCIA DE *Sitophilus zeamais***

Felipe Hermínio Oliveira Souza

2013



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



Felipe Hermínio Oliveira Souza

EFEITOS ABIÓTICOS NA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia gracilis*: INFLUÊNCIA NA MORTALIDADE E REPELÊNCIA DE *Sitophilus zeamais*

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

Orientador

Prof. Dr. Leandro Bacci

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2013

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

S729e Souza, Felipe Hermínio Oliveira
Efeitos abióticos na composição do óleo essencial de *Lippia gracilis* : influência na mortalidade e repelência de *Sitophilus zeamais* / Felipe Hermínio Oliveira Souza ; orientador Leandro Bacci. – São Cristóvão, 2013.
50 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Sergipe, 2013.

1. *Lippia gracilis*. 2. Gorgulho do milho. 3. Carvacrol. 4. Adubação química. 5. Adubação orgânica. 6. Irrigação. 7. Repelência. I. Bacci, Leandro, orient. II. Título

CDU: 632.936:665.528.1

Felipe Hermínio Oliveira Souza

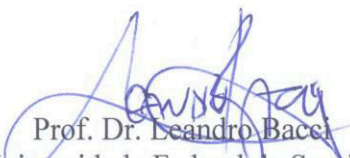
EFEITOS ABIÓTICOS NA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia gracilis*: INFLUÊNCIA NA MORTALIDADE E REPELÊNCIA DE *Sitophilus zeamais*

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

APROVADA: em 28 de fevereiro de 2013.


Prof. Dr. Vinícius Albano Araújo
UFV


Prof. Dra. Ana Paula Albano Araújo
UFS


Prof. Dr. Leandro Bacci
Universidade Federal de Sergipe
(Orientador)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

Ao cosmos, que na figura dos meus pais Antônio Fernando Vieira de Souza e Anita Hermínia
Oliveira Souza, família e amigos me proporcionaram o amor verdadeiro!

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, por cada vitória e reconhecimento alcançado.

Aos meus Pais, Antonio Fernando e Anita Hermínia, e minhas irmãs Flávia e Fernanda, pelo amor sincero e infinito que me deu a força para enfrentar os desafios colocados diante de mim.

À Bia, meu amor, que sempre presente transmitiu carinho e afeto, me guiando nos momentos de maior dificuldade.

Ao meu padrinho Luiz Neto, exemplo de humildade, que não negou esforços para me apoiar neste trabalho.

À Roseanne, Carlisson, Aracelle, Alexandre, Anne Caroline, Indira Morgana, Beatriz, e demais estagiários por dividirem comigo o sucesso alcançado.

À Abrãao Almeida que com seus conselhos e ajuda incondicional, provou que o afeto pode coexistir com o mundo acadêmico.

Aos meus colegas e amigos, Elisângela, Fabiana, Jefferson, Flávio Bianchini, Rogena, Elânia, Janaína, Richard e Íkaro por proporcionarem conforto durante esta jornada.

À Universidade Federal de Sergipe.

Ao Núcleo de Pós-Graduação em Agroecossistemas e aos Professores cujas aulas tanto acrescetaram á minha vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Leandro Bacci, pelo exemplo de sabedoria e pelos conhecimentos a mim cedidos ao longo do curso. Muito obrigado pela oportunidade de ter convivido e crescido em sua companhia, o senhor foi mais que um orientador, para mim o senhor foi um amigo. À Prof. Dr. Ana Araújo que sempre me ajudou, e me fez vislumbrar o caminho para a boa escrita científica.

À Prof. Dr. Ana Valéria, que sempre solícita proporcionou a realição desta pesquisa. Ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa semi-árido pelo óleo essencial de *Lippia gracilis*.

Ao Laboratório de Química da Universidade Federal de Sergipe, na figura do Prof. Dr. Péricles, que permitiu que a análise química pudesse ser realizada com precisão.

Por fim a todos aqueles que me ajudaram direta ou indiretamente na realização desta pesquisa.

BIOGRAFIA

Felipe Hermínio Oliveira Souza, filho de Antônio Fernando Vieira de Souza e Anita Hermínia Oliveira Souza, nasceu em Aracaju, em 22 de julho de 1987.

Em 2010, graduou-se em Engenharia Agroômica pela Universidade Federal de Sergipe, Aracaju-SE. Durante o período de graduação foi estagiário da Empresa Brasileira de Pesquisa de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA.

Em 2011, iniciou o curso de Mestrado em Agroecossistemas, na Universidade Federal de Sergipe (UFS) defendendo a dissertação em Fevereiro de 2013.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Manejo de pragas de grãos armazenados	3
2.2 Gorgulho do milho <i>Sitophilus zeamais</i>	4
2.3 Compostos botânicos no controle de pragas	5
2.4 Óleos essenciais	5
2.5 Óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i>	6
2.6 Fatores ambientais e agrônômicos influenciando na composição do óleo essencial	7
3. ARTIGO 1: Efeitos abióticos na composição do óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i> : influência na mortalidade e repelência de <i>Sitophilus zeamais</i>	10
3.1 Resumo	11
3.2 Abstract	12
3.3 Introdução	13
3.4 Material e Métodos	14
Material vegetal	14
Extração do OE e análise por GC-MS e CG-FID	15
Insetos	16
Aplicação tópica dos OEs de <i>L. gracilis</i> e seus monoterpenos	16
Fumigação dos OEs de <i>L. gracilis</i> e seus monoterpenos	17
Bioensaios de atração/repelência	18
Análises estatísticas	19
3.5 Resultados e Discussão.....	20
Constituintes dos OEs de <i>L. gracilis</i>	20
Aplicação tópica dos OEs de <i>L. gracilis</i> e seus monoterpenos	21
Fumigação dos OEs de <i>L. gracilis</i> e seus monoterpenos	22
Atração/repelência dos OEs de <i>L. gracilis</i> e seus monoterpenos	25
3.6 Conclusão	31
3.7 Referências	32
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
5. CONCLUSÃO GERAL	39

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1: Efeitos abióticos na composição do óleo essencial de *Lippia gracilis*: influência na mortalidade e repelência do *Sitophilus zeamais*.

Tabela 1. Composição química caracterizada por GC/MS e GC/FID dos óleos essenciais de plantas de *Lippia gracilis* cultivadas com diferentes práticas agrícolas.

Tabela 2. Tempo letal (TL₅₀ e TL₉₉) dos OEs de plantas *Lippia gracilis* cultivadas com diferentes práticas agrícolas e seus principais monoterpenos, expostos via fumigação sobre adultos de *Sitophilus zeamais*. Concentração = 339,5 µl l⁻¹.

Tabela 3. Toxicidade por fumigação (CL₅₀ e CL₉₉) dos OEs de plantas *Lippia gracilis* cultivadas com diferentes práticas agrícolas e seus principais monoterpenos sobre adultos de *Sitophilus zeamais* após 84 horas de exposição.

Tabela 4. Repelência dos OEs de *Lippia gracilis* provenientes de plantas cultivadas com diferentes práticas agrícolas e seus monoterpenos sobre adultos de *Sitophilus zeamais* após cinco tempos de exposição.

RESUMO

SOUZA, Felipe Hermínio Oliveira. **Efeitos abióticos na composição do óleo essencial de *Lippia gracilis*: influência na mortalidade e repelência de *Sitophilus zeamais***. São Cristóvão: UFS, 2013. 39p. (Dissertação – Mestrado em Agroecossistemas).*

Fatores abióticos podem interferir na produção de metabólitos secundários de plantas e consequentemente influenciar na bioatividade destes compostos sobre insetos-praga. Assim, neste trabalho objetivou-se avaliar a influência de diferentes práticas agrícolas (irrigação, adubação química e orgânica) na composição química do óleo essencial (OE) de *Lippia gracilis* e seus efeitos na mortalidade e repelência do gorgulho do milho *Sitophilus zeamais*. As composições químicas dos OEs das plantas de *L. gracilis* cultivadas sobre diferentes tratamentos foram analisadas usando CG-MS e CG-FID. As práticas de cultivo não afetaram significativamente a composição dos OEs de *L. gracilis*, o carvacrol foi o componente majoritário dos OEs nas diferentes práticas agrícolas, seguido pelo timol e ρ -cimeno. Estes três monoterpenos foram utilizados nos bioensaios posteriores. Pequenas variações na composição dos OEs resultaram em diferentes respostas biológicas de *S. zeamais*. Todos os OEs de *L. gracilis* aplicados topicamente mostraram baixa toxicidade sobre *S. zeamais* após 84 horas de exposição na dose 10 mg g^{-1} . Contudo, estes mesmos compostos foram altamente tóxicos a *S. zeamais* por fumigação. O tempo necessário para causar 50% de mortalidade desta praga foi em média 28,4 horas; variando de 17,3 a 40,8 horas entre os tratamentos. A ação tóxica do carvacrol, timol e do OEs de *L. gracilis* (ausência de irrigação/adubação mineral e 40 t ha^{-1} de adubação orgânica) foram as mais rápidas, $TL_{50}=18,3$. A magnitude da variação das CL_{50} e CL_{99} foram de 1,9 e 2,1 vezes. A concentração necessária para causar 50 e 99% de mortalidade desta praga foi em média 69 e $260 \mu\text{l l}^{-1}$, respectivamente. Considerando as CL_{50} e CL_{99} , os OEs de *L. gracilis* mais tóxicos foram obtidos de plantas cultivadas na ausência de adubação mineral e presença de adubação orgânica com 20, 40 e 60 t ha^{-1} (sem irrigação) e 40 e 60 t ha^{-1} (com irrigação). Grande parte da atividade dos OEs de *L. gracilis* deve-se ao composto majoritário carvacrol. Foram necessários apenas 27,2 e $92,2 \mu\text{l l}^{-1}$ para causar 50 e 99% de mortalidade à adultos de *S. zeamais*. A atividade tóxica deste monoterpeno foi de $TL_{50} = 17,3$ e $TL_{99} = 70,8$ horas. Já o timol e ρ -cimeno foram os compostos de menor toxicidade a adultos de *S. zeamais* ($CL_{50}= 4,4$ e 26,1 respectivamente). De forma geral, os OEs de *L. gracilis* e os monoterpenos utilizados nas menores concentrações (0,01 e 0,1% v/v) apresentaram efeito neutro (não significativo) ou atrativo (negativo e significativo) em todos os tempos analisados. Já na concentração 10% (v/v) quase todos os tratamentos foram repelentes a *S. zeamais* em qualquer tempo analisado (repelência $> 50\%$). Maiores índices de repelência (54-86%) foram observadas nos tratamentos irrigados com máxima adubação orgânica e concentração 1 e 10% (v/v). Assim, nossos resultados mostram o grande potencial do OE de *L. gracilis* e seu composto majoritário para o desenvolvimento de novos produtos e utilização em programas de manejo integrado de pragas de grãos armazenados.

Palavras-chave: Gorgulho do milho, carvacrol, adubação, irrigação, repelência.

* Comitê Orientador: Leandro Bacci – UFS (Orientador), Felipe Hermínio Oliveira Souza - UFS.

ABSTRACT

SOUZA, Felipe Hermínio Oliveira. **Abiotic effects on the composition of the essential oil of *Lippia gracilis*: influence on mortality and repellency of the *Sitophilus zeamais***. São Cristóvão: UFS, 2013. 39p. (Dissertation – Master Program in Agroecosystem).*

Abiotic factors may interfere in production of plant secondary metabolites and consequently influence the bioactivity of these compounds on insect pests. Thus, this study aimed to evaluate the influence of different agricultural practices (irrigation, mineral fertilizer and organic manure) in chemical composition of the essential oil (EO) of *Lippia gracilis* and its effects on the maize weevil *Sitophilus zeamais*. The chemical compositions of EO from plants of *L. gracilis* cultured on different treatments were analyzed using GC-MS and GC-FID. The carvacrol was the major component of EO in different agricultural practices followed by thymol and *p*-cymene. These three monoterpenes were used in subsequent bioassays. Cultivation practices did not significantly affect the composition of the OEs of *L. gracilis*. However, small variations in the composition of EOs resulted in different biological responses to *S. zeamais*. All EOs of *L. gracilis* and its main monoterpenes applied topically showed low toxicity on *S. zeamais* after 84 hours exposure at a dose 10 mg g⁻¹. However, these same compounds were highly toxic to *S. zeamais* by fumigation. The time required to cause 50% mortality of the pest was 28.4 hours on average, ranging from 17.3 to 40.8 hours between treatments. The toxic action of carvacrol, thymol and EOs of *L. gracilis* (no irrigation/fertilization mineral and 40 t ha⁻¹ organic fertilizer) were the fastest, LT₅₀=18,3. The magnitude of the variation of CL₅₀ and CL₉₉ were 1.9 and 2.1 times. The concentration needed to cause 50 to 99% mortality of the pest was on average 69 and 260 µl l⁻¹, respectively. Considering the LC₅₀ and LC₉₉, the more toxic OEs of *L. gracilis* were obtained from plants grown in the absence of mineral fertilizer and in the presence of organic manure with of 20, 40 and 60 t ha⁻¹ (no irrigation) and 40 and 60 t ha⁻¹ (with irrigation). Much of the activity of the EOs of *L. gracilis* is due to the major compound carvacrol. It took only 27.2 and 92.2 l µl l⁻¹ to cause 50% and 99 % mortality of adult *S. zeamais*. The toxic activity of this monoterpene was still one of the fastest (LT₅₀ = 17.3 and LT₉₉ = 70.8 hours). Already the thymol and *p*-cymene were compounds of low toxicity to adult *S. zeamais* (LC₅₀= 4,4 e 26,1 respectively). Generally, the EOs of *L. gracilis* and the monoterpenes applied at lower concentrations (0.01 and 0.1% v/v) showed a neutral effect (not significant) or attractive (negative and significant) in all periods analyzed. At concentration 10% (v/v) almost all treatments were repellents to *S. zeamais* at any time analyzed (repellence > 50%). Major indexes repellency (54-86%) were observed in treatments irrigated and with maximum organic manure, at concentrations of 1 and 10% (v/v). Thus, our results show the great potential of EO of *L. gracilis* and its major compound for the development of new products and programs for use in integrated pest management of stored grain.

Key-words: Maize weevil, carvacrol, fertilization, irrigation, repellency.

* Guidance Committee: Leandro Bacci – UFS (Orientador), Felipe Hermínio Oliveira Souza – UFS.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O ataque de insetos resulta em considerável redução do crescimento de plantas em sistemas cultivados e naturais. As perdas econômicas ocasionadas por insetos fitófagos consistem em danos causados diretamente na planta ou em seus produtos estocados, como é o caso dos cereais. Apesar do grande potencial dos insetos fitófagos em se alimentar de plantas, estes o fazem apenas em uma faixa restrita de plantas hospedeiras. Esta restrição deve-se ao fato de que plantas superiores possuem defesas químicas (ex. metabolismo secundário) que limitam a ação dos insetos herbívoros.

Os compostos defensivos dos vegetais superiores, apresentam grande importância nas relações ecológicas da planta, seja através de suas interações com outros organismos (ex. bióticas) ou com o ambiente (ex. fatores abióticos). Dentre as atividades dos compostos secundários das plantas destacam-se seu papel defensivo (ex. contra herbívoros, fitopatógenos e competidores), atrativo (ex. polinizadores, dispersores), além de sua proteção contra radiação ultravioleta. Uma vez que tais compostos podem restringir o uso das plantas pelos insetos, muitos estudos tem buscado avaliar o potencial de toxicidade destes para o controle de insetos praga.

Nos últimos anos, a busca por inseticidas naturais (ex. botânicos) tem se intensificado. Um dos principais fatores que motivam estudos por novas fontes inseticidas consiste nos enormes prejuízos econômicos, ambientais e sociais decorrentes da utilização dos pesticidas organossintéticos. O uso indiscriminado desses produtos tem resultado na contaminação do solo, da água e de animais.

O potencial de exploração de novas fontes de inseticidas botânicos é enorme no Brasil. Com mais de 55.000 espécies inventariadas, o país se destaca como a maior fonte de diversidade genética do mundo (SOUZA et al., 2010). Dentre os produtos de origem botânica, os óleos essenciais, característicos de plantas medicinais e aromáticas, tem-se destacado por serem altamente voláteis e de baixa persistência, o que pode resultar em menor contaminação do ambiente assim como de outros organismos que não sejam o alvo de controle. Diversos estudos tem avaliado a toxicidade dos óleos essenciais de plantas sobre diferentes organismos. Apesar de muitas plantas medicinais e aromáticas serem intensamente cultivadas devido às suas propriedades de interesse para o homem, ainda pouco se sabe a respeito do efeito das condições de cultivos destas plantas sobre a composição de seus óleos essenciais. Conhecer os fatores capazes de aperfeiçoar os processos de cultivos para produção de óleos essenciais de maior toxicidade e eficiência no controle de pragas pode ter grande importância econômica.

A planta aromática *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae), endêmica da vegetação semi-árida do Nordeste do Brasil (GOMES et al. 2011), destaca-se por sua atividade

antimicrobiana, antisséptica, larvicida e inseticida. Tais propriedades devem-se à composição do seu óleo essencial que possui como componentes majoritários o timol, carvacrol, *p*-cymeno, γ -terpineno, e β -cariofileno.

Assim, com o intuito de contribuir com formas alternativas de controle, neste trabalho *L. gracilis* foi produzida sobre diferentes combinações de regimes de cultivo (16 tratamentos com variações na adubação orgânica, mineral e irrigação). Foi verificado se tais fatores interferem na composição química e na toxicidade de seu óleo essencial contra *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). Este inseto é uma das principais pragas mundiais de grãos armazenados, mostrando elevada capacidade de destruição dos grãos. A composição química dos óleos essenciais de *L. gracilis*, cultivadas sobre diferentes tratamentos, foi analisada usando CG-MS e CG-FID. A toxicidade dos óleos para *S. zeamais* foi avaliada através de testes de aplicação tópica, fumigação e repelência. Nesta dissertação é apresentada uma revisão teórica sobre o assunto abordado, seguido pelo estudo principal apresentado na forma de artigo científico.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Manejo de pragas de grãos armazenados

Sementes e grãos representam a base da alimentação mundial. Cereais, oleaginosas e leguminosas representam 80% dos alimentos produzidos e ocupam cerca de 60 a 80% das áreas agrícolas cultivadas no mundo. Para chegar de forma utilizável ao consumidor final, mais de dois bilhões de toneladas destes alimentos precisam ser estocados (PIMENTELA et al., 2012; JAYAS, 2012, COX et al., 2012, COX et al., 2006). Este estoque é necessário porque: i) o local de consumo difere do local de produção; ii) o consumo é realizado ao longo do ano, enquanto a produção é sazonal (JAYAS, 2012). Locais de armazenamento impróprios forçam os produtores a vender seus produtos logo após a colheita, impedindo-os de esperar por melhores preços de safra. Assim, os grãos devem permanecer acondicionados de maneira adequada para preservar suas características pelo maior tempo possível, de forma a evitar ou diminuir danos econômicos.

Entre as principais causas de danos econômicos durante o armazenamento de grãos, destaca-se o ataque por insetos praga. No caso do milho, de 20 a 30% do que foi produzido em campo é perdido durante o armazenamento. As principais pragas de grãos armazenados são: *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), *Prostephanus truncatus* Horn (Coleoptera: Bostrichidae), *Sitotroga cerealella* Oliv. (Lepidoptera: Gelechiidae) e *Sitophilus oryzae* Linne (Coleoptera: Curculionidae) (TEFERA et al., 2011).

Além da depreciação dos grãos devido ao ataque direto destes insetos, à medida que suas populações crescem, a temperatura e umidade entre os grãos são aumentadas, favorecendo assim o desenvolvimento de fungos patogênicos e micotoxinas que apresentam efeitos deletérios aos consumidores (ABRAMSON et al., 2005). Portanto um silo adequado ao armazenamento de grãos deve apresentar um adequado monitoramento tanto dos fatores bióticos como abióticos (JAYAS, 2012).

A principal forma de controle das pragas de grãos armazenados é realizada através de agentes químicos através de fumigação. Entretanto o uso indiscriminado destes produtos levou à seleção de pragas resistentes, dificultando seu controle. No Brasil, as populações de *S. zeamais* são relatadas por apresentar resistência aos piretróides desde a década de 90, havendo também indícios de resistência aos organofostatos (BRAGA et al., 2011).

Novas formas de controle, visando mitigar os efeitos nocivos dos gorgulhos na produção de grãos vêm sendo pesquisadas. Dentre estas, atmosferas modificadas, ozonização, radiação ionizante, fungos, bactérias e compostos botânicos são alternativas economicamente viáveis e ambientalmente mais seguras que estão sendo adotadas em detrimento do uso

demasiado de pesticidas convencionais (TIWARI et al., 2010; OPPERT; MORGAN; KRAMER, 2011; HALLMAN, 2013).

2.2 Gorgulho do milho *S. zeamais*

Dentre as pragas que acometem os grãos de milho o gorgulho *S. zeamais* se destaca por ser um dos três insetos que mais causam danos econômicos (GUEYE et al., 2012). Estes organismos são caracterizados como praga primária, atacando os grãos ainda no local de cultivo, o que dificulta seu controle uma vez que podem contaminar silos e armazéns isentos de insetos praga (CHU et al., 2012). Populações não controladas se desenvolvem rapidamente podendo, em um período de seis meses, ocasionar perdas de até 40% (MEIKE et al., 1999; TAPONDJIEU et al., 2002; GUEYE et al., 2012).

Os adultos de *S. zeamais* possuem coloração marrom escuro e tamanho diminuto (2,5mm a 4mm de comprimento). Suas asas possuem quatro manchas marrom-avermelhadas (CHU et al., 2012). A cabeça do gorgulho do milho prolonga-se em um rostro que possui em sua extremidade o aparelho bucal. Larvas são do tipo curculioniforme e oriundas de ovoposição endofítica.

O controle usual para o gorgulho do milho é realizado através de inseticidas organo-sintéticos. Estes são aplicados na forma de pós ou pastilhas voláteis através de fumigação. A utilização descontrolada destes produtos tem mostrado efeitos indesejados, como resistência das populações de pragas, ressurgência populacional, contaminação do meio ambiente e doenças em seres humanos (CHU et al., 2012; GUEYE et al., 2012). A resistência das populações de *S. zeamais* aos piretróides, organofosfatos e outros inseticidas, tem dificultado seu manejo devido a crescente ineficiência destes produtos (BRAGA et al., 2011).

No entanto, nos últimos anos, o mercado consumidor tem apresentado maior exigência com relação aos produtos consumidos, buscando cada vez mais produtos que sejam isentos de inseticidas ou que apresentem resíduos em quantidades mínimas (CARVALHO et al., 2012). Assim, esta problemática decorrente do manejo tradicional de pragas tem desencadeado uma necessidade urgente em se produzir novos agentes de controle menos agressivos aos organismos vivos e ao meio ambiente (CORREA; SALGADO, 2011).

2.3. Compostos botânicos no controle de pragas

Nos últimos 50 anos inúmeros estudos vêm sendo realizados com milhares de plantas na busca por fontes alternativas para a produção de repelentes e inseticidas menos prejudiciais ao ambiente (NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010). As plantas produzem uma ampla variedade de compostos químicos oriundos da síntese de metabólitos secundários que possuem ação anti-herbivoria sendo, portanto, considerados inseticidas naturais ou

botânicos. Tais compostos foram selecionados ao longo do curso evolutivo como resposta à pressão de herbívora (DEQUECH et al., 2008) e atuam na defesa da planta por mecanismos de antibiose e antixenose (TAIZ; EDUARDO, 2009).

Uma grande vantagem da utilização dos inseticidas botânicos em relação aos inseticidas organossintéticos deve-se ao fato de apresentarem ação e degradação rápidas. Estas características conferem aos inseticidas botânicos: baixa a moderada toxicidade para mamíferos, maior seletividade biológica (ex. redução de contaminação de organismos não alvos) e baixa fitotoxicidade. Entretanto, alguns autores têm apontado como desvantagens: a necessidade de utilização de compostos sinergistas (em alguns casos), a baixa persistência no ambiente, escassez do recurso natural, ausência de controle de qualidade e a dificuldade de registro (CORREA; SALGADO, 2011). Por isso, mais pesquisas tem sido desenvolvidas com o intuito de mitigar estas limitações e permitir a inserção de produtos de melhor qualidade no mercado.

Os principais grupos de compostos oriundos do metabolismo secundário das plantas são os terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. Plantas aromáticas podem demonstrar atividade repelente ou atraente sobre insetos por possuírem grande diversidade de compostos voláteis. Estes compostos voláteis são formados por várias substâncias que se apresentam como componentes minoritários ou majoritários com atividade biológica (BAKKALI et al., 2008; KNAAK; FIUZA, 2010; VIEGAS JR, 2003). Assim, plantas aromáticas podem representar fontes para o manejo de insetos pragas (PICHERSKY; GERSHENZON, 2002; SIMAS et al., 2004). Dentre os produtos oriundos das plantas que tem se destacado em relação à atividade biológica sobre insetos, estão os óleos essenciais.

2.4. Óleos essenciais

Óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal, constituídos por hidrocarbonetos como monoterpenos, acompanhados por sesquiterpenos, fenilpropanóides, compostos oxigenados e aromáticos (VIEGAS JR., 2003). Já foram descobertos cerca de 3000 óleos essenciais. As principais famílias botânicas que apresentam esses compostos são: Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae e Piperaceae (KNAAK; FIUZA, 2010). Os óleos essenciais se encontram em estruturas secretoras como células parenquimáticas diferenciadas, canais, pelos glandulares e cavidades.

Os óleos essenciais produzidos pelas plantas atuam diretamente nos processos ecológicos, seja protegendo as plantas de interações antagônicas (ex. possuem ação antibacteriana, antifúngica, repelente, inseticida) ou facilitando suas interações positivas (ex.

atração de insetos dispersores de pólenes e sementes) (BAKKALI et al., 2008). Os óleos essenciais podem atuar sobre os insetos, causando redução do número de ovos, repelência, assim como inibição da oviposição, do desenvolvimento e da alimentação (KNAAK; FIUZA, 2010). As toxinas botânicas podem penetrar nos insetos pelas vias respiratórias, por ingestão e contato (KNAAK; FIUZA, 2010), neste último caso sendo absorvidos pela quitina e exoesqueleto (CORREA; SALGADO, 2011). Os inseticidas botânicos podem ainda atuar sobre o sistema nervoso central do inseto, apresentando ação tóxica, e conseqüentemente a morte. Vários terpenos como α -pineno, β -pineno, 3-careno, limoneno, mirceno, α -terpineno e canfeno já mostraram toxicidade sobre vários insetos (NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010). Os monoterpenos cineol, eugenol, limoneno, citronelol, citronelal e timol são exemplos de compostos isolados dos óleos essenciais de plantas que apresentam reconhecida atividade repelente aos mosquitos (VIEGAS JR., 2003).

Além de serem estudados devido ao seu potencial no controle de insetos e outros organismos, óleos essenciais de plantas também apresentam importância econômica para diversos setores, como: perfumaria, indústria química e alimentos, fabricação de medicamentos e produtos de limpeza (BIZZO; HOVELL; RESENDE, 2009).

A bioatividade dos óleos essenciais normalmente é decorrente de seus compostos majoritários. No entanto, a bioatividade também pode ser influenciada pelos compostos minoritários (JIANG et al., 2009). As relações entre os compostos majoritários e minoritários são complexas e podem afetar as características do óleo essencial, bem como seus efeitos no inseto alvo.

2.5. Óleo essencial de *Lippia gracilis*

O gênero *Lippia* (Verbenaceae) abrange 250 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores, distribuídas pelas Américas subtropical, tropical e África (MOLDENKE, 1965; JANSEN-JACOBS, 1988). Estas plantas apresentam grande importância econômica, na medicina e agricultura. No Brasil existem cerca de 120 espécies de *Lippia*, muitas delas ainda não estudadas quanto à bioatividade de seus compostos (BEZERRA et al., 1981).

Algumas espécies desse gênero possuem compostos conhecidos por suas propriedades antivirais e tumorais, decorrentes de seus componentes majoritários: timol, carvacrol, 1,8 cineol, humulene, and p-cimeno (SILVA et al., 2008). Assim, existe a possibilidade destas plantas apresentarem atividade de interesse para o controle de insetos e outras pragas (CAVALCANTI et al., 2010).

L. gracilis é um arbusto decíduo que pode atingir 2 metros de altura. Por se encontrar nas regiões semiáridas do nordeste brasileiro, esta planta cresce em solos pobres e bem

drenados. As flores desta planta são aromáticas e medicinais, ricas em óleo essencial que possui entre seus componentes majoritários o timol e o carvacrol, ambos conhecidos por suas atividades antimicrobianas (PESSOA et al., 2005).

2.6. Fatores ambientais e agronômicos influenciando na composição do óleo essencial

Fatores climáticos são de extrema importância para a produtividade dos ecossistemas e dos sistemas cultivados. Mudanças na intensidade de precipitação, na temperatura e na radiação ultravioleta podem afetar seriamente sistemas agrícolas que não possuem níveis de tecnologia suficientes para mitigar as perdas causadas por tais variações.

A radiação solar que atinge a Terra abrange a radiação direta e a difusa, incluindo a radiação ultravioleta-B (UV-B: 280-315 nm), ultravioleta-A (UV-A: 315-400 nm) e a infravermelha (IR >700 nm) (BEHN et al., 2010). No entanto, a faixa de radiação que pode ser assimilada pelas plantas, chamada de radiação fotosinteticamente ativa, abrange os comprimentos de onda na faixa de 400 a 700 nm.

A camada de ozônio limita parte da radiação ultravioleta (UV-B) que atinge a biosfera. O lançamento na atmosfera de produtos antagonistas à camada de ozônio (ex. clorofluorcarbonos) tem resultado em seu estreitamento. Tal ação pode ter consequências negativas aos seres vivos, uma vez que a camada de ozônio protege os organismos da radiação, evitando danos no DNA, RNA e proteínas. Pesquisas recentes têm demonstrado relações entre a concentração de compostos voláteis e sua possível interação com a radiação UV. Além de possuírem papel fundamental na capacidade reprodutiva das plantas, uma vez que as protegem contra patógenos e herbívoros; os compostos do metabolismo secundário também participam da absorção de luz UV evitando os danos foliares causados pelo excesso de luz. As variações na intensidade de radiação podem interferir na produção dos compostos do metabolismo secundário (fenilpropanóides e terpenóides) alterando os perfis químicos dos voláteis nas plantas aromáticas (KUMARI et al., 2009).

Alguns trabalhos tem mostrado que compostos flavonóides provenientes do metabolismo secundário podem proteger as plantas da radiação UV-B (LI et al., 1993). A *Mentha spicata* do quimiotipo rico em carvona e dihidrocarvona apresentou maiores teores de óleo essencial com o aumento da radiação ultravioleta. Este aumento na radiação foi equivalente a 15% de esgotamento da camada de ozônio para a região de Patras (38,3°N, 29,1°E) Grécia (KAROUSOU et al., 1998). Estudos em casa de vegetação com *Ocimum basilicum* L. mostrou que quando cultivadas sobre luz total (ex. sem sombra), os índices de linalool e eugenol responsáveis pelo aroma e sabor do manjeriço foram aumentados (CHANG; ALDERSON; WRIGHT, 2008). Para *Acorus calamus* L. a adição de índices

suplementares de UV-B levou a um aumento significativo nas concentrações de p-cimeno e carvavrol em seu óleo essencial. Por outro lado, houve decréscimos no seu componente majoritário (beta-asarone) (KUMARI et al., 2009).

Espécies adaptadas às regiões de alta temperatura e altos índices de radiação solar podem reduzir a produção de metabólitos secundários caso venham a ser cultivadas em locais com menos temperatura e radiação UV-B. Sendo assim, espera-se que *L. gracilis* L., espécie vegetal nativa do semiárido, produza óleo essencial de melhor qualidade biológica quando cultivada em condições semelhantes às encontradas em sua região original de distribuição geográfica.

Toda cadeia de reações que determina os mecanismos de defesa química das plantas é oriunda de seu metabolismo secundário. Sendo assim, os fatores que podem aperfeiçoar este metabolismo devem ser estudados e aplicados. Dentre os fatores abióticos que influenciam na produção dos metabólitos secundários o stress hídrico é considerado por muitos fisiologistas e bioquímicos como um fator determinante (CHARLES; JOLY; SIMON, 1994; BETTAIEB et al., 2009). Alterações na disponibilidade de água no solo podem resultar em complexas respostas metabólicas por parte das plantas. Sobre stress hídrico, as plantas *O. basilicum* L. e *O. americanum* L. tiveram aumento na concentração de seus constituintes majoritários, no teor de prolina e no total de carboidratos (KHALID, 2006). Estudo semelhante com *O. basilicum* mostrou que o número de constituintes do óleo essencial aumentou com a intensificação do stress hídrico (EKREN, 2012). O stress hídrico também teve efeito positivo na concentração de capsaicinoides fenólicos da pimenta *Capsicum annuum* L. var. *annuum* e para o rendimento do óleo essencial de citronela *Cymbopogon winterianus* Jowitt (ESTRADA et al., 1999; FATIMA; FAROOQI; SRIKANT, 2000; PETROPOULOS et. al, 2008).

A irrigação, por sua vez, também pode interferir nas características de salinidade a qual a planta está sujeita, influenciando assim na composição química de plantas aromáticas. Sobre aumento das concentrações de NaCl as plantas de coentro *Coriandrum sativum* L. mostraram maiores teores de seus compostos majoritários (linalool and cânfora) (NEFFATI et al., 2011).

As propriedades físico-químicas do solo são outros fatores que também influenciam a produção de aleloquímicos. Doses de magnésio e outros micronutrientes determinaram aumentos significativos na altura, no número de folhas e no rendimento do óleo essencial da palmarosa *Cymbopogon martinii* (RAO, 2011). Além da adubação mineral, a adubação orgânica também tem se mostrado promissora para a produção de óleos essenciais, uma vez que aumenta a disponibilidade de micronutrientes disponíveis para a planta. O rendimento do óleo essencial de *Origanum marjorana* L. foi maior com mais altos teores de adubação

orgânica e mineral (EDRIS; SHALABY; FADEL, 2003). Já para *Cymbopogon martinii* a adubação orgânica (15 t/ha por ano) aumento em 10,3% o rendimento de óleo essencial, enquanto para adubação mineral nitrogenada (80 kg/ha ano) o rendimento foi 60.3% maior do que nos tratamentos não adubados.

Desta forma, estudos que visem o entendimento dos fatores de cultivo responsáveis pelo incremento da produção de óleos essenciais de plantas podem ser de grande utilidade, tendo em vista o amplo espectro de utilização destes produtos. Assim, com o intuito de analisar se diferentes formas de cultivo que possam produzir óleos essenciais com maior toxicidade, neste trabalho analisamos o potencial inseticida do óleo essencial de *L. gracilis* sobre o gorguho-do-milho *S. zeamais*.

3. ARTIGO

Será submetido para: Journal of Agricultural and Food Chemistry

Efeitos Abióticos na Composição do Óleo Essencial de *Lippia gracilis*: Influência na Mortalidade e Repelência de *Sitophilus zeamais*

RESUMO

Plantas de *Lippia gracilis* foram cultivadas em diferentes regimes de irrigação, adubação química e orgânica a fim de avaliar a influência desses fatores sobre a composição e bioatividade de seus óleos essenciais (OEs) sobre *Sitophilus zeamais*. O carvacrol foi o componente majoritário, seguido por timol e *p*-cimeno. Todos os OEs de *L. gracilis* e o carvacrol foram altamente tóxicos a *S. zeamais* por fumigação. As concentrações médias dos OEs e do carvacrol necessárias para causar 50% de mortalidade foram 69 e 27 $\mu\text{l l}^{-1}$, respectivamente. Os OEs de *L. gracilis* mais tóxicos foram obtidos de plantas cultivadas na ausência de adubação mineral e presença de adubação orgânica com 20, 40 e 60 t ha^{-1} (sem irrigação) e 40 e 60 t ha^{-1} (com irrigação). Os OEs de *L. gracilis* e o carvacrol foram ainda repelentes a adultos de *S. zeamais*. Assim, nossos resultados mostram o grande potencial do OE de *L. gracilis* e seu composto majoritário para o desenvolvimento de novos produtos e utilização em programas de manejo integrado de pragas de grãos armazenados.

PALAVRAS-CHAVE: *Lippia gracilis*, gorgulho do milho, carvacrol, adubação, irrigação, repelência.

ABSTRACT

Lippia gracilis plants were grown under different irrigation regimes, chemical and organic fertilization to assess the influence of these factors on the composition and bioactivity of essential oils (EO) on *Sitophilus zeamais*. The carvacrol was the major component, followed by thymol and *p*-cymene. All EOs of *L. gracilis* and carvacrol were highly toxic to *S. zeamais* by fumigation. The mean concentration of EOs and carvacrol required to cause 50% mortality were 69 and 27 $\mu\text{l l}^{-1}$. The most toxic EOs of *L. gracilis* were obtained from plants grown in the absence of mineral fertilizer and organic manure with the presence of 20, 40 and 60 t ha^{-1} (no irrigation) and 40 and 60 t ha^{-1} (with irrigation). The EOs of *L. gracilis* and carvacrol were even repellent to adults *S. zeamais*. Thus, our results show the great potential of EO *L. gracilis* and its major compound for the development of new products and programs for use in integrated pest management of stored grain.

KEYWORDS: *Lippia gracilis*, maize weevil, carvacrol, fertilization, irrigation, repellency.

INTRODUÇÃO

Plantas superiores apresentam uma ampla diversidade de compostos provenientes de seu metabolismo secundário. Estes compostos selecionados ao longo do curso evolutivo são conhecidos por suas funções ecológicas com potencial defensivo (ex. contra herbívoros, fitopatógenos e competidores), atrativo (ex. polinizadores, dispersores), dentre outros. A produção quantitativa e qualitativa desses compostos pode variar devido a uma ampla gama de fatores.¹⁻⁴ Apesar da longa história evolutiva entre insetos e plantas, a maioria dos insetos fitófagos restringe-se à seleção de poucas espécies hospedeiras. Isto pode ser explicado pela limitada capacidade de cada espécie de insetos de processar e tolerar a grande variabilidade de metabólitos secundários produzidos pelas plantas.⁵ Assim, os produtos de origem vegetal tem sido alvo de grande interesse no controle de insetos pragas.

O controle convencional de insetos, baseado em produtos organosintéticos, tem sido responsável por uma série de problemas ambientais, como contaminação de áreas naturais, toxicidade a humanos e animais, e indução de resistência de pragas. Inseticidas botânicos além de serem relativamente pouco persistentes no ambiente, ainda possuem variados mecanismos de ação e, portanto possivelmente podem ser mais eficiente no controle de pragas.⁶ As regiões tropicais e neotropicais abrangem a maior diversidade de plantas do planeta. No entanto, apesar da elevada riqueza de plantas nos ecossistemas brasileiros, pouco se conhece sobre a constituição química destas espécies e seus potenciais de utilização no manejo de pragas.

Dentre a rica flora da América do Sul e Central, o gênero *Lippia* (Verbenaceae) engloba aproximadamente 200 espécimes de ervas, arbustos e pequenas árvores. A planta aromática *L. gracilis* Schauer, presente na vegetação semi-árida do Nordeste do Brasil⁷ destaca-se por sua atividade antimicrobiana, antisséptica, larvicida e inseticida. Tais propriedades devem-se à composição do seu óleo essencial (OE) que possui como os principais componentes o timol, carvacrol, *p*-cymeno, γ -terpineno, e β -cariofileno. Os OEs são formados por uma mistura de

compostos que se apresentam em altas e baixas concentrações.⁸ Por serem substâncias de baixo peso molecular, OEs são altamente voláteis, o que reduz sua persistência e consequente toxicidade ao ambiente e aos organismos não alvos.^{8,9}

A composição do OE das plantas e sua bioatividade podem variar de acordo com fatores bióticos e abióticos. Disponibilidade de água^{10,11} e de nutrientes^{12,13}, época de plantio³ e de colheita; estágio fenológico¹⁴, fatores climáticos e ambientais¹⁵ são capazes de alterar a composição dos compostos secundários das plantas. Desta forma, tais fatores poderiam interferir no efeito inseticida dos OEs por meio de interações de sinergismo, aditismo, antagonismo e potenciação entre seus componentes majoritários e minoritários.

Neste trabalho avaliamos o efeito de fatores abióticos sobre a composição e bioatividade do OE de *L. gracilis* sobre *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Este inseto é uma das principais pragas de grãos armazenados no mundo. Os OEs provenientes de plantas cultivadas sobre diferentes regimes abióticos e os principais monoterpenos do OE de *L. gracilis* foram utilizados para avaliar a toxicidade sobre *S. zeamais*, por meio de aplicação tópica, fumigação e repelência.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal. O cultivo de *L. gracilis* foi instalado no Campo Experimental de Bebedouro, pertencente a Embrapa Semiárido, localizado no município de Petrolina-PE, Brasil (376m de altitude; 09°23'35''S e 40°30'27''W). Mudas de *L. gracilis* foram produzidas a partir do enraizamento de estacas coletadas em plantas provenientes de áreas naturais de Caatinga da região.

O plantio das mudas foi conduzido em julho de 2011 no período matutino em canteiros previamente preparados (1,5 × 1,0 m), com espaçamento de 0,5 m entre plantas e 1,0 m entre linhas. Os tratamentos consistiram em diferentes doses de adubação orgânica [esterco

ovino/caprino (1:1) curtido: 0, 20, 40 e 60 t ha⁻¹]; adubação mineral [ausência e presença: 0,6 t ha⁻¹ de NPK (15-9-20)] e irrigação por gotejamento (ausência e presença: 5,33 mm dia⁻¹). O experimento consistiu em um fatorial completo, totalizando 16 tratamentos.

O delineamento experimental foi realizado em blocos ao acaso, com três repetições/parcela. Cada parcela consistiu em três plantas. As plantas foram colhidas após 120 dias de cultivo, no período matutino para a extração dos OEs. As plantas da bordadura foram descartadas.

Extração do OE e análise por GC-MS e CG-FID. Folhas de *L. gracilis* foram secas a 40 ± 1°C por quatro dias em estufa de secagem (Marconi MA 037). O OE foi obtido através da hidrodestilação do pó das folhas, em aparelho do tipo Clevenger. Posteriormente, o óleo foi separado da fase aquosa e mantido em freezer até sua utilização.

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

Os dados de CG-EM e CG-DIC foram simultaneamente adquiridos empregando um sistema de separação de detector; a razão de separação de escoamento foi de 4:1 (EM: FID). Um tubo restritor de 0,62 m x 0,15 milímetros d.i. (coluna capilar) foi usado para ligar o divisor para o detector do EM; um tubo restritor de 0,74 m x 0,22 mm d.i. foi usado para ligar

o divisor para o detector do DIC. A temperatura do injetor foi de 250 °C e a temperatura da fonte de íons foi de 200°C. Os íons foram gerados à 70 eV; a uma velocidade de varredura de 0,3 fragmentos (scans) s⁻¹ detectados no intervalo de 40-350 Da. A temperatura do DIC foi ajustada para 250 °C, e os suprimentos de gás para o DIC foram ar sintético, hidrogênio, hélio em taxas de fluxo de 30, 300 e 30 ml min⁻¹, respectivamente. A quantificação de cada constituinte foi estimada por normalização área do pico gerado no DIC-(%). As concentrações dos compostos foram calculadas a partir das áreas dos picos de CG e foram dispostos por ordem de eluição do CG.

A identificação dos constituintes foi realizada com base na comparação dos índices de retenção da literatura.¹⁶ Para o índice de retenção foi utilizando a equação de Van den Dool e Kratz¹⁷ em relação a uma série homóloga de n-alcanos (nC₉-nC₁₈). Foram utilizadas três bibliotecas do equipamento WILEY8, NIST107 e NIST21 que permite a comparação dos dados dos espectros com aqueles constantes das bibliotecas utilizando um índice de similaridade de 80%.

Os três constituintes em maior proporção nos OEs dos *L. gracilis* (carvacrol, timol e p-cimeno) foram adquiridos da empresa SIGMA-ALDRICH e utilizados em bioensaios posteriores.

Insetos. Espécimes de *S. zeamais* foram obtidos do município de Aracaju-SE, Brasil. Insetos foram mantidos na ausência de luz, em potes plásticos (25 cm de altura; 12 cm de diâmetro) preenchidos com milho, na Clínica Fitossanitária da Universidade Federal de Sergipe (UFS), município de São Cristovão, estado de Sergipe. Os grãos de milho foram previamente lavados e matindos em freezer (-10°C) por quinze dias, a fim de eliminar possíveis resíduos de inseticidas e organismos presentes nos mesmos.

Aplicação tópica dos OEs de *L. gracilis* e seus monoterpenos. A toxicidade dos 16 OEs de *L. gracilis* e dos três monoterpenos principais foi avaliada via aplicação tópica. Para isso, cada unidade experimental foi composta por uma placa de Petri (60 x 15 mm) contendo 10 adultos não sexados de *S. zeamais*. O fundo das placas foi coberto com discos de papel filtro (Unifil, cod. 501.009). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições.

Na região protorácica de cada indivíduo foi aplicada a quantidade de 1 µl de cada OE e monoterpeno nas doses de 0,1; 1 e 10 µg mg⁻¹ utilizando-se uma micropipeta Hamilton™ de 10 µl. A massa média de um indivíduo de *S. zeamais* foi obtida por medição da massa de dez insetos em balança analítica. Todas as doses foram preparadas através da diluição dos OEs e monoterpenos em acetona. O controle foi tratado apenas com 1 µl de acetona. Testes preliminares mostraram que a aplicação tópica de acetona não interfere na sobrevivência dos insetos.

As placas contendo os insetos tratados foram cobertas com filme plástico e acondicionadas em estufa tipo B.O.D., à temperatura de 25°C ± 1°C e umidade relativa >70%. A mortalidade foi avaliada após 4, 12, 24, 36, 48, 60, 72 e 84 horas da montagem dos bioensaios. Foram considerados mortos os indivíduos que não apresentavam movimentos das pernas e antenas.

Fumigação dos OEs de *L. gracilis* e seus monoterpenos. A toxicidade dos 16 OEs de *L. gracilis* e dos três monoterpenos principais foi avaliada via fumigação. Cada unidade experimental foi composta por um pote de acrílico (volume de 22,089 cm³) contendo 10 adultos não sexados de *S. zeamais*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições.¹⁸

Para volatilização dos compostos no interior dos potes os OEs e os monoterpenos foram aplicados (10 µl de solução) em papel filtro (2 cm²) (Unifil, 80g) que foram colocados na

parte interna da tampa do pote. Papel alumínio foi utilizado para impedir o contato da solução aplicada com a tampa. Em seguida a tampa foi coberta com tecido organza para impedir o contato dos insetos com o papel filtro tratado e o pote foi fechado hermeticamente com filme de PVC.

Inicialmente os OEs de *L. gracilis* e os monoterpenos foram diluídos em acetona nas concentrações: 56,59; 84,88; 94,16; 113,18; 132,19; 169,77; 188,33; 207,34; 226,35; 263,93; 282,94; 339,53 $\mu\text{l l}^{-1}$. Bioensaios posteriores foram realizados com concentrações que variaram de 0,45 a 2263,5 $\mu\text{l l}^{-1}$ para a determinação das curvas de concentração-mortalidade. No controle utilizou-se apenas acetona.

Os potes foram virados 180° e mantidos nesta posição para permitir a saturação e homogeneização do vapor dos OEs e dos monoterpenos no interior dos mesmos. Em seguida os potes foram acondicionados em estufa tipo B.O.D., à temperatura de 25°C $\pm$ 1°C e umidade relativa >70%. A mortalidade foi avaliada após 4, 12, 24, 36, 48, 60, 72 e 84 horas da montagem dos bioensaios. Durante cada avaliação os potes foram cuidadosamente girados para permitir a homogeneização do ar. Foram considerados mortos os indivíduos que não apresentavam movimentos das pernas e antenas. Estes dados foi possível obter as curvas de tempo-mortalidade e concentração-mortalidade de *S. zeamais* expostos aos 16 OEs de *L. gracilis* e aos três monoterpenos.

Bioensaios de atração/repelência. Para o bioensaio de atração/repelência foram utilizados os três principais monoterpenos e os OEs de *L. gracilis* que apresentaram as maiores toxicidades pelo bioensaio de fumigação (menores CL₅₀ e CL₉₉).

Para avaliação da atração/repelência, cada unidade experimental foi composta por uma placa de Petri (60 x 15 mm) contendo 10 adultos não sexados de *S. zeamais*. O fundo das placas foi coberto com discos de papel filtro (Unifil, cod. 501.009) divididas em metade

tratada e metade não tratada (acetona). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dez repetições.

O papel filtro foi dividido ao meio, sendo cada metade tratada separadamente com concentrações de 0,01; 0,1; 1 e 10 % (v/v) dos tratamentos. Após a evaporação do solvente, as duas metades foram coladas na placa de Petri por meio de uma fita adesiva dupla face afixada no centro da mesma. As avaliações foram realizadas 2, 4, 6, 8 e 10 horas após a aplicação dos tratamentos. Foram registrados os números de indivíduos presentes em cada lado da placa (área tratada e não-tratada).

Análises estatísticas. Análise de variância foi realizada para detectar diferenças na concentração dos OEs em função do composto, da prática agrícola e da interação composto $\times$ prática agrícola. Diferenças no rendimento dos OEs também foram verificadas por meio de análise de variância seguida pelo teste de Scott-Knott a $P < 0,05$.

Nos bioensaios de aplicação tópica foram determinadas as médias de mortalidade causada para cada tratamento.

Os resultados de mortalidade por fumigação foram corrigidos em relação à mortalidade ocorrida na testemunha usando-se a fórmula de Abbott. Análises de Próbit foram realizadas para determinar as curvas de tempo- e concentração-mortalidade dos OEs de *L. gracilis* e dos monoterpenos. Foram consideradas curvas com probabilidade de aceitação da hipótese de nulidade (de que os dados possuem distribuição de Próbit) pelo teste $\chi^2 > 0,05$. Por meio destas curvas foram estimados os tempos letais (TL_{50} e TL_{99}) e as concentrações letais (CL_{50} e CL_{99}) para causar mortalidade de 50 e 99% da população de *S. zeamais*. Em todos os casos foram determinados os intervalos de confiança a 95% de probabilidade. As TLs e CLs foram comparadas pelo critério dos intervalos de confiança (IC_{95}).

Somente os OEs com maiores toxicidades e os monoterpenos tiveram seu efeito repelente estudado. Para analisar se os OEs e os monoterpenos apresentaram atividade de

repelência/atração sobre *S. zeamais*, foi calculado o índice de distribuição entre as áreas tratada e controle das placas. O índice foi calculado através da fórmula: $ID = [(C - T) / (C + T)] * 100$. Onde: C é o número de insetos na área controle, e Testemunha o número de insetos na área tratada. Em todos os casos, resultados com valores positivos dos índices indicam repelência enquanto resultados negativos expressam atração. Os dados foram submetidos à ANOVA, seguida por teste t pareado para verificar diferenças entre o lado tratado e o não tratado usando o software SAS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Constituintes dos OEs de *L. gracilis*. A Tabela 1 apresenta a composição dos OEs de *L. gracilis* sobre diferentes regimes de cultivo agrícola. O carvacrol ($76,16 \pm 0,32\%$) foi o componente majoritário dos OEs nas diferentes práticas agrícolas, seguido pelo timol ($6,98 \pm 0,36\%$) e *p*-cimeno ($2,55 \pm 0,10\%$). Foram identificados, em média cerca de 97% dos constituintes dos OEs, sendo a maioria (87%) representada por monoterpenos. Outros acessos de *L. gracilis* apresentaram os mesmos compostos majoritários em concentrações semelhantes ao encontrado no presente trabalho.¹⁹

Alguns estudos têm demonstrado que a disponibilidade de água e nutrientes influencia na composição dos OEs das plantas. A concentração de carvacrol no OE de *Satureja hortensis* L. (Lamiaceae) aumenta com a intensificação do stress hídrico.²⁰ Irrigação e adubação orgânica aumentaram a concentração de aldeído cumínico e *p*-cimeno e reduziram β -pinene, γ -terpineno e α -pineno no OE de *Cuminum cyminum* L. (Apiaceae).²¹ Contudo, este padrão não foi observado em nosso trabalho já que não houve diferença na concentração considerando-se cada composto em relação às práticas agrícolas ($F_{15,899} = 0,44$; $P = 0,968$). Foram detectadas diferenças dos OEs entre a concentração dos diferentes compostos

($F_{28;899}=104829$; $P<0,001$) e na interação tipo de composto $\times$ prática agrícola ($F_{420;899}=15,68$; $P<0,001$).

Dessa forma, as práticas de cultivo não afetaram significativamente a composição dos OEs de *L. gracilis*, o que demonstra a rusticidade desta planta às variações de disponibilidade de água e nutrientes. Isto indica que o cultivo de *L. gracilis* pode ser realizado com pouco investimento e com menor nível tecnológico visando à homogeneidade quali- e quantitativa de seus constituintes, contudo, pequenas variações na composição dos OEs podem resultar em diferentes respostas biológicas dos insetos devido à complexa influência mútua entre eles, que pode resultar em interações de aditismo, sinergismo, antagonismo e potenciação.

Outro fator importante é o rendimento do OEs que foi significativamente afetado pelas práticas de cultivo ($F_{15;32}=5,20$; $P<0,001$). O rendimento do OE de *L. gracilis* foi maior quando a planta foi cultivada com adubação orgânica nas doses 20 e 40 t ha⁻¹ (sem irrigação) e 20, 40 e 60 t ha⁻¹ (com irrigação) (Tabela 1).

Aplicação tópica dos OEs de *L. gracilis* e seus monoterpenos. Todos os OEs de *L. gracilis* aplicados topicamente mostraram baixa toxicidade (mortalidades inferiores a 50%) para *S. zeamais*, mesmo na maior dose testada (10 mg g⁻¹) após 84 horas de exposição. O mesmo ocorreu com os monoterpenos destes OEs: carvacrol (<57%), *p*-cimeno (<17%) e timol (<27%). Dessa forma, não foi possível traçar as curvas de tempo- e dose-mortalidade dos OEs e seus monoterpenos quando a via de exposição foi por aplicação tópica.

A baixa eficiência da aplicação topica dos OEs e monoterpenos quando aplicados por esta via de exposição pode ser devido às características da cutícula do inseto que podem dificultar a absorção dos princípios bioativos.^{22,23} A espessura e dureza, aliada à baixa elasticidade do exoesqueleto de *S. zeamais* podem funcionar como uma barreira física a penetração destes compostos diminuindo sua velocidade de penetração. Essas características resultam na volatilização dos compostos reduzindo a quantidade que efetivamente penetra no

inseto, aumentando assim a possibilidade de metabolização por enzimas destoxificativas.²⁴ Esta hipótese é reforçada no fato de que os OEs e seus monoterpenos foram muito eficientes no controle de *S. zeamais* quando expostos por fumigação.

Fumigação dos OEs de *L. gracilis* e seus monoterpenos. Os tempos letais (TL₅₀ e TL₉₉) dos OEs de *L. gracilis* e dos monoterpenos sobre *S. zeamais* quando aplicados por fumigação são mostradas na Tabela 2.

Os OEs de *L. gracilis* e seus monoterpenos demonstraram rápido efeito tóxico por fumigação em adultos de *S. zeamais*. O tempo necessário para causar 50% de mortalidade desta praga foi em média 28,4 horas; variando de 17,3 a 40,8 horas entre os tratamentos (Tabela 2).

A ação tóxica do carvacrol, timol e do OEs de *L. gracilis* (ausência de irrigação/adubação mineral e 40 t ha⁻¹ de adubação orgânica) foram as mais rápidas, levando em média 18,3 horas para causar mortalidade na metade da população (Tabela 2). Os tratamentos com adubação orgânica, independente da irrigação e da adubação mineral, apresentaram menores tempos letais (TL₅₀) se comparados com os tratamentos que não receberam este tipo de adubação. Os tempos médios para causar mortalidade de 50% da população de *S. zeamais* nos tratamentos com e sem adubação orgânica foram de 27,8 horas (25,4-30,4) e 35,9 horas (33,3-38,9) (Tabela 2).

Curvas de tempo-mortalidade com as maiores inclinações (p.ex. OE de *L. gracilis* na presença de irrigação/adubação mineral e 20 t ha⁻¹ de adubação orgânica; $\beta = 7,86$), apesar de possuírem as maiores TLs₅₀, apresentaram os menores tempos letais para matar 99% da população de *S. zeamais* (Tabela 2).

A toxicidade por fumigação (CL₅₀ e CL₉₉) dos OEs de *L. gracilis* e dos monoterpenos sobre *S. zeamais* quando aplicados por fumigação após 84 horas de exposição são mostrados na Tabela 3.

Houve aumento da toxicidade ao longo dos tempos de avaliação. Dessa forma, as curvas de concentração-mortalidade foram traçadas para o maior tempo de exposição (84 horas).

Os OEs de *L. gracilis* foram altamente tóxicos a *S. zeamais* por fumigação. Compostos com atividade tóxica sobre esta praga via fumigação são altamente desejáveis no manejo uma vez que os indivíduos se desenvolvem na massa e no interior dos grãos. Assim, a dificuldade imposta pelo hábito críptico deste inseto é em grande parte resolvida com a volatilização das moléculas bioativas e penetração na massa de grãos.

Os OEs das plantas de *L. gracilis* sob diferentes práticas agrícolas que causaram toxicidade semelhante sobre *S. zeamais*. A magnitude da variação das CL_{50} e CL_{99} foram de 1,9 e 2,1 vezes. A concentração necessária para causar 50 e 99% de mortalidade desta praga foi em média 69 (60,3-76,2) e 260 (205,9-391,1) $\mu\text{l l}^{-1}$, respectivamente (Tabela 3). Considerando as CL_{50} e CL_{99} , os OEs de *L. gracilis* mais tóxicos foram obtidos de plantas cultivadas na ausência de adubação mineral e presença de adubação orgânica com 20, 40 e 60 t ha^{-1} (sem irrigação) e 40 e 60 t ha^{-1} (com irrigação). Nestes tratamentos, as CL_{50} variaram de 45,47 a 47,87 $\mu\text{l l}^{-1}$ e as CL_{99} de 179,5 a 198,4 $\mu\text{l l}^{-1}$, respectivamente (Tabela 3).

Desta forma, apesar das práticas de cultivo não influenciarem significativamente os constituintes dos OEs (Tabela 1), estes causaram diferentes toxicidades em adultos *S. zeamais* (Tabela 3). Este resultado sugere que componentes em concentrações mínimas ou traço podem influenciar a atividade inseticida do óleo essencial. Estas substâncias podem interagir através de sinergismo, antagonismo, aditismo ou potenciação. Estudos têm demonstrado que a complexidade de interações entre os componentes dos OEs podem agir de diferentes formas alterando a fisiologia dos insetos.^{25, 26}

Grande parte da atividade dos OEs de *L. gracilis* deve-se ao composto majoritário carvacrol. Foram necessários apenas 27,2 e 92,2 $\mu\text{l l}^{-1}$ para causar 50 e 99% de mortalidade à adultos de *S. zeamais* (Tabela 3). A atividade tóxica deste monoterpene foi ainda uma das

mais rápidas ($TL_{50} = 17,3$ e $TL_{99} = 70,8$ horas) (Tabela 2). Já o timol e p-cimeno foram os compostos de menor toxicidade a adultos de *S. zeamais*. Eles precisaram de concentrações 4,4 e 26,1 maiores para matar os mesmos 50% da população deste inseto (Tabela 3).

Este padrão de toxicidade do OE e seu majoritário corroboram os encontrados em outros estudos. Grande parte da mortalidade causada pelo OE de *Litsea cubeba* à *Trichoplusia ni* deve-se ao seu composto majoritário γ -terpineno.²⁷ A toxicidade do carvacrol à pragas de grãos armazenados por fumigação já está descrita na literatura.^{28,29,30} OEs obtidos de diferentes acessos de *L. gracilis* exibiram maiores concentrações letais para *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* do que o carvacrol.¹⁹ O óleo essencial de *Thymus persicus*, que também possui carvacrol como majoritário (44,69%), mostrou eficiência no controle de *Tribolium castaneum* com $CL_{50} = 236,9 \text{ ul l}^{-1}$.³⁰

Embora no presente estudo, o timol e o p-cimeno tenham apresentado baixa eficiência em relação ao carvacrol, alguns estudos relatam suas atividades contra a malária, anti-carcinogênica e antiviral.^{19,31-33}

Estes monoterpenos podem atuar sobre artrópodos por meio de vários mecanismos de ação, como inibidor da acetilcolinesterase e do citocromo P₄₅₀ monoxigenase, ou ainda atuando em seus sistemas nervosos octopaminérgicos.⁶ Possivelmente o OE de *L. gracilis* apresentou efeito neurotóxico uma vez que os indivíduos apresentaram movimentos descoordenados e interrupção das atividades.³⁴

A maior eficiência da rota de exposição por fumigação em relação à aplicação tópica deve-se ao fato dos voláteis saturarem o ar diminuindo a capacidade destoxificativa do citocromo P₄₅₀ monoxigenase. Isto ocorre porque as vias aéreas dos insetos (ex. espiráculos) não possuem barreiras efetivas contra a penetração gasosa. Por esse motivo a fumigação consiste na mais rápida e eficiente maneira do inseticida atingir seus sítios de ação no sistema nervoso dos insetos.^{35,36}

Atração/repelência dos OEs de *L. gracilis* e de seus monoterpenos. Nestes bioensaios foram utilizados apenas os monoterpenos e os OEs de *L. gracilis* que apresentaram maior toxicidade no bioensaio de fumigação. Os resultados dos testes de atração/repelência são apresentados na Tabela 4.

De forma geral, os OEs de *L. gracilis* e os monoterpenos utilizados nas menores concentrações (0,01 e 0,1% v/v) apresentaram efeito neutro (não significativo) ou atrativo (negativo e significativo) em todos os tempos analisados. A partir da concentração 1% (v/v) o efeito repelente (positivo e significativo) dos OEs e monoterpenos torna-se maior. Já na concentração 10% (v/v) quase todos os tratamentos foram repelentes a *S. zeamais* em qualquer tempo analisado (repelência > 50%). A única exceção foi em relação ao timol, que mostrou efeito neutro nesta concentração.

Maiores índices de repelência (54-86%) foram observados nos tratamentos irrigados com máxima adubação orgânica e concentração 1 e 10% (v/v). Esta atividade repelente foi significativa em todos os tempos analisados, demonstrando que o OE produzido neste tratamento pode ser uma boa alternativa para repelir pragas de grãos armazenados.

Em relação à atividade dos monoterpenos, no tempo 10h, a maior repelência foi observada para o carvacrol ($86\pm 6\%$) na concentração 10% (v/v). Assim, este componente parece ser o principal responsável pela repelência do OE sobre *S. zeamais*. Timol e carvacrol já tiveram sua atividade repelente relatada contra *T. castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), onde apresentaram mais que 77% de repelência nas concentrações 0,03 e 0,006 mg.cm², respectivamente.³⁷

Ainda não são totalmente conhecidos os mecanismos físico-químicos que conferem repelência às moléculas. No entanto, alguns estudos indicam que a lipofilicidade, pressão de vapor, ponto de ebulição, tamanho molecular entre outros podem ter influência sobre tal atividade.^{38,39,40} Outro fator que pode determinar a repelência é o arranjo molecular. O timol e o carvacrol são esteroisômeros e mesmo essa pequena mudança estrutural pode alterar o modo

de ação destes compostos. Isômeros geométricos com diferentes respostas biológicas foram descritos para pragas de produtos armazenados.^{41,37}

O efeito repelente é importante no controle de pragas de grãos armazenados, pois induz o expurgo ou impede que os insetos entrem nos silos.^{42,43} Embora existam muitos repelentes sintéticos para insetos [ex. IR3535 ethyl 3-(N-acetyl-N-butylamino) propionate e DEET N,N-di-ethyl-m-toluamide⁴⁰], tais produtos apresentam alta toxicidade para humanos podendo causar dermatites, reações alérgicas e coma.⁴⁴ Sendo assim, óleos essenciais consistem em alternativas viáveis no controle de pragas de grãos armazenados, pois em concentrações mínimas podem apresentar mudanças comportamentais nos insetos, como atração ou repelência.^{31,45,46}

Tabela 1. Composição química caracterizada por GC/MS e GC/FID dos óleos essenciais de plantas de *Lippia gracilis* cultivadas com diferentes práticas agrícolas.

Composto	IR ^a	Ausência de irrigação ^b								Irrigação por gotejamento (5,33 mm dia ⁻¹) ^b							
		Ausência NPK				0,6 t ha ⁻¹ de NPK (15-9-20)				Ausência NPK				0,6 t ha ⁻¹ de NPK (15-9-20)			
		Adubação orgânica com esterco ovino/caprino (1:1) (t ha ⁻¹)															
		0	20	40	60	0	20	40	60	0	20	40	60	0	20	40	60
α -tujeno	945	0,03	-	0,04	-	-	0,05	0,19	0,03	0,07	0,06	0,02	0,09	-	-	0,07	0,10
α -pineno	951	0,02	-	-	-	-	-	0,15	-	0,07	-	0,02	0,03	-	-	-	0,04
1-octen-3-ol	984	0,16	0,09	0,13	0,08	-	0,09	-	0,04	-	0,05	0,09	0,02	-	0,07	0,06	0,15
Mirceno	994	0,34	0,37	0,40	0,31	0,35	0,49	0,64	0,46	0,32	0,37	0,28	0,43	0,31	0,33	0,36	0,37
α -terpineno	1020	0,17	0,26	0,23	0,06	0,18	0,25	0,39	0,25	0,26	0,20	0,12	0,26	0,15	0,16	0,24	0,24
ρ -cimeno	1027	2,51	2,65	2,39	2,68	2,40	3,16	3,67	3,19	2,32	2,63	1,68	2,59	2,22	2,35	2,37	2,23
1,8-cineol	1034	0,38	0,99	-	0,64	-	0,24	1,03	0,16	0,85	-	-	0,69	0,56	0,19	1,66	-
E-b-ocimeno	1048	0,02	-	-	-	-	-	0,09	-	-	0,07	-	-	0,03	0,08	-	-
γ -terpineno	1061	1,00	1,49	1,39	0,35	1,01	1,35	2,14	1,44	1,89	1,28	0,68	1,37	0,84	0,79	1,76	1,48
Cis-sabinene hydrate	1069	0,42	0,27	0,40	0,38	0,25	0,40	0,40	0,25	0,38	0,29	0,21	0,38	0,29	0,27	0,42	0,42
Linalol	1102	0,48	0,42	0,35	0,45	0,38	0,53	0,59	0,38	0,89	0,60	1,06	0,39	0,58	0,45	0,63	0,41
Ipsdienol	1148	0,53	0,53	0,45	0,63	0,45	0,61	0,59	0,63	0,42	0,65	0,76	0,61	0,68	0,82	0,51	0,51
Terpinen-4-ol	1181	0,64	0,77	0,64	0,56	0,71	0,68	0,75	0,71	0,82	0,66	0,70	0,63	0,64	0,74	0,68	0,61
Éter metil timol	1238	2,31	2,58	1,65	1,36	-	1,39	2,35	2,05	2,36	2,30	0,46	2,38	1,82	1,88	1,35	1,31
Éter metil carvacrol	1247	0,33	0,27	0,30	0,32	0,23	0,25	0,28	0,30	0,23	0,35	0,26	0,23	0,20	0,19	0,25	0,25
Timol	1297	6,3	5,1	9,5	7,0	14,3	7,1	5,6	5,4	4,9	4,9	8,0	5,2	5,7	6,2	6,0	10,3
Carvacrol	1311	78,6	76,5	75,6	77,0	71,5	78,0	76,8	74,9	76,2	77,3	74,8	78,3	74,9	79,0	73,9	75,9
Acetato de timol	1358	-	0,15	-	-	0,10	-	-	0,21	-	0,13	-	-	0,16	-	0,39	0,06
Acetato de carvacrol	1375		0,97	0,14	0,12	0,26	0,29	0,25	1,70	0,38	0,65	0,45	0,11	1,03	0,37	1,78	-
E-cariofileno	1425	1,24	3,01	1,77	1,28	2,32	1,56	1,25	2,85	2,55	1,56	4,53	1,50	3,85	1,54	2,65	1,33
Aromadendreno	1443	0,03	-	-	0,24	-	-	0,06	0,06	0,41	0,25	0,33	0,32	0,07	-	-	-
α -humuleno	1458	0,26	0,06	0,48	0,04	0,66	0,26		0,20	-	-	0,30	-	0,27	-	-	0,40
ar-curcumeno	1484	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,20	-	-	-	-	-
α -zingibereno	1496	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,67	-	-	-	-	-
β -bisaboleno	1509	0,17	0,23	0,34	0,32	0,48	0,16	0,03	0,14	0,23	0,37	0,52	0,17	0,51		0,28	0,29
δ -cadineno	1526	-	-	0,21	-	0,32		0,04	0,46	0,26	-	0,31	-	-	-	-	0,17
Espatulenol	1584	0,26	0,27	0,19	0,68	0,24	0,30	0,27	0,32	0,61	0,33	0,22	0,29	0,20	0,22	0,35	0,14
Óxido de cariofileno	1591	0,85	1,00	0,76	1,98	1,56	0,76	0,58	1,05	1,20	1,28	1,11	0,70	1,41	0,92	1,29	0,64
Epóxido de humuleno	1616	0,03	-	0,04	-	0,22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total detectado (%)		97,1	98,0	97,4	96,5	97,9	97,9	98,2	97,2	97,7	96,3	97,8	96,7	96,4	96,6	97,0	97,4
Rendimento % (v/m) ^c		0,85b	5,90a	4,70a	2,13b	1,83b	5,47a	6,47a	2,87b	2,60b	5,73a	4,60a	5,10a	3,23b	6,77a	9,00a	7,13a

^a Índice de retenção calculado utilizando a equação de Van den Dool e Kratz 1963 em relação a uma série homóloga de n-alcenos (nC9- nC18). ^b Valores do conteúdo dos compostos obtido pela média de três diferentes determinações obtidas por GC/MS e GC/FID. Traços indicam que o composto não foi encontrado. ^c Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a p<0,05

Tabela 2. Tempo letal (TL₅₀ e TL₉₉) dos OEs de plantas *Lippia gracilis* cultivadas com diferentes práticas agrícolas e seus principais monoterpenos, expostos via fumigação sobre adultos de *Sitophilus zeamais*. Concentração = 339,5 µl l⁻¹.

Tratamento	Irrigação ^a	NPK ^b	Adubação orgânica ^c	Número de insetos	TL ₅₀ (IC95%) ^d (horas)	TL ₉₉ (IC95%) ^d (horas)	β ^e	χ ²	P
OE de <i>L. gracilis</i>	Ausente	Ausente	0	360	35,3 (32,7-37,7)	86,8 (77,5-100,6)	5,96	4,12	0,125
			20	280	27,4 (25,1-29,9)	115,0 (91,1-160,6)	3,74	1,03	0,604
			40	280	18,7 (16,4-21,7) *	78,7 (60,5-112,0) *	3,74	1,95	0,621
			60	280	29,9 (26,9-32,9)	105,0 (89,5-129,8)	4,27	2,26	0,323
	Ausente	Presente	0	280	30,9 (27,8-34,5)	188,4 (136,8-301,6)	2,97	4,45	0,106
			20	280	24,0 (22,0-25,9)	84,4 (70,5-108,3)	4,26	0,00	0,999
			40	280	29,0 (26,3-32,0)	149,4 (111,5-231,1)	3,27	4,83	0,087
			60	280	30,7 (27,9-34,1)	169,4 (122,8-275,9)	3,14	3,02	0,219
	Presente	Ausente	0	280	36,8 (34,1-39,3)	94,7 (84,0-111,1)	5,68	2,47	0,291
			20	280	29,5 (26,2-33,4)	181,9 (134,2-278,2)	2,95	2,04	0,362
			40	280	27,8 (25,2-30,4)	144,3 (114,7-197,0)	3,26	7,72	0,051
			60	280	25,4 (23,7-27,2)	69,0 (60,0-83,4) *	5,37	1,18	0,559
	Presente	Presente	0	280	40,8 (38,7-42,8)	95,6 (86,8-108,2)	6,30	4,84	0,304
			20	280	33,0 (31,4-34,7)	65,4 (59,5-74,1) *	7,86	1,65	0,558
			40	560	24,1 (21,9-26,5)	81,2 (67,0-105,3)	4,42	4,50	0,103
			60	280	34,0 (31,6-36,5)	89,9 (77,1-111,3)	5,52	4,94	0,082
Carvacrol	-	-	-	640	17,3 (15,7-19,0)	70,8 (59,0-89,3)	3,82	2,55	0,532
Timol ^f	-	-	-	640	19,0 (16,6-21,3)	108,3 (85,5-149,6)	3,08	3,85	0,143
ρ-cimeno ^g	-	-	-	640	28,6 (24,7-32,5)	252,7 (177,9-425,0)	2,46	1,53	0,532

^a Irrigação por gotejamento (5,33 mm dia⁻¹). ^b Adubação mineral 0,6 t ha⁻¹ de NPK (15-9-20). ^c Esterco ovino/caprino (1:1) curtido nas doses 0, 20, 40 e 60 t ha⁻¹. ^d Dose letal com intervalo de confiança a 95%. ^e Inclinação da curva. ^f A TL₅₀ e TL₉₉ foram calculadas para a concentração de 226,4 µl l⁻¹ devido à alta toxicidade da concentração de 339,5 µl l⁻¹. ^g A TL₅₀ e TL₉₉ foram calculadas para a concentração de 2263,4 µl l⁻¹ devido à baixa toxicidade do composto. * Indicam os OEs com ação mais rápida (< TL₅₀ e TL₉₉)

Tabela 3. Toxicidade por fumigação (CL₅₀ e CL₉₉) dos OEs de plantas *Lippia gracilis* cultivadas com diferentes práticas agrícolas e seus principais monoterpênos sobre adultos de *Sitophilus zeamais* após 84 horas de exposição.

Tratamento	Irrigação ^a	NPK ^b	Adubação orgânica ^c	Número de insetos	CL ₅₀ (IC95%) ^d (μl l ⁻¹)	CL ₉₉ (IC95%) ^d (μl l ⁻¹)	β ^e	χ ²	P
OE de <i>L. gracilis</i>	Ausente	Ausente	0	360	84,46 (73,28-93,15)	294,0 (237,3-421,3)	4,29	2,63	0,267
			20	280	45,47 (32,80-54,70) *	313,4 (221,1-613,4)	2,65	2,00	0,629
			40	280	47,87 (35,80-57,83) *	330,5 (247,1-534,1)	2,78	4,12	0,125
			60	280	47,71 (36,46-55,33) *	198,4 (153,2-330,2) *	3,75	3,88	0,141
	Ausente	Presente	0	280	84,46 (78,96-90,43)	230,7 (189,1-315,2)	5,34	2,28	0,320
			20	280	76,22 (69,56-82,59)	215,7 (186,7-262,2)	5,13	1,43	0,507
			40	280	64,86 (57,60-70,79)	225,9 (178,7-336,7)	4,29	2,17	0,339
			60	280	72,13 (65,40-78,24)	253,2 (199,2-376,0)	4,27	2,25	0,326
	Presente	Ausente	0	280	66,91 (60,72-72,63)	204,2 (167,3-278,8)	4,81	0,04	0,982
			20	280	75,57 (62,81-84,58)	247,0 (201,0-359,0)	4,49	2,89	0,235
			40	280	64,07 (58,01-69,17)	183,1 (154,0-239,9) *	5,09	1,60	0,547
			60	280	74,39 (69,61-78,90)	179,5 (164,8-203,1) *	6,06	1,35	0,722
	Presente	Presente	0	280	75,48 (65,54-84,62)	385,2 (302,4-549,0)	3,29	2,23	0,328
			20	280	60,39 (51,28-68,28)	311,4 (238,8-472,4)	3,25	1,24	0,544
			40	560	77,33 (68,23-84,88)	385,3 (279,4-678,1)	3,34	0,82	0,671
			60	280	86,57 (78,18-93,07)	212,6 (181,4-277,6)	5,94	2,23	0,329
Carvacrol	-	-	-	610	27,2 (24,9-29,7)	92,2 (73,9-127,9)	4,40	5,59	0,059
Timol	-	-	-	610	119,7 (110,8-127,0)	307,3 (251,9-439,2)	5,69	1,43	0,506
p-cimeno	-	-	-	610	711,0 (695,4-851,2)	2370,3 (1851,3-3412,0)	4,46	4,02	0,132

^a Irrigação por gotejamento (5,33 mm dia⁻¹). ^b Adubação mineral 0,6 t ha⁻¹ de NPK (15-9-20). ^c Esterco ovino/caprino (1:1) curtido nas doses 0, 20, 40 e 60 t ha⁻¹. ^d Concentração letal com intervalo de confiança a 95%. ^e Inclinação da curva. * Indicam os OEs mais tóxicos (< CL₅₀ e CL₉₉).

Tabela 4. Repelência dos OEs de *Lippia gracilis* provenientes de plantas cultivadas com diferentes práticas agrícolas e seus monoterpenos sobre adultos de *Sitophilus zeamais* após cinco tempos de exposição.

Tratamento ^a	Irrigação ^b	Adubação orgânica ^c	Conc. ^d (%v/v)	Repelência ^e (%) depois do tempo de exposição				
				2h	4h	6h	8h	10h
OE de <i>L. gracilis</i>	Ausente	20	0,01	16±25	24±20	10±24	8±20	10±20
			0,1	-26±24	-32±20*	-22±27	-38±17*	-2±22
			1	34±16*	4±22	-30±23	-6±22	-18±22
			10	58±18*	62±11*	52±20*	58±13*	48±17*
	Ausente	40	0,01	-16±19	-20±23	-20±22	-28±22	10±23
			0,1	-46±20*	-44±20*	-38±18*	-10±20	-8±19
			1	26±19	-2±21	0±22	-34±22*	6±20
			10	56±8*	26±12*	22±13*	42±10*	58±9*
	Ausente	60	0,01	0±13	-24±11*	-20±13*	22±16	-14±18
			0,1	-26±22	14±24	-18±23	-12±18	2±24
			1	68±16*	44±17*	30±12*	16±12	8±17
			10	62±13*	54±18*	60±18*	66±10*	50±16*
	Presente	40	0,01	-8±24	-20±17	-2±24	-20±20	-20±14
			0,1	-34±27	-36±17*	-34±20*	-38±17*	-20±21
			1	54±16*	8±23	-28±22	0±17	-22±16
			10	68±12*	76±8*	70±10*	62±9*	68±10*
	Presente	60	0,01	-6±17	-22±16	-6±26	-24±18	-24±20
			0,1	-18±24	-36±17*	-24±20	-44±11*	-18±16
			1	86±7*	86±8*	56±10*	56±13*	54±9*
			10	60±18*	78±12*	86±8*	80±12*	80±11*
Carvacrol	-	-	0,01	0±13	8±20	26±22	16±29	24±22
			0,1	-6±19	16±16	-14±21	-12±21	2±21
			1	20±14	-8±15	-4±22	6±19	30±18*
			10	68±13*	66±11*	72±13*	64±18*	86±6*
Timol	-	-	0,01	14±20	6±18	-16±14	34±15*	30±27
			0,1	16±17	36±14*	28±12*	34±20*	22±12*
			1	-6±15	6±16	26±9*	44±11*	22±18
			10	18±16	2±18	2±18	-8±13	-8±9
p-cimeno	-	-	0,01	-4±13	-2±16	20±15	-6±15	2±17
			0,1	20±18	44±13*	40±12*	42±13*	26±11*
			1	-18±21	40±15*	-2±15	38±13*	58±11*
			10	72±8*	52±13*	22±21	26±19	34±14*

^a OE que apresentaram maior toxicidade considerando as CL₅₀ e CL₉₉ dos bioensaios de fumigação, todos na ausência de adubação mineral (NPK) e os monoterpenos destes OE. ^b Irrigação por gotejamento (5,33 mm dia⁻¹).

^c Esterco ovino/caprino (1:1) curtido nas doses 0, 20, 40 e 60 t ha⁻¹. ^d Concentração. ^e Valores são a média ± erro-padrão do índice de repelência. Valores positivos representam repelência e valores negativos mostram a atividade de atração. * Diferença significativa entre o número de organismos nas metades tratadas e não tratadas, utilizando o teste t pareado (P <0,05).

CONCLUSÃO

As práticas de cultivo não afetaram significativamente a composição dos OEs de *L. gracilis*. Contudo, pequenas variações na composição dos OEs resultaram em diferentes respostas biológicas de *S. zeamais*. De forma geral, os OEs de *L. gracilis* foram muito tóxicos a adultos de *S. zeamais* por fumigação. Grande parte desta toxicidade se deve ao seu composto majoritário carvacrol. As maiores toxicidades foram observadas nos OEs produzidos por plantas cultivadas na ausência de irrigação/adubação mineral e na presença de adubação orgânica. Adicionalmente, os OEs de *L. gracilis* e o carvacrol foram repelentes a adultos de *S. zeamais*. Assim, nossos resultados mostram o grande potencial do OE de *L. gracilis* e seu composto majoritário para o desenvolvimento de novos produtos e utilização em programas de manejo integrado de pragas de grãos armazenados.

REFERÊNCIAS

- (1) Ormeño E, Baldy V, Ballini C, Production and diversity of volatile terpenes from plants on calcareous and siliceous soils: effect of soil nutrients. *Journal of Chemical Ecology*, **2008**, 34, 1219-1229.
- (2) Bettaieb, I.; Knioua, S.; Hamrouni, I.; Limam, F.; Marzouk, B. Water-deficit impact on fatty acid and essential oil composition and antioxidant activities of cumin (*Cuminum cyminum* L.) aerial parts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**, 59, 328–34.
- (3) Mohammad R.; Hamid S; An A.; Norbert D.K.; Patrick V.D., Effects of planting date and seedling age on agro-morphological characteristics, essential oil content and composition of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) grown in Belgium. *Industrial Crops and Products*, **2010**, 31, 145-152.
- (4) Rebey IB, Jabri-karoui I, Hamrouni-sellami I, Bourgou S, Limam F, Marzouk B, Effect of drought on the biochemical composition and antioxidant activities of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds. *Industrial Crops & Products* **2012**, 36 238-245.
- (5) Futuyma, D.J., Agrawal, A.A. Macroevolution and the biological diversity of plants and herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2009**, 106, 18054-18056.
- (6) Pontes, W.J.T.; Oliveira, J.C.S.; Câmara, C.A.G; Gondim-Junior, M.G.C.; Oliveira, J.V.; Schwartz, M.O.E. Artigo. Atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Xylopia sericea* sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* KOCH). *Quimica Nova*, **2007**, 30, 838–841.
- (7) Pessoa, O.D.L.; Carvalho, C.B.M.; Silvestre, J.O.V.L.; Lima, M.C.L.; Neto, R.M.; Matos, F.J.A.; Lemos, T.L.G. Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia aff. gracillis*. *Fitoterapia*, **2005**, 76, 712-714.
- (8) Roel, AR. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. *Revista Internacional de Desenvolvimento Local*, **2011**, 1, 43-50.
- (9) Bakkali, F.; Averback, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, **2008**, 46, 446-475.
- (10) Silva, WC, Ribeiro, JD, Souza, HEM, Corrêa, RS. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. *Acta Amazonica*, **2007**, 37, 293-298.
- (11) Petropoulos, S. A.; Daferera, D.; Polissiou, M. G.; Passam, H. C. The effect of water deficit stress on the growth, yield and composition of essential oils of parsley. *Scientia Horticulturae*, **2008**, 115, 393–397.
- (12) Ormeño, E.; Baldy, V.; Ballini, C. Production and diversity of volatile terpenes from plants on calcareous and siliceous soils: effect of soil nutrients. *Journal of Chemical Ecology*, **2008**, 34, 1219–1229.
- (13) Petronilho, S.; Maraschin, M.; Delgadillo, I.; Coimbra, M. A.; Rocha, S. M. Sesquiterpenic composition of the inflorescences of brazilian chamomile (*Matricaria recutita* L.): Impact of the agricultural practices. *Industrial Crops and Products* **2011**, 34, 1482–1490.
- (14) Hosni, K.; Msaada, K.; Ben Taârit, M.; Marzouk, B. Phenological variations of secondary metabolites from *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Biochemical Systematics and Ecology*, **2011**, 39, 43–50.
- (15) Alekseeva, L. I.; Gruzdev, I. V. Polymorphism of essential oils in thyme species growing in European part of North-East Russia and Ural. *Russian Journal of Plant Physiology*, **2012**, 59, 818–827.
- (16) Adams, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, Fourth ed. Allured Publishing Corporation, Illinois, **2007**.

- (17) Vandendool, H.; Kratz, J.D.J. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, **1963**, 11, 463-471.
- (18) Islam, R.; Khan, R. I.; Al-Reza, S. M.; Jeong, Y. T.; Song, C. H.; Khalequzzaman, M. Chemical composition and insecticidal properties of *Cinnamomum aromaticum* (Nees) essential oil against the stored product beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2009**, 89, 1241-1246.
- (19) Cruz, E. M. D. O.; Costa-Junior, L. M.; Pinto, J. A. O.; Santos, D. D. A.; Araujo, S. A. De; Arrigoni-Blank, M. D. F.; Bacci, L.; Alves, P. B.; Cavalcanti, S. C. D. H.; Blank, A. F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, **2013**, in press.
- (20) Baher, Z. F.; Mirza, M.; Ghorbanli, M.; Rezaii, M. B. The influence of water stress on plant height, herbal and essential oil yield and composition in *Satureja hortensis* L. *Flavour and Fragrance*, **2002**, 17, 275-277.
- (21) Ahmadian, A.; Tavassoli, A.; Amiri, E. The interaction effect of water stress and manure on yield components, essential oil and chemical compositions of cumin (*Cuminum cyminum*). *African Journal of Agricultural Research*, **2011**, 6, 2309-2315.
- (22) Chapman, R.F. Integument. In *The Insects: Structure and Function*; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1998; pp. 415-440.
- (23) Harrison, R. L.; Bonning, B. C. Proteases as Insecticidal Agents. *Toxins*, **2010**, 935-953.
- (24) Plapp, F. W. Biochemical genetics of insecticide resistance, *Annual Review of Entomology*, **1976**, 21, 179-197.
- (25) Khalfi, O.; Sahraoui, N.; Bentahar, F.; Boutekedjiret, C. Chemical composition and insecticidal properties of *Origanum glandulosum* (Desf .) essential oil from Algeria. *Science of Food and Agriculture*, **2008**, 88, 1562-1566.
- (26) Rattan, R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*, **2010**, 29, 913-920.
- (27) Jiang, Z.; Akhtar, Y.; Bradbury, R.; Zhang, X.; Isman, M. B. Comparative toxicity of essential oils of *Litsea pungens* and *Litsea cubeba* and blends of their major constituents against the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, 57, 4833-4837.
- (28) Ahn, Y.; Lee, S.; Lee, H. Insecticidal and acaricidal activity of carvacrol and / 3-thujaplicine derived from *Thujopsis dolabrata* var. *hondai* SAWDUST. *Journal of Chemical Ecology*, **1998**, 24, 81-90.
- (29) Isman, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, **2000**, 19, 603-608.
- (30) Saroukolai, A. T.; Moharramipour, S.; Meshkatsadat, M. H. Insecticidal properties of *Thymus persicus* essential oil against *Tribolium castaneum* and *Sitophilus oryzae*. *Journal of Pest Science* **2009**, 83, 3-8.
- (31) Matos, F.J.A.; Machado, M.I.L.; Craveiro, A.A.; Alencar, J.W.; Silva, M.G.V. Medicinal plants Northeast Brazil containing thymol and carvacrol *Lippia sidoides* Cham. and *L. gracilis* H.B.K (Verbenaceae). *Journal of Essential Oil Research*, **1999**, 11, 666-668.
- (32) Cavalcanti, S.C.H.; Niculau, E. S.; Blank, A.F.; Câmara, C.A.G.; Araújo, I.N.; Alves, P.B. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). *Bioresource Technology*, **2010**, 101, 829-832.
- (33) Mendes, S. S.; Bomfim, R. R.; Jesus, H. C. R.; Alves, P. B.; Blank, a F.; Estevam, C. S.; Antonioli, a R.; Thomazzi, S. M. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, **2010**, 129, 391-7.

- (34) Kostromytska, O. S.; Buss, E. A.; Scharf, M. E. Toxicity and neurophysiological effects of selected insecticides on the mole cricket, *Scapteriscus vicinus* (Orthoptera : Gryllotalpidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **2011**, 100, 27–34.
- (35) Gerolt, P. Mode of entry of contact insecticides. *Journal of Insect Physiology*, **1969**, 15, 563–580.
- (36) Sugiura, M.; Horibe, Y.; Kawada, H.; Takagi, M. Insect spiracle as the main penetration route of pyrethroids. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **2008**, 91, 135–140.
- (37) Kim, S.I.; Yoon, J.-S.; Jung, J. W.; Hong, K.-B.; Ahn, Y.-J.; Kwon, H. W. Toxicity and repellency of organum essential oil and its components against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) adults. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **2010**, 13, 369–373.
- (38) Davis, E. E. Insect repellents concepts of their mode of action relative to potencial sensory mechanisms in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* **1985**, 22, 237–243.
- (39) Wang, Z.; Song, J.; Chen, J.; Song, Z.; Shang, S.; Jiangd, Z.; Han, Z. QSAR study of mosquito repellents from terpenoid with a six- member-ring. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters*, **2008**, 18, 2854–2859.
- (40) Caballero-Gallardo, K.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E. E. Repellent activity of essential oils and some of their individual constituents against *Tribolium castaneum* herbst. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**, 59, 1690–6.
- (41) Park, C.; Kim, S.I.; Ahn, Y.J. Insecticidal activity of asarones identified in *Acorus gramineus* rhizome against three coleopteran stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*. **2003**, 39, 333–342. (47) Kim, S.I.; Yoon, J.-S.; Jung, J. W.; Hong, K.-B.; Ahn, Y.-J.; Kwon, H. W. Toxicity and repellency of organum essential oil and its components against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) adults. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **2010**, 13, 369–373.
- (42) Maceljski, m. & Korunic. Contribution to the morphology and ecology of *Sitophilus zeamais* Motsch. in Yugoslavia. *Journal of Stored Products Research*, **1973**, 9, 225–234.
- (43) Chu, S. S.; Feng Hu, J.; Liu, Z. L. Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Pest Management Science*, **2011**, 67, 714–8.
- (44) Brown M.; Hebert A.A. Insect repellents: an overview. *JAmAcad Derma- tol* 1997; 36: 243–249 Pohlit, A. M.; Lopes, N. P.; Gama, R. A.; Tadei, W. P.; Neto, V. F. D. A. Patent literature on mosquito repellent inventions which contain plant essential oils a review. *Planta Medica*, **2011**, 77, 598–617.
- (45) Maia, M. F.; Moore, S. J. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malaria Journal*, **2011**, 10, 11.
- (46) Zhang, J. S.; Zhao, N. N.; Liu, Q. Z.; Liu, Z. L.; Du, S. S.; Zhou, L.; Deng, Z. W. Repellent constituents of essential oil of *Cymbopogon distans* aerial parts against two stored-product insects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**, 59, 9910–5.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMSON D.; HULASARE R.; YORK R.K.; WHITE N.D.G.; JAYAS D.S. Mycotoxins, ergosterol, and odor volatiles in durum wheat during granary storage at 16% and 20% moisture content. **Journal of Stored Products Research**, 4, 67–76, 2005.
- BAKKALI, F.; AVERBACK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, 46, 446–475, 2008.
- BEHN, H.; ALBERT, A.; MARX, F.; NOGA, G.; ULBRICH, A. Ultraviolet-B and photosynthetically active radiation interactively affect yield and pattern of monoterpenes in leaves of peppermint (*Mentha x piperita* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, 7361–7367, 2010.
- BETTAIEB, I.; ZAKHAMA, N.; WANNES, W. A.; KCHOUK, M. E.; MARZOUK, B. Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. **Scientia Horticulturae**, 120, 271–275, 2009.
- BEZERRA, P.; FERNANDES, A.G.; CRAVEIRO, A.A.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L.; VIANA, G.S.B.; MATOS, F.F.; ROUQUAYROL, MZ. Composição química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas do Nordeste-gênero *Lippia*. **Ciência e Cultura**, 33, 1–14, 1981.
- BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; RESENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, 32, 588–594, 2009.
- BRAGA, L.S.; CORRÊA, A.S.; PEREIRA, E. J. G.; GUEDES, R. N. C. Face or flee? Fenitrothion resistance and behavioral response in populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Journal of Stored Products Research**, 47, 161–167, 2011.
- CAVALCANTI, S.C.H., NICULAU, E. S., BLANK, A.F., CÂMARA, C.A.G., ARAÚJO, I.N., ALVES, P.B. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, 101, 829–832, 2010.
- CARVALHO, M. O.; PIRES, I.; BARBOSA, A.; BARROS, G.; RIUDAVETS, J.; GARCIA, A. C.; BRITES, C.; NAVARRO, S. The use of modified atmospheres to control *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus oryzae* on stored rice in Portugal. **Journal of Stored Products Research**, 50, 49–56, 2012.
- CHANG, X.; ALDERSON, P. G.; WRIGHT, C. J. Solar irradiance level alters the growth of basil (*Ocimum basilicum* L.) and its content of volatile oils. **Environmental and Experimental Botany**, 63, 216–223, 2008.
- CHARLES, O.; JOLY, R.; SIMON, J.E. Effect of osmotic stress on the essential oil content and composition of peppermint. **Phytochemistry**, 29, 2837–2840, 1994.
- CHU, S.; LIU, Z.; DU, S.; DENG, Z. Chemical composition and insecticidal activity against *Sitophilus zeamais* of the essential oils derived from *Artemisia giraldii* and *Artemisia subdigitata*. **Molecules**, 17, 7255–7265, 2012.

- CORREA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.13, p. 500-506, 2011.
- COX, T.S., GLOVER, J.D., VAN TASSEL, D.L., COX, C.M., DEHAAN, L.R. Prospects for developing perennial grain crops. **Bioscience**, 56, 649–659, 2006.
- COX, T.S.; VAN TASSEL, D.L.; COX, C.M.; DEHAAN, L.R. Progress in breeding perennial grains. **Crop Pasture Science**, 61, 513–521, 2010.
- DEQUECH, S. T. B.; RIBEIRO, L. P.; SAUSEN, C.D.; EGEWARTHE, R.; KRUSE, N. D. Fitotoxicidade causada por inseticidas botânicos em feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado em estufa plástica. **Revista da FZVA**, 15, 71-80, 2008.
- EDRIS, A. E.; SHALABY, A.; FADEL, H. M. Effect of organic agriculture practices on the volatile aroma components of some essential oil plants growing in Egypt II: sweet Marjoram (*Origanum marjorana* L.) essential oil. **Flavour and Fragrance Journal** 18, 45–351, 2003.
- ESTRADA, B.; POMAR, F.; DÕÂAZ, J.; MERINO, F.; BERNAL, M.A. Pungency level in fruits of the Padron pepper with different water supply. **Sci. Hort**, 81, 385–396, 1999.
- EKREN, S.; SÖNMEZ, Ç.; ÖZÇAKAL, E.; KURTTAŞ, Y. S. K.; BAYRAM, E.; GÜRGÜLÜ, H. The effect of different irrigation water levels on yield and quality characteristics of purple basil (*Ocimum basilicum* L.). **Agricultural Water Management**, 109, 155–161, 2012.
- FATIMA, S.F.; FAROOQI, A.H.A.; SRIKANT, S. Effect of drought stress and plant density on growth and essential oil metabolism in citronella java (*Cymbopogon winterianus*). **J. Med. Aromat. Plant Sci.**, 22 (1B), 563–567, 2000.
- GOMES, S.V.F.; SANTOS, A.D.C.; MORAES, V.R.S.; MARTINS, L.R.R.; VIANA, M.D.; BLANK, A.F.; PEREIRA-FILHO, E. R. Differentiation of *Lippia gracilis* Schauer Genotypes by LC Fingerprint and Chemometrics Analyses. **Chromatographia**, 72 (3-4), 275–280, 2010.
- GUEYE, M.T.; CISSOKHO, P.S.; GOERGEN G.; SALIOU NDIAYE, SECK, D. GUEYE, G.; WATHELET, J.P.; LOGNAY, G. Efficacy of powdered maize cobs against the maize weevil *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in stored maize in Senegal. **International Journal of Tropical Insect Science**, 32, 94-100, 2012.
- HALLMAN. G. J. Control of stored product pests by ionizing radiation. **Journal of Stored Products Research**, 52, 36-41, 2013.
- JANSEN-JACOBS, M.J. Verbenaceae. In: Rijn, A.R.A. (Ed.), *Flora of the Guianas*, Series A: Phanerogams, Fascicle 4 (148). **Gorts-Van Hoetz Scientific Books**, Koenigstein, p. 116. 1988.
- TAIZ, L.; EDUARDO Z. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- JAYAS, D.S. Storing grains for food security and sustainability. **Agric Res.**, 1, 21–24, 2012.
- JIANG, Z.; AKHTAR, Y.; BRADBURY, R.; ZHANG, X.; ISMAN, M. B. Comparative toxicity of essential oils of *Litsea pungens* and *Litsea cubeba* and blends of their major

- constituents against the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57, 4833–4837, 2009.
- KAROUSOU, R.; GRAMMATIKOPOULOS, G.; LANARAS, T.; MANETAS, Y., KOKKINI, S. Effects of enhanced UV-B radiation on *Mentha spicata* essential oils. **Phytochemistry**, 49, 2273–2277, 1998.
- KHALID, K.A., Influence of water stress on growth, essential oil and chemical composition of herbs (*Ocimum* sp.). **International Agrophysics**, 20, 289–296, 2006.
- KNAAK, N.; FIUZA, L.M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, 5, 120-132, 2010.
- KUMARI, R.; AGRAWAL, S. B.; SINGH, S.; DUBEY, N. K. Supplemental ultraviolet-B induced changes in essential oil composition and total phenolics of *Acorus calamus* L. (sweet flag). **Ecotoxicology and environmental safety**, 72, 2013–9, 2009.
- LI J.; OU-LEE, T.M; RABA, R.; AMUNDSON, R.G.; LAST, R.L. Arabidopsis mutants are hypersensitive to UV-B radiation. **Plant Cell**, 5, 171–179, 1993.
- MEIKLE W. G.; HOLST N.; MARKHAM R. H. Population simulation model of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in grains stores in West Africa. **Environmental Entomology**, 28, 836–844, 1999.
- MOLDENKE, H.N. Materials toward a monograph of the genus *Lippia* I. **Phytologia**, 12, 331–334, 1965.
- NEFFATI, M.; SRITI, J.; HAMDAOUI, G.; KCHOUK, M. E.; MARZOUK, B. Salinity impact on fruit yield , essential oil composition and antioxidant activities of *Coriandrum sativum* fruit extracts. **Food Chemistry**, 124, 221–225, 2011.
- NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresource Technology**, 101, 372-378, 2010.
- OPPERT, B.; MORGAN T.D.; KRAMER K.J. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin and protease inhibitors against coleopteran storage pests. **Pest management Science**, 5, 568-73, 2011.
- PESSOA, O.D.L.; CARVALHO, C.B.M.; SILVESTRE, J.O.V.L.; LIMA, M.C.L.; NETO, R.M.; MATOS, F.J.A.; LEMOS, T.L.G. Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia aff. gracillis*. **Fitoterapia**, 76, 712-714, 2005.
- PETROPOULOS, S. A.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M. G.; PASSAM, H. C. The effect of water deficit stress on the growth, yield and composition of essential oils of parsley. **Scientia Horticulturae**, 115, 393–397, 2008.
- PICHERSKY, E.; GERSHENZON J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, 5, 237-243, 2002.
- PIMENTELA, D.; CERASALEA, D.; STANLEYA, R.C.; PERLMANA, R.; NEWMANB, E.M.; BRENTA, L.C.; MULLANA, A.; TAI-I CHANGA, D. Annual vs. perennial grain production. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. 161, 1– 9, 2012.

RAO, B. R. R.. Biomass and essential oil yields of rainfed palmarosa *Cymbopogon martini* Roxb. Wats. var. *motia* Burk. supplied with different levels of organic manure and fertilizer nitrogen in semi-arid tropical climate. **Industrial Crops and Products**, 14, 171–178, 2001.

SILVA, W.J.; DÓRIA, G.A.A.; MAIA, R.T.; NUNES, R.S.; CARVALHO, G.A.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B.; MARCAL, R.M.; CAVALCANTI, S.C.H. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, 99, 3251–3255, 2008.

SIMAS, N.K.; LIMA, E.C.; CONCEIÇÃO, S.R.; KUSTER, R.M.; OLIVEIRA FILHO, A.M. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue - Atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, 27, 46-49, 2004.

SOUZA, S.A.M.; MEIRA, M. R.; FIGUEIREDO, L.S.; MARTINS, E.R. Óleos essenciais: aspectos econômicos e sustentáveis. **Enciclopédia Biosfera**, 6, 01-11, 2010.

TAIZ, L.; EDUARDO Z. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TAPONDJOU L. A.; ADLER C.; BOUDA H.; FONTEM D. A. Efficacy of powder and essential oil from *Chenopodium ambrosioides* leaves as post-harvest grain protectants against six stored-product beetles. **Journal of Stored Products Research**, 38, 395–402, 2002.

TEFERA, T.; KANAMPIU, F.; DE GROOTE, H.; HELLIN, J.; MUGO, S.; KIMENJU, S.; BEYENE, Y.; BODDUPALLI, P.M.; SHIFERAW, B.; BANZIGER, M. The metal silo: An effective grain storage technology for reducing post-harvest insect and pathogen losses in maize while improving smallholder farmers' food security in developing countries. **Crop Protection**, 30, 240-245, 2011.

TIWARI, B.K.; BRENNANB, C.S.; CURRANA, T.; GALLAGHER, E.; CULLEN, P.J.; O'DONNELL C.P. Application of ozone in grain processing. **Journal of Cereal Science**, 51, 248–255, 2010.

VIEGAS J.R. C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, 26, 390-400, 2003.

5. CONCLUSÃO GERAL

As práticas de cultivo não afetaram significativamente a composição dos OEs de *L. gracilis*. Contudo, pequenas variações na composição dos OEs resultaram em diferentes respostas biológicas de *S. zeamais*. De forma geral, os OEs de *L. gracilis* foram muito tóxicos a adultos de *S. zeamais* por fumigação. Grande parte desta toxicidade se deve ao seu composto majoritário carvacrol. As maiores toxicidades foram observadas nos OEs produzidos por plantas cultivadas na ausência de irrigação/adubação mineral e na presença de adubação orgânica. Adicionalmente, os OEs de *L. gracilis* e o carvacrol foram repelentes a adultos de *S. zeamais*. Assim, nossos resultados mostram o grande potencial do OE de *L. gracilis* e seu composto majoritário para o desenvolvimento de novos produtos e utilização em programas de manejo integrado de pragas de grãos armazenados.