



ELLISON ROSARIO DE OLIVEIRA

**TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Cymbopogon flexuosus E DO CITRAL PARA
Spodoptera frugiperda E SUAS ATIVIDADES
COLINESTERÁSICAS *in vitro***

LAVRAS - MG

2016

ELLISON ROSARIO DE OLIVEIRA

**TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon flexuosus* E DO
CITRAL PARA *Spodoptera frugiperda* E SUAS ATIVIDADES
COLINESTERÁSICAS *in vitro***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Bioatividade de Plantas Medicinais, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Geraldo Andrade de Carvalho

Coorientadora

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci

LAVRAS - MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Oliveira, Ellison Rosario de.

Toxicidade do óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* e do citral para *Spodoptera frugiperda* e suas atividades colinesterásicas *in vitro* / Ellison Rosario de Oliveira. – Lavras : UFLA, 2016.

70 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: Geraldo Andrade de Carvalho.

Bibliografia.

1. Lagarta-do-cartucho. 2. Óleo essencial. 3. Citral. 4. Acetilcolinesterase. 5. Produtos Naturais. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

ELLISON ROSARIO DE OLIVEIRA

**TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon flexuosus* E DO
CITRAL PARA *Spodoptera frugiperda* E SUAS ATIVIDADES
COLINESTERÁSICAS *in vitro***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 05 de agosto de 2015.

| | |
|---------------------------------------|---------------------|
| Dra. Dejana Santos Alves | UFLA |
| Dra. Lenira Viana Costa Santa-Cecília | EPAMIG Sul de Minas |
| Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci | UFLA |

Dr. Geraldo Andrade de Carvalho
Orientador

**LAVRAS - MG
2015**

*Ao Pai celeste, por ser fonte nunca bastante de inspiração, por sempre me
amparar em todos os momentos da minha vida e, principalmente,
naqueles quando eu mais preciso. E por sempre me abençoar,
mesmo quando não sou merecedor de tamanha dádiva.*

*Aos meus queridos pais, Helena e Benedito Oliveira, por serem alicerces da
minha vida, pelos ensinamentos e por sempre fazerem de tudo,
mesmo quando não podiam, para que eu gozasse
daquilo que a honestidade, o respeito ao próximo
e o suor de cada dia proporcionam.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela positividade que Ele sempre emana para a minha vida e por ser meu combustível na empreitada de cada dia ser uma melhor pessoa.

Aos meus pais, Helena e Benedito Oliveira, pelo espelho que são para mim em todos os âmbitos e por nunca medirem esforços para que alcançasse meus objetivos.

À minha irmã Ellen Oliveira, por sempre ter me apoiado nos estudos, pela força e companheirismo.

À minha esposa Bárbara, por me fazer um homem melhor a cada dia, pela sua paciência e compreensão, pelo exemplo de companheirismo que ela é. Por todas as tardes e noites em que ela esteve no laboratório me ajudando. Pela referência de garra, força e dedicação em buscar aquilo que se almeja. E, principalmente, por ela me fazer entender o que de fato é o Amor.

A todos os meus familiares, pelos ensinamentos e valores a mim transmitidos, que muito contribuíram para minha formação como cidadão. Em especial, aos meus avós Orcília e Benedito (*in memoriam*), pelo carinho, amor sem medida e por tornarem as férias escolares sempre mais divertidas, tenho certeza de que vocês torceram bastante e estão muito felizes. E à minha avó Aduzina, pelos seus ensinamentos, valores, conselhos, que até hoje ela transmite e por ser um canal de amor e honestidade, além de ser espelho para todos nós.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares (PPGPMAC) pela oportunidade concedida para que eu solidificasse a minha formação acadêmica, por meio da realização do Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Geraldo Andrade, pela amizade, paciência e, principalmente, pela oportunidade concedida para que eu pudesse beber da fonte chamada ciência.

À DeJane Alves, pela amizade, parceria, paciência, pelos ensinamentos transmitidos, que me fizeram trilhar pelo caminho das pedras, por ser exemplo de perseverança, dedicação e de que o trabalho sério rende os melhores frutos.

A todos os professores do PPGPMAC, em especial, aos professores José Eduardo e Suzan Bertolucci, pelo voto de confiança e pela oportunidade concedida.

Aos funcionários, motores desta Instituição, em especial à grande amiga e parceira Eliana Andrade (Léa) do Departamento de Entomologia, pelos agradáveis momentos de convivência (Tudo Nosso). Ao ilustre Luizinho, à dupla dinâmica Dico e Paulinho e à Annete do Horto de plantas medicinais.

Aos amigos e parças da República Papa Chibé, Igor e Anderson, pela amizade, pelos ótimos e harmoniosos momentos de convivência durante esta etapa. E, principalmente, por me aturarem durante este tempo. Levo- os em meus átrios e torço pelo sucesso de vocês (Paguem 10!).

Aos antigos moradores da República Papa Chibé e agregados, Luiz, Téo, Cilene, Adones, Fernando e Flávia pela amizade e bons momentos que compartilhamos.

Aos amigos, Daniel e Claubert, pela parceria, amizade e apoio na condução dos experimentos, vocês foram um dos alicerces nesta jornada.

Aos amigos do Clã TPC e do LM Team: Adam, Danilo, Deyvison, Diego, Marco, Marcos, Otiniel, Sérgio, pelo ótimo convívio que vocês me proporcionam, mesmo nessa “pequena distância” e pelas sempre descontraídas “resenhas” que acontecem quando estamos reunidos, mesmo que virtualmente.

Às amizades construídas durante o curso, pelos momentos de convivência e “resenhas” ao longo destes anos, em especial, à Giselly Motta

pelas apostilas que me emprestou lá em 2012; aos amigos da turma do Darce: Iberê, Alline e Lívia, pelos bons momentos de convívio nas horas vagas.

À minha amiga Juliana Salimena, pela amizade, pelos conselhos, pelos incontáveis momentos de risada e pela parceria que se perduram mesmo fora do ambiente acadêmico.

Aos amigos da Família Handebol Ufla/Lavras, pela amizade, cumplicidade e convívio desde 2013. Com vocês pude conhecer mais de Lavras e de Minas Gerais e desfrutar da ludicidade que esse maravilhoso esporte proporciona. Em especial, ao Treinador e Professor Flávio Lísias, por ter me concedido a oportunidade de fazer parte desta família.

Ao Professor Orlando Ohashi, pela amizade, por ter me apresentado o universo da pesquisa e, principalmente, por sempre ter me apoiado e ser exemplo de honestidade e perfil de um verdadeiro profissional.

E a todos que direta e indiretamente participaram desta etapa, e emanaram positividade para que eu lograsse êxito.

Meu sincero, muito Obrigado!

"All men are created equal. Some work harder in preseason."

Emmitt Smith

RESUMO

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é um inseto polífago, considerada uma importante praga de diversas culturas de importância agrícola, sendo, historicamente, controlada pela utilização do método químico e, atualmente, pela utilização de plantas geneticamente modificadas. No entanto, esses métodos de controle possibilitam a seleção de populações resistentes do inseto. Assim, os óleos essenciais de plantas são considerados como uma rica fonte de moléculas que podem possuir atividade biológica para artrópodes-praga. Na literatura, há vários estudos que comprovam que plantas do gênero *Cymbopogon* possuem ação inseticida sobre vários insetos-praga. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade inseticida do óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* (Steud.) Wats. (Poaceae) e de seu constituinte majoritário para *S. frugiperda*, assim como a atividade desses compostos para a inibição *in vitro* da enzima acetilcolinesterase. Inicialmente, o óleo essencial de *C. flexuosus* foi obtido de plantas cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras, Minas Gerais. Aos sete meses de cultivo das plantas, suas folhas foram coletadas para extração do óleo essencial pelo método de destilação por arraste a vapor. Com o bioensaio de concentração-mortalidade, determinou-se a concentração letal mediana (CL₅₀) que foi 1,35 mg.mL⁻¹ de dieta e o tempo letal mediano (TL₅₀) que foi de 18,85 horas. Assim, com a ocorrência de efeito letal pronunciado do óleo essencial, foi realizada a identificação dos constituintes químicos, na qual o citral (77,25%) foi identificado como constituinte majoritário. Em seguida, as concentrações CL₉₀ (2,053 mg.mL⁻¹), CL₅₀ (1,35 mg.mL⁻¹) e CL₂₀ (0,675 mg.mL⁻¹) do óleo essencial e as concentrações equivalentes a CL₉₀ (1,58 mg.mL⁻¹), CL₅₀ (1,042 mg.mL⁻¹) e CL₂₀ (0,521 mg.mL⁻¹) do citral foram adicionadas à dieta artificial e, logo, foram submetidas a ensaios biológicos com *S. frugiperda* para a determinação dos efeitos letal e subletal do óleo essencial e do citral. Foi registrada a ocorrência de quatro grupos congêneres, nos quais foi observado que o citral apresentou atividade inseticida para lagartas de *S. frugiperda* semelhante ao óleo essencial de *C. flexuosus*. Além disso, tanto o óleo essencial de *C. flexuosus* quanto o citral demonstraram atividade inibitória *in vitro* para a enzima acetilcolinesterase, na qual o citral necessitou de uma menor concentração (0,533 mg.mL⁻¹), em relação ao óleo essencial (0,841 mg.mL⁻¹), para inibir 50% da atividade da enzima. Dessa forma, pode-se concluir que óleo essencial de *C. flexuosus* é tóxico para lagartas de *S. frugiperda*, e a atividade inseticida está diretamente relacionada ao citral.

Palavras-chave: Lagarta-do-cartucho. Óleo essencial. Citral. Acetilcolinesterase. Produtos naturais.

ABSTRACT

The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) is a polyphagous insect, considered an important pest for many agricultural cultures. It is historically controlled by means of chemical method and, currently, by the use of genetically modified plants. However, these control methods allow the selection of resistant insect populations. Thus, essential oils extracted from plants are considered a rich source for molecules with arthropod pests biological activity. In literature, many studies prove that plants from the *Cymbopogon* genus present insecticide properties over many insect pests. Therefore, the objective of this work was to evaluate the insecticide properties of the essential oil extracted from *Cymbopogon flexuosus* (Steud.) Wats. (Poaceae) and its major constituent over *S. frugiperda*, as well as the activity of these compounds for the *in vitro* inhibition of enzyme acetylcholinesterase. Initially, the *C. flexuosus* essential oil was obtained from plants cultivated at the Medicinal Plant Garden at the Universidade Federal de Lavras, in the municipality of Lavras, Minas Gerais, Brazil. At seven months of cultivation, leaves were collected for extracting the essential oil by steam distillation. By means of the concentration-mortality bioassay, we determined the median lethal concentration (LC₅₀) of 1.35 mg.mL⁻¹ of diet, and the median lethal time (LT₅₀) of 18.85 hours. Thus, with the pronounced occurrence of lethal effect of the essential oil, we identified its chemical constituents, of which Citral (77.25%) was the major constituent. Subsequently, LC₉₀ (2.053 mg.mL⁻¹), LC₅₀ (1.35 mg.mL⁻¹) and LC₂₀ (1.58 mg.mL⁻¹) concentrations of the essential oil, and the equivalent concentration of LC₉₀ (1.58 mg.mL⁻¹), LC₅₀ (1.042 mg.mL⁻¹) and LC₂₀ (0.521 mg.mL⁻¹) of the Citral were added to the artificial diet and submitted to biological trials with *S. frugiperda* for determining the lethal and sublethal effects of the essential oil and Citral. The occurrence of four related groups was verified, in which Citral presented insecticide activity over *S. frugiperda* caterpillars, similar to what occurred with the *C. flexuosus* essential oil. Both *C. flexuosus* essential oil and Citral showed *in vitro* inhibitory activity over the enzyme acetylcholinesterase, for which Citral demanded lower concentration (0.533 mg.mL⁻¹) in relation to the essential oil (0.841 mg.mL⁻¹) to inhibit 50% of the enzyme activity. Thus, we conclude that *C. flexuosus* essential oil is toxic to *S. frugiperda* caterpillars, and the insecticide activity is directly associated to Citral.

Keywords: Fall Armyworm. Essential oil. Citral. Acetylcholinesterase. Natural products.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Danos causados pelo ataque de *S. frugiperda*: sinais de ataque da lagarta (a), ataques iniciais caracterizados pela raspagem e perfuração das folhas (b), lagarta se alimentando do pendão (c) e lagarta se alimentando da espiga do milho (d)24
- Figura 2 Ciclo biológico de *S. frugiperda*: Vista lateral de lagarta de *S. frugiperda* (esquerda) com Y invertido na parte frontal da cabeça (direita) (a), pupa de *S. frugiperda* (b), adultos de *S. frugiperda* (c) e ovos de *S. frugiperda* (d)25
- Figura 3 Estrutura do citral: neral (a) e geranial (b).....31
- Figura 4 Células de armazenamento de óleo essencial: secção transversal da folha de *C. flexuosus* cv. OD-19 apresentando célula de armazenamento de óleo essencial de cor vermelho (CO) identificando o local de acumulação de citral (A); secção transversal da folha de *C. flexuosus* quimiotipo mutante GRL-1 mostrando célula de óleo essencial incolor como indicação da ausência de citral (B).....32
- Figura 5 Curvas de sobrevivência para lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo diferentes concentrações do óleo essencial de *C. flexuosus* e os tratamentos controle. Em que: $S(t) = \exp(-(\text{tempo}/\delta)^\alpha)$, δ = parâmetro de forma; α = parâmetro de escala. Sendo: Grupo 1 = dieta acrescida de óleo essencial de *C. flexuosus* (2,25, 2,5 e 4,0 mg.mL⁻¹ de dieta); Grupo 2 = dieta acrescida de óleo essencial de *C. flexuosus* (1,5; 1,75 e 2,0 mg.mL⁻¹ de dieta); Grupo 3 = dieta acrescida de óleo essencial de *C. flexuosus* na faixa de concentração de 0,5 a 1,4 mg.mL⁻¹ de dieta); Grupo 4

= dieta acrescida de água e corante, e dieta acrescida de solução aquosa Tween[®] a 1%43

Figura 6 Curva de sobrevivência para lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo diferentes concentrações do óleo essencial de *C. flexuosus* e tratamentos controle. Em que: $S(t) = \exp(-(\text{tempo}/\delta)^\alpha)$, δ = parâmetro de forma; α = parâmetro de escala. Sendo: Grupo 1 = dieta acrescida de óleo essencial de *C. flexuosus* na concentração equivalente a CL₅₀ (1,35 mg.mL⁻¹ de dieta); Grupo 2 = dieta acrescida de óleo essencial de *C. flexuosus* na concentração equivalente a CL₂₀ (0,675 mg.mL⁻¹ de dieta); Grupo 3 = testemunhas dieta acrescida de água e corante alimentício, e dieta acrescida de solução aquosa Tween[®] a 1% e corante45

Figura 7 Sobrevivência de larvas com 48 horas de idade de *S. frugiperda* após exposição à dieta artificial contendo óleo essencial de *C. flexuosus* e seu constituinte majoritário puro (citril) em diferentes concentrações. Grupo 1: CL₉₀ (2,053 mg.mL⁻¹) do óleo essencial de *C. flexuosus* e CL₉₀ (1,58 mg.mL⁻¹) do citral. Grupo 2: CL₅₀ (1,35 mg.mL⁻¹) do óleo essencial de *C.* (1,042 mg.mL⁻¹). Grupo 3: CL₂₀ (0,675 mg.mL⁻¹) do óleo essencial de *C. flexuosus* e CL₂₀ (0,521 mg.mL⁻¹), do citral. Grupo 4: = testemunhas dieta acrescida de água e corante alimentício, e dieta acrescida de solução aquosa Tween[®] 80 a 1% e corante. Em que: $S(t) = \exp(-(\text{tempo}/\delta)^\alpha)$, δ = parâmetro de forma; α = parâmetro de escala.....47

Figura 8 Atividade inibitória da AChE do óleo essencial das folhas de *C. flexuosus* e do citral48

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Composição química do óleo essencial das folhas frescas de <i>C. flexuosus</i> | 41 |
| Tabela 2 | Duração do estágio larval (média \pm erro padrão) de <i>S. frugiperda</i> quando suas larvas com 48 horas de idade foram alimentadas com dieta artificial contendo óleo essencial de <i>C. flexuosus</i> | 46 |
| Tabela 3 | Porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase para o óleo essencial de <i>C. flexuosus</i> e para o citral..... | 49 |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 20 |
| 3 | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 21 |
| 3.1 | Importância econômica do milho <i>Zea mays</i> L..... | 21 |
| 3.2 | Aspectos gerais de <i>S. frugiperda</i> e seu controle | 22 |
| 3.3 | Metabólitos secundários | 27 |
| 3.4 | Óleos essenciais..... | 28 |
| 3.5 | <i>Cymbopogon flexuosus</i> (Steud.) Wats. (Poaceae) | 30 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 34 |
| 4.1 | Material vegetal..... | 34 |
| 4.2 | Extração do óleo essencial | 34 |
| 4.3 | Análise química do óleo essencial de <i>C. flexuosus</i> | 34 |
| 4.4 | Criação de <i>S. frugiperda</i> | 36 |
| 4.5 | Bioensaio com <i>S. frugiperda</i> | 36 |
| 4.5.1 | Determinação da resposta concentração-mortalidade para lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta contendo o óleo essencial de <i>C. flexuosus</i> | 37 |
| 4.5.2 | Efeito subletal do óleo essencial para <i>S. frugiperda</i> | 37 |
| 4.5.3 | Toxicidade do citral para <i>S. frugiperda</i> | 38 |
| 4.5.4 | Inibição da atividade enzimática da acetilcolinesterase | 39 |
| 4.6 | Análise estatística | 40 |
| 5 | RESULTADOS | 41 |
| 5.1 | Análise química do óleo essencial de <i>C. flexuosus</i> | 41 |
| 5.2 | Determinação da resposta concentração-mortalidade para lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta contendo o óleo essencial de <i>C. flexuosus</i> | 42 |
| 5.3 | Efeito subletal do óleo essencial para <i>S. frugiperda</i> | 44 |
| 5.4 | Toxicidade do citral para <i>S. frugiperda</i> | 46 |
| 5.5 | Inibição da atividade enzimática da acetilcolinesterase | 48 |
| 6 | DISCUSSÃO..... | 50 |
| 7 | CONCLUSÃO | 56 |
| | REFERÊNCIAS..... | 57 |

1 INTRODUÇÃO

Os lepidópteros destacam-se por constituírem a segunda ordem mais diversa de insetos, sendo que muitas espécies são consideradas pragas chaves de cultivos agrícolas e florestais (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011). Dentre as inúmeras espécies da ordem Lepidoptera, *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), comumente conhecida no Brasil como lagarta-do-cartucho. É considerado como um inseto polífago que causa danos econômicos a diversas culturas de interesse agrícola, principalmente, à cultura do milho, sorgo, arroz, algodão (BARROS et al., 2010; BUSATO et al., 2005; MURÚA et al., 2015; POGUE, 2002).

A lagarta-do-cartucho é nativa das Américas, onde encontra condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento. Devido ao seu comportamento migratório, é amplamente distribuída em vários países, com ocorrência destacada no Brasil e nos Estados Unidos (NAGOSHI; MEAGHER, 2008) e ocorrência ocasional até mesmo na China durante o verão (ZHANG et al., 2016).

Historicamente, esse lepidóptero ataca preferencialmente o cartucho das plantas de milho, consumindo grande parte da área foliar antes das folhas abrirem (CRUZ, 2008). Entretanto, os hábitos desse inseto têm apresentado mudanças e, atualmente, é encontrado atacando todos os estágios de desenvolvimento da planta (CRUZ et al., 2013).

Assim, o inseto vem sendo constatado atacando desde os primeiros estágios de desenvolvimento da planta (emergência), destruindo a região basal, podendo causar a morte da plântula e, em alguns casos, causando ataques na parte reprodutiva da planta (BUNTIN, 1986; WAQUIL et al., 1982). Tal mudança de comportamento deve-se à oferta de alimento constante tanto nas áreas produtivas quanto nas proximidades, em razão do cultivo intensivo de

culturas como milho, sorgo, algodão e outras, além do cultivo de plantas transgênicas, não havendo, assim, a interrupção do ciclo biológico do inseto, possibilitando sua reprodução durante todas as etapas de cultivo.

Nesse sentido, os danos causados pela lagarta-do-cartucho e outras pragas do complexo da cultura do milho geram uma perda de aproximadamente seis mil toneladas por ano, que oneram os custos e reduzem a produção da cultura (OLIVEIRA et al., 2014). Assim, levando em consideração que o Brasil é o 3º maior produtor e 2º maior exportador mundial de milho, com produção de cerca de 84,6 milhões de toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2016) é de suma importância o estudo de outras moléculas que possam ser empregadas para o controle desse inseto.

No que se refere ao controle de *S. frugiperda*, a alta taxa de infestação e os danos econômicos, que esse inseto causa, permitiram que houvesse uma dependência intensiva do método químico. No entanto, essa dependência histórica e o uso indiscriminado de diversas classes de inseticidas ocasionaram a seleção de populações resistentes desse inseto, reduzindo assim a eficiência dessa tecnologia (CARVALHO et al., 2013; DIEZ-RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001).

Atualmente, esse cenário tem mudado, existem alternativas de controle viáveis para *S. frugiperda* como o controle biológico por meio da liberação de inimigos naturais, tais como parasitoides de ovos de insetos-praga (PARRA; ZUCCHI, 2004). Apesar disso, atualmente, a estratégia mais utilizada para o controle de *S. frugiperda*, em diversas culturas agrícolas, tem sido a utilização de plantas geneticamente modificadas (WAQUIL et al., 2013). Todavia, já existem relatos da seleção de populações resistentes à essa tecnologia (STORER et al., 2010).

Assim, as substâncias produzidas pelo metabolismo secundário de plantas podem ser uma ferramenta promissora no controle de pragas, pois, em

sua maioria, são mais apropriados ambientalmente por possuírem menor toxicidade aos inimigos naturais e menor toxicidade ao homem em relação aos pesticidas sintéticos (ISMAN, 2006; REGNAULT-ROGER; VICENT; ARNASON, 2012; TAVARES et al., 2011).

Salienta-se que algumas classes de inseticidas sintéticos foram desenvolvidas por moléculas presentes em plantas. Dentre essas, destacam-se os carbamato, piretroides e os neonicotinoides que foram obtidos pelas alterações estruturais das moléculas que ocorrem naturalmente nas plantas das quais foram obtidos. Dessa forma, com moléculas oriundas do metabolismo secundário de plantas há a possibilidade de isolar aquelas com maior potencial inseticida para, assim, sintetizá-las e, posteriormente, comercializá-las. Ainda pode-se alterar a estrutura química de tais moléculas para que sejam mais estáveis, preservando dessa forma sua atividade contra artrópodes-praga (ISMAN, 2006).

Ressalta-se que, na literatura, são encontrados vários estudos acerca da atividade de metabólitos secundários de plantas sobre insetos pragas de interesse agrícola (BASKAR et al., 2011; HUMMELBRUNNER; ISMAN, 2001; ROEL et al., 2010), fomentando, dessa forma, mais pesquisas com o objetivo de encontrar moléculas com potencial inseticida, ou ainda verificar a atividade e a estabilidade dessas moléculas quando modificadas estruturalmente.

Nesse sentido, a utilização desses metabólitos é uma alternativa ecológica, para o controle de insetos-praga nos mais variados ambientes e, dentro dessa classe, são incluídos os óleos essenciais. Esses compostos possuem várias substâncias bioativas que podem reduzir o potencial de resistência a pragas devido à sua complexidade (ISMAN, 2006).

Nas últimas duas décadas, a atividade inseticida de óleos essenciais tem ganhado destaque no meio científico, devido esses metabólitos secundários possuírem uma complexa composição química, com uma ou mais substâncias ativas, o que pode possibilitar a atuação em diferentes sítios e em diferentes

estágios de desenvolvimento de um inseto alvo, sendo relatadas atividades fumigante, repelente, antialimentar ou reguladora de crescimento (AKHTAR et al., 2012; ENAN, 2001; ISMAN, 2000; SILVA et al., 2008).

Nesse aspecto, os gêneros botânicos capazes de elaborar compostos que constituem os óleos essenciais estão distribuídos em um número limitado de famílias como Apiaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Piperaceae, Poaceae, Rutaceae e Zingiberaceae (ENAN, 2001). Nesse âmbito, as espécies do gênero botânico *Cymbopogon*, pertencente à família Poaceae, são amplamente conhecidas por produzirem óleo essencial e pelas suas propriedades repelentes a insetos.

Dentre as espécies do gênero *Cymbopogon*, o *Cymbopogon flexuosus* (Steud.) Wats. (Poaceae) é uma espécie botânica conhecida como capim-limão da Índia oriental que produz elevada biomassa, podendo chegar a mais de 2 metros de altura (EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA - EPAGRI, 2004). É uma das plantas produtoras de óleo essencial mais cultivada em regiões tropicais e subtropicais da Índia, Indonésia, Madagascar, e países da África e América do Sul (GANJEWALA; LUTHRA, 2010), conhecida pelas suas atividades biológicas, por exemplo, a atividade inseticida para pragas de grãos armazenados (CABALLERO-GALLARDO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2012), insetos vetores de doença (TAWATSIN et al., 2001; TENNYSON et al., 2013; VERA et al., 2014), inclusive, contra pragas de oleaginosas (HERNÁNDEZ-LAMBRAÑO; CABALLERO-GALLARDO; OLIVERO-VERBEL, 2014). No entanto, não há relatos sobre sua ação contra *S. frugiperda*.

Levando-se em consideração os danos provocados por *S. frugiperda*, pesquisas com moléculas naturais visando ao seu controle são necessárias, pois o efeito inseticida de óleos essenciais para lepidópteros pragas ainda é pouco

explorado. Dessa forma, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a toxicidade aguda do óleo essencial de *C. flexuosus* e de seu constituinte majoritário para *S. frugiperda*, assim como avaliar, *in vitro*, seus potenciais efeitos inibitórios sobre a enzima acetilcolinesterase nesse inseto.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Extração do óleo essencial de *C. flexuosus* e análise qualitativa e quantitativa por meio de CG-EM;
- b) Determinar a resposta concentração-mortalidade do óleo essencial para lagartas de *S. frugiperda*;
- c) Analisar o efeito subletal causado pelo óleo essencial para lagartas de *S. frugiperda*;
- d) Avaliar a toxicidade do constituinte majoritário do óleo essencial para *S. frugiperda*;
- e) Estudar a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) pelo óleo essencial de *C. flexuosus* e do seu constituinte majoritário.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Importância econômica do milho *Zea mays* L.

O milho é uma gramínea pertencente à família Poaceae, tribo Maydeae, espécie *Zea mays* L. Tem sua origem ligada à América, mais provavelmente na região onde está situado o México e representa um dos principais cereais, sendo cultivado nos hemisférios norte e sul, em climas úmidos e regiões secas (PATERNIANI; CAMPOS, 1999; PATERNIANI; NASS; SANTOS, 2000), em praticamente todas as regiões do mundo (CONAB, 2014).

Em virtude de possuir alto potencial produtivo, constituição química que lhe confere valor nutritivo, o milho é um dos mais importantes cereais cultivados e consumidos no mundo. Esse cereal possui grande importância social e econômica, pois possibilita a geração de empregos nas zonas rurais e urbanas.

A cultura do milho gera diversos produtos largamente utilizados na alimentação humana, tanto na forma “in natura” como processada e para alimentação animal, sendo considerado o principal insumo para a produção de rações e de biocombustíveis como o etanol (FORNASIERI FILHO, 2007).

Salienta-se que o milho e seus derivados constituem-se em matéria-prima para vários segmentos da indústria, como, por exemplo, farmacêutica, têxtil, bebidas, cosméticos, papéis dentre outras (SILVA; BENEZ, 2005). No entanto, a maior parte da produção mundial (70%) é destinada à alimentação animal, sendo que nos Estados Unidos cerca de 36% é destinada a este fim, enquanto que, no Brasil, varia de 60 a 80% (DUARTE et al., 2010; FANCELLI; DOURADO NETO, 2004; UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2016).

Atualmente, o milho é cultivado em todo o território brasileiro e, devido aos avanços na tecnologia de produção, há cada vez mais áreas produtivas, sendo o Brasil um dos maiores exportadores do cereal (CRUZ et al., 2006). Na safra de 2013/2014, o Brasil alcançou uma produção total de 79,9 milhões de toneladas do cereal, ratificando sua posição como o 3º maior produtor mundial de milho, perdendo apenas para China e Estados Unidos (CONAB, 2014).

Todavia, o aumento de áreas produtivas do cereal e a ocorrência de duas safras durante o ano são um dos fatores que geram condições favoráveis para o ataque de pragas, durante todo o período de cultivo, e os agricultores geralmente utilizam com maior frequência o método químico (CRUZ, 2008; FARIAS et al., 2008), o que onera os custos de produção e aumenta a pressão de seleção de populações resistentes de artrópodes-pragas.

3.2 Aspectos gerais de *S. frugiperda* e seu controle

Das 30 espécies descritas no mundo do gênero *Spodoptera*, a metade é considerada praga de várias culturas de importância econômica (POGUE, 2002) e são amplamente distribuídas pelo mundo. A espécie *S. frugiperda*, popularmente conhecida como lagarta militar ou lagarta-do-cartucho, é considerada, historicamente, em todo o hemisfério ocidental como a principal praga da cultura do milho (CRUZ et al., 2013; DEQUECH et al., 2007; MENDES et al., 2011).

No entanto, atualmente, esse inseto causa danos em diversas culturas de interesse agrícola, sendo relatado por predação de arroz (BUSATO et al., 2005), amendoim (ISIDRO; ALMEIDA; PEREIRA, 1997), algodão (BARROS et al., 2010; HARDKE et al., 2015), e sorgo (MEAGHER; NAGOSHI, 2004), possuindo ampla distribuição na América Latina, Caribe e sul dos Estados

Unidos (BUSATO et al., 2005; NAGOSHI; MEAGHER; HAY-ROE, 2014; VIRLA et al., 2008).

É uma espécie polífaga que pode estar associada a 23 famílias botânicas (BUSATO et al., 2005), podendo infestar até 186 espécies de plantas dentro da sua zona de distribuição e ocorrência (CASMUZ et al., 2010). No Brasil ocorre em todas as regiões produtoras, tanto nos cultivos de verão quanto nos cultivos safrinha (FIGUEREDO; DIAS-MARTINS; CRUZ, 2006).

A lagarta-do-cartucho se alimenta de todas as fases de desenvolvimento da planta, como o cartucho de plantas jovens (Figura 1a) (CRUZ, 2008; GIOLO et al., 2002). Os insetos atacam já nos primeiros estádios de desenvolvimento da planta, destruindo a região basal do caule, podendo causar a morte da plântula (WAQUIL et al., 1982). Assim, após eclodirem, as lagartas se alimentam das partes mais tenras das folhas, raspando-as sem consumirem a epiderme membranosa da face inferior (Figura 1b). Quando as plantas estão mais desenvolvidas, as lagartas podem se alimentar do pendão (Figura 1c) e das espigas (Figura 1d), alimentando-se dos grãos em formação (CRUZ, 2008).

Após a primeira ecdise, as lagartas possuem aspecto esbranquiçado, com sombreamento dorsal marrom, possuindo cerca de 4 mm de comprimento. Nesse momento, as lagartas começam a raspar e/ou furar o limbo foliar, indo em direção ao cartucho da planta, onde permanecem até completar seu desenvolvimento larval. Quando bem desenvolvidas, as lagartas chegam a possuir cerca de 50 mm de comprimento, tendo duração do período larval variável de 12 a 30 dias (Figura 2a) (CRUZ, 2008).



Figura 1 Danos causados pelo ataque de *S. frugiperda*: sinais de ataque da lagarta (a), ataques iniciais caracterizados pela raspagem e perfuração das folhas (b), lagarta se alimentando do pendão (c) e lagarta se alimentando da espiga do milho (d)

Fonte: Moreira e Aragão (2009).

Após esse período, a lagarta penetra no solo e transforma-se em pupa, estágio esse que dura de 8 a 25 dias (Figura 2b). Por fim, a mariposa (Figura 2c), após realizar a cópula, faz sua postura na forma de aglomerado de ovos, formando uma massa que pode conter mais de 300 ovos (Figura 2d) (CRUZ, 2008).

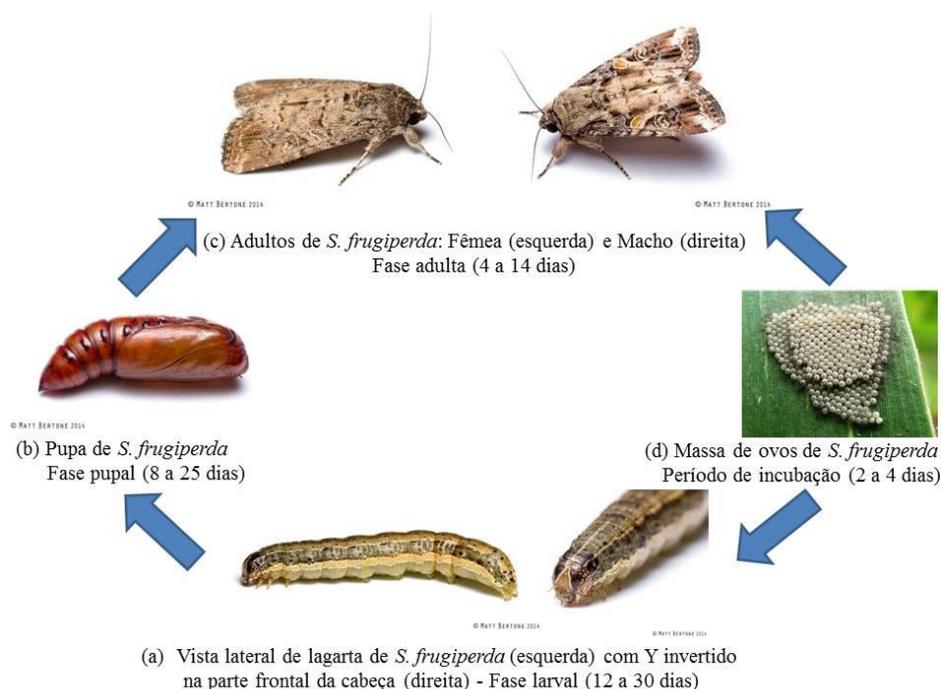


Figura 2 Ciclo biológico de *S. frugiperda*: Vista lateral de lagarta de *S. frugiperda* (esquerda) com Y invertido na parte frontal da cabeça (direita) (a), pupa de *S. frugiperda* (b), adultos de *S. frugiperda* (c) e ovos de *S. frugiperda* (d)

Fonte: Bertone (2015)

A redução nos rendimentos de grãos provocada pelo ataque desse inseto varia de 17,7 a 55,6%, de acordo com o estágio de desenvolvimento e dos genótipos de milho, sendo o estágio em que a planta possui de 8 a 10 folhas o mais sensível ao ataque da praga (CRUZ, 2008).

A lagarta-do-cartucho era controlada, geralmente, com inseticidas sintéticos, todavia com o uso inadequado dessa tecnologia aumenta os riscos de contaminação ambiental e eleva os custos de produção, muitas vezes não produzindo o efeito esperado para o controle desse inseto (BUSATO et al., 2005; MENDES et al., 2011). Além disso, estudos revelam que os pesticidas

sintéticos utilizados favoreceram a seleção de populações resistentes da praga em vários locais (DIEZ-RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001; VIRLA et al., 2008; YU; MCCORD JUNIOR, 2007).

Atualmente, a principal método de controle, inserido em programas de manejo integrado de pragas, é a utilização de plantas geneticamente modificadas que possuem proteínas inseticidas expressas pela bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner, representando cerca de 82,5% da área plantada de milho no Brasil (CÉLERES, 2015). No entanto, pesquisas já registraram, em condições de campo, a ocorrência de populações da lagarta-do-cartucho resistentes à proteína em Porto Rico (STORER et al., 2010) e no oeste da Bahia (FARIAS et al., 2014) comprovando, assim, a quebra de resistência à proteína.

Dessa forma, a busca por substâncias inseticidas que apresentem menor impacto sobre o ambiente e menor toxicidade a organismos não-alvo torna-se necessária. Nesse âmbito, nas últimas duas décadas, as pesquisas têm sido direcionadas para a descoberta de novos pesticidas ecologicamente seguros, em substituição aos pesticidas sintéticos tóxicos atuais (ISMAN, 2006; REGNAULT-ROGER; VICENT; ARNASON, 2012).

Nesse aspecto, inseticidas oriundos do metabolismo secundário das plantas são apontados como promissores agentes no controle de insetos pragas, pois possuem complexa constituição química o que possibilita a atuação dessas substâncias em diferentes sítios no inseto, menor toxicidade ao homem em relação aos pesticidas sintéticos (ISMAN, 2006; TAVARES et al., 2011) e podem ser seletivos a inimigos naturais (WERDIN GONZÁLEZ et al., 2013).

Sendo assim, pesquisas a respeito do metabolismo secundário de plantas possibilitam a descoberta de novas moléculas com potencial inseticida, para que sejam testadas para o controle de insetos pragas, possibilitando, dessa forma, a síntese de moléculas análogas com igual ou superior atividade inseticida.

3.3 Metabólitos secundários

As plantas possuem a capacidade de produzir, geralmente, uma variedade de compostos que desempenham um importante papel ecológico na regulação das interações entre plantas, microrganismos, insetos e outros animais, que são chamados metabólitos secundários, os quais são empregados na proteção ao ataque de herbívoros. As plantas sintetizam substâncias defensivas com propriedades tóxicas ou criam condições inibidoras para o desenvolvimento de patógenos (WITTSTOCK; GERSHENZON, 2002).

Os metabólitos secundários podem se acumular em concentrações variáveis de acordo com a espécie de planta. Esses compostos possuem diferenças estruturais e são encontrados em poucas famílias botânicas. Tais compostos foram ignorados, durante muito tempo, todavia, devido ao papel que esses desempenham nas plantas, várias pesquisas foram desenvolvidas, pois alguns desses compostos atuam na proteção das plantas à herbivoria e infecção microbiana, como atrativos para polinizadores e de dispersão de sementes por animais, como agentes alelopáticos e protetores contra raios UV (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; DEWICK, 2009).

O interesse na possível aplicação dessas substâncias para combater insetos e doenças que afetam a produção de alimentos resultou na busca de novas formulações de pesticidas (ISMAN, 2006). Para *S. frugiperda*, em estudo avaliando-se a eficiência de inseticidas naturais à base de nim, *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) e rotenona *Derris* sp. (Fabaceae) registrou-se eficiência semelhante a dos inseticidas à base de nim quando comparado ao um inseticida padrão, sugerindo dessa forma que inseticidas à base de nim podem ser utilizados como alternativa para o controle de *S. frugiperda* (LIMA et al., 2008).

3.4 Óleos essenciais

As plantas medicinais e aromáticas são conhecidas por produzirem vários metabólitos secundários com atividade biológica, dentre eles destacam-se os óleos essenciais. Os óleos essenciais são frações altamente voláteis naturais de composição complexa, lipofílicas, geralmente odoríferas, são límpidos, raramente coloridos, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos, com densidade geralmente mais baixa que a da água, constituídos principalmente de terpenos (terpenoides) e fenilpropanoides (SIMÕES et al., 2007).

Esses constituintes químicos que estão presentes nos óleos essenciais são classificados de acordo com sua origem biossintética. Os compostos do grupo dos terpenoides são sintetizados pela condensação de unidades pentacarbonadas, o difosfato de isopentenila (IPP), que, após sua síntese, é convertido em seu isômero difosfato de dimetilalila (DMAPP), pela enzima IPP isomerase, dando início assim à formação dos terpenos. A formação do IPP pode ocorrer por duas rotas biossintéticas: a via clássica ou via do mevalonato (MVA), responsável pela formação dos sesquiterpenos e triterpenos, que ocorre preferencialmente no citosol e cujos precursores são piruvato e acetilcoenzima A; e a via alternativa ou via do metileritritol fosfato (MEP), que origina os monoterpênicos, diterpenos e tetraterpenos, ocorrendo preferencialmente nos plastídeos e tem como precursores piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (AHARONI et al., 2006).

A união de uma molécula de IPP a uma molécula de DMAPP forma o difosfato de geranila (GPP), precursor dos monoterpênicos (C10). À medida que são adicionadas unidades de IPP é formado o difosfato de farnesila (FPP), precursor dos sesquiterpenos (C15) e o difosfato de geranyl geranila (GGPP), precursor dos diterpenos (C20). Essas estruturas são posteriormente modificadas por enzimas (hidroxilases, desidrogenases, redutases e glicosil, metil e acil

transferases), que juntas geram uma série de compostos diferentes originando os óleos essenciais (AHARONI et al., 2006).

São considerados como misturas naturais que podem conter, aproximadamente, 20–60 componentes em concentrações diferentes, caracterizando-se por apresentar 2 ou 3 constituintes majoritários que compõem 20-70% do óleo e o constituinte majoritário, em geral, é o responsável pela atividade do óleo. Quimicamente são compostos de hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpenos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos contendo enxofre em diferentes concentrações (BAKKALI et al., 2008; SIMÕES et al., 2007). A constituição química de óleos essenciais pode variar em qualidade e quantidade de acordo com a temperatura, a composição do solo, órgão de planta, idade e fase do ciclo vegetativo (BAKKALI et al., 2008; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

São armazenados em estruturas especializadas como células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae e Poaceae), bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae e Rutaceae), canais oleíferos (Apiaceae), células epidérmicas ou tricomas glandulares (Lamiaceae), nos quais não se distribuem de maneira homogênea na planta. Podem estar concentrados em órgãos anatômicos específicos, como folhas (capim-limão, eucalipto), cascas de caule (canela), rizomas (gengibre), dentre outros (SIMÕES et al., 2007).

Os compostos mais comuns em óleos essenciais são os monoterpenos e sesquiterpenos. Os monoterpenos são os mais representativos, constituindo 90% dos óleos essenciais e com uma grande variedade estrutural e funcional (BAKKALI et al., 2008). Esses compostos são alvos de inúmeros estudos como bioinseticidas, pois uma das principais finalidades destas classes de compostos é a proteção contra insetos-herbívoros em plantas (SIMÕES et al., 2007) e seus efeitos biológicos são o resultado de uma sinergia de algumas ou de todas as

moléculas, ou ainda apenas das principais moléculas presentes em níveis mais elevados, ou seja, do(s) componente(s) majoritário(s) (BAKKALI et al., 2008).

Na literatura, há registros de vários modos de ação de óleos essenciais e seus constituintes sobre artrópodes-praga, tais como: toxicidade por ingestão ou contato por meio da cutícula ou inalação de compostos voláteis, repelência, deterrência, redução do crescimento e fecundidade, rompimento da cutícula, além de atuarem sobre ciclos bioquímicos desses organismos como inibição da acetilcolinesterase e antagonista dos receptores de octopamina. Assim, os óleos essenciais podem atuar sobre vários sítios fisiológicos na mesma ou em diferentes fases de desenvolvimento dos insetos (AKHTAR et al., 2012; COPPING; MENN, 2000; ENAN, 2001; ISMAN, 2000; ISMAN; MIRESMAILLI; MACHIAL, 2011).

3.5 *Cymbopogon flexuosus* (Steud.) Wats. (Poaceae)

O gênero *Cymbopogon* pertence à família Poaceae, sendo originário do Sul Asiático, Sudeste Asiático e Austrália. Este gênero foi perfeitamente adaptado no Brasil e é comumente encontrado nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Pará, Pernambuco, Maranhão e da Bahia ao Rio de Janeiro. A espécie *C. flexuosus* é uma planta conhecida como capim-limão da Índia oriental, possui florescimento intenso durante os meses de inverno nas condições climáticas do Brasil (MAY et al., 2008) e produz elevada biomassa, podendo chegar a mais de 2 metros de altura (EPAGRI, 2004).

É uma das plantas produtoras de óleo essencial mais cultivada em regiões tropicais e subtropicais da Índia, Indonésia, Madagascar e países da África e América do Sul (GANJEWALA; LUTHRA, 2010). É uma espécie perene que pode ser cultivada em áreas irrigadas ou não e que ocorre, naturalmente, em áreas de floresta mista e ao longo das margens de rios e canais.

É utilizada também como cerca viva e como medida conservacionista no controle de erosão do solo (POUDEL; MIDMORE; WEST, 2000). A espécie também possui potencial para ser utilizada na produção de biocombustíveis (ZHELJAZKOV et al., 2011).

A espécie é cultivada como ornamental e aromática (CORRÊA; PENNA, 1984) e das suas folhas é extraído seu óleo essencial que é amplamente utilizado na indústria de alimentos e farmacêutica, perfumaria e cosmética. É também utilizada como repelente natural de insetos (GANJEWALA; LUTHRA, 2010) e, na medicina popular, ao seu óleo essencial são atribuídas atividades sedativas, digestivas, antirreumáticas, calmantes, antifebris, carminativas, estomáquicas, analgésicas, antiespasmódicas e antimicrobianas (CORRÊA JÚNIOR, 1991).

O constituinte majoritário do óleo essencial, geralmente, é o citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal), que é um aldeído alifático, formado pela mistura de dois monoterpenos acíclicos estereoisômeros, neral (*cis*-citral) e geranial (*trans*-citral) (Figura 3), com propriedades sedativas (VALE et al., 2002), antidepressivas (KOMORI et al., 1995), antifúngicas (ZHENG et al., 2015) e inseticida (KUMAR et al., 2013; PINTO et al., 2015; YANG; MA; ZHENG, 2005).

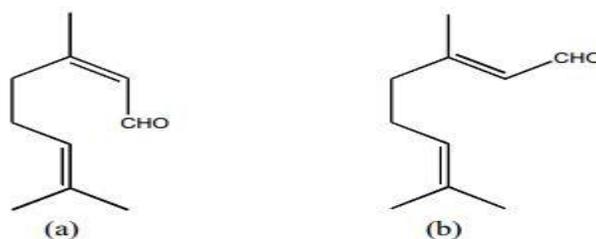


Figura 3 Estrutura do citral: neral (a) e geranial (b)

A localização histoquímica do óleo essencial e de seu constituinte majoritário (cital) em *C. flexuosus* foi observada, por meio de técnica de detecção de aldeídos (Reagente de Schiff), na qual células parenquimáticas especializadas localizadas na superfície adaxial do mesófilo foliar foram identificadas como responsáveis pelo armazenamento do óleo essencial (Figura 4) (LUTHRA; SRIVASTAVA; GANJEWALA, 2007).

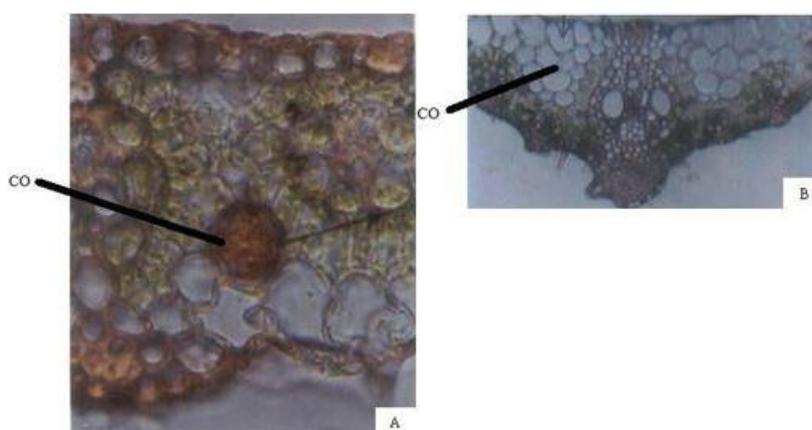


Figura 4 Células de armazenamento de óleo essencial: secção transversal da folha de *C. flexuosus* cv. OD-19 apresentando célula de armazenamento de óleo essencial de cor vermelho (CO) identificando o local de acumulação de citral (A); secção transversal da folha de *C. flexuosus* quimiotipo mutante GRL-1 mostrando célula de óleo essencial incolor como indicação da ausência de citral (B)

Fonte: Luthra, Srivastava e Ganjewala (2007).

No âmbito do controle de pragas, na literatura, há vários relatos sobre atividade biológica do óleo essencial de *C. flexuosus* a diversos organismos alvos. Guynot et al. (2003), Kumar et al. (2009) e Pandey, Rai e Acharya (2003) realizaram estudos comprovando a ação antifúngica desse óleo essencial. Agnolin, Olivo e Parra (2014), estudando a ação do óleo essencial de *C. flexuosus* *in vitro* e *in vivo* sobre o carrapato dos bovinos *Rhipicephalus*

(Boophilus) microplus (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae), mostraram que o óleo essencial possui ação carrapaticida. No que se refere à utilização do óleo essencial para insetos, Caballero-Gallardo, Olivero-Verbel e Stashenko (2012) relataram que o óleo essencial de *C. flexuosus* demonstrou efeito repelente para o besouro castanho *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) que é praga de grãos armazenados. *C. flexuosus* também apresentou atividade inseticida para larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) (TENNYSON et al., 2013; VERA et al., 2014), tendo como compostos majoritários geranial, neral e acetato geranil (VERA et al., 2014). Entretanto, apesar dos relatos da ação do óleo essencial de *C. flexuosus*, este é o primeiro trabalho com *S. frugiperda*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

As plantas de *C. flexuosus* foram cultivadas em solo com adubação orgânica (esterco bovino), na dose 3,0 Kg.m⁻², irrigadas, periodicamente, com espaçamento entre plantas de 45 cm, no Horto de Plantas Medicinais (21°14' 43 S 44 °59' 59 W), do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. No dia 5 de agosto de 2013, pela manhã, as folhas das plantas, com sete meses de idade, foram coletadas a 20 cm do solo.

4.2 Extração do óleo essencial

As folhas frescas de *C. flexuosus* foram submetidas à destilação por arraste a vapor, por uma hora e meia, em destilador de óleos essenciais Marconi MA480. O óleo essencial foi separado por decantação por 20 minutos e armazenado em freezer a -10°C, até as análises químicas e os ensaios biológicos.

4.3 Análise química do óleo essencial de *C. flexuosus*

Para a análise quantitativa do óleo essencial de *C. flexuosus*, foi utilizado Cromatógrafo Agilent® 7890A, operado com sistema de processamento de dados HP GC ChemStation ver. A.01.14, equipado com injetor/amostrador automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) e detector de ionização em chama de hidrogênio (CG-DIC). As amostras foram preparadas diluindo-se o óleo essencial em acetato de etila (1%, v/v). O volume de injeção foi de 1,0 µL, no modo *split* a uma razão de injeção de 50:1. Foi empregada coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m

de comprimento x 250 µm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 240°C. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, mantido por 1 minuto, seguido por uma rampa de temperatura de 3 °C/min até 240 °C, seguida de rampa de 10 °C/min até 250 °C, mantendo-se em condição isotérmica por 1 minuto. As concentrações dos constituintes foram expressas pela média da porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos ± o desvio padrão das 3 amostras analisadas.

As análises qualitativas foram realizadas em Cromatógrafo Agilent® 7890A, acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização por impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. As condições operacionais foram as mesmas empregadas nas análises por CG-DIC.

Os constituintes químicos das amostras foram identificados por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY - NIST, 2008). Além disso, foram comparados os índices de retenção da literatura Adams (2007) com os índices de retenção calculados com base na equação de Dool e Kratz (1963) relativos à coinjeção de uma solução padrão de n-alcenos (C₈-C₂₀, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e coinjeção com citral (mistura de neral e geranial com 95% de pureza) de referência (Sigma-Aldrich®).

4.4 Criação de *S. frugiperda*

Lagartas de *S. frugiperda*, com 48 horas de idade, provenientes da segunda postura de espécimes criadas em laboratório e alimentadas com dieta artificial, foram utilizadas para os experimentos. A dieta artificial foi constituída de feijão do grupo Carioca (166,66 g); gérmen de trigo (79,20 g); levedo de cerveja (50,70 g); ácido sórbico (1,65 g); ácido ascórbico (5,10 g); 4-hidroxibenzoato de metila (3,15 g); ágar (27,0 g); formaldeído (4,15 mL); solução inibidora de crescimento microbiano (4,15 mL) preparada com ácido propanoico (18,0 mL), ácido fosfórico (43,0 mL) e água (540,0 mL). Para o preparo da dieta, o feijão foi cozido com 1,5 L de água. As proporções de ingredientes supracitadas foram empregadas para o volume de 750 mL de água destilada, usada para dissolução do ágar, mais 750 mL de caldo de feijão, proveniente do cozimento do feijão (PARRA, 2001). Os adultos foram alimentados com solução aquosa de mel a 10%. Todos os insetos foram mantidos em sala climatizada a 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas.

4.5 Bioensaio com *S. frugiperda*

As lagartas de *S. frugiperda* foram criadas permanentemente, e aquelas referentes à segunda postura com 48 horas de idade foram utilizadas para a realização dos bioensaios.

4.5.1 Determinação da resposta concentração-mortalidade para lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta contendo o óleo essencial de *C. flexuosus*

O óleo essencial de *C. flexuosus*, nas faixas de concentração de 0,5 a 4,0 mg.mL⁻¹ de dieta, foi solubilizado em solução aquosa de Tween[®] 80 (Polissorbato 80, Sigma-Aldrich[®]) a 1% (20 mL) e incorporado em dieta artificial (200 mL) a 40°C. Com o objetivo de certificar-se de que houve a homogeneização da solução aquosa de Tween[®] 80 ao óleo essencial, foram adicionadas, com auxílio de pipeta de Pasteur, 10 gotas de corante alimentício (Arcólor[®]).

O delineamento foi inteiramente casualizado, composto pelo óleo essencial de *C. flexuosus* solubilizado em diferentes concentrações e pelas testemunhas: dieta acrescida de água e corante alimentício e dieta acrescida de solução aquosa Tween[®] 80 e corante, totalizando 14 tratamentos. A parcela experimental foi constituída por uma lagarta mantida de forma individualizada e trinta repetições. Foram seccionados pedaços de dieta de mesmo tamanho (1 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) e peso ($9 \pm 0,35$ g) e, posteriormente, transferidos para tubos de vidro (8 cm x 2,5 cm), nos quais foi introduzida uma lagarta com 48 horas de idade, previamente alimentada com dieta artificial sem adição de óleo essencial.

A sobrevivência dos insetos foi avaliada, diariamente, durante 11 dias, para a verificação da análise de sobrevivência.

4.5.2 Efeito subletal do óleo essencial para *S. frugiperda*

As concentrações referentes à concentração letal CL₂₀ (0,675 mg.mL⁻¹ de dieta) e CL₅₀ (1,35 mg.mL⁻¹ de dieta) de *C. flexuosus*, obtidas no bioensaio

anterior, foram utilizadas para a execução deste experimento. Os procedimentos referentes à solubilização do óleo essencial à solução aquosa de Tween[®] 80, incorporação do óleo essencial à dieta artificial e introdução das lagartas aos pedaços de dieta artificial em tubos de vidro, foram os mesmos descritos no item 2.4.1.

O bioensaio foi realizado em delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo os tratamentos: dieta acrescida de óleo essencial nas concentrações de 0,675 mg.mL⁻¹ de dieta (CL₂₀) e 1,35 mg.mL⁻¹ de dieta (CL₅₀) de dieta, e as testemunhas foram dieta acrescida de água e corante alimentício, e dieta acrescida de solução aquosa Tween[®] 80 e corante. Cada tratamento foi constituído por 120 repetições com uma lagarta por repetição, em que a parcela experimental foi constituída por uma lagarta mantida individualizada. O desenvolvimento dos insetos foi avaliado, diariamente, até a fase de pupa, registrando-se a sobrevivência larval, durante 11 dias a cada 24 horas, duração da fase larval e peso de pupa.

4.5.3 Toxicidade do citral para *S. frugiperda*

Neste bioensaio, foi utilizado o citral (mistura de neral e geranial com 95% de pureza) de referência (Sigma-Aldrich[®]), visto que foi o composto majoritário presente na constituição química do óleo essencial de *C. flexuosus*. O citral foi adicionado à dieta artificial de *S. frugiperda*, de acordo com o percentual desse composto, determinado na análise cromatográfica do óleo essencial, em três concentrações equivalentes à CL₂₀ (0,521 mg.mL⁻¹ de dieta), CL₅₀ (1,042 mg.mL⁻¹ de dieta) e CL₉₀ (1,58 mg.mL⁻¹ de dieta) obtidas previamente para o óleo essencial de *C. flexuosus*. A metodologia para diluição do citral à dieta artificial foi a mesma utilizada para o óleo essencial de *C. flexuosus*.

O bioensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, sendo composto por 8 tratamentos, sendo eles: CL₂₀ do óleo essencial (0,675 mg.mL⁻¹), CL₅₀ do óleo essencial (1,35 mg.mL⁻¹), CL₉₀ (2,053 mg.mL⁻¹) do óleo essencial, CL₂₀, CL₅₀ e CL₉₀ do citral, e as testemunhas foram dieta acrescida de água e corante alimentício, e dieta acrescida de solução aquosa Tween[®] 80 e corante. Cada tratamento foi constituído por 60 repetições, cada qual representada por uma lagarta de 48 horas de idade, mantida em tubo de vidro (8 cm x 2,5 cm), contendo dieta artificial de mesmo tamanho (1 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura), incorporada com os referidos tratamentos.

4.5.4 Inibição da atividade enzimática da acetilcolinesterase

A atividade inibitória da acetilcolinesterase foi determinada conforme metodologia descrita por Aazza, Lyoussi e Miguel (2011) com modificações. Para isso, 4,25 µL de tampão Tris-HCl (0,1M, pH = 8) e 25 µL do composto teste (óleo essencial ou citral) foram dissolvidos em etanol, em diferentes concentrações 0,01 a 2,24 mg.mL⁻¹, para o óleo essencial e para o citral. Posteriormente, foram adicionados 25 µL da enzima AChE (0.22 U/mL) (Sigma-Aldrich[®]) e homogeneizado. Após a incubação a 37°C por 15 minutos, 75 µL do substrato de iodeto de acetilcolina (Sigma-Aldrich[®]) a 15 mM e 475 µL de ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) a 3 mM (Sigma-Aldrich[®]) foram adicionados e a solução resultante foi incubada à temperatura ambiente durante 30 minutos. O mesmo procedimento foi realizado para o controle positivo, um produto comercial à base de metomil, que foi realizado para o controle negativo (etanol). As soluções foram transferidas para microplacas e a absorbância das soluções foi medida a 405 nm em leitor de microplacas de leitura TECAN Infinite[®] M200 PRO. O efeito inibitório da atividade enzimática foi calculado por comparação com o controle negativo: % = [(A0-A1)/A0] × 100, sendo A0 a

absorbância do controle negativo e A1 a absorbância da amostra teste. Cada teste foi realizado em triplicata.

4.6 Análise estatística

Os dados de sobrevivência foram submetidos à análise de sobrevivência, aplicando-se o modelo de Weibull, por meio do pacote Survival (THERNEAU, 2014) do software R[®] (R CORE TEAM, 2014). Após a seleção do modelo matemático mais adequado, por meio da análise de resíduos, foi realizada a análise de contraste, para verificar a semelhança entre os tratamentos empregados com vista à formação de grupos congêneres, sendo calculado o tempo letal mediano (TL₅₀) para cada grupo formado.

Para determinação da resposta concentração-mortalidade, os dados de sobrevivência obtidos, 72 horas após o início do bioensaio, foram submetidos à análise de Logit, usando-se o pacote drc (RITZ; STREIBIG, 2013) do *software* R[®] (R CORE TEAM, 2014).

Os dados referentes à duração do período larval e peso de pupas foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e, em seguida, ao teste de comparações múltiplas utilizando o software R[®] (R CORE TEAM, 2014) e o pacote Pgirmess (GIRAUDOUX, 2015).

5 RESULTADOS

5.1 Análise química do óleo essencial de *C. flexuosus*

Por meio da CG-EM foi constatada a presença de 21 constituintes no óleo essencial de *C. flexuosus* correspondentes ao percentual de 90,57% de sua composição química. Os constituintes majoritários do óleo essencial de *C. flexuosus* foram neral (*Z*-citral) 32,59% e geranial (*E*-citral) 44,65% e esses monoterpenos isoméricos totalizaram 77,25% desse óleo essencial, enquanto os demais compostos somaram 13,32% do conteúdo total do óleo (Tabela 1).

Tabela 1 Composição química do óleo essencial das folhas frescas de *C. flexuosus*

| | COMPOSTO | TR | IR* | AREA % |
|----|-------------------------------|--------|------|--------|
| 1 | 5-Hepten-2-one, 6-methyl- | 7,820 | 985 | 1,58 |
| 2 | Mirceno | 7,971 | 990 | 0,45 |
| 3 | Óxido de <i>Tras</i> -linalol | 11,711 | 1088 | 0,14 |
| 4 | Linalol | 12,171 | 1100 | 2,79 |
| 5 | Exo-isocitral | 14,127 | 1144 | 0,42 |
| 6 | Photocitral A | 14,345 | 1149 | 0,38 |
| 7 | Citronelal | 14,493 | 1152 | 0,29 |
| 8 | <i>Z</i> -isocitral | 15,003 | 1164 | 0,98 |
| 9 | <i>E</i> -isocitral | 15,815 | 1182 | 1,28 |
| 10 | Estragole | 16,513 | 1198 | 0,35 |
| 11 | n-decanal | 16,843 | 1205 | 0,42 |
| 12 | Neral | 18,523 | 1242 | 32,59 |
| 13 | Geraniol | 19,061 | 1254 | 0,93 |
| 14 | Geranial | 19,897 | 1273 | 44,65 |
| 15 | Ácido nerólico | 22,168 | 1323 | 0,54 |
| 16 | Ni <i>m/z</i> = 168 | 22,850 | 1339 | 2,31 |

“Tabela 1, conclusão”

| | COMPOSTO | TR | IR* | AREA % |
|----|------------------------------|--------|------|--------|
| 17 | Acido Gerânico | 23,939 | 1363 | 0,18 |
| 18 | Ni $m/z = 169$ | 24,479 | 1375 | 3,41 |
| 19 | Geranyl Acetate | 24,882 | 1384 | 1,92 |
| 20 | Ar-Curcumeno | 29,165 | 1483 | 0,46 |
| 21 | Sandacopimara-8(14),15-dieno | 47,356 | 1966 | 0,22 |

TR= tempo de retenção; *IR= índice de retenção calculado relativo à série n-alcanos (C8-C20) em coluna HP-5MS na ordem de eluição;

Ni = composto não identificado

5.2 Determinação da resposta concentração-mortalidade para lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta contendo o óleo essencial de *C. flexuosus*

O óleo essencial de *C. flexuosus* apresentou atividade inseticida por ingestão para lagartas de *S. frugiperda*. Pela análise de sobrevivência de lagartas de *S. frugiperda*, alimentadas com dieta contendo óleo essencial da referida espécie botânica, foi constatada a formação de quatro grupos congêneres. O grupo 1 englobou as lagartas alimentadas com dieta, contendo óleo essencial nas concentrações 2,25, 2,5 e 4,0 mg.mL⁻¹ de dieta com TL₅₀ de 18,85 horas. O grupo 2 foi formado pelos tratamentos nas concentrações 1,5; 1,75 e 2,0 mg.mL⁻¹ de dieta, com TL₅₀ de 106,5 horas. O grupo 3 foi formado pelos tratamentos na faixa de concentração de 0,5 a 1,4 mg.mL⁻¹ de dieta, os quais apresentaram TL₅₀ superior às 264 horas de avaliação. As testemunhas dieta, acrescida de água e corante alimentício, e dieta acrescida de solução aquosa Tween[®] 80 a 1% e corante formaram o grupo 4, apresentando TL₅₀ superior às 264 horas de avaliação (Figura 5).

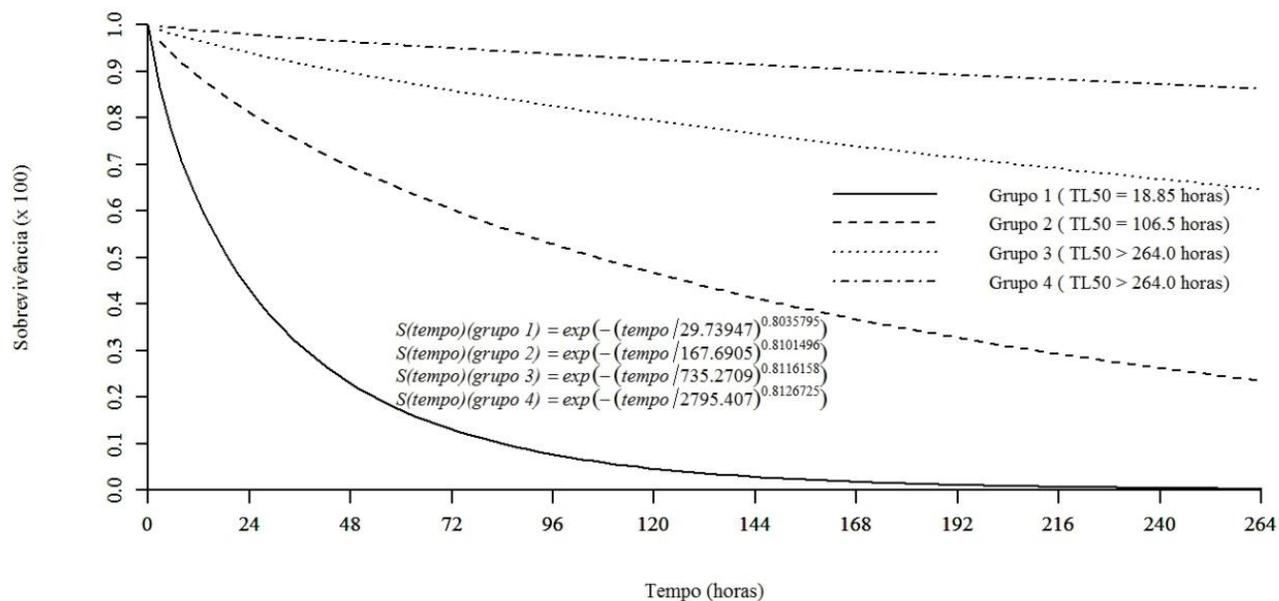


Figura 5 Curvas de sobrevivência para lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo diferentes concentrações do óleo essencial de *C. flexuosus* e os tratamentos controle. Em que: $S(t) = \exp(-(\text{tempo}/\delta)^\alpha)$, δ = parâmetro de forma; α = parâmetro de escala. Sendo: Grupo 1 = dieta acrescida de óleo essencial de *C. flexuosus* (2,25, 2,5 e 4,0 mg.mL⁻¹ de dieta); Grupo 2 = dieta acrescida de óleo essencial de *C. flexuosus* (1,5; 1,75 e 2,0 mg.mL⁻¹ de dieta); Grupo 3 = dieta acrescida de óleo essencial de *C. flexuosus* na faixa de concentração de 0,5 a 1,4 mg.mL⁻¹ de dieta); Grupo 4 = dieta acrescida de água e corante, e dieta acrescida de solução aquosa Tween® a 1%

A determinação da CL_{50} , concentração estimada capaz de provocar morte de 50% da população, foi realizada após 72 horas de alimentação das lagartas com a dieta artificial contendo óleo essencial de *C. flexuosus*. Assim, a CL_{50} foi de $1,33 \pm 0,05$, com limite inferior (LI) de 1,21 e limite superior (LS) de $1,45 \text{ mg.mL}^{-1}$ de dieta ($\chi^2 = 395,68$; $df = 351$; $p = 0,1088$). A CL_{90} foi estimada em $2,81 \pm 0,26 \text{ mg.mL}^{-1}$ de dieta (LI = 2,29; LS = 3,32), e a CL_{20} estimada foi de $0,84 \pm 0,06 \text{ mg.mL}^{-1}$ de dieta (LI = 0,7; LS = 0,96).

5.3 Efeito subletal do óleo essencial para *S. frugiperda*

Com base na análise de sobrevivência de lagartas de *S. frugiperda*, alimentadas com dieta contendo óleo essencial de *C. flexuosus*, foi registrada a formação de três grupos congêneres. O grupo 1 foi formado pelo tratamento constituído pela dieta artificial acrescida do óleo essencial em concentração equivalente a CL_{50} ($1,35 \text{ mg.mL}^{-1}$ de dieta), o qual causou mortalidade de 65,83% para as lagartas de *S. frugiperda*, durante as 264 horas de avaliação, registrando tempo letal (TL_{50}) de 102,6 horas (Figura 2). O grupo 2 foi formado pelo tratamento referente à concentração de $0,675 \text{ mg.mL}^{-1}$ (CL_{20}) do óleo essencial, a mortalidade registrada foi de 29,17% (Figura 3), em que a TL_{50} foi maior que 264 horas. As testemunhas dieta acrescida de água e corante alimentício, e dieta acrescida de solução aquosa Tween[®] 80 a 1% e corante não se diferiram estatisticamente entre si, formando assim o grupo 3, com média de 94% de sobrevivência (Figura 6), e apresentaram, também, tempo letal (TL_{50}) maior que as 264 horas.

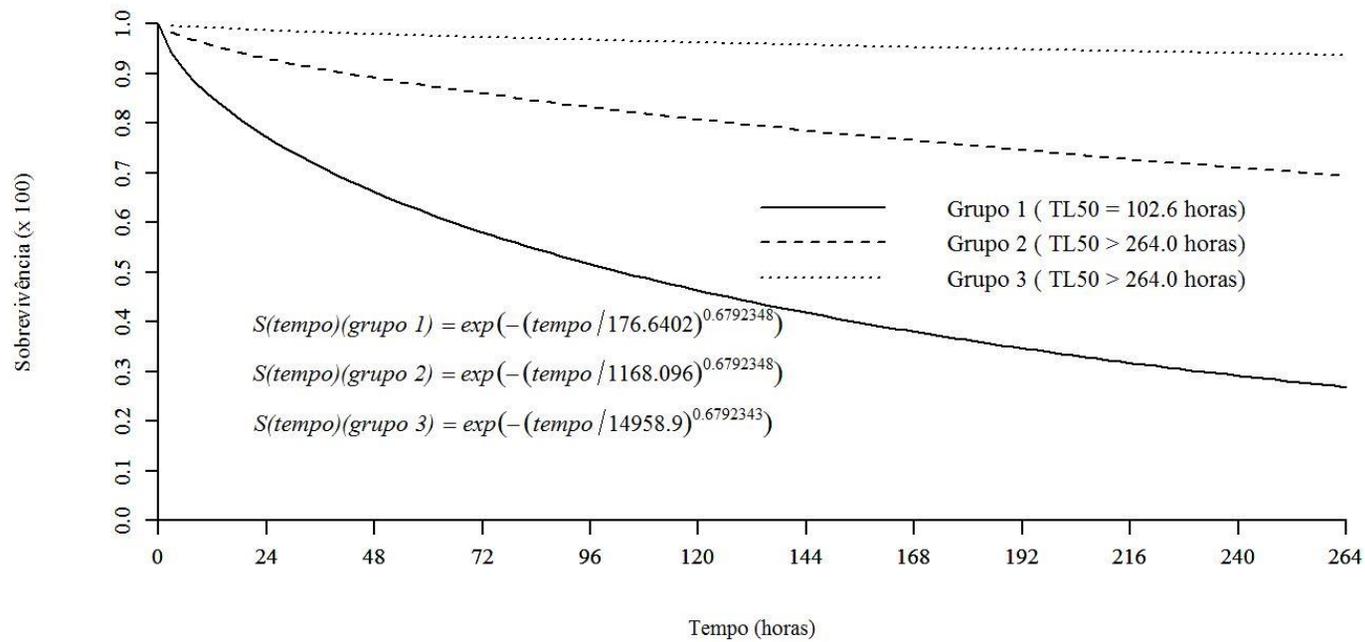


Figura 6 Curva de sobrevivência para lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo diferentes concentrações do óleo essencial de *C. flexuosus* e tratamentos controle. Em que: $S(t) = \exp(-(\text{tempo}/\delta)^\alpha)$, δ = parâmetro de forma; α = parâmetro de escala. Sendo: Grupo 1 = dieta acrescida de óleo essencial de *C. flexuosus* na concentração equivalente a CL_{50} ($1,35 \text{ mg.mL}^{-1}$ de dieta); Grupo 2 = dieta acrescida de óleo essencial de *C. flexuosus* na concentração equivalente a CL_{20} ($0,675 \text{ mg.mL}^{-1}$ de dieta); Grupo 3 = testemunhas dieta acrescida de água e corante alimentício, e dieta acrescida de solução aquosa Tween[®] a 1% e corante

O óleo essencial de *C. flexuosus* interferiu, significativamente, no desenvolvimento das lagartas de *S. frugiperda* prolongando seu o estágio larval. Para as lagartas que foram alimentadas com dieta artificial, contendo óleo essencial na concentração equivalente à CL₅₀ e CL₂₀, foi observada prolongação no estágio larval, podendo ser até 23% maior em relação às testemunhas. No entanto, para o peso das pupas, não houve diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2 Duração do estágio larval (média ± erro padrão) de *S. frugiperda* quando suas larvas com 48 horas de idade foram alimentadas com dieta artificial contendo óleo essencial de *C. flexuosus*

| Tratamento | Período larval (dias) | Peso de pupa (mg) ^{ns} |
|--|-----------------------|---------------------------------|
| Água + Corante | 16,90±0,16 a | 243,83±2,25 |
| Água + Corante + Tween [®] 80 a 1% | 17,32±0,14 a | 243,12±2,75 |
| <i>C. flexuosus</i> – 0,675 mg.mL ⁻¹ de dieta | 18,36±0,37 b | 242,17±3,32 |
| <i>C. flexuosus</i> – 1,35 mg.mL ⁻¹ de dieta | 20,85±0,72 c | 241,81±4,25 |
| <i>p</i> ≤ 0,05 | 0,0000 | 0,0855 |
| F | 24,472 | 0,968 |
| Df | 3 | 3 |

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott (*p* ≤ 0,05%). ^{ns} Valores não se diferenciaram estatisticamente.

5.4 Toxicidade do citral para *S. frugiperda*

O citral apresentou atividade inseticida para lagartas de *S. frugiperda* semelhante ao óleo essencial de *C. flexuosus*, causando alta mortalidade. Por meio da análise de sobrevivência, foi verificada a formação de quatro grupos congêneres, em que o grupo 1 foi formado pelos tratamentos CL₉₀ do óleo essencial de *C. flexuosus* (2,053 mg.mL⁻¹) e CL₉₀ do citral (1,58 mg.mL⁻¹) com TL₅₀ de 44,5 horas, sendo registrada mortalidade acumulada de 93%. O grupo 2

foi composto pelos tratamentos CL₅₀ do óleo essencial de *C. flexuosus* (1,35 mg.mL⁻¹) e CL₅₀ do citral (1,042 mg.mL⁻¹), apresentando TL₅₀ de 120,5 horas, com mortalidade acumulada de 71%. Ao passo que o grupo 3 foi constituído pelos tratamentos CL₂₀ do óleo essencial de *C. flexuosus* (0,675 mg.mL⁻¹) e CL₂₀ do citral (0,521 mg.mL⁻¹), no entanto esse grupo apresentou TL₅₀ maior que 264 horas, sendo registrada sobrevivência de 69,9%. As testemunhas dieta acrescida de água e corante alimentício, e dieta acrescida de solução aquosa Tween[®] 80 formaram o grupo 4 com sobrevivência acumulada de 98,33% (Figura 7).

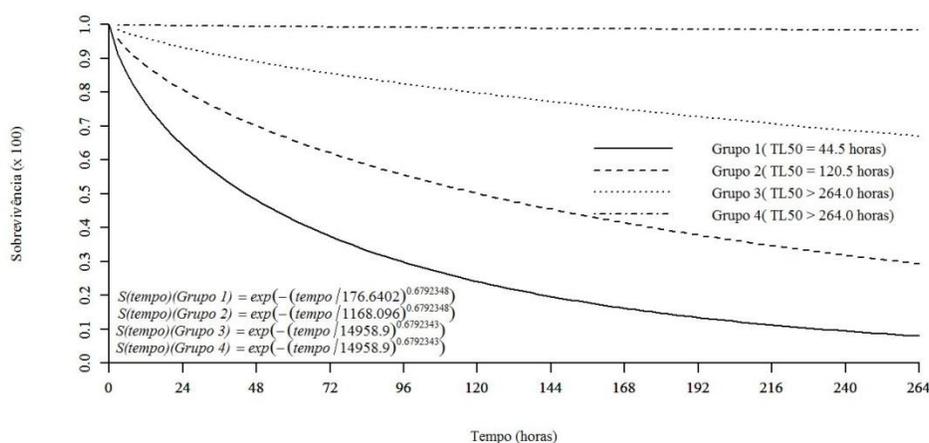


Figura 7 Sobrevivência de larvas com 48 horas de idade de *S. frugiperda* após exposição à dieta artificial contendo óleo essencial de *C. flexuosus* e seu constituinte majoritário puro (citral) em diferentes concentrações. Grupo 1: CL₉₀ (2,053 mg.mL⁻¹) do óleo essencial de *C. flexuosus* e CL₉₀ (1,58 mg.mL⁻¹) do citral. Grupo 2: CL₅₀ (1,35 mg.mL⁻¹) do óleo essencial de *C. flexuosus* (1,042 mg.mL⁻¹). Grupo 3: CL₂₀ (0,675 mg.mL⁻¹) do óleo essencial de *C. flexuosus* e CL₂₀ (0,521 mg.mL⁻¹), do citral. Grupo 4: = testemunhas dieta acrescida de água e corante alimentício, e dieta acrescida de solução aquosa Tween[®] 80 a 1% e corante. Em que: $S(t) = \exp(-(\text{tempo}/\delta)^\alpha)$, δ = parâmetro de forma; α = parâmetro de escala

5.5 Inibição da atividade enzimática da acetilcolinesterase

Tanto o óleo essencial de *C. flexuosus* quanto seu constituinte majoritário (cital) causou inibição de acetilcolinesterase em ensaio realizado *in vitro* (Figura 8). Para o óleo essencial, a concentração média requerida para inibir a atividade de acetilcolinesterase em 50% (IC₅₀), foi de 0,84 mg.mL⁻¹. Para o citral, a IC₅₀ foi de 0,523 mg.mL⁻¹ (Tabela 3).

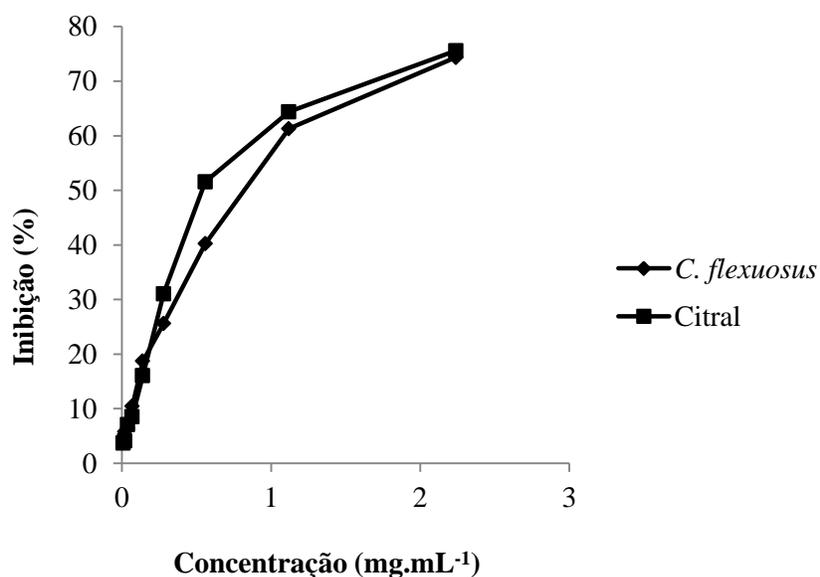


Figura 8 Atividade inibitória da AChE do óleo essencial das folhas de *C. flexuosus* e do citral

Tabela 3 Porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase para o óleo essencial de *C. flexuosus* e para o citral

| Concentração (mg.mL ⁻¹) | % de Inibição ± Dp <i>C. flexuosus</i> | % de Inibição ± Dp Citral |
|--|---|------------------------------|
| 0,01 | 3,88 ± 2,14 | 3,70 ± 0,51 |
| 0,02 | 5,81 ± 0,91 | 4,11 ± 0,99 |
| 0,04 | 6,41 ± 1,11 | 7,05 ± 0,28 |
| 0,07 | 10,48 ± 1,57 | 8,55 ± 0,24 |
| 0,14 | 18,71 ± 0,05 | 16,08 ± 0,86 |
| 0,28 | 25,59 ± 0,67 | 31,06 ± 0,52 |
| 0,56 | 40,22 ± 0,15 | 51,57 ± 0,77 |
| 1,12 | 61,30 ± 0,21 | 64,40 ± 0,36 |
| 2,24 | 74,36 ± 0,37 | 75,57 ± 0,56 |

Dp: Desvio padrão

6 DISCUSSÃO

A atividade inseticida de óleos essenciais do gênero *Cymbopogon* sobre lepidópteros-praga ainda é pouco explorada (JIANG et al., 2009; LABINAS; CROCOMO, 2002), sendo este o primeiro estudo sobre a atividade inseticida do óleo essencial de *C. flexuosus* para *S. frugiperda*. A atividade inseticida, constatada nesse trabalho, pode ser atribuída ao citral, presente majoritariamente na constituição química do óleo essencial.

O óleo essencial de *C. flexuosus*, geralmente, expressa como compostos majoritários os aldeídos geranial e neral, que juntos formam o citral, podendo variar em conteúdo de acordo com a origem da planta. O conteúdo registrado de citral (77,25%), no presente estudo, foi relativamente menor em relação a alguns estudos na literatura científica. Adukwu, Allen e Phillips (2012) identificaram 10 componentes (91,6%) do óleo essencial de *C. flexuosus* e, também, verificaram o citral (80%) como composto majoritário. Ahmad e Viljoen (2015), utilizando CG-EM, identificaram 7 componentes para *C. flexuosus* correspondentes a 93,5% da constituição química do óleo essencial tendo citral (79%) e geraniol (6,1%) como principais componentes. Ao passo que Silva et al. (2015), utilizando as mesmas condições das utilizadas neste estudo, identificaram 20 componentes (97,69%), tendo também como composto majoritário o citral (80,26%).

No entanto, os resultados encontrados no presente trabalho foram maiores do que os reportados por Anaruma et al. (2010), por meio da mesma técnica, identificaram 30 componentes e observaram que os componentes majoritários foram o transgeraniol (27,02%), citronelal (23,3%), nerol (13,47%), citral (22,24%). De forma análoga, Vera et al. (2014), também, encontraram menores teores dos principais componentes químicos, sendo identificados apenas 5 componentes, dentre eles citral (65,7%) e acetato de geraniol (10%)

foram os componentes mais representativos. Dessa forma, com base na análise qualitativa dos principais constituintes químicos, presentes no óleo essencial de *C. flexuosus*, pode-se afirmar que a constituição química, observada no presente estudo, corrobora com os estudos que constam na literatura científica para *C. flexuosus*.

As diferenças na composição química quantitativa de *C. flexuosus*, observadas neste estudo em relação aos trabalhos reportados, podem ser explicadas devido à variação no genótipo, origem geográfica, fatores ambientais, ao estágio de desenvolvimento da planta, época de colheita, tipo de adubação e à forma de obtenção do óleo essencial (BAKKALI et al., 2008; GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Verifica-se que plantas de uma mesma espécie, mas de origens diferentes, podem expressar diferentes padrões de metabólitos. Dessa forma, para a obtenção de óleos essenciais de composição química constante, é necessário que esse seja extraído, sob as mesmas condições (método de extração), com base em um mesmo órgão da planta, mesmas condições de cultivo (solo e clima) e que seja colhido/extraído na mesma estação do ano.

No corrente estudo, a ação do óleo essencial de *C. flexuosus* ocasionou alta mortalidade para lagartas de *S. frugiperda*, em que a mortalidade registrada para as lagartas foi dependente da concentração. Tal mortalidade pode ser atribuída à funcionalidade molecular dos compostos presentes no óleo essencial que majoritariamente foram monoterpênicos acíclicos. A rápida atividade inseticida, registrada para as maiores concentrações, pode ser atribuída a uma interação desses compostos com sítios de ação no sistema nervoso das lagartas. Estudos com monoterpênicos de óleos essenciais mostraram que a toxicidade em insetos é mediada por mecanismos neurológicos (LEE; PETERSON; COATS, 2002; RYAN; BYRNE, 1988).

Salienta-se que as espécies do gênero *Cymbopogon* são amplamente conhecidas pela sua atividade inseticida (MOORE et al., 2007; NERIO;

OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010; TRONGTOKIT et al., 2005). Labinas e Crocomo (2002) avaliaram a ação inseticida do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowit (Poaceae) para *S. frugiperda* e concluíram que o óleo essencial possui propriedades inseticida e repelente para esse inseto e sugeriram que ação do óleo essencial pode ser devido à estrutura do monoterpene presente na sua constituição química. Segundo os autores, o nível de saturação (dupla ligação) e o grupo funcional presentes nas moléculas influenciam a penetração dessas substâncias pela cutícula do inseto. Em outro estudo, foi relatado que o óleo essencial de *C. winterianus* possui efeito inseticida para *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) nas fases de ovo, pupa e adulto. Os autores relacionaram tais efeitos ao composto majoritário, o citral, sendo a mortalidade de pupas relacionada à interrupção metabólica, devido a uma possível obstrução dos espiráculos ou ainda pela penetração dos canais traqueais (COLPO; JAHNKE; FÜLLER, 2014).

Na literatura, há vários relatos sobre atividade biológica do óleo essencial de *C. flexuosus* a diversos insetos-alvo. Estudos com óleo essencial de *C. flexuosus* comprovaram atividade inseticida para larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) (TENNYSON et al., 2013; VERA et al., 2014), em que tal atividade foi atribuída à toxicidade dos compostos majoritários, geranial e neral, presentes na constituição química dos óleos essenciais. No entanto, nos dois estudos, o modo de ação não foi analisado. Em estudo, avaliou-se a toxicidade e a atividade deterrente do óleo essencial de *C. flexuosus* para *Euprosterina elaeasa* Dyar e *Acharia fusca* Stoll (Lepidoptera: Limacodidae) e foi constatado que o óleo essencial possui atividade para ambos os parâmetros. Destaca-se que, após 24 horas de avaliação, os insetos apresentaram mudanças de comportamento, características de toxicidade por inibição da atividade de acetilcolinesterase, tais como agitação extrema, caminhar aleatório e sem direção, tremores e convulsões, levando-os à

paralisa e morte (HERNÁNDEZ-LAMBRAÑO; CABALLERO-GALLARDO; OLIVERO-VERBEL, 2014).

Óleos essenciais geralmente apresentam maior atividade inseticida quando comparados a qualquer um dos componentes presentes em sua constituição química (AKHTAR et al., 2012; HUMMELBRUNNER; ISMAN, 2001; JIANG et al., 2009). Não obstante, no presente estudo, a atividade inseticida do óleo essencial de *C. flexuosus* foi estatisticamente igual ao seu componente majoritário (citrал). Com base nesse resultado pode-se afirmar que a toxicidade do óleo essencial deve-se à ação do citral. Resultado semelhante ao corrente estudo foi encontrado por Tak, Jovel e Isman (2016), ao avaliarem a atividade inseticida do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* Stapf. (Poaceae) e dos seus constituintes majoritários citral e limoneno. Esses autores verificaram que a aplicação tópica desses compostos em lagartas de 3º ínstar de *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) revelou que a toxicidade do citral foi semelhante a do óleo essencial, sendo esse o principal responsável pela atividade inseticida do referido óleo essencial. Entretanto, em estudo avaliando a toxicidade aguda da espécie *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown (quimiotipo citral) para lagartas de terceiro ínstar de *S. frugiperda* via aplicação tópica, foi registrada mortalidade de 64% das lagartas na dose de 3 µg de citral/mg de inseto, atribuindo-se à atividade inseticida ao citral (composto majoritário da planta), sendo essa do tipo dose-dependente (NICULAU et al., 2013).

A ação de óleos essenciais em insetos pode ser neurotóxica ocasionando sintomas semelhantes aos produzidos pelos inseticidas organofosforados e carbamatos (ISMAN, 2000). Nesse âmbito, alguns óleos essenciais e monoterpenos têm sido amplamente investigados, devido à capacidade de inibir significativamente a enzima acetilcolinesterase (AChE) (PICOLLO et al., 2008). Nesse contexto, salienta-se que a acetilcolina é um neurotransmissor sintetizado pelas células pré-sinápticas responsáveis pela transmissão dos impulsos

nervosos de uma célula nervosa ou músculos involuntários. Nas sinapses colinérgicas, a AChE catalisa a hidrólise da acetilcolina para colina e acetato. Portanto, a AChE regula a transmissão do impulso nervoso através colinérgicas (SIEGFRIED; SCOTT, 1992).

Em estudo *in vivo* e *in vitro* com *T. castaneum* foi observado que monoterpenoides como pulegona, linalool, eucaliptol e citral ocasionaram paralisia e morte do referido inseto e, ainda, inibiram a atividade da acetilcolinesterase, sendo essas atividades do tipo dose-dependente (RYAN; BYRNE, 1988). Tal fenômeno pode ser atribuído como causa da ação inseticida pronunciada do óleo essencial de *C. flexuosus* e do citral para *S. frugiperda*, quando empregados em suas concentrações mais elevadas (2,25, 2,5 e 4,0 mg.mL⁻¹), nas quais foram registradas as maiores taxas de mortalidade dos insetos. Assim, na tentativa de buscar uma possível relação do efeito tóxico observado pelo óleo essencial de *C. flexuosus* e do citral, determinou-se o potencial inibitório destes produtos sobre a inibição *in vitro* da AChE. Em ambos os casos observou-se que a atividade foi dose-dependente. Fato esse verificado na concentração de 0,5 mg.mL⁻¹, na qual o óleo essencial inibiu, aproximadamente, 40% e o citral 50%, demonstrando uma maior atividade do citral em relação ao óleo. Isto pode ser confirmado pelos valores obtidos para a IC₅₀ que foram de 0,84 mg.mL⁻¹ e 0,53 mg.mL⁻¹, respectivamente. Dessa forma, com base nos resultados deste estudo sugere-se que a ação inseticida do óleo essencial de *C. flexuosus* possa ser atribuída ao seu constituinte majoritário (citral).

Portanto, a ação dos óleos essenciais sobre insetos pode variar, de acordo com a espécie vegetal, cuja variedade dos constituintes químicos do óleo essencial, isolados ou em mistura, pode ser agente causador de mortalidade em virtude das diferenças nas respostas do inseto estudado aos compostos químicos das plantas. De acordo com Isman (2006), há algumas substâncias químicas

presentes nas plantas que podem ser deterrentes a um determinado grupo de pragas, mas podem ser atraentes a outras. No presente estudo, por exemplo, tanto o óleo essencial de *C. flexuosus* quanto seu composto majoritário (citril) apresentaram ação inseticida para lagartas de *S. frugiperda* e foram inibidores de acetilcolinesterase, em que como efeito subletal foi constatada a prolongação do estágio larval. Assim, esse efeito pode favorecer a exposição do inseto a predadores e ou parasitoides, tornando o inseto mais vulnerável à ação desses agentes.

Assim, a rápida atividade inseticida nas concentrações mais altas do óleo essencial pode ser atribuída a uma interação desses compostos com sítios de ação no sistema nervoso das lagartas, sugerindo-se que os compostos estudados apresentam potencial para serem empregados em formulações para o controle do inseto.

7 CONCLUSÃO

Os compostos geranial e neral, que juntos formam o citral, são os compostos majoritários do óleo essencial de *C. flexuosus*. Esse óleo essencial é letal às lagartas de *S. frugiperda* e pode causar mortalidade de até 90% da população de *S. frugiperda*. O óleo essencial de *C. flexuosus* causa mortalidade na concentração de $1,35 \text{ mg.mL}^{-1}$ (CL_{50}) e prolonga o estágio larval de *S. frugiperda*, enquanto na concentração de $0,675 \text{ mg.mL}^{-1}$ (CL_{20}) prolonga o desenvolvimento das larvas de *S. frugiperda*. O mesmo comportamento é observado para o citral quando analisado nas concentrações equivalentes a CL_{50} e CL_{20} do óleo. O óleo essencial de *C. flexuosus* e o citral são promotores de inibição da enzima acetilcolinesterase, quando analisados *in vitro*, sendo essa inibição do tipo dose-dependente. Dessa forma, pode-se concluir que óleo essencial de *C. flexuosus* é tóxico para *S. frugiperda*, e a atividade inseticida está diretamente relacionada ao citral.

REFERÊNCIAS

AAZZA, S.; LYOUSSE, B.; MIGUEL, M. G. Antioxidant and antiacetyl cholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. **Molecules**, Basel, v. 16, n. 9, p. 7672-7690, 2011.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4th ed. Illinois: Allured, 2007. 804 p.

ADUKWU, E. C.; ALLEN, S. C. H.; PHILLIPS, C. A. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 113, n. 5, p. 1217-1227, 2012.

AGNOLIN, C. A.; OLIVO, C. J.; PARRA, C. L. C. Effect of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Stapf) oil on the control of cattle ticks. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2014.

AHARONI, A. et al. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v. 5, n. 1, p. 49-58, 2006.

AHMAD, A.; VILJOEN, A. The in vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. **Phytomedicine**, Jena, v. 22, n. 6, p. 657-665, 2015.

AKHTAR, Y. L. et al. Effect of chemical complexity of essential oils on feeding deterrence in larvae of the cabbage looper. **Physiological Entomology**, Hoboken, v. 37, n. 1, p. 81-91, Mar. 2012.

ANARUMA, N. D. et al. Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.in yellow passion fruit using *Cymbopogon citratus* essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 66-73, 2010.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BARROS, E. M. et al. Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Hoboken, v. 137, n. 3, p. 237-245, 2010.

BASKAR, K. et al. Bioefficacy of *Aristolochia tagala* Cham. Against *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae). **Saudi Journal of Biological Sciences**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 23-27, 2011.

BERTONE, M. **Attack of the Armyworms**. Raleigh: NC State University, North Carolina Plant Disease and Insect Clinic, 2015. Disponível em: <<http://ncsupdicblog.blogspot.com.br/2014/08/attack-of-armyworms.html>>. Acesso em: 4 ago. 2015.

BUNTIN, G. D. A review of plant response to fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), injury to select field and forage crops. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 69, n. 3, p. 549-559, 1986.

BUSATO, G. R. et al. Biologia comparada de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em folhas de milho e arroz. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 5, p. 743-750, set./out. 2005.

CABALLERO-GALLARDO, K.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. E. Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia origanoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 50, p. 62-65, July 2012.

CARVALHO, R. A. et al. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 4, 2013. Disponível em: <<http://saudepublica.bvs.br/pesquisa/resource/pt/mdl-23614047>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

CASMUZ, A. et al. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, Mendoza, v. 69, n. 3/4, p. 209-231, 2010.

CÉLERES. **IB15.01**: 3º levantamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil, safra 2014/15. Uberlândia, 2015. Disponível em: <http://www.celeres.com.br/docs/biotecnologia/IB1501_150611.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2015.

COLPO, J. F.; JAHNKE, S. M.; FULLER, T. Potencial inseticida de óleos de origem vegetal sobre *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 16, n. 2, p. 182-188, 2014.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira de grãos**: v. 1, safra 2013/2014, décimo segundo levantamento. Brasília, 2014. 127 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira de grãos**: v. 3, safra 2015/2016, quarto levantamento. Brasília, 2016. 154 p.

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, London, v. 56, n. 8, p. 651-676, 2000.

CORRÊA, M. P.; PENNA, L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Defesa Florestal, 1984. v. 1, 577 p.

CORRÊA JÚNIOR, C. **Cultivo de plantas medicinais condimentares e aromáticas**. Curitiba: EMATER-Paraná, 1991. 151 p.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products: secondary metabolites. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. chap. 24, p. 1250-1318.

CRUZ, I. Manejo de pragas da cultura do milho. In: CRUZ, J. C. et al. (Ed.). **A cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2008. cap. 12, p. 303-362.

CRUZ, I. et al. **Risco potencial das pragas de milho e de sorgo no Brasil**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2013. 40 p. (Circular Técnica, 150).

CRUZ, J. C. et al. **Manejo da cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2006. 12 p. (Circular Técnica, 87).

DEQUECH, S. T. B. et al. Histopathology of larvae of *Spodoptera frugiperda* (Lep.; Noctuidae) infected by *Bacillus thuringiensis aizawai* and with eggs of *Campoletis flavicincta* (Hym.; Ichneumonidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 273-276, 2007.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. Chichester: J. Wiley, 2009. 539 p.

DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I.; OMOTO, C. Inheritance of lambda-cyhalothrin resistance in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 311-316, 2001.

DOOL, H. van den; KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 11, n. C, p. 463-471, 1963.

DUARTE, J. O. et al. **Cultivo do milho: economia da produção**. 6. ed. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2010. (Sistemas de Produção, 1). Disponível em:
<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/economia.htm>. Acesso em: 15 nov. 2014.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA. **Normas técnicas para cultivo de capim-limão, citronela, palma-rosa e patchouli.** Florianópolis, 2004. 58 p. (Sistemas de Produção, 37).

ENAN, E. Insecticidal activity of essential oils: Octopaminergic sites of action. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 130, n. 3, p. 325-337, 2001.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho.** 2. ed. Guaíba: Agropecuária, 2004. 360 p.

FARIAS, J. R. et al. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, Oxford, v. 64, p. 150-158, Oct. 2014.

FARIAS, P. R. S. et al. Spatial analysis of the distribution of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera : Noctuidae) and losses in maize crop productivity using geostatistics. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 37, n. 3, p. 321-327, 2008.

FIGUEREDO, M. de L. C.; DIAS-MARTINS, A. M. P.; CRUZ, I. Relação entre a lagarta-do-cartucho e seus agentes de controle biológico natural na produção de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1693-1698, dez. 2006.

FORNASIERI FILHO, D. **Manual da cultura do milho.** Jaboticabal: FUNEP, 2007. 7 p.

GANJEWALA, D.; LUTHRA, R. Essential oil biosynthesis and regulation in the genus *Cymbopogon*. **Natural Products Communications**, Westerville, v. 5, n. 1, p. 163-172, 2010.

GIOLO, F. P. et al. Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) oriundas de diferentes localidades e hospedeiros. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 8, n. 3, p. 221-224, 2002.

GIRAUDOUX, P. **Pgirmess**: data analysis in ecology. R Package Version 1.6.2. 2015. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=pgirmess>>. Acesso em: 15 nov. 2015.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GUYNOT, M. E. et al. Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 94, n. 5, p. 893-899, 2003.

HARDKE, J. T. et al. Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) development, survivorship, and damage on cotton plants expressing insecticidal plant-incorporated protectants. **Journal of Economic Entomology**, Annapolis, v. 108, n. 3, p. 1086-1093, 2015.

HERNÁNDEZ-LAMBRAÑO, R.; CABALLERO-GALLARDO, K.; OLIVERO-VERBEL, J. Toxicity and antifeedant activity of essential oils from three aromatic plants grown in Colombia against *Euprosterina elaeasa* and *Acharia fusca* (Lepidoptera: Limacodidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Haikou, v. 4, n. 9, p. 695-700, 2014.

HUMMELBRUNNER, L. A.; ISMAN, M. B. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep.; Noctuidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 2, p. 715-720, 2001.

ISIDRO, R.; ALMEIDA, R. P.; PEREIRA, J. O. V. Consumo foliar de *S. frugiperda* em amendoim cultivares TATU e CNPA BR-1. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 1, n. 1, p. 37-42, 1997.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 51, p. 45-66, 2006.

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, Oxford, v. 19, n. 8/10, p. 603-608, 2000.

ISMAN, M. B.; MIRESMAILLI, S.; MACHIAL, C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v. 10, n. 2, p. 197-204, 2011.

JIANG, Z. et al. 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**, Washington, v. 57, n. 11, p. 4833-4837, 2009.

KOMORI, T. et al. Potential antidepressant effects of lemon odor in rats. **European Neuropsychopharmacology**, Amsterdam, v. 5, n. 4, p. 477-480, 1995.

KUMAR, A. et al. Biodeterioration of some herbal raw materials by storage fungi and aflatoxin and assessment of *Cymbopogon flexuosus* essential oil and its components as antifungal. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Birmingham, v. 63, n. 6, p. 712-716, 2009.

KUMAR, P. et al. Housefly (*Musca domestica* L.) control potential of *Cymbopogon citratus* Stapf. (Poales: Poaceae) essential oil and monoterpenes (citral and 1,8-cineole). **Parasitology Research**, New York, v. 112, n. 1, p. 69-76, 2013.

LABINAS, A. M.; CROCOMO, W. B. Effect of Java grass (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) essential oil on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 4, n. b5, p. 1401-1405, 2002.

LEE, S.; PETERSON, C. J.; COATS, J. R. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 77-85, 2002.

LIMA, J. F. M. et al. Action of natural insecticide in control of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) in corn crop cultivated in low agroecosystem. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 607-613, 2008.

LUTHRA, R.; SRIVASTAVA, A. K.; GANJEWALA, D. Histochemical localization of citral accumulating cite in lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Ness Ex. Steud) wats cultivar OD-19. **Asian Journal of Plant Sciences**, Faisalabad, v. 6, n. 2, p. 419-422, 2007.

MAY, A. et al. Influence of the interval between cuts on biomass yield of two lemon grass species. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 379-382, 2008.

MEAGHER, R. L.; NAGOSHI, R. N. Population dynamics and occurrence of *Spodoptera frugiperda* host strains in southern Florida. **Ecological Entomology**, Oxford, v. 29, n. 5, p. 614-620, 2004.

MENDES, S. M. et al. Respostas da lagarta-do-cartucho ao milho geneticamente modificado expressando a toxina Cry 1A(b). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 3, p. 239-244, 2011.

MOORE, S. J. et al. Field evaluation of traditionally used plant-based insect repellents and fumigants against the malaria vector *Anopheles darlingi* in Riberalta, Bolivian Amazon. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 44, n. 4, p. 624-630, 2007.

MOREIRA, H. J. da C.; ARAGÃO, F. D. **Manual de pragas do milho**. Campinas: FMC, 2009. 109 p.

MURÚA, M. G. et al. Demonstration using field collections that Argentina fall armyworm populations exhibit strain-specific host plant preferences. **Journal of Economic Entomology**, Annapolis, v. 108, n. 5, p. 2305-2315, 2015.

NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L. Review of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) genetic complexity and migration. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 91, n. 4, p. 546-554, 2008.

NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L.; HAY-ROE, M. Assessing the resolution of haplotype distributions to delineate fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) migratory behaviors. **Journal of Economic Entomology**, Annapolis, v. 107, n. 4, p. 1462-1470, 2014.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **PC version 2.0 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library**. Gaithersburg, 2008. Software.

NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: a review. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 101, n. 1, p. 372-378, 2010.

NICULAU, E. S. et al. Atividade inseticida de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Herit e *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 9, p. 1391-1394, 2013.

OLIVEIRA, C. M. et al. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, Oxford, v. 56, p. 50-54, Feb. 2014.

PANDEY, A. K.; RAI, M. K.; ACHARYA, D. Chemical composition and antimycotic activity of the essential oils of corn mint (*Mentha arvensis*) and lemon grass (*Cymbopogon flexuosus*) against human pathogenic fungi. **Pharmaceutical Biology**, London, v. 41, n. 6, p. 421-425, 2003.

PARRA, J. R. P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 2001. 137 p.

PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. *Trichogramma* in Brazil: feasibility of use after twenty years of research. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 271-281, 2004.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: UFV, 1999. v. 1, p. 429-485.

PATERNIANI, E.; NASS, L. L.; SANTOS, M. X. O valor dos recursos genéticos de milho para o Brasil: uma abordagem histórica da utilização do germoplasma. In: UDRY, C. W.; DUARTE, W. (Org.). **Uma história brasileira do milho: o valor dos recursos genéticos**. Brasília: Paralelo 15, 2000. cap. 1, p. 11-41.

PICOLLO, M. I. et al. Anticholinesterase and pediculicidal activities of monoterpenoids. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 271-278, 2008.

PINTO, Z. T. et al. Chemical composition and insecticidal activity of *Cymbopogon citratus* essential oil from Cuba and Brazil against housefly. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 36-44, 2015.

POGUE, G. M. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomological Society**, Philadelphia, v. 43, n. 28, p. 1-202, 2002.

POUDEL, D. D.; MIDMORE, D. J.; WEST, L. T. Farmer participatory research to minimize soil erosion on steep land vegetable systems in the Philippines. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 79, n. 2/3, p. 113-127, 2000.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2014. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 1 nov. 2014.

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J. T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 57, p. 405-424, 2012.

RITZ, C.; STREIBIG, J. C. **Package ‘drc’**: analysis of dose-response curve data. 2013. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/web/packages/drc/drc.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2014.

ROEL, A. R. et al. Efeito de doses subletais do óleo de *Azadirachta indica* (Meliaceae) no mesêntero de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera, Noctuidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 54, n. 3, p. 505-510, 2010.

RYAN, M. F.; BYRNE, O. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v. 14, n. 10, p. 1965-1975, 1988.

SIEGFRIED, B. D.; SCOTT, J. G. Biochemical characterization of hydrolytic and oxidative enzymes in insecticide resistant and susceptible strains of the *German cockroach* (Dictyoptera: Blattellidae). **Journal of Economic Entomology**, Annapolis, v. 85, n. 4, p. 1092-1098, 1992.

SILVA, A. R. B. da; BENEZ, S. H. Cultivares de milho: produtividade em diferentes sistemas de manejo de solo e espaçamentos. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 20, n. 4, p. 77-90, 2005.

SILVA, J. L. da et al. Essential oil of *Cymbopogon flexuosus*, *Vernonia polyanthes* and potassium phosphite in control of bean anthracnose. **Journal of Medicinal Plant Research**, Lagos, v. 9, n. 8, p. 243-253, 2015.

SILVA, W. et al. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource technology**, Oxford, v. 99, n. 8, p. 3251-3255, 2008.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Florianópolis: UFSC, 2007. 1102 p.

STORER, N. P. et al. Discovery and characterization of field resistance to Bt Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Annapolis, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, 2010.

TAK, J. H.; JOVEL, E.; ISMAN, M. B. Contact, fumigant, and cytotoxic activities of thyme and lemongrass essential oils against larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Journal of Pest Science**, Heidelberg, 2016. In press.

TAVARES, W. S. et al. Insecticide activity of piperine: toxicity to eggs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) and phytotoxicity on several vegetables. **Journal of Medicinal Plants Research**, Lagos, v. 5, n. 21, p. 5301-5306, 2011.

TAWATSIN, A. et al. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. **Journal of Vector Ecology**, Corona, v. 26, n. 1, p. 76-82, 2001.

TENNYSON, S. et al. Larvicidal efficacy of plant oils against the dengue vector *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Middle East Journal of Scientific Research**, Dubai, v. 13, n. 1, p. 64-68, 2013.

THERNEAU, T. M. **A Package for Survival Analysis in S**. Version 2.37-7. 2014. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=survival>>. Acesso em: 15 nov. 2014.

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. **Estudo dos insetos**. São Paulo: Cengage Learning, 2011. 809 p.

TRONGTOKIT, Y. et al. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. **Phytotherapy Research**, Hoboken, v. 19, n. 4, p. 303-309, 2005.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **World agricultural supply and demand estimates**. Washington, 2016. 40 p. (WASDE, 549).

VALE, T. G. do et al. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (mill.) N.E. Brown. **Phytomedicine**, Jena, v. 9, n. 8, p. 709-714, 2002.

VERA, S. S. et al. Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, New York, v. 113, n. 7, p. 2647-2654, 2014.

VIRLA, E. G. et al. Fall armyworm strains (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina, their associate host plants and response to different mortality factors in laboratory. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 91, n. 1, p. 63-69, 2008.

WAQUIL, J. M. et al. Controle da lagarta do cartucho em milho com inseticidas químicos e biológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 2, p. 163-166, fev. 1982.

WAQUIL, J. M. et al. Management of Lepidopteran pests in maize crop using the Bt pyramided event Cry1A.105 and Cry2Ab2. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 12, p. 1529-1537, dez. 2013.

WERDIN GONZÁLEZ, J. O. et al. Lethal and sublethal effects of four essential oils on the egg parasitoids *Trissolcus basalus*. **Chemosphere**, Oxford, v. 92, n. 5, p. 608-615, 2013.

WITTSTOCK, U.; GERSHENZON, J. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, n. 4, p. 300-307, 2002.

YANG, P.; MA, Y.; ZHENG, S. Adulticidal activity of five essential oils against *Culex pipiens quinquefasciatus*. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 30, n. 2, p. 84-89, June 2005.

YU, S. J.; MCCORD JUNIOR, E. Lack of cross-resistance to indoxacarb in insecticide-resistant *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Plutella Xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 63, n. 1, p. 63-67, 2007.

ZHANG, J. et al. Using satellite multispectral imagery for damage mapping of armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in maize at a regional scale. **Pest Management Science**, Sussex, v. 72, n. 2, p. 335-348, 2016.

ZHELJAZKOV, V. D. et al. Lemongrass productivity, oil content, and composition as a function of nitrogen, sulfur, and harvest time. **Agronomy Journal**, Madison, v. 103, n. 3, p. 805-812, 2011.

ZHENG, S. et al. Citral exerts its antifungal activity against *Penicillium digitatum* by affecting the mitochondrial morphology and function. **Food Chemistry**, Oxford, v. 178, p. 76-81, July 2015.