



**CLAUBERT WAGNER GUIMARÃES DE MENEZES**

**ANÁLISE QUÍMICA POR CG-EM E  
TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Ocimum selloi* BENTH. E ESTRAGOL PARA  
*Spodoptera frugiperda* E *Zabrotes subfasciatus***

**LAVRAS – MG**

**2015**

**CLAUBERT WAGNER GUIMARÃES DE MENEZES**

**ANÁLISE QUÍMICA POR CG-EM E TOXICIDADE DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Ocimum selloi* BENTH. E ESTRAGOL PARA *Spodoptera  
frugiperda* E *Zabrotes subfasciatus***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte da exigência do programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

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).**

Menezes, Claubert Wagner Guimarães de.

Análise química por CG-EM e toxicidade do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth. e estragol para *Spodoptera frugiperda* e *Zabrotes subfasciatus* / Claubert Wagner Guimarães de Menezes. –  
Lavras : UFLA, 2015.

94 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Bibliografia.

1. Inseticidas botânicos. 2. Pragas agrícolas. 3. Fração Volátil. 4.  
Efeito letal. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**CLAUBERT WAGNER GUIMARÃES DE MENEZES**

**ANÁLISE QUÍMICA POR CG-EM E TOXICIDADE DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Ocimum selloi* BENTH. E ESTRAGOL PARA *Spodoptera  
frugiperda* E *Zabrotes subfasciatus***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte da exigência do programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 12 de fevereiro de 2015.

Dr. Marcus Alvarenga Soares	UFVJM
Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto	UFLA
Dra. Dejjane Santos Alves	UFLA
Dr. Geraldo Andrade Carvalho	UFLA

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci  
Orientadora

**LAVRAS-MG**

**2015**

*“Basta ter foco, olhar para frente e seguir”*

## AGRADECIMENTOS

A todas as forças que regem o universo por terem me dado a oportunidade de compartilhar este momento com a humanidade.

À minha mãe Marilene, aos meus irmãos Sady e Alexandre e à minha sobrinha Manu, que me apoiaram e acreditaram no meu trabalho e na minha capacidade.

À Universidade Federal de Lavras, pelo curso oferecido e minha formação acadêmica.

À Professora Suzan e ao Professor José Eduardo, que me acolheram no início do meu doutorado e me incentivaram a trilhar os caminhos da ciência.

Aos Professores Geraldo Andrade Carvalho, Marcus Alvarenga Soares, Maurilio Alves Martins da Costa e Sady Júnior Martins da Costa de Menezes pela amizade, orientação e incentivo para alcançar, cada vez mais, todos os meus sonhos de ciência e crescimento humano.

A todos os professores e funcionários (as) da Pós-Graduação em Fitotecnia, pelos ensinamentos e auxílios prestados durante o curso de doutorado.

À Rosilene e sua família pelo grande apoio nestes anos de caminhada no curso de doutorado e concursos públicos.

Aos grandes amigos Arley, Vinicius, Ellison, Luizinho e Annete (Horto), Lea (Entomologia), DeJane, Jader, Rafa, Rodriguinho, Ivan, Waguinho, e todos aqueles (são muitos, muitos nomes), que puderam compartilhar comigo o companheirismo e a amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de Estudo.

Aos colegas do curso, pelo constante apoio e consideração.

A quem torceu pela minha vitória.

Obrigado a todos!

## RESUMO

A espécie *Ocimum selloi* Benth. (Lamiaceae) possui constituintes químicos em seu óleo essencial com ação inseticida. Objetivou-se avaliar o efeito inseticida por ingestão e por fumigação do óleo essencial de *O. selloi* do estragol sobre *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e o efeito por fumigação do óleo essencial sobre *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1833) (Coleoptera, Bruchidae). No primeiro experimento, larvas de 48 horas de idade de *S. frugiperda* foram alimentadas com dieta artificial acrescida com diferentes doses do óleo essencial de *O. selloi*. O tratamento de 0,6 mg do óleo essencial.mL<sup>-1</sup> de dieta artificial, equivalente à concentração letal 50 (CL<sub>50</sub>), causou a mortalidade acumulada de 73,2% das larvas de *S. frugiperda* até o período 264 horas após o início do experimento, com um Tempo Letal 50 (TL<sub>50</sub>) de 94,7 horas. Os períodos, larval e pupal de *S. frugiperda*, foram maiores que a média normal, com as doses correspondentes à CL<sub>50</sub> e CL<sub>20</sub> do óleo essencial e o peso das pupas, oriundas das larvas alimentadas com a dieta artificial, acrescida com o óleo essencial, foi menor para a dose correspondente à CL<sub>20</sub>. A reprodução das fêmeas adultas de *S. frugiperda* não foi afetada negativamente pelas doses testadas do óleo essencial. O conteúdo de proteínas nas fezes das larvas desse inseto foi maior quando alimentadas com a dieta artificial acrescida da dose CL<sub>20</sub>. O constituinte químico puro do óleo essencial, estragol, foi letal no período de 24 horas para as larvas de *S. frugiperda* a concentração de 0,92 mg do óleo essencial.mL<sup>-1</sup> de dieta. No segundo experimento, a caracterização química do óleo essencial de *O. selloi*, extraído no ano de 2011 e no ano de 2014, foram semelhantes, e o estragol foi o composto majoritário para ambos os óleos essenciais. O óleo essencial, diluído a 1mg.mL<sup>-1</sup> de dieta artificial, foi letal para as larvas de *S. frugiperda* até 48 horas. A fração volátil de 5 µL do óleo essencial de *O. selloi* puro, aplicado em disco de papel-filtro em tubo de vidro, causou 100% de mortalidade das larvas de *S. frugiperda* até o período de 48 horas de exposição ao vapor. O óleo essencial de *O. selloi* não inibiu a enzima tripsina, presente no trato digestivo de *S. frugiperda*. A fração volátil de 5 µL do óleo essencial puro extraído no ano de 2014, causou a paralisia de 100% dos adultos de *Z. subfasciatus* expostos até 24 horas ao vapor. No período até 48 horas de exposição ao vapor, causou a mortalidade superior a 80% dos insetos. *Ocimum selloi* apresentou potencial como fonte de moléculas inseticidas para o controle de *S. frugiperda* e *Z. subfasciatus*, porém, estudos são necessários para se esclarecer a ação desse óleo essencial sobre esses insetos pragas.

Palavras-chave: Inseticidas botânicos. Pragas agrícolas. Fração volátil. Efeito letal.

## ABSTRACT

*Ocimum selloi* Benth. (Lamiaceae) presents chemical constituents in its essential oil with insecticidal action. This study was aimed evaluate the insecticidal effect by ingesting and spraying *O. selloi* essential oil and estragole over *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) as well as the effect of the essential oil by fumigation over *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1833) (Coleoptera, Bruchidae). In the first experiment, 48-hour-old *S. frugiperda* larvae were fed artificial diet supplemented with different doses of *O. selloi* essential oil. The treatment of 0.6 mg of essential oil.mL<sup>-1</sup> of artificial diet, equivalent to the lethal concentration 50 (LC<sub>50</sub>), caused accumulated mortality of 73.2% of the *S. frugiperda* larvae until the period of 264 hours after the beginning of the experiment, with a Lethal Time 50 (LT<sub>50</sub>) of 94.7 hours. The periods, larval and pupal, of *S. frugiperda* were higher than the normal average at doses corresponding to CL<sub>50</sub> and CL<sub>20</sub> of the essential oil, with the weight of the pupas, originated from larvae fed with the artificial diet supplemented with essential oil, was lower for the dose corresponding to CL<sub>20</sub>. The reproduction of *S. frugiperda* adult females was not negatively affected by the doses of essential oil tested. The protein content in the faeces of the larvae was higher when fed the artificial diet supplemented with CL<sub>20</sub>. The pure chemical constituent of essential oil, estragole, was lethal within 24 hours for *S. frugiperda* larvae in the concentration of 0.92 mg of the essential oil.mL<sup>-1</sup> of the diet. In the second experiment, the chemical characterization of *O. selloi* essential oil, extracted in 2011 and in 2014, were similar, and the estragole was the major compound for both essential oils. The essential oil diluted at 1 mg.mL<sup>-1</sup> of artificial diet was lethal for *S. frugiperda* larvae within 48 hours. The volatile fraction of 5 µL of the pure *O. selloi* essential oil, applied on filter paper disk in a glass tube, caused 100% mortality of *S. frugiperda* larvae in the period of 48 hours of vapor exposure. The *O. selloi* essential oil did not inhibit the enzyme trypsin present in the digestive tract of *S. frugiperda*. The volatile fraction of 5 µL of pure essential oil extracted in 2014, caused the paralysis of 100% of *Z. subfasciatus* adults exposed to vapor in 24 hours. In the period up to 48 hours, vapor exposure caused mortality in higher than 80% of the insects. *Ocimum selloi* presented potential as a source of insecticide molecules for the control of *S. frugiperda* and *Z. subfasciatus*, however, studies are needed to clarify the action of this essential oil over these insect pests.

Keywords: Botanical insecticides. Agricultural pests. Volatile fraction. Lethal effect

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1 Ciclo de vida da lagarta do cartucho do milho: *Spodoptera frugiperda* (J. E Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) .....21
- Figura 2 Fêmea (esquerda) e macho (direita) de *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1833) (Coleoptera, Bruchidae) (A) e grão de feijão com posturas e danos causados pela broca (B).....23
- Figura 3 Estruturas químicas de constituintes presentes no óleo essencial de *Ocimum selloi* (Lamiaceae). Estragol (metil chavicol) (1), *transanetol* (2), linalol (3) e germacreno-D (4) .....27

### CAPÍTULO 2

- Figura 1 Sobrevivência de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta artificial acrescida ou não, de óleo essencial de *Ocimum selloi* (Lamiaceae). Grupo 1:  $CL_{50} = 0,60$   $mg.mL^{-1}$ ; Grupo 2:  $CL_{20} = 0,52$   $mg.mL^{-1}$ ; Grupo 3: Controles 1 e 2 = sem óleo essencial .....43

### CAPÍTULO 3

- Figura 1 Tubo utilizado para o ensaio com a fração volátil do óleo essencial de *O. selloi*.....63

### CAPÍTULO 4

- Figura 1 Paralisia de *Zabrotes subfasciatus* expostos no período de 24h ao óleo essencial de *Ocimum selloi* (Lamiaceae) .....83
- Figura 2 Mortalidade de *Z. subfasciatus* expostos no período de 24h a 48h ao óleo essencial de *O. selloi* .....84

## CAPÍTULO 5

Figura 1 *Aethalion reticulatum* Linnaeus, 1767 (Hemiptera: Aethalionidae) ovipositando em um galho de *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae) (A). Ninfas de *A. reticulatum* em galhos e ramos de *V. condensata* e insetos se alimentado do honedew excretado pelas cigarrinhas (B e C). Ramo de *V. condensata* parasitado por *A. reticulatum* (seta) (D).....91

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1 Composição química do óleo essencial de *Ocimum selloi* (Lamiaceae).....41
- Tabela 2 Duração dos períodos larval e pupal (média  $\pm$  erro padrão) de *Spodoptera frugiperda*, provenientes de larvas do segundo instar alimentadas com dieta artificial acrescida do óleo essencial de *Ocimum selloi* (Lamiaceae).....45
- Tabela 3 Quantidade de proteínas em fezes de *Spodoptera frugiperda* provenientes de larvas segundo instar alimentadas com dieta artificial acrescida do óleo essencial de *Ocimum selloi* (Lamiaceae).....46
- Tabela 4 Sobrevivência de larvas com 48 horas de idade de *Spodoptera frugiperda*, após exposição à dieta artificial, acrescida com o óleo essencial de *Ocimum selloi* (Lamiaceae) e seu constituinte majoritário puro .....47

### CAPÍTULO 3

- Tabela 1 Caracterização química do óleo essencial de *Ocimum selloi* extraído no ano de 2011 e 2014 e armazenado em baixa temperatura (-20 °C).....66
- Tabela 2 Sobrevivência acumulada (%  $\pm$  desvio padrão) de larvas de *Spodoptera frugiperda* com 24 h e 48 h, após serem alimentadas com dieta artificial acrescida ou não com óleo essencial de *Ocimum selloi* extraído no ano de 2011 e 2014.....67

Tabela 3	Mortalidade das larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (%), após 24 horas de exposição ao vapor do óleo essencial de <i>Ocimum selloi</i> .....	67
Tabela 4	Porcentagem de inibição $\pm$ erro padrão da enzima tripsina presente no intestino de <i>Spodoptera frugiperda</i> pelo óleo essencial de <i>Ocimum selloi</i> .....	68

#### **CAPÍTULO 4**

Tabela 1	Composição química do óleo essencial de <i>Ocimum selloi</i> (Lamiaceae).....	82
----------	---	----

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 .....	15
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 Importância da investigação da atividade inseticidas de metabólitos secundários para o controle de pragas agrícolas .....	17
2.2 Características dos óleos essenciais e sua ação sobre insetos alvos.....	18
2.3 A cultura do milho e sua principal praga agrícola .....	20
2.4 A cultura do feijão e sua principal praga agrícola.....	22
2.5 Efeito Inseticida de Produtos Botânicos sobre <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>Zabrotes subfasciatus</i> .....	24
2.6 <i>Ocimum</i> sp. (Lamiaceae) e <i>O. selloi</i> Benth como plantas inseticidas.....	25
REFERÊNCIAS .....	27
CAPITULO 2 Toxicidade do óleo essencial de <i>Ocimum selloi</i> (Lamiaceae) e de estragol para <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae).....	32
1 INTRODUÇÃO.....	34
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	35
2.1 Obtenção do óleo essencial.....	35
2.2 Análise cromatográfica do óleo essencial.....	36
2.3 Criação de <i>S. frugiperda</i> .....	37
2.4 Preparo do óleo essencial para a mistura em dieta.....	37
2.5 Bioensaio 1: Efeito do óleo essencial sobre o desenvolvimento de <i>S. frugiperda</i> .....	38
2.6 Bioensaio 2: Teor proteínas nas fezes de <i>S. frugiperda</i> .....	39
2.7 Bioensaio 3: Toxicidade do estragol para <i>S. frugiperda</i> .....	40
3 RESULTADOS .....	41
3.1 Análise cromatográfica .....	41
3.2 Efeito do óleo essencial de <i>O. selloi</i> no desenvolvimento de <i>S. frugiperda</i> .....	42
4 DISCUSSÃO .....	47
4.1 Caracterização química do óleo essencial de <i>O. selloi</i> .....	47
4.2 Efeito do óleo essencial de <i>O. selloi</i> no desenvolvimento de <i>S. frugiperda</i> .....	48
5 CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS .....	51
CAPÍTULO 3 Análise química de constituintes voláteis de <i>Ocimum selloi</i> (Lamiaceae) e sua atividade inseticida para <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae).....	55
1 INTRODUÇÃO.....	57

2	MATERIAL E MÉTODOS.....	58
2.1	Obtenção do óleo essencial.....	58
2.2	Análises químicas do óleo essencial .....	59
2.3	Criação de <i>S. frugiperda</i> .....	60
2.4	Preparação dos óleos essenciais para a mistura em dieta artificial para <i>S. frugiperda</i> .....	61
2.5	Bioensaio 1: Efeito do óleo essencial na sobrevivência de <i>S.</i> <i>frugiperda</i> .....	61
2.6	Bioensaio 2: Efeito da fração volátil do óleo essencial de <i>O. selloi</i> sobre larvas de <i>S. frugiperda</i> .....	62
2.7	Bioensaio 3: Inibição da enzima tripsina pelo óleo essencial de <i>O.</i> <i>selloi</i> .....	63
3	RESULTADOS.....	65
3.1	Análises químicas do óleo essencial de <i>O. selloi</i> .....	65
3.2	Efeito do óleo essencial de <i>O. selloi</i> sobre larvas de <i>S. frugiperda</i> .....	66
3.3	Exposição das larvas de <i>S. frugiperda</i> à fração volátil do óleo essencial de <i>O. selloi</i> .....	67
3.4	Inibição da tripsina de <i>S. frugiperda</i> pelo óleo de <i>O. selloi</i> .....	68
4	DISCUSSÃO.....	68
4.1	Análise química do óleo essencial de <i>O. selloi</i> .....	68
4.2	Efeito do óleo essencial de <i>O. selloi</i> sobre larvas de <i>S. frugiperda</i> .....	69
4.3	Efeito da fração volátil do óleo essencial sobre larvas de 48 h de idade de <i>S. frugiperda</i> .....	70
4.4	Inibição da enzima tripsina em <i>S. frugiperda</i> .....	70
5	CONCLUSÕES.....	71
	REFERÊNCIAS.....	72
	CAPITULO 4 Atividade inseticida do óleo essencial de <i>Ocimum</i> <i>selloi</i> (Lamiaceae) e estragol sobre <i>Zabrotes subfasciatus</i> (Coleoptera: Bruchidae).....	
1	INTRODUÇÃO.....	77
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	78
2.1	Obtenção do óleo essencial.....	78
2.2	Análises químicas do óleo essencial .....	79
2.3	Criação de <i>Z. subfasciatus</i> .....	80
2.4	Efeito da fração volátil do óleo essencial de <i>O. selloi</i> sobre <i>Z.</i> <i>subfasciatus</i> .....	80
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
3.1	Análises químicas do óleo essencial de <i>O. selloi</i> .....	81
3.2	Exposição dos adultos de <i>Z. subfasciatus</i> à fração volátil do óleo essencial de <i>O. selloi</i> .....	82
4	CONCLUSÃO.....	85
	REFERÊNCIAS.....	85

	CAPITULO 5 Primeiro registro de <i>Aethalion reticulatum</i> (Hemiptera: Aethalionidae) em <i>Vernonia condensata</i> (Asteraceae), uma planta medicinal do Brasil .....	88
1	INTRODUÇÃO.....	90
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	90
3	RESULTADOS .....	90
4	DISCUSSÃO.....	91
5	CONCLUSÃO.....	92
	REFERÊNCIAS .....	93

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

Extratos vegetais são empregados para o controle de pragas desde a antiguidade, entretanto, na segunda metade do século XX, o uso de inseticidas sintéticos se tornou comum em relação aos extratos naturais de origem vegetal, em razão de sua eficiência, praticidade, baixo custo, dentre outros. Décadas mais tarde, constatou-se que muitos dos produtos químicos sintéticos causavam impactos negativos ao meio ambiente tais como, capacidade de contaminação a diferentes ecossistemas, seleção de insetos pragas resistentes aos inseticidas ou agindo de forma tóxica a organismos não-alvos. Com base nesses problemas, tem aumentado a cada ano o número de pesquisas focadas na busca por novas moléculas inseticidas, provenientes do metabolismo secundário de plantas, com o objetivo de serem utilizadas em produtos para controle de pragas, mas que causem menor impacto negativo ao meio ambiente.

Atualmente, alguns grupos de derivados de plantas são comercialmente utilizados na agricultura tais como, piretro, rotenona, neen e os óleos essenciais, tanto para controle de pragas agrícolas quanto veterinárias. Algumas famílias botânicas como Meliaceae, Asteraceae, Fabaceae, Anonaceae, Rutaceae, Mirtaceae e Lamiaceae são potenciais fontes de novas moléculas inseticidas, onde espécies botânicas da família Lamiaceae, apresentam interesse por produzirem óleos essenciais com ação inseticida (ISMÁN, 2000; TAVARES et al., 2013).

A família Lamiaceae tem sido estudada por apresentar atividade biocida a organismos vivos, dentre esses os insetos pragas (KHANI; ASGHARI, 2012). O gênero *Ocimum* sp. (Lamiaceae) apresentou atividade biocida a diversos organismos vivos, inclusive, insetos nocivos aos seres humanos, e o interesse

por estudos desse gênero tem aumentado (LULEKAL et al., 2014). A espécie *Ocimum selloi* Benth (Lamiaceae) é uma planta herbácea e perene das regiões sul e sudeste do Brasil (FRANCA et al., 2008). O óleo essencial de *O. selloi* é composto por dezenas de constituintes químicos da classe dos terpenos e fenilpropeno, sendo estudado por apresentar efeito inseticida repelente ou por contato a diferentes espécies de artrópodes, muitos dos quais de interesse agrícola (LOPEZ; CONTRERAS; PASCUAL-VILLALOBOS, 2008; PAULA; GOMES-CARNEIRO; PAUMGARTTEN, 2003).

No Brasil, o consórcio na mesma área entre as culturas agrícolas do milho e feijão é comum, principalmente, em pequenas e médias propriedades rurais. No entanto, essas culturas agrícolas sofrem perdas com o ataque de pragas, sendo a lagarta do cartucho do milho e broca do feijão consideradas pragas-chaves dessas culturas agrícolas.

*Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma importante praga da cultura do milho no Brasil. Lagartas recém-eclodidas desse noctuídeo alimentam-se primeiramente dos restos do córion de seus ovos e, após um curto período de tempo, raspam a superfície dos tecidos verdes de folhas da cultura do milho. Ao se alimentar no interior do cartucho do milho, as larvas liberam excrementos frescos que indicam seu ataque à cultura (CRUZ et al., 2012). *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1833) (Coleoptera, Bruchidae) ocorre em todo o país, e suas larvas penetram nos grãos armazenados de feijão causando danos como a perda de massa, redução do valor nutritivo e da higiene do produto, perda do poder de germinação. Dessa forma, deprecia a qualidade comercial dos grãos causando prejuízos.

Tendo em vista o potencial ainda subexplorado do óleo essencial de lamiáceas, para o controle de insetos pragas de culturas agrícolas no Brasil, este trabalho foi realizado como objetivo de caracterização química e da avaliação da

toxicidade do óleo essencial de *O. selloi* sobre as pragas agrícolas, *S. frugiperdae* e *Z. subfasciatus*.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Importância da investigação da atividade inseticidas de metabólitos secundários para o controle de pragas agrícolas**

Entre os animais, a classe Insecta representa o maior número de seres vivos, sendo grande parte herbívoros. A coevolução insetos-plantas tendeu para a aquisição de mecanismos de defesa, físicos e químicos, contra o ataque de insetos. A defesa química representa papel importante para as plantas, em decorrência da ativação e produção de compostos tóxicos e repelentes a insetos. O ataque de insetos a plantas pode desencadear a produção de fitormônios, como, por exemplo, inibidores de endopeptidases que agem no sistema digestivo dos insetos, prejudicando-os, ou a produção de óleos essenciais que são utilizados na defesa de doenças e pragas (LOPES et al., 2004). O homem pode explorar o mecanismo químico natural de defesa das plantas para o combate a insetos pragas e, nos últimos anos, a busca por novas moléculas inseticidas tem sido realizada.

Os óleos essenciais têm sido largamente estudados como forma para o controle de insetos pragas, em virtude da facilidade de obtenção e análise de seus constituintes, forma de extração consolidada em grandes indústrias e, geralmente, baixa toxicidade aos animais, como os mamíferos (REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2012). A proibição do uso de muitos produtos sintéticos, para o controle de pragas, como, por exemplo, o brometo de metila, ou a resistência de insetos pragas a esses produtos químicos, tem reduzido os produtos disponíveis para o combate de insetos nocivos à

agricultura. Os óleos essenciais têm mostrado potencialidade como fonte de novas moléculas inseticidas, cujos modos de ação podem variar de acordo com os seus constituintes químicos. Entretanto, têm se constatado efeitos por fumigação, contato e repelência (WANG et al., 2014).

## **2.2 Características dos óleos essenciais e sua ação sobre insetos alvos**

Óleos essenciais são produtos obtidos de partes de plantas principalmente pelo método de arraste a vapor d'água. Nas plantas, os óleos essenciais são de natureza terpênica, de baixo peso molecular e voláteis, com ação atraente ou repelente a organismos vivos. As famílias botânicas que produzem esses compostos orgânicos, denominados também de aromáticos, são limitadas e representadas principalmente por Mirtaceae, Lauraceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae e Piperaceae. Os óleos essenciais sintetizados nas plantas estão relacionados com sua volatilidade para a atração de polinizadores, diminuição da perda d'água, proteção da planta contra predadores e patógenos, além de inibidores da germinação. A composição química dos óleos essenciais depende de fatores como o clima, época do ano, condições geográficas, período de colheita, além da técnica de destilação e obtenção desses compostos e do seu armazenamento. Os monoterpenos, sesquiterpenos e compostos aromáticos de baixo peso molecular são os principais constituintes dos óleos essenciais (REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2012).

A função específica dos óleos essenciais nas plantas não é bem conhecida, mas pode estar relacionada com o seu crescimento, ao sintetizar terpenoides específicos, como os reguladores de crescimento, pigmentos e esteroides. Muitos dos compostos, produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, apresentam baixa persistência no meio ambiente e baixa toxicidade a

mamíferos, salvo algumas moléculas comprovadamente tóxicas, como a nicotina, cianeto, escopolamina, dentre outras. A quantidade de componentes químicos individuais presentes em um óleo essencial pode superar a 60 e algumas das moléculas podem constituir em mais de 80% do teor total do óleo essencial, sendo os demais compostos considerados elementos traços. São constituintes dos óleos essenciais os hidrocarbonetos terpenicos, álcoois simples e terpenicos, aldeídos, cetonas, fenóis, esterres, entre outros. Compostos tais como linalol, tujona, limoneno são monoterpenos, comumente encontrados em óleos essenciais e, entre os sesquiterpenos, são comuns o bisaboleno, farnesol, etc. A biossíntese dos óleos essenciais pode ocorrer por via do ácido mevalônico-acetato, no qual se encontram os derivados dos terpenoides, ou pela via do ácido chiquímico, onde se encontram os derivados dos fenilpropanoides.

As plantas que produzem os óleos essenciais apresentam características químicas como fonte de moléculas biocidas, sendo de interesse para a agricultura, em vista das atividades bactericidas, fungicidas, herbicidas e inseticidas. O efeito inseticida dos óleos essenciais pode ser variado, afetando o metabolismo desses organismos em uma ou várias vias de intoxicação (REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2012). Esses compostos botânicos podem atuar em rotas específicas no organismo de insetos pragas, inibindo enzimas responsáveis pela quebra e aproveitamento energético do alimento consumido pelo artrópode (MITTAL et al., 2014), ou causar efeitos neurotóxicos ao sistema nervoso. O óleo essencial de *Lavandula angustifolia* (Lamiaceae) afetou negativamente a atividade de enzimas digestivas de *Glyphodes pyloalis* (Lepidoptera: Crambidae), prejudicando seu desenvolvimento (YAZDANI et al., 2013). No entanto, a ação de óleos essenciais sobre enzimas presentes no trato digestivo de insetos ainda é pouco estudada. Uma das características positivas do uso de óleos essenciais no combate a insetos pragas é a sua baixa toxicidade a mamíferos, além da baixa

persistência no meio ambiente, o que torna interessante a investigação de novas moléculas inseticidas oriundas desses compostos naturais.

### **2.3 A cultura do milho e sua principal praga agrícola**

O milho é uma gramínea cultivada em várias partes do mundo e serve de alimento para humanos e animais (MENEZES et al., 2012). A demanda por áreas cultivadas com o milho tende a crescer até a década de 2050, especialmente em países em desenvolvimento (MCINTYRE et al., 2009). No entanto, fatores abióticos e bióticos, como, por exemplo: o ataque de insetos pragas pode afetar negativamente a qualidade e quantidade produzida dessa espécie agrícola. No Brasil, a cultura do milho representa um importante *commoditie* agrícola, com novas áreas produtivas a cada ano, e produção próxima a 80 milhões de toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2014). Essa cultura agrícola é cultivada por pequenos, médios e grandes produtores rurais e abastece tanto o mercado nacional, quanto o internacional. No entanto, essa cultura pode sofrer perdas em sua produção, em decorrência do ataque de insetos pragas, que pode ocorrer em diferentes épocas e fases de cultivo. Estima-se que a perda de produção no milho, por causa de insetos pragas, pode chegar a mais de 30%. Em infestações elevadas, ocasiona o uso intensivo de inseticidas, elevando assim o custo de produção, além de riscos de acúmulo de resíduos tóxicos nos grãos e ocorrência de intoxicação ao homem e organismos não alvos (PICANÇO et al., 2003).

Dentre as várias pragas da cultura do milho, *S. frugiperda* popularmente conhecida como lagarta do cartucho, destaca-se como praga chave. A lagarta do cartucho é uma praga que ataca diferentes fases de desenvolvimento da cultura do milho e, se não controlada, pode causar prejuízos. O ciclo de vida da lagarta do cartucho está esquematizado na Figura 1. O período de incubação dos ovos

desse lepidóptero dura em torno de 2,8 a 3,3 dias. As larvas recém-eclodidas alimentam-se dos restos de seus ovos e do limbo foliare, nos estádios mais avançado de desenvolvimento, migram-se para o cartucho do milho onde se alimentam até a fase de pupação. A duração da fase larval varia de 10,7 a 21,7 dias em média, de acordo com a sua qualidade nutricional entre outros fatores. O estágio de pré-pupa é de 1,1 a 2,4 dias e de pupa de 9 a 17 dias, com emergência antecipada das fêmeas em relação aos machos. A duração da fase adulta é em média de 14,7 dias. O período de pré- oviposição varia, de acordo com a fonte de alimentação das lagartas e dos adultos de *S. frugiperda*, mas com duração máxima de 3,8 dias. O período de oviposição e número de ovos variam, de acordo com as condições em que o inseto se encontra, porém, o número de ovos total no período de oviposição pode chegar a 2000 (CRUZ et al., 2012).



Figura 1 Ciclo de vida da lagarta do cartucho do milho: *Spodoptera frugiperda*(J.E Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).

O uso de variedades de milho transgênicos, com proteínas Bt, ou inseticidas sintéticos, é o mais comum para o controle de *S. frugiperda*, no entanto, os inseticidas podem ser tóxicos e prejudiciais ao meio ambiente, além de causar a seleção de espécies de *S. frugiperda* resistentes aos produtos (TAVARES et al., 2013). Além disso, o uso indiscriminado desses produtos sintéticos pode ocasionar resistência dessa praga a inseticidas (DIEZ-RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001) e causar impacto negativo ao homem e organismos não alvos (TAVARES et al., 2013). Métodos de controle populacional de *S. frugiperda*, em culturas agrícolas, que contemplem o menor uso de inseticidas, de uma mesma classe ou grupo químico, visando à alternância ou substituição destes, são necessários. Inseticidas botânicos têm sido estudados em razão de sua menor toxicidade a organismos não alvos, rápida degradação no meio ambiente, baixa toxicidade ao homem e seletividade a inimigos naturais, sendo, por isso, considerados como fonte de novas moléculas inseticidas (BASKAR et al., 2012; TAVARES et al., 2013).

#### **2.4 A cultura do feijão e sua principal praga agrícola**

O cultivo do feijão no Brasil é fonte de renda para pequenos e médios produtores agrícolas, além de ser uma espécie vegetal típica na culinária brasileira. Seus grãos são fontes ricas em proteínas e minerais e seu consumo atinge todas as faixas de renda no país (SMANIOTTO et al., 2010). Estima-se que a produção total de feijão no Brasil no período de 2013/2014, chegue a aproximadamente 3,5 milhões de toneladas (CONAB 2014). O ataque de insetos pragas à cultura do feijão acarreta em perdas na produção, sobretudo no ataque aos grãos, reduzindo a qualidade e quantidade desse produto. Os danos ocorridos em grãos por insetos pragas ocasionam a perda quantitativa em função da alimentação direta dos insetos, ou perdas qualitativas como a diminuição do

valor nutricional ou redução na qualidade fisiológica da semente, o que acarreta perdas no valor de mercado do grão danificado ou até, em casos mais severos, perdas de um lote inteiro de sementes (CANEPILLE et al., 2003). Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations- FAO (2008), estima-se que as perdas de grãos armazenados no Brasil são de aproximadamente 10% anualmente. Essa perda pode ocorrerem consequência da presença de insetos no armazenamento, que favorece a deterioração da massa de grãos, contaminação fúngica, presença de micotoxinas, etc.

Na cultura do feijão, a broca de grãos armazenados, *Z. subfasciatus* é a principal praga dessa espécie agrícola. Esse coleóptero se desenvolve no interior do grão de feijão, e suas larvas se alimentam do endosperma, causando perdas na qualidade da semente, danos nutricionais, perda de peso, diminuição do vigor e da germinação e, por fim, depreciação do produto (SILVA et al., 2013). Os insetos são pequenos, de coloração castanho-escuro e medem de 1,8 a 2,5 mm. As fêmeas são maiores que os machos e apresentam manchas brancas no pronoto (Figura 2A). A larva passa diretamente do ovo para o interior do grão, onde constrói galerias até a o período de pupação (Figura 2B). A pupa mede 3 mm de comprimento e tem coloração branca e bem maior que os adultos. O estágio pupal dura de 5 a 6 dias. A longevidade das fêmeas é em média de 11 dias e oviposita, em média, 22 ovos, sendo o ciclo médio, ovo-adulto de 26 dias (GALLO et al., 2002).



Figura 2 Fêmea (esquerda) e macho (direita) de *Zabrotes subfasciatus*(Bohemann, 1833) (Coleoptera, Bruchidae) (A) e grão de feijão com posturas e danos causados pela broca (B)

O armazenamento do feijão, sem nenhum tipo de tratamento, pode favorecer o aparecimento de fungos e de insetos pragas e, assim, ocorrer perdas do produto. A incidência do caruncho do feijão pode ocorrer mesmo em condições de baixa umidade, sendo o mais comum, o tratamento químico dos grãos, por meio da fumigação, ou utilizando inseticidas sintéticos residuais da classe dos organofosforados ou piretroides (LORINI; MORÁS; BECKEL, 2002). No entanto, a restrição do uso de produtos químicos como o brometo de metila, e a detecção de resistência de insetos pragas para produtos químicos sintéticos como a fosfina (AGUIAR et al., 2010), ou resíduos tóxicos nos grãos, diminuiu a disponibilidade de princípios ativos contra pragas de grãos armazenados.

## **2.5 Efeito Inseticida de Produtos Botânicos sobre *Spodoptera frugiperda* e *Zabrotes subfasciatus***

A suscetibilidade do gênero *Spodoptera* spp. (Lepdoptera: Noctuidae) a óleos essenciais e extratos de variadas espécies de plantas têm demonstrado potencial inseticida (TAVARES et al., 2013). Lagartas de terceiro estágio de *S. frugiperda* apresentaram declínio no consumo, crescimento relativo e eficiência de consumo quando alimentadas com folhas de milho tratadas com óleo essencial de *Jatropha curcas* Linnaeus (Euphorbiaceae), rico em ésteres de forbol, um diterpenoide bioativo (DEVAPPA et al., 2012).

O óleo de *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) adicionado em dieta artificial causou mortalidade dos primeiros estágios de *S. frugiperda*, prolongou os estágios larval e de pupa e reduziu o peso das pupas desse inseto. Além disso, causou alterações histológicas no trato digestivo dessa praga. Óleos essenciais ou extratos de plantas nativas ou não do Brasil, tiveram efeito deletério em diferentes variáveis de desenvolvimento e biologia de *S. frugiperda*,

comprovando o potencial inseticida de compostos botânicos sobre esse inseto (GALLO et al., 2006; RAMOS-LOPEZ et al., 2010).

Em se tratando de grãos armazenados, inseticidas botânicos têm sido estudados a fim de controlar insetos pragas desses produtos (PAUL et al., 2009). O óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* (Mirtaceae) e *Cymbopogon citratus* (Poaceae) foram repelentes a adultos de *Z. subfasciatus*, em contato com feijão tratado, e o óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (Poaceae) reduziu a viabilidade dos ovos e a emergência de *Z. subfasciatus* (FRANÇA et al., 2012). *Hyptis marruboides* (Lamiaceae) foi repelente a *Z. subfasciatus*, quando em contato com grãos de feijão tratados com óleo essencial dessa planta (MELLO et al., 2014). Plantas do gênero *Piper* sp. (Piperaceae) foram tóxicas a *Z. subfasciatus* causando a mortalidade dos insetos (GIRÃO FILHO et al., 2014).

A atividade inseticida dos óleos essenciais sobre *Z. subfasciatus* é uma alternativa ao uso de inseticidas químicos de efeito residual ou por fumigação. Além disso, os óleos essenciais podem ser fonte de novas moléculas inseticidas para essa praga de grãos armazenados, contribuindo para a redução da resistência de insetos a produtos químicos sintéticos. É necessário mais estudo sobre o efeito dos óleos essenciais sobre *Z. subfasciatus* e maiores informações sobre o mecanismo de ação nesse coleóptero, dos compostos químicos produzidos pelo metabolismo secundário de plantas.

## **2.6 *Ocimum* sp. (Lamiaceae) e *O. selloi* Benth como plantas inseticidas**

Plantas da família Lamiaceae têm sido estudadas por apresentar atividade deletéria ou repelente a insetos (NGAMO et al., 2007). O gênero *Ocimum* possui cerca de 150 espécies de plantas e estão distribuídas em diversas partes do mundo, sendo comuns em locais de clima tropical. São conhecidas por sua diversidade e sabor delicado, sendo o óleo essencial utilizado como

aromatizante de alimentos, produtos orais e dentais, fragrâncias e na medicina popular (JANBAZ et al., 2014). Além disso, o óleo essencial de *Ocimum* sp. contém constituintes com atividade biológica, sobretudo inseticida (VIEIRA; SIMON, 2006).

Óleos essenciais do gênero *Ocimum* sp. podem ser compostos por fenilpropanoides como o estragol, ou outros terpenos como eugenol, linalol, cânfora e cinamato de metila. A ação inseticida de óleos essenciais de *Ocimum* sp. e seus constituintes químicos tem sido estudada nos últimos anos e tem mostrado potencial para o controle de diferentes ordens de pragas agrícolas e vetores de doenças. Esses compostos voláteis foram expostos aos insetos e apresentaram efeito fumigante, deterrente, tóxica por contato, entre outros efeitos deletérios a insetos (KIM; LEE, 2014).

*Ocimum selloi* Benth (Lamiaceae) possui porte arbustivo e perene e se distribui nas regiões sul e sudeste do Brasil. É conhecida como elixir paregórico, alfavaca ou atroveran, em virtude de suas propriedades medicinais no tratamento de diarreias, dores e inflamações (COSTA et al., 2010). O óleo essencial dessa planta é de interesse para a indústria farmacêutica, de alimentos e cosmética e, também, biocida por ter atividade a diferentes organismos e sobre insetos pragas (FRANCA et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2011; PAULA; GOMES-CARNEIRO; PAUMGARTTEN, 2003).

Análises fitoquímicas do óleo essencial de *O. selloi* identificaram uma série de compostos secundários, da classe dos terpenos e fenilpropeno (COSTA et al., 2010). O fenilpropanoide estragol, geralmente, é identificado como o majoritário da espécie, sendo utilizado na indústria alimentícia como aromatizante e aditivo alimentar em produtos de panificação, bebidas não alcoólicas e doces. Pesquisas têm divergido sobre a segurança dessa molécula na saúde humana, em razão do fato do estragol estar presente em alimentos industrializados, no entanto, o efeito toxicológico desse constituinte em ratos foi

baixo, com uma DL50 de 1250 mg/Kg (PAULA; GOMES-CARNEIRO; PAUMGARTTEN, 2003). A *The Scientific Committee on Food of the European Union* (SCF) determinou que o estragol é genotóxico e carcinogênico e que está presente em doses acima da recomendada (0,07 mg/kg/dia) (JEURISSEN et al., 2007). No entanto, especialistas do *Flavour and Extract Manufacturers' Association of the United States* (FEMA) salientam que a presença do estragol, na dose de 0,6 mg/kg/dia, não causa risco de câncer a mamíferos.

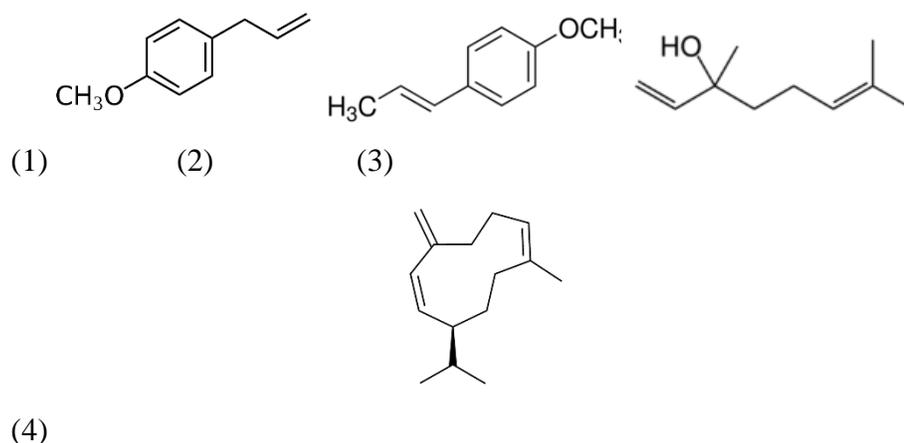


Figura 3 Estruturas químicas de constituintes presentes no óleo essencial de *Ocimum selloi* (Lamiaceae). Estragol (metil chavicol) (1), *trans*-anetol (2), linalol (3) e germacreno-D (4).

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, R.W.S. et al. Toxicidade da combinação de dióxido de carbono e fosfina sob diferentes temperaturas para *Tribolium castaneum*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.14, n.8, p.881-886, 2010.

BASKAR, K. et al. Bioefficacy of *Aristolochia tagala* Cham. against *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae). **Saudi Journal of Biological Sciences**, Riade, v.18, n.1, p.23-27, 2012.

CANEPELLE, M.A.B. et al. Correlation between the infestation level of *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera, Curculionidae) and the quality factors of stored corn, *Zea mays* L. (Poaceae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v.47, n. 4, p.625-630, dez. 2003.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Produtos e serviços:** indicadores da agropecuária. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=548&t=2>>. Acesso em: 9 nov. 2014.

COSTA, L.C.et al. Yield and composition of the essential oil of *Ocimum selloi* Benth. cultivated under colored netting. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v.22, n.1, p. 34-39, 2010.

CRUZ, I.et al. Using sex pheromone traps in the decision-making process for pesticide application against fall armyworm *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae ) larvae in maize. **International Journal of Pest Management**, London, v.58, n. 1, p.83-90, Jan./Mar. 2012.

DEVAPPA, R.K.et al. Potential of using phorbol esters as an insecticide against *Spodoptera frugiperda*. **Industrial Crops and Products**, London, v.38, p.50-53, July 2012.

DIEZ-RODRIGUEZ, G.I.; OMOTO, C.Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.30, n.2, p.311-316, 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Better information sharing could reduce post-harvest food losses:** new database launched. Rome, 2008. Disponível em: <<http://www.fao.org/es/>>. Acesso em: 9 nov. 2013.

FRANCA, C.S.et al. Analgesic and antidiarrheal properties of *Ocimum selloi* essential oil in mice. **Fitoterapia**, Milano, v.79, n. 7/8, p.569-573, Dec. 2008.

FRANÇA, S.M. et al. Toxicidade e repelência de óleos essenciais a *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae) em grãos de *Phaseolus vulgaris* L. **Acta Amazonica**, Manaus, v.42, n.3, p.381-386, 2012.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GALLO, M.B.C.et al. Bioactivity of extracts and isolated compounds from *Vitex polygama* (Verbenaceae) and *Siphoneugena densiflora* (Myrtaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, Sussex,v.62, n. 11, p.1072-1081, Nov. 2006.

GIRAO FILHO, J.E.et al. Repelência e atividade inseticida de pós vegetais sobre *Zabrotes subfasciatus* Boheman em feijão-fava armazenado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.16, n.3, p. 499-504, 2014.

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

JANBAZ, K.H.et al. Spasmolytic, bronchodilator and vasodilator activities of aqueous-methanolic extract of *Ocimum basilicum*. **International Journal of Agriculture and Biology**, Beijing, v.16, n. 2, p.321-327, 2014.

JEURISSEN, S.M.et al. Human cytochrome P450 enzyme specificity for the bioactivation of estragole and related alkenylbenzenes. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v.20, n.5, p.798-806, 2007.

KHANI, A.; ASGHARI, J. Insecticide activity of essential oils of *Mentha longifolia*, *Pulicaria gnaphalodes* and *Achillea wilhelmsii* against two stored product pests, the flour beetle, *Tribolium castaneum*, and the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Insect Science**, Madison,v.12, n. 73, p.1-8, July 2012.

KIM, S.I.; LEE, D.W. Toxicity of basil and orange essential oils and their components against two coleopteran stored products insect pests. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Beijing, v.17, n. 1, p.13-17, Mar. 2014.

LOPES, A.R. Coevolution of insect trypsins and inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v.55, n.3, p.140-152, 2004.

LOPEZ, M.D.; CONTRERAS, J.; PASCUAL-VILLALOBOS, M.J. Selection for tolerance to volatile monoterpenoids in *Sitophilus oryzae* (L.), *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Cryptolestes pusillus* (Schonherr). **Journal of Stored Products Research**, Elmsford,v.46, n.1, p.52-58, 2008.

LORINI, I.; MORÁS, A.; BECKEL, H. Pós inertes no controle das principais pragas de grãos armazenados. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da EMBRAPA**, Brasília, v.8, p.1-35,2002.

LULEKAL, E. et al. Antimicrobial activity of traditional medicinal plants from Ankober District, North Shewa Zone, Amhara Region, Ethiopia.

**Pharmaceutical Biology**, Lisse, v.52, n.5, p.614-620, 2014.

MCINTYRE, B. D. et al. (Ed.). **Looking into the future for agriculture and KST**. Washington: IAASTD Global Report Island, 2009. 376 p.

MELLO, M.B.D. et al. Atividade inseticida do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* no controle de *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae). **Revista Agrogeoambiental**, Porto Alegre, v.6, n. 1, p. 1-8, 2014.

MENEZES, C.W.G. et al. Selectivity of atrazin and nicosulfurom to *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v.30, n.2, p.327-334, 2012.

MITTAL, A. et al. A kidney bean trypsin inhibitor with an insecticidal potential against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v.36, n. 2, p.525-539, Feb. 2014.

NASCIMENTO, J.C. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Ocimum canum* Sims. and *Ocimum selloi* Benth. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.83, n. 3, p.787-799, set. 2011.

NGAMO, T.L.S. et al. Chronic toxicity of essential oils of 3 local aromatic plants towards *Sitophilus zeamais* Motsch (Coleoptera : Curculionidae). **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v.2, n. 4, p.164-167, Apr. 2007.

PAUL, U.V. et al. Effectiveness of products from four locally grown plants for the management of *Acanthoscelides obtectus* (Say) and *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae) in stored beans under laboratory and farm conditions in Northern Tanzania. **Journal of Stored Products Research**, Elmsford, v.45, n. 2, p.97-107, Apr. 2009.

PAULA, J. P. de; GOMES-CARNEIRO, M. R.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 88, n. 2/3, p. 253-260, 2003.

PICANCO, M.C. et al. Intensities of losses and of insect pests attack to cultivars on the late maize cultivation. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n. 2, p.339-347, mar./abr. 2003.

RAMOS-LOPEZ, M.A.et al. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi,v.9, n. 9, p.1359-1365, Mar. 2010.

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**, Stanford,v.57, p.405-424, 2012.

SILVA, J. F. da et al. Dados biológicos de *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1833) (Coleoptera: Bruchidae) em dois genótipos de *Phaseolus vulgaris* L. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró,v. 8, n. 3, p. 6-9, 2013.

SMANIOTTO, L.et al. Bioatividade da *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) no controle de adultos de *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera, Bruchidae) em laboratório. **Revista Biotemas**, Florianópolis,v.23, n. 2, p.31-35, jun. 2010.

TAVARES, W.S.et al. Ar-turmerone from *Curcuma longa* (Zingiberaceae) rhizomes and effects on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Industrial Crops and Products**, London,v.46, p.158-164, Apr. 2013.

VIEIRA, R.F.; SIMON, J.E. Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.) based on volatile oils. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester,v.21, n. 2, p. 214-221, Jan. 2006.

WANG, X.et al. Fumigant, contact, and repellent activities of essential oils against the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*.**Journal of Insect Science**, Madison,v.14, n. 75, p.1-11, May 2014.

YAZDANI, E.et al. Effect of *Lavandula angustifolia* essential oil against lesser mulberry pyralid *Glyphodes pyloalis* Walker (Lep: Pyralidae) and identification of its major derivatives. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego,v.107, n. 2, p.250-257, Oct. 2013.

**CAPITULO 2 Toxicidade do óleo essencial de *Ocimum selloi* (Lamiaceae) e de estragol para *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)**

**RESUMO**

Constituintes químicos do óleo essencial de plantas do gênero *Ocimum* sp. apresentam potencial como moléculas inseticidas. A toxicidade do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth e do seu constituinte majoritário, estragol, para *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) foi avaliada. Larvas de *S. frugiperda* com 48h de idade foram alimentadas com dieta artificial contendo o óleo essencial e o estragol. A CL<sub>50</sub> foi de 0,6 mg.mL<sup>-1</sup> após 94,7 h do início do bioensaio, com mortalidade acumulada de 73,2% das larvas até 264 horas. Os períodos larval e pupal de *S. frugiperda* foram prolongados pelos tratamentos com CL<sub>50</sub> e CL<sub>20</sub> do óleo e o peso das pupas foi menor para a CL<sub>20</sub>. A reprodução de *S. frugiperda* não foi afetada negativamente pelo óleo essencial. O conteúdo de proteínas nas fezes desse inseto foi maior no tratamento com a CL<sub>20</sub>. O estragol foi letal para todas as larvas na concentração de 0,92 mg.mL<sup>-1</sup> de dieta. Os resultados demonstraram que *O. selloi* apresenta potencial para ser utilizado no controle de *S. frugiperda* *in vitro*; entretanto, novas investigações em condições de campo devem ser realizadas para confirmação de sua toxicidade a este noctuídeo.

Palavras-chave: CG-EM. Controle. Inseto-praga. Planta aromática. Produtos naturais.

### ABSTRACT

Chemical constituents of essential oils originated from the *Ocimum* sp. plant genus, have potential as insecticide molecules. We evaluated the toxicity of the essential oil extracted from *Ocimum selloi* Benth and of its major constituent, estragole, over *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *S. frugiperda* 48-hours-old larvae were fed with artificial diet containing the essential oil and estragole. The LC50 was of 0.6 mg.mL<sup>-1</sup> after 94.7 hours from the beginning of the bioassay, with accumulated mortality of 73.2% of the larvae within 264 hours. The larval and pupal periods of *S. frugiperda* were extended by the treatments with CL50 and CL20 of the oil, presenting pupa weight lower for the CL20. The reproduction of *S. frugiperda* was not negatively affected by the essential oil. Protein content in the feces was higher in the treatment with CL20. The results show that *O. selloi* has potential for use in the control of *S. frugiperda* in vitro; however, further research under field conditions should be conducted to confirm its toxicity to this noctuidae.

Keywords: GC-MS. Control. Insect pests. Aromatic plant. Natural products.

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de pesticidas sintéticos tem sido muito discutido atualmente, em função da sua toxicidade a organismos não alvos e riscos de contaminação ambiental (MENEZES et al., 2012; TAVARES et al., 2013). Populações de insetos resistentes aos produtos químicos sintéticos, com consequências à dificuldade de manejo, também, têm sido registrados (AL-SARAR; HALL; DOWNER, 2006). Nesse contexto, novas moléculas para o controle de pragas vêm sendo estudadas, e substâncias com atividade inseticida oriundas do metabolismo secundário das plantas são promissoras (ISMAN, 2008; MENEZES et al., 2014). Óleos essenciais botânicos tóxicos a insetos herbívoros são comuns em plantas das famílias Asteraceae, Mirtaceae, Apiaceae, também, a Lamiaceae que é representada por muitas espécies aromáticas (REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2012).

Óleos essenciais de espécimes da família Lamiaceae têm apresentado ação biocida, destacando-se as plantas do gênero *Ocimum* sp. (MOUMITA; DATTA, 2007). *Ocimum selloi* Benth (Lamiaceae) é uma planta herbácea perene das regiões sul e sudeste do Brasil (FRANCA et al., 2008). Estudos indicaram que o óleo essencial de *O. selloi* e seu constituinte químico majoritário estragol apresentaram ação inseticida de repelência, fumigação e neurotóxica a diferentes espécies de artrópodes (LOPEZ; PASCUAL-VILLALOBOS, 2010; MOREIRA et al., 2007; PAULA; GOMES-CARNEIRO; PAUMGARTTEN, 2003). Portanto, diante desses resultados, o óleo essencial de *O. selloi* pode ser considerado como potencial fonte de moléculas inseticidas, para o controle de pragas agrícolas, como, por exemplo, para a lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).

A espécie *S. frugiperda* é uma importante praga da cultura do milho no Brasil, visto que pode atacar essa cultura em diferentes fases de desenvolvimento e causar prejuízos econômicos (AL-SARAR; HALL; DOWNER, 2006; DEQUECH et al., 2007). As larvas recém-eclodidas alimentam-se dos restos de seus ovos e de folhas e, nos estádios mais avançados de desenvolvimento, alimentam-se do cartucho do milho (BARROS; TORRES; BUENO, 2010; BUSATO et al., 2004). Aplicações de inseticidas sintéticos de classes químicas diferentes são comuns para o controle dessa praga. Embora eficazes, o uso desses produtos por longo período de tempo tem causado impactos negativos ao agroecossistema, proporcionando a resistência de *S. frugiperda* a inseticidas, tóxicos a organismos não alvos e nocivos ao meio ambiente e à segurança do homem (AL-SARAR; HALL; DOWNER, 2006).

Objetivou-se neste trabalho caracterizar a composição química do óleo essencial de *O. selloi* e avaliar o potencial inseticida do óleo essencial e do seu constituinte majoritário, estragol, sobre o desenvolvimento e metabolismo de *S. frugiperda*.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção do óleo essencial**

Plantas de *O. selloi* foram cultivadas em canteiros localizados no Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras (21°14' 43S 44 °59' 59W, média anual de precipitação de 1530 mm, temperatura média de 20,4 °C e 919 m altitude), Minas Gerais, Brasil. Os canteiros foram adubados com esterco bovino na dose de 3,0 kg.m<sup>2</sup> e irrigados periodicamente 4 vezes por semana.

Exsicatas da espécie foram depositadas no herbário da UFLA, com o número de referência ESAL 7474. Folhas de *O. selloi* foram coletadas no verão pela manhã, de plantas com seis meses de idade. O óleo essencial foi extraído das folhas frescas por destilação por arraste a vapor de água, em destilador Marconi MA480, por 90 minutos (COSTA et al., 2010). O óleo essencial foi purificado por decantação e tratamento com sulfato de magnésio anidro. O sal foi removido por filtração simples com papel filtro e o óleo essencial foi armazenado em freezer a -20 °C, até a realização dos ensaios biológicos e análises químicas.

## **2.2 Análise cromatográfica do óleo essencial**

Análises do óleo essencial foram realizadas, utilizando um sistema de cromatografia de fase gasosa 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 um Detector de Ionização em Chama (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 1:50. Empregou-se 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). Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 240°C. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, mantida por 1 minuto, seguido por uma rampa de temperatura de 3 °C/min até 240 °C, seguida de uma rampa de 10 °C/min até 250 °C, mantendo-se em condição isotérmica por 1 minuto. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos pela média da porcentagem de área normalizada relativa dos picos cromatográficos ± o desvio padrão.

As análises por CG/EM foram realizadas em Cromatógrafo Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de 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 foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à série de *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI e de literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados, usando a equação proposta por Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007).

### **2.3 Criação de *S. frugiperda***

Os insetos usados no experimento foram obtidos da criação do Laboratório de Seletividade do Departamento de Entomologia da UFLA. As lagartas de 2ªpostura foram alimentadas com dieta artificial (GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976), e os adultos de *S. frugiperda* com solução aquosa de mel (10%, v/v).

### **2.4 Preparo do óleo essencial para a mistura em dieta**

O óleo essencial foi pesado em balança de precisão na quantidade referente à CL20 (0,52 mg do óleo essencial) e CL50(0,6 mg do óleo essencial) e, logo após, foi solubilizado em solução aquosa de Tween® 80(Polissorbato 80, Sigma-Aldrich®) a 1% m/v (0,01 g.mL<sup>-1</sup>). Vinte mililitros de água destilada

foram adicionados na mistura de óleo essencial e Tween®80, para que fosse possível realizar a mistura com a dieta artificial. Dez gotas de corante alimentício foram adicionadas na solução aquosa, contendo o óleo essencial e Tween®, a fim de garantir a homogeneização do óleo essencial na dieta artificial. A solução contendo o óleo essencial foi adicionada após a temperatura da dieta artificial se estabilizar em 40°C, a fim de se evitar a volatilização do óleo essencial.

## **2.5 Bioensaio 1: Efeito do óleo essencial sobre o desenvolvimento de *S. frugiperda***

Lagartas de 48 horas de idade, oriundas da segunda postura, previamente mantidas em dieta artificial pura (sem óleo essencial), foram utilizadas para o bioensaio. Ensaio preliminares com diferentes concentrações do óleo essencial de *O. selloi* foram realizados para se obter as Concentrações Letais (CL<sub>20</sub> e CL<sub>50</sub>). Com base nesses resultados, as concentrações do óleo essencial de *O. selloi* utilizadas nas dietas foram de 0,52 mg de óleo essencial.mL<sup>-1</sup> de dieta artificial (CL<sub>20</sub>) e 0,60 mg de óleo essencial.mL<sup>-1</sup> dieta artificial (CL<sub>50</sub>), as quais foram adicionadas em alíquotas de dieta artificial equivalentes a 9 ± 0,35 g (suficiente para a fase larval completar o seu ciclo). As dietas foram oferecidas às lagartas em tubos de vidro (8 cm x 2,5 cm), os quais continham uma lagarta de *S. frugiperda* por tubo. Estes foram mantidos sob condições temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 70 ± 10% 12 horas de fotofase.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por quatro tratamentos: (T1) controle 1: água + corante, (T2) controle 2: água + corante + Tween® 80, (T3) CL<sub>20</sub> e (T4) CL<sub>50</sub>, contendo 120 repetições (1 lagarta por tubo, como parcela experimental). A sobrevivência das lagartas, período pré-pupal, peso das pupas, longevidade e sobrevivência das pupas foram avaliados. O desenvolvimento das lagartas foi avaliado diariamente até a fase adulta.

Os adultos sobreviventes de lagartas que se alimentaram de dietas contaminadas foram separados em casais (mínimo de seis e máximo de vinte e cinco por tratamento) que foram distribuídos em gaiolas de PVC de 10 cm altura  $\times$  10 cm diâmetro e alimentados com solução aquosa de mel (10%, v/v). As características biológicas avaliadas foram período de pré-oviposição, oviposição e número de ovos por fêmea, além da longevidade de machos e fêmeas de *S. frugiperda*.

Os dados de desenvolvimento e reprodução foram submetidos à ANOVA, por meio do software R (pacote laercio) e as análises das médias foram realizadas pelo teste de Scott Knott ( $p < 0,05$ ). Aqueles relativos à mortalidade das larvas de *S. frugiperda* foram submetidos à análise de logit, considerando o período máximo da avaliação de 264h de exposição das lagartas à dieta tratada, usando-se o pacote drc (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013).

## **2.6 Bioensaio 2: Teor proteínas nas fezes de *S. frugiperda***

Para cada grupo de seis lagartas vivas por tratamento, coletou-se uma quantidade de fezes, durante a fase de pré-pupa dos insetos, suficiente para realização das análises. Foi utilizado um mínimo de 5 alíquotas por tratamento, com 135 mg de fezes, de onde foram retiradas 3 amostras (repetições) de 45 mg de fezes para proceder às análises de cada tratamento. As amostras foram secas a 40 °C em câmara de fluxo de ar contínuo até peso constante. O conteúdo de proteínas nas amostras foi quantificado utilizando-se o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Às amostras de 45 mg de fezes foram adicionados 200  $\mu$ L de ácido perclórico 1M e 200  $\mu$ L de água deionizada. A mistura foi homogeneizada e centrifugada a 10.000  $\times$  g por 5 min a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. Ao precipitado adicionaram-se 200  $\mu$ L de NaOH 0,1

M, o qual foi novamente homogeneizado e centrifugado. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi retirada, transferida para um microtubo de 2 mL, adicionado 1 mL do reagente de Bradford e analisado em espectrofotômetro a 595 nm. A curva de calibração foi construída com uma solução tamponada de albumina sérica bovina (BSA) na faixa de 0 a 20  $\mu\text{g}/\text{mg}$ .

O teor (%) de proteínas foi submetido à ANOVA, por meio do software R (pacote *laercio*), e a análise das médias foi realizada pelo teste de Scott Knott (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013).

### **2.7 Bioensaio 3: Toxicidade do estragol para *S. frugiperda***

Conforme resultados preliminares, verificou-se que 1 mg do óleo essencial  $\text{mL}^{-1}$  de dieta artificial foi letal às larvas de 48h de idade de *S. frugiperda*. Dessa forma, realizou-se novo bioensaio, para verificar a toxicidade do constituinte químico majoritário, estragol, para larvas desse noctuídeo. O bioensaio consistiu na adição de estragol à dieta de lagartas de *S. frugiperda*.

Estragol (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, pureza declarada  $\geq 99,1\%$ ) foi incorporado à dieta artificial de *S. frugiperda* na concentração de 0,92  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Essa concentração foi escolhida de acordo com a quantidade desse composto na análise cromatográfica do óleo essencial. Os tratamentos avaliados foram: controle 1 (T1) – água + corante; controle 2 (T2) – água + corante + Tween<sup>®</sup> 80; estragol - 0,92  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (T3) e óleo essencial de *O. selloi* - 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (T4).

A metodologia para diluição do estragol e do óleo essencial na dieta artificial foi a mesma utilizada no bioensaio 1. Foram utilizadas 60 repetições, sendo cada uma representada por uma larva mantida em tubo de vidro com uma alíquota de  $9 \pm 0,35$  g de dieta tratada. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado.

Foi avaliada a mortalidade das larvas expostas à dieta contaminada e os dados obtidos foram analisados de forma descritiva.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Análise cromatográfica

O óleo essencial de *O. selloi* caracterizou-se pela presença de 14 constituintes químicos que representaram 99,86% da composição química total. O constituinte majoritário identificado foi o fenilpropanoide estragol com 92,32% do teor total. Dos 7,54% dos componentes químicos restantes, 5,64% corresponderam à soma dos sesquiterpenos,  $\beta$ -cariofileno (1,55%), germacreno D (1,78%) e  $\gamma$ -elemeno (2,31%) (Tabela 1).

Tabela 1 Composição química do óleo essencial de *Ocimum selloi* (Lamiaceae).

PICO	CONSTITUINTE	TR <sup>1</sup>	IR <sup>2</sup>	AREA % $\pm$ DP
1	ni	7,65	977	0,23 $\pm$ 0,02
2	estragol	16,43	1206	92,32 $\pm$ 0,49
3	ni	22,01	1338	0,11 $\pm$ 0,01
4	$\alpha$ -copaeno	23,58	1376	0,20 $\pm$ 0,01
5	$\beta$ -bourboneno	24,22	1392	0,16 $\pm$ 0,08
6	metil-eugenol	24,78	1405	0,27 $\pm$ 0,02
7	$\beta$ -cariofileno	25,35	1420	1,55 $\pm$ 0,02
8	<i>trans</i> - $\beta$ -bergamoteno	26,02	1436	0,23 $\pm$ 0,01
9	Aloaromadendreno	26,97	1460	0,17 $\pm$ 0,01
10	germacreno D	27,81	1481	1,78 $\pm$ 0,02
11	$\gamma$ -elemeno	28,42	1497	2,31 $\pm$ 0,03

“Tabela 1, conclusão”

PICO	CONSTITUINTE	TR <sup>1</sup>	IR <sup>2</sup>	AREA % ± DP
12	β-bisaboleno	28,89	1509	0,29 ± 0,01
13	δ-cadineno	29,45	1524	0,12 ± 0,01
14	espatulenol	31,47	1577	0,12 ± 0,01

<sup>1</sup> TR: Tempo de retenção. <sup>2</sup> Índice de retenção relativo à série *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>) em coluna HP-5MS na ordem de eluição. DP: desvio padrão (*n*=3). ni: não identificado.

### 3.2 Efeito do óleo essencial de *O. selloi* no desenvolvimento de *S. frugiperda*

#### a) Bioensaio 1

A sobrevivência das larvas de *S. frugiperda* foi reduzida pelo óleo essencial de *O. selloi* na concentração equivalente a 0,60 mg.mL<sup>-1</sup> (CL<sub>50</sub>) (Grupo 1, Figura 1). O tempo letal (TL<sub>50</sub>) foi de 94,7 h, causando mortalidade acumulada de 73,2% das lagartas até o fim da avaliação dessa variável (264h). A sobrevivência das larvas expostas à CL<sub>20</sub> (Grupo 2, Figura 1) foi menor em comparação ao tratamento controle, não sendo possível determinar o TL<sub>50</sub>, no período de avaliação, uma vez que a mortalidade acumulada até 264h não ultrapassou 30,7%. Quanto aos controles 1 e 2 (Grupo 3, Figura 1), constatou-se mortalidade máxima acumulada de 5,5% nesse período.

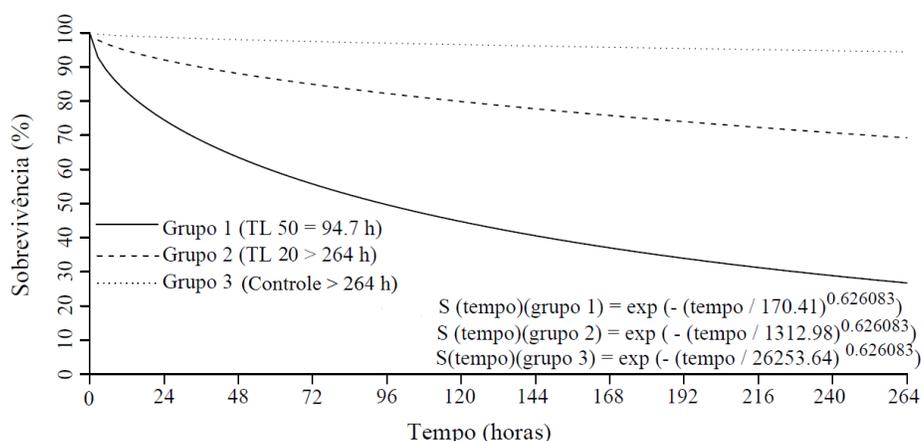


Figura 1 Sobrevivência de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta artificial acrescida ou não, de óleo essencial de *Ocimum selloi* (Lamiaceae). Grupo 1:  $CL_{50} = 0,60 \text{ mg.mL}^{-1}$ ; Grupo 2:  $CL_{20} = 0,52 \text{ mg.mL}^{-1}$ ; Grupo 3: Controles 1 e 2 = sem óleo essencial

O período larval de *S. frugiperda* foi maior para os insetos alimentados com a dieta contaminada com a concentração equivalente a  $CL_{50}$ , aproximadamente 17 dias. Quanto aos controles 1 (água + corante) e 2 (água + corante + Tween® 80), esse período foi de aproximadamente 13 dias e, para a dieta contaminada com a concentração equivalente a  $CL_{20}$ , foi de 16 dias. O período de pré-pupa foi próximo de 2 dias para todos os tratamentos. O período pupal foi maior no tratamento com a  $CL_{20}$ , cerca de 10 dias, e menor nos tratamentos controles 1 e 2, em torno de 9 dias. O óleo essencial de *O. selloi*, na concentração de  $0,52 \text{ mg.mL}^{-1}$  ( $CL_{20}$ ), reduziu o peso das pupas de *S. frugiperda*, que foi de cerca de 226 mg, enquanto para os demais tratamentos foi observado peso médio de 231 mg. A sobrevivência das pupas foi maior que 92%, não havendo diferenças entre os tratamentos (Tabela 2).

Não foram observados efeitos negativos dos tratamentos sobre os períodos de pré-oviposição ( $p \leq 0,05 = 0,4758$ ;  $F = 0,8409$ ; 2,00 a 2,40 dias) e oviposição ( $p \leq 0,05 = 0,8937$ ;  $F = 0,2035$ ; 9,40 a 10,25 dias), bem como na

fecundidade ( $p \leq 0,05 = 0,4689$ ;  $F = 0,8546$ ; 2267 a 2507 ovos). A longevidade de machos e fêmeas também não foi reduzida pelos tratamentos ( $p \leq 0,05 = 0,4736$ ;  $F = 0,9037$ ; 10,12 a 11,37 dias) e 15 ( $p \leq 0,05 = 0,5690$ ;  $F = 0,6768$ ; 14,25 a 15,85 dias).

Tabela 2 Duração dos períodos larval e pupal (média ± erro padrão) de *Spodoptera frugiperda*, provenientes de larvas do segundo instar alimentadas com dieta artificial acrescida do óleo essencial de *Ocimum selloi* (Lamiaceae)

Tratamento	Período larval (dias)	Período pré-pupa (dias)*	Período pupal	Peso de pupas (mg)	Sobrevivência das pupas (%) <sup>ns</sup>
Água + Corante	12,95 ± 0,78 c	2,17 ± 0,71	8,91 ± 1,2 c	230,66 ± 15,26 a	95,05
Água + Corante + Tween® 80 -1%	13,12 ± 1,08 c	2,05 ± 0,21	9,05 ± 0,65 c	231,76 ± 17,29 a	92,45
<i>O. selloi</i> - CL <sub>20</sub>	16,00 ± 1,30 b	2,08 ± 0,27	9,88 ± 0,26 a	226,18 ± 16,73 b	92,95
<i>O. selloi</i> - CL <sub>50</sub>	16,75 ± 1,21 a	2,14 ± 0,36	9,40 ± 0,34 b	232,45 ± 15,43 a	92,31
$p \leq 0,05$	0,0000	0,2724	0,0000	0,0001	0,8748
<i>F</i>	157,94	1,3063	11,7610	15,3830	0,2294

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ( $p \leq 0,05\%$ ). <sup>ns</sup> Valores não se diferenciaram estatisticamente. CL<sub>20</sub> = 0,52 mg do óleo essencial de *O. selloi*.mL<sup>-1</sup> de dieta artificial; CL<sub>50</sub> = 0,60mg do óleo essencial de *O. selloi*.mL<sup>-1</sup> de dieta artificial

### b) Bioensaio 2 - Teor de Proteínas nas Fezes

A quantidade de proteínas analisada nas fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial acrescida do óleo essencial de *O. selloi* foi maior na concentração de 0,52 mg.mL<sup>-1</sup> (CL<sub>20</sub>), com média de 431,24 ± 48,14 µg.mg<sup>-1</sup> de fezes. Nos controles 1 e 2 e no tratamento da CL<sub>50</sub>, as médias de proteína foram semelhantes, sendo de 390,87 ± 58,84; 388,40 ± 72,39 e 372,14 ± 52,30 µg.mg<sup>-1</sup> de fezes, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 Quantidade de proteínas em fezes de *Spodoptera frugiperda* provenientes de larvas segundo instar alimentadas com dieta artificial acrescida do óleo essencial de *Ocimum selloi* (Lamiaceae)

Tratamentos	Proteína (µg.mg <sup>-1</sup> )*
Água + corante	390,87 ± 58,84 b
Água + corante + Tween® 80	388,40 ± 72,39 b
<i>O. selloi</i> CL <sub>20</sub>	431,24 ± 48,14 a
<i>O. selloi</i> CL <sub>50</sub>	372,14 ± 52,30 b
$p \leq 0,05$	0,0085
F	4,3410

\* Médias não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ( $p \leq 0,05\%$ ). CL<sub>20</sub> = 0,52mg.mL<sup>-1</sup>; CL<sub>50</sub> = 0,60mg.mL<sup>-1</sup>, do óleo essencial puro de *Ocimum selloi*.

### c) Bioensio3 - Efeito do óleo essencial de *O. selloi* e estragol sobre *S. frugiperda*

Após 24 horas da exposição das lagartas à dieta artificial acrescida com o óleo essencial de *O. selloi* (1 mg.mL<sup>-1</sup>) ou estragol (0,92 mg.mL<sup>-1</sup>), ocorreu 100% de mortalidade das larvas de *S. frugiperda*. Para os controles 1 e 2 a sobrevivência foi acima de 95% nesse mesmo período (Tabela 4).

Tabela 4 Sobrevivência de larvas com 48 horas de idade de *Spodoptera frugiperda*, após exposição à dieta artificial, acrescida com o óleo essencial de *Ocimum selloi* (Lamiaceae) e seu constituinte majoritário puro

Tempo de exposição (horas)	Início*	24
Tratamento	Número de larvas vivas	
Água + Corante (controle 1)	60	59
Água + Corante + Tween® 80– 1% (controle 2)	60	58
Óleo essencial (1mg.mL <sup>-1</sup> )	60	0
Estragol (0,92mg.mL <sup>-1</sup> )	60	0

\*Início do experimento

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização química do óleo essencial de *O. selloi*

Constituintes das classes dos fenilpropanoides (estragol e metil-eugenol) e sesquiterpenos ( $\beta$ -cariofileno, germacreno D,  $\gamma$ -elemeno, dentre outros) são frequentemente encontrados no óleo essencial de *O. selloi*. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com aqueles determinados por Alva et al. (2012), Castro et al. (2006), Knaak et al. (2010), Lopez et al. (2010) e Paula, Gomes-Carneiro e Paumgartten (2003). Estes autores também observaram que o óleo essencial de *O. selloi* e alguns constituintes químicos secundários comuns nessa planta e presente em outras plantas da família Lamiaceae, apresentaram atividade inseticida para pragas agrícolas.

Salienta-se que a escolha do método de extração de óleos essenciais é importante para seleção e conservação de seus constituintes. Nesse contexto, o método de extração por arraste a vapor do óleo essencial de *O. selloi*, utilizado no presente trabalho, foi eficaz e não degradou constituintes comuns, demonstrando potencial para uso em grande escala.

## 4.2 Efeito do óleo essencial de *O. selloi* no desenvolvimento de *S. frugiperda*

### a) Bioensaio 1

A alta mortalidade acumulada até 264h das larvas de *S. frugiperda*, expostas à dieta acrescida com o óleo essencial de *O. selloi* na concentração de 0,60 mg.mL<sup>-1</sup> pode estar relacionada com danos ao sistema nervoso, haja vista que óleos essenciais podem ter ação neurotóxica sobre artrópodes, provocando efeito *knock down* semelhante ao ocorrido por inseticidas da classe dos piretroides, ou afetar a enzima acetilcolinesterase como os inseticidas da classe dos organofosforados e carbamatos (ISMAN, 2000).

O maior período larval nas concentrações de 0,52 mg.mL<sup>-1</sup> (CL<sub>20</sub>) e 0,60 mg.mL<sup>-1</sup> (CL<sub>50</sub>) e a redução do peso das pupas na concentração de 0,52 mg.mL<sup>-1</sup>, podem estar relacionados à atividade de antibiose, comum em substâncias de origem natural. Essas substâncias podem afetar a atividade de enzimas digestivas e prejudicar a disponibilidade de aminoácidos necessária para o desenvolvimento dos insetos (FARIAS-RIVERA et al., 2003; PAVELA; VRCHOTOVÁ; ŠERÁ, 2008). Salienta-se que o efeito subletal do óleo essencial sobre o período larval de *S. frugiperda* pode favorecer a exposição desses insetos a predadores e ou parasitoides, e o menor peso das pupas pode originar adultos menos aptos a se estabelecerem no ambiente.

O óleo essencial de *O. selloi* foi inócuo à reprodução e longevidade de *S. frugiperda*. No entanto, o óleo essencial de *Piper hispidinervum* (Piperaceae) afetou negativamente a espermatogênese e reduziu o número de ovariolos de *S. frugiperda* (ALVES et al., 2014). O óleo essencial de *Acanthospermum hispidum* (Asteraceae), adicionado em dieta artificial e oferecido a larvas de *S. frugiperda*, causou alterações na alimentação e oviposição desse inseto (ALVA et al., 2012). Dessa forma, a ação dos óleos essenciais na reprodução de *S. frugiperda* varia de acordo com a espécie botânica, onde a variedade dos constituintes químicos do

óleo essencial, isolados ou em mistura, podem ser agentes causadores de efeitos deletérios a esse inseto.

#### **b) Bioensaio 2 - Teor de Proteínas nas Fezes**

O maior teor de proteínas nas fezes de *S. frugiperda*, criadas em dieta tratada na concentração de  $0,52 \text{ mg.mL}^{-1}$  (CL<sub>20</sub>), indica que o óleo essencial de *O. selloi* provavelmente atuou como inibidor de proteases no intestino desse inseto. A ingestão crônica de dieta artificial, contendo inibidores de proteínas, pode afetar o metabolismo e o desenvolvimento de insetos imaturos. Nesse caso, o maior período pupal e menor peso das pupas de *S. frugiperda* na concentração de  $0,52 \text{ mg.mL}^{-1}$  (CL<sub>20</sub>) pode estar relacionado com o baixo aproveitamento proteico na fase imatura ocasionado por uma possível inibição de proteases pelo óleo essencial. Por outro lado, insetos podem alterar a composição de enzimas proteolíticas no seu intestino após a ingestão de inibidores de proteases e favorecer sua tolerância (JONGSMA; BOLTER, 1997). Assim, na concentração de  $0,60 \text{ mg.mL}^{-1}$  (CL<sub>50</sub>) pode ter ocorrido uma maior produção de enzimas, para a degradação do alimento contaminado, o que desfavoreceu o desenvolvimento larval, mas afetou pouco o aproveitamento proteico. Dessa forma, uma compensação do uso de proteínas pode ter sido necessária para finalizar o ciclo larval e o período pupal, porém, não afetando o peso das pupas. Entretanto, a verdadeira causa de tal efeito ainda não está clara, havendo necessidade de novos estudos para sua comprovação.

#### **c) Bioensaio 3 - Efeito do óleo essencial de *O. selloi* e estragol sobre *S. frugiperda***

O efeito inseticida do estragol sobre as larvas de *S. frugiperda* na concentração de  $0,92 \text{ mg.mL}^{-1}$ , observado no presente estudo, pode ser em decorrência de sua ação neurotóxica, uma vez que Lopez et al. (2010)

constataram que esse composto desencadeou inibição mista à enzima acetilcolinesterase (AChE), ligando-se tanto à enzima livre como no complexo enzima-substrato. Salienta-se que mais estudos devem ser realizados sobre o modo de ação do estragol, bem como do óleo essencial de *O. selloi*, em *S. frugiperda*, uma vez que compostos químicos voláteis podem atuar em diferentes sistemas biológicos.

Contudo, estudos recentes mostraram o potencial da ação inseticida de óleos essenciais para pragas de grãos armazenados e também do fenilpropanoide estragol (CHU et al., 2011; EBADOLLAHI, 2011; KIM; LEE, 2014; LÓPEZ; PASCUAL-VILLALOBOS, 2010; MBATA; PASCUAL-VILLALOBOS; PAYTON, 2012; WANG et al., 2011; ZHAO et al., 2012).

## 5 CONCLUSÕES

A concentração de 0,52 mg de óleo essencial.mL<sup>-1</sup> de dieta artificial (CL<sub>20</sub>) do óleo essencial de *O. selloi* prolonga a fase larval e reduz o estágio de pupa, bem como provoca maior concentração de proteínas nas fezes de *S. frugiperda*.

A concentração de 0,60 mg de óleo essencial.mL<sup>-1</sup> de dieta artificial (CL<sub>50</sub>) do óleo essencial de *O. selloi* causa 50% de mortalidade das larvas de *S. frugiperda* e aumenta os períodos larval e pupal.

O composto estragol na concentração de 0,92 mg.mL<sup>-1</sup> na dieta artificiale o óleo essencial de *O. selloi* na concentração 1 mg.mL<sup>-1</sup> na dieta artificial causam 100% de mortalidade de larvas de *S. frugiperda*.

A realização de pesquisas, para desvendar os mecanismos do potencial de ação inibitório do óleo essencial de *O. selloi* e do estragol, nos sistemas metabólicos de *S. frugiperda*, poderão sugerir o desenvolvimento de novos produtos para o controle desta importante praga do milho.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERÊNCIAS

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

AL-SARAR, A.; HALL, F.R.; DOWNER, R.A. Impact of spray application methodology on the development of resistance to cypermethrin and spinosad by fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). **Pest Management Science**, Sussex, v.62, n.11, p.1023-1031, 2006.

ALVA, M. et al. Bioactivity of the Essential Oil of an Argentine Collection of *Acanthospermum hispidum* (Asteraceae). **Natural Product Communications**, Westerville, v.7, n.2, p.245-248, 2012.

ALVES, T.J.S. et al. Effects of *Piper hispidinervum* on spermatogenesis and histochemistry of ovarioles of *Spodoptera frugiperda*. **Biotechnic & Histochemistry**, Louisville, v.89, n.4, p.245-255, 2014.

BARROS, E.M.; TORRES, J.B.; BUENO, A.F. Oviposition, development, and reproduction of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) fed on different hosts of economic importance. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.39, n.6, p.996-1001, 2010.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, n.1/2, p.248-254, 1976.

BUSATO, G.R. et al. Consumption and utilization of food by *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) at two different temperatures. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.6, p.1278-1283, nov./dez. 2004.

CASTRO, D. et al. Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.8, n.4, p. 27-32, 2006.

CHU, S.S. et al. Chemical composition and toxic activity of essential oil of *Caryopteris incana* against *Sitophilus zeamais*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.10, n.42, p.8476-8480, 2011.

COSTA, L. C. et al. Yield and composition of the essential oil of *Ocimum selloi* Benth. cultivated under colored netting. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 22, n. 1, p. 34-39, 2010.

DEQUECH, S.T.B. et al. Histopatologia de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lep., Noctuidae) infectadas por *Bacillus thuringiensis* aizawai e com ovos de *Campoletis flavicincta* (Hym., Ichneumonidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n. 1, p. 273-276, jan./fev. 2007.

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, p. 463-471, 1963.

EBADOLLAHI, A. Chemical constituents and toxicity of *Agastache foeniculum* (pursh) Kuntze essential oil against two stored-product insect pests. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Santiago de Chile, v.71, n.2, p.212-217, 2011.

FARIAS-RIVERA, L.A. et al. Effect of leaf extracts of teosinte, *Zea diploperennis* L., and a mexican maize variety, criollo 'uruapeño', on the growth and survival of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v.86, n.3, p.239-243, 2003.

FRANCA, C. S. et al. Analgesic and antidiarrheal properties of *Ocimum selloi* essential oil in mice. **Fitoterapia**, Milano, v. 79, n. 7/8, p. 569-573, 2008.

GREENE, G.; LEPPLA, N.; DICKERSON, W. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology** College Park, v.69, n.4, p.487-488, 1976.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides: for richer, for poorer. **Pest Management Science**, Sussex, v. 64, n. 1, p. 8-11, 2008.

- ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, n. 8/10, p. 603-608, 2000.
- JONGSMA, M.A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.43, n.10, p.885-895, 1997.
- KIM, S. I.; LEE, D. W. Toxicity of basil and orange essential oils and their components against two coleopteran stored products insect pests. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Beijing, v. 17, n. 1, p. 13-17, 2014.
- KNAAK, N. et al. Toxicity of essential oils to the larvae of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Biopesticides**, Oxford, v.6, n.1, p.49-53, 2013.
- LOPEZ, M. D.; CONTRERAS, J.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Selection for tolerance to volatile monoterpenoids in *Sitophilus oryzae* (L.), *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Cryptolestes pusillus* (Schonherr). **Journal of Stored Products Research**, Elmsford, v. 46, n. 1, p. 52-58, 2008.
- LOPEZ, M.D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M.J. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. **Industrial Crops and Products**, London, v.31, n.2, p.284-288, 2010.
- MBATA, G.N.; PASCUAL-VILLALOBOS, M.J.; PAYTON, M.E. Comparative Mortality of Diapausing and Nondiapausing Larvae of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) Exposed to Monoterpenoids and Low Pressure. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.105, n.2, p.679-685, 2012.
- MENEZES, C. W. G. de et al. Effects of crude extract fractions of *Adenocalymma nodosum* (Bignoniaceae) on duration of pupa stage emergence of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) and phytotoxicity on vegetable crops. **Allelopathy Journal**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 141-149, 2014.
- MENEZES, C.W.G.de et al. Reproductive and toxicological impacts of herbicides used in *Eucalyptus* culture in Brazil on the parasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). **Weed Research**, Oxford, v.52, n.6, p.520-525, 2012.
- MOREIRA, M.D. et al. Plant compounds insecticide activity against Coleoptera pests of stored products. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.7, p.909-915, 2007.

MOUMITA, M.; DATTA, A.K. The basils: a review. **Plant Archives**, Oxford,v.7, n.2, p.473-483, 2007.

PAULA, J. P. de; GOMES-CARNEIRO, M. R.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 88, n. 2/3, p. 253-260, 2003.

PAVELA, R.; VRCHOTOVÁ, N.; ŠERÁ, B. Growth inhibitory effect of extracts from *Reynoutria* sp. plants against *Spodoptera littoralis* larvae. **Agrociencia**, Montevideo,v.42, n.5, p. 573-584, 2008.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**:a language and environment for statistical computing. Version 3.0.2. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Software.

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**, Stanford,v.57, p. 405-424, 2012.

TAVARES, W. S. et al. Ar-turmerone from *Curcuma longa* (Zingiberaceae) rhizomes and effects on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Industrial Crops and Products**, London, v. 46, p. 158-164, Apr. 2013.

WANG, C.F. et al. Components and insecticidal activity against the maize weevils of *Zanthoxylum schinifolium* fruits and leaves. **Molecules**, Basel,v.16, n.4, p.3077-3088, 2011.

ZHAO, N.N. et al. Evaluation of the toxicity of the essential oils of some common Chinese spices against *Liposcelis bostrychophila*. **Food Control**, Guildford, v.26, n.2, p.486-490, 2012.

**CAPÍTULO 3 Análise química de constituintes voláteis de *Ocimum selloi*  
(Lamiaceae) e sua atividade inseticida para *Spodoptera  
frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)**

**RESUMO**

O óleo essencial de plantas do gênero *Ocimum* possui constituintes químicos de interesse para a agricultura e podem ser fontes de novas moléculas com ação inseticida. No entanto, a qualidade química de óleos essenciais pode ser afetada por diversos fatores químicos e físicos, e o período de armazenamento deve ser considerado. A caracterização química do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth (Lamiaceae), extraído nos anos de 2011 e 2014, e sua toxicidade para *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) foi avaliada. Lagartas de *S. frugiperda*, com 48 h de idade, foram alimentadas com dieta artificial, contendo o óleo essencial, ou expostas ao vapor de *O. selloi*, sendo avaliada a mortalidade dos insetos ao longo do tempo. A inibição da enzima tripsina foi avaliada com o óleo essencial de *O. selloi* extraído nos anos de 2011 e 2014. A caracterização química do óleo essencial de *O. selloi*, extraído nos anos de 2011 e 2014, foi semelhante, e o estragol foi o composto majoritário, indicando que o tempo de armazenamento não degrada esse óleo essencial. O óleo essencial diluído na dieta artificial a  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  causou a morte das larvas de *S. frugiperda* em até 48 h de avaliação do experimento. A exposição das larvas de 48 h de idade ao vapor de  $5 \mu\text{L}$  do óleo essencial puro de *O. selloi* causou 100% de mortalidade dos insetos em 24 h de avaliação do experimento. O óleo essencial de *O. selloi* não inibiu a enzima tripsina. O período de armazenamento em condições de baixa temperatura não afetou a qualidade química e a ação inseticida do óleo essencial de *O. selloi*. Portanto, o óleo essencial de *O. selloi* possui potencial inseticida contra lagartas de *S. frugiperda*.

Palavras-chave: Constituintes químicos. Controle de pragas. Estragol. Produtos naturais.

## ABSTRACT

The essential oil extracted from plants of the *Ocimum* genus have chemical constituents of interest for agriculture and can be sources of new molecules with insecticidal action. However, the chemical quality of essential oils can be affected by many physical and chemical factors, and the storage period must also be considered. We performed the chemical characterization of *Ocimum selloi* Benth (Lamiaceae) essential oil, extracted in 2011 and 2014, and evaluated its toxicity to *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *S. frugiperda* 48-hour-old larvae were fed the artificial diet containing the essential oil, or exposed to *O. selloi* vapor, as we evaluated insect mortality over time. The inhibition of the enzyme trypsin was assessed using the *O. selloi* essential oil extracted in 2011 and 2014. The chemical characterization of *O. selloi* essential oil extracted in 2011 and 2014 was similar, and estragole was the major compound, indicating that the storage time does not degrade this essential oil. The essential oil diluted in the artificial diet at 1 mg.mL<sup>-1</sup> caused the death of the *S. frugiperda* larvae within 48 hours. The exposure of the 48-hour-old larvae to 5 µL of vapor of pure *O. selloi* essential oil caused 100% insect mortality in 24 hours. The *O. selloi* essential oil did not inhibit the enzyme trypsin. The storage period in low temperature conditions did not affect the chemical quality and insecticide action of the essential oil. Therefore, the *O. selloi* essential oil has insecticide potential against *S. frugiperda* larvae.

Keywords: Chemical constituents. Estragole. Natural product. Pest control.

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de inseticidas botânicos foi comum na primeira metade do século XX, mas declinou após o desenvolvimento dos pesticidas sintéticos. No entanto, a aplicação contínua e indiscriminada de produtos químicos industriais pode causar impactos negativos ao meio ambiente, a organismos não alvos e ao homem (REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2012). Nas últimas décadas, o estudo de compostos botânicos, como potencial fonte de moléculas inseticidas, ou como produtos alternativos para uso na agricultura tem sido resgatado. Dentre os compostos naturais, os óleos essenciais têm se destacado em razão de sua disponibilidade no mercado, facilidade de obtenção e análise dos constituintes químicos, e diversidade de espécies botânicas aromáticas (ISMAN; GRIENEISEN, 2014).

O metabolismo secundário dos vegetais atua como forma de defesa ao ataque de patógenos e artrópodes herbívoros, sendo os óleos essenciais importantes substâncias de defesas para algumas famílias botânicas (REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2012). A composição química dos óleos essenciais pode variar em virtude das condições de cultivo ou espécies de plantas (quimiotipo), aspectos de pós-colheita, forma de extração e do período e condições de armazenamento. Em relação ao armazenamento, se realizado de forma inapropriada, pode causar alterações na composição química dos óleos essenciais e afetar sua qualidade, e, conseqüentemente, afetar seu valor comercial e aceitação por consumidores (ROSADO et al., 2013). Porém, estudos sobre a qualidade inseticida de óleos essenciais armazenados são escassos.

Os óleos essenciais podem ter ação neurotóxica, antialimentar ou repelente a insetos pragas de interesse agrícola (ISMAN, 2006; LOPEZ; CONTRERAS; PASCUAL-VILLALOBOS, 2010). Dentre as famílias botânicas que produzem esses compostos químicos, espécies da família Lamiaceae e do

gênero *Ocimum* são interesse para a agricultura (BAKKALI et al., 2008; MOUMITA; DATTA, 2007). O óleo essencial da espécie *Ocimum selloi* Benth (Lamiaceae) apresentou efeitos tóxicos para diferentes pragas agrícolas, agindo como repelente e neurotóxico (LOPEZ; CONTRERAS; PASCUAL-VILLALOBOS, 2010; PAULA; GOMES-CARNEIRO; PAUMGARTTEN, 2003). Dessa forma, o óleo essencial de *O. selloi* pode ser uma alternativa atraente para o controle de pragas agrícolas, como, por exemplo, para a lagarta do cartuxo do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).

*Spodoptera frugiperda* é considerada a praga chave da cultura do milho no Brasil e seus danos podem causar sérios prejuízos econômicos (CRUZ et al., 2012). As lagartas desse lepidóptero, nos primeiros estádios de vida, alimentam-se do resto de seus ovos e raspam o limbo foliar dessa planta. Nos estádios mais avançados, as lagartas podem perfurar as folhas do milho e, logo após, migram para a região do cartucho do milho causando danos (BARROS; TORRES; BUENO, 2010).

Objetivou-se analisar a composição química e avaliar a atividade inseticida de dois óleos essenciais de *O. selloi*, um armazenado desde 2011 e outro obtido recentemente, contra *S. frugiperda*.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção do óleo essencial**

Plantas de *O. selloi* foram cultivadas, nos anos de 2011 e 2014, em canteiros localizados no Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras (21°14' 43S 44°59' 59W, média anual de precipitação de 1530 mm, temperatura média de 20,4

°C e 919 m altitude), Minas Gerais, Brasil. Os canteiros foram adubados com esterco bovino na dose de 3,0 kg.m<sup>2</sup>e irrigados periodicamente 4 vezes por semana.

Exsiccatas da espécie foram depositadas no herbário da UFLA, com o número de referência ESAL 7474. Folhas de *O. selloi* foram coletadas nos verões de 2011 e 2014 pela manhã, de plantas com seis meses de idade. O óleo essencial foi extraído das folhas frescas por destilação por arraste a vapor, em destilador Marconi MA480, por 90 minutos (COSTA et al., 2010). O óleo essencial foi purificado por decantação e tratamento com sulfato de magnésio anidro. O sal foi removido por filtração simples e o óleo essencial foi armazenado em freezer a -20 °C, até a realização dos ensaios biológicos e análises químicas.

## 2.2 Análises químicas do óleo essencial

As análises do óleo essencial foram realizadas no Laboratório do Horto de Plantas Medicinais da UFLA. Para a análise quantitativa do óleo volátil, utilizou-se um 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 (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 1:50. Empregou-se 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). Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min e as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 240°C. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C mantida por 1 minuto, seguido por rampa de

temperatura de 3 °C/min até 240 °C e de outra 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  $\pm$  desvio padrão de 3 amostras injetadas (COSTA et al., 2010).

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 de 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 demais condições experimentais foram as mesmas das análises quantitativas.

Os constituintes químicos foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à co-injeção de uma solução padrão de *n*-alcanos (C8-C20, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA), co-injeção com substância de referência (estragol, Sigma-Aldrich®) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI e de literatura (ADAMS, 2001). Os índices de retenção foram calculados usando-se a equação de Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção citados em literatura (ADAMS, 2001).

### **2.3 Criação de *S. frugiperda***

Os insetos usados no experimento foram obtidos da criação do Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Entomologia da UFLA. As larvas de *S. frugiperda* foram alimentadas com dieta artificial (GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976) e os adultos com solução aquosa de mel (10%, v/v).

#### **2.4 Preparação dos óleos essenciais para a mistura em dieta artificial para *S. frugiperda***

O óleo essencial foi solubilizado em solução aquosa, contendo Tween80<sup>®</sup> (Polissorbato 80, Sigma-Aldrich a 1% - 0,01 g.mL<sup>-1</sup>), acrescido com dez gotas de corante alimentício (0,5 mL), a fim de garantir a homogeneização do óleo essencial na dieta artificial.

#### **2.5 Bioensaio 1: Efeito do óleo essencial na sobrevivência de *S. frugiperda***

Larvas de 48 horas de idade, previamente mantidas em dieta artificial pura (sem óleo essencial), foram utilizadas para o bioensaio. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, sob condições controladas (temperatura de  $25 \pm 2$  °C,  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa e fotofase de 12 horas). Foi composto por quatro tratamentos: (T1) controle 1: água + 0,5 mL de corante, (T2) controle 2: água + 0,5 mL de corante + Tween 80<sup>®</sup>, (T3) 1 mg de óleo essencial extraído em 2011.mL<sup>-1</sup> de dieta artificial (T4) 1 mg de óleo essencial extraído em 2014.mL<sup>-1</sup> de dieta artificial.

O óleo essencial de *O. selloi* foi incorporado na dieta artificial e, logo após, pedaços equivalentes a  $9 \pm 0,35$  g (quantidade suficiente para a fase larval completar o seu ciclo) foram cortados e oferecidos às larvas. Em seguida, os pedaços da dieta foram transferidos para tubos de vidro (8 cm de altura x 2 cm de diâmetro), os quais continham uma larva de *S. frugiperda*. Cada tratamento constituiu-se de 120 repetições, sendo cada representada por um tubo de vidro, contendo uma lagarta e uma porção de dieta tratada ou não. A sobrevivência e o desenvolvimento das lagartas foram avaliados diariamente. Os dados coletados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas com o teste de Scott-

Knott ( $p < 0,05$ ), usando o programa estatístico R (Pacote laercio) (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013).

## **2.6 Bioensaio 2: Efeito da fração volátil do óleo essencial de *O. selloi* sobre larvas de *S. frugiperda***

O experimento foi realizado utilizando larvas de *S. frugiperda* de 48 horas de idade, alimentadas com  $4,5 \pm 0,3$  mg dieta artificial isenta de óleo essencial. Em razão da baixa quantidade disponível do óleo essencial extraído em 2014, foi avaliado somente o óleo essencial extraído em 2011. Empregaram-se discos de papel-filtro impregnados com 5  $\mu$ L do óleo essencial de *O. selloi*, os quais foram depositados no fundo de um tubo de vidro (8 cm altura x 2 cm de diâmetro). A exposição das larvas à fração volátil do óleo essencial foi feita, por meio de uma ponte de papel de filtro perfurado, introduzida a 1 cm acima dos discos impregnados com óleo, conforme apresentado na Figura 1. A dieta oferecida às larvas foi ofertada sobre a ponte de papel de filtro. O tubo foi tampado com um chumaço de algodão.

O bioensaio foi composto por três tratamentos: (T1) controle 1: 5  $\mu$ L de água + corante; (T2) controle 2: 5  $\mu$ L de água + 0,5 mL de corante + Tween 80<sup>®</sup>; (T3) - 5  $\mu$ L do óleo essencial de *O. selloi* extraído em 2011, puro. O ensaio foi realizado em condições controladas (temperatura de  $25 \pm 2$  °C,  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa e fotofase de 12 horas). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 30 repetições por tratamento contendo uma larva de *S. frugiperda* por repetição. A avaliação da mortalidade das larvas ocorreu 24 h após o início do experimento e terminou após a constatação de 100% de mortalidade dos insetos. Os dados coletados foram analisados de forma descritiva, uma vez que a mortalidade dos insetos foi de 100% no tempo avaliado.

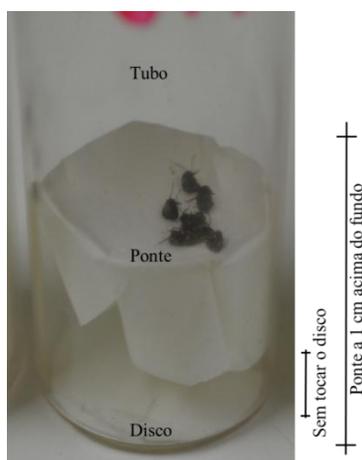


Figura 1 Tubo utilizado para o ensaio com a fração volátil do óleo essencial de *O. selloi*

### 2.7 Bioensaio 3: Inibição da enzima tripsina pelo óleo essencial de *O. selloi*

Para extração da enzima, lagartas de sexto instar de *S. frugiperda*, criadas em laboratório, foram imobilizadas com acetato de etila e mortasa  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 min. O tubo digestivo das lagartas foi removido com pinça e tesoura e macerados em homogeneizador *potter* onde foi colocado um tubo digestivo para cada 4 mL de água destilada a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O extrato bruto foi filtrado em malha de nylon de  $100\text{ }\mu\text{m}$  e centrifugado a  $10000g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. O sobrenadante (extrato enzimático) foi recolhido e armazenado em freezera  $-20^{\circ}\text{C}$ , até sua utilização (ROSSI et al., 2010).

O efeito da atividade proteolítica do extrato dos intestinos médios da larva foi medido, usando  $1,25\text{ mmol.L}^{-1}$  de BApNA ( $N\alpha$ -Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida) como substrato, em Gli-NaOH  $0,1\text{ M}$  e pH de 9,7 como tampão de reação. Para o preparo dessa solução, solubilizaram-se  $54,5\text{ mg}$  de BApNA em  $1,25\text{ mL}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) e completou-se o volume de  $100\text{ mL}$  com o tampão.

Para a realização do ensaio cinético, o óleo essencial de *O. selloi* de 2011 e 2014 foram diluídos em metanol (MeOH) e dimetilsulfóxido (DMSO) na seguinte proporção: 1 µL do óleo essencial: 200 µL de DMSO: 1000 µL de MeOH 50%. Essa proporção foi suficiente para a diluição do óleo essencial, sem ocorrer turvação do meio e ser possível a reação com a solução contendo tripsina. O ensaio foi realizado de forma cinética, com quatro períodos de reação: 30, 60, 90 e 120 minutos. Foram realizadas 10 diluições da solução com óleo essencial (1:10 a 1:100) com 3 repetições em cada diluição. Para cada ensaio de inibição, foram adicionados à mistura reacional 200 µl do óleo essencial de *O. selloi*, 200 µL da enzima diluída em água (extrato enzimático, nesse caso foi usado 1:20) e 800 µL da solução do substrato. O ensaio controle foi feito sem o inibidor para que a reação ocorresse em velocidade máxima. A reação foi paralisada com 200 µL de ácido acético 30% e a leitura da absorbância foi feita a 410 nm (ERLANGER; KOKOWSKY; COHEN, 1961).

O cálculo da UTI (Unidades de Tripsina Inibida) foi realizado utilizando-se a equação:

$$UTI = ((I_c - I_i) / I_c) * 100$$

Onde:  $I_c$  = Inclinação da reta do gráfico de absorbância x tempo (min.) do ensaio controle;  $I_i$  = Inclinação da reta do gráfico de absorbância x tempo (min.) do ensaio de inibição;  $I_e$  = Inclinação da reta obtida com o padrão de *p*-nitroanilida por Erlanger, Kokowsky e Cohen (1961).

O valor de 1 UTI corresponde a 1 µmol de *p*-nitroanilida que deixa de ser produzido, em decorrência da presença do inibidor. A faixa considerada significativa como inibidora de tripsina foi entre 40% e 80%. Valores acima podem ser considerados falso positivos, já que a inibição estaria sendo maior que a observada. Valores menores que 40% podem indicar nenhuma inibição da enzima pela solução inibidora ou erros experimentais.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Análises químicas do óleo essencial de *O. selloi*

Na caracterização química do óleo de *O. selloi* extraído nos anos de 2011 e 2014 foram encontrados 13 e 12 constituintes, os quais caracterizaram  $99,63\% \pm 0,02$  e  $99,42\% \pm 0,02$ , respectivamente, da composição química total. O fenilpropanoide estragol foi identificado como o composto majoritário de ambos os óleos,  $92,97\% \pm 0,06$  (2011) e  $92,02\% \pm 0,05$  (2014). Dos 6,66% dos compostos químicos restantes de *O. selloi* extraído em 2011, 5,46% corresponderam à soma dos sesquiterpenos,  $\beta$ -cariofileno (1,55%), germacreno D (1,73%) e  $\gamma$ -elemeno (2,18%). Para o óleo essencial de *O. selloi* de 2014, a composição química total dos constituintes remanescentes perfaz 7,4%;6,27% corresponderam, também, aos sesquiterpenos:  $\beta$ -cariofileno (1,71%), germacreno D (2,01%) e  $\gamma$ -elemeno (2,55%). A maioria dos compostos foi comum entre os óleos essenciais de 2011 e 2014. No entanto, os componentes aloaromadendreno, germacreno B e espatulenol estiveram presentes apenas no óleo essencial de 2011 e o  $\beta$ -bourboneno e *o*trans- $\beta$ -bergamoteno no óleo essencial de 2014 (Tabela 1).

Tabela 1 Caracterização química do óleo essencial de *Ocimum selloi* extraído no ano de 2011 e 2014.

Pico	Constituintes	Area (%)	
		Óleo Essencial 2011	Óleo Essencial 2014
1	ni*	0,21 ± 0,01	0,12 ± 0,01
2	estragol	92,97 ± 0,06	92,02 ± 0,05
3	ni	0,20 ± 0,01	0,17 ± 0,02
4	$\alpha$ -copaeno	0,26 ± 0,01	0,28 ± 0,01
5	$\beta$ -bourboneno	-	0,11 ± 0,02
6	metil-eugenol	0,22 ± 0,02	0,33 ± 0,01
7	$\beta$ -cariofileno	1,55 ± 0,02	1,71 ± 0,01
8	<i>trans</i> - $\beta$ -bergamoteno	-	0,12 ± 0,01
9	aloaromadendreno	0,27 ± 0,04	-
10	germacreno D	1,73 ± 0,01	2,01 ± 0,01
11	$\gamma$ - elemeno	2,18 ± 0,01	2,55 ± 0,03
12	germacreno B	0,18 ± 0,02	-
13	espatulenol	0,07 ± 0,01	-
TOTAL		99.63 ± 0,02	99.42 ± 0,02

\*ni: não identificado. -: ausente.

### 3.2 Efeito do óleo essencial de *O. selloi* sobre larvas de *S. frugiperda*

Em comparação com os tratamentos controles, a sobrevivência das larvas de *S. frugiperda* foi drasticamente reduzida nos tratamentos contendo os óleos essenciais de *O. selloi* de 2011 e 2014, na concentração equivalente a 1 mg do óleo essencial.mL<sup>-1</sup> de dieta artificial. Após 24 horas de exposição, a sobrevivência das larvas foi de 3,00 ± 0,32 % e 5,00 ± 0,24 %. Todas as larvas morreram em ambos os tratamentos com os óleos essenciais, até o período de 48 horas. Quanto aos controles 1 e 2, constatou-se mortalidade máxima acumulada inferior a 10 % para o período total de avaliação (48 h) (Tabela 2).

Tabela 2 Sobrevivência acumulada (%  $\pm$  desvio padrão) de larvas de *Spodoptera frugiperda* com 24 h e 48 h, após serem alimentadas com dieta artificial acrescida ou não com óleo essencial de *Ocimum selloi* extraído no ano de 2011 e 2014

Tratamento	Sobrevivência acumulada (% $\pm$ desvio padrão)	
	24 h após oferta da dieta	48 h após oferta da dieta
Controle 1 (Água + Corante na dieta)	96,66 $\pm$ 1,81 a	92,00 $\pm$ 3,03 a
Controle 2 (Água + Corante + Tween 80 <sup>®</sup> na dieta)	95,00 $\pm$ 2,19 a	93,33 $\pm$ 2,51 a
<i>O. selloi</i> extraído em 2011 (1 mg.mL <sup>-1</sup> na dieta)	3,00 $\pm$ 0,32 b	0,00 $\pm$ 0,00 b
<i>O. selloi</i> extraído em 2014 (1 mg.mL <sup>-1</sup> na dieta)	5,00 $\pm$ 0,24 b	0,00 $\pm$ 0,00 b
$p \leq 0,05$	0,000	0,000
$F$	332,884	358,081

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

### 3.3 Exposição das larvas de *S. frugiperda* à fração volátil do óleo essencial de *O. selloi*

Após 24 horas da exposição das larvas ao vapor do óleo essencial de *O. selloi*, ocorreu 100% de mortalidade das larvas de *S. frugiperda*. Para os controles 1 e 2 a mortalidade foi inferior a 10 % nesse mesmo período (Tabela 3).

Tabela 3 Mortalidade das larvas de *Spodoptera frugiperda*(%), após 24 horas de exposição ao vapor do óleo essencial de *Ocimum selloi*

Tratamento	Mortalidade (%)
Água + Corante no disco (controle 1)	3,33
Água + Corante + Tween 80 <sup>®</sup> – 1% no disco (controle 2)	6,67
Discos de papel contendo 5 $\mu$ L de óleo essencial	100

n = 30 larvas (uma larva por tubo).

### 3.4 Inibição da tripsina de *S. frugiperda* pelo óleo de *O. selloi*

Os óleos essenciais de *O. selloi* de 2011 e de 2014 não inibiram a enzima tripsina. As porcentagens médias de inibição foram de apenas  $9,03 \pm 1,63\%$  e  $9,08 \pm 2,05\%$  de Unidade de Tripsina Inibida (UTI), para os óleos essenciais de *O. selloi* extraído nos anos de 2011 e 2014, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 Porcentagem de inibição  $\pm$  erro padrão da enzima tripsina presente no intestino de *Spodoptera frugiperda* pelo óleo essencial de *Ocimum selloi*

Tratamento	% de Inibição de tripsina
Controle (sem inibidor)	0
Óleo essencial <i>O. selloi</i> extraído em 2011*	$9,03 \pm 1,63^{**}$
Óleo essencial <i>O. selloi</i> extraído em 2014*	$9,08 \pm 2,05^{**}$

\*Solução de 1  $\mu$ L do óleo essencial: 200  $\mu$ L de DMSO: 1000  $\mu$ L de MeOH 50%.

\*\*Faixa de inibição (%) da enzima tripsina: 40% - 80%.

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Análise química do óleo essencial de *O. selloi*

Os constituintes químicos, presentes nos óleos essenciais de 2011 e 2014, são comuns em *O. selloi*, como o fenilpropanoide estragol e os sesquiterpenos,  $\beta$ -cariofileno, germacreno D,  $\gamma$ -elemeno, dentre outros (COSTA et al., 2010; MARTINS et al., 1997). O armazenamento do óleo essencial de *O. selloi* em freezer conservou a qualidade de seus constituintes químicos mais comuns e evitou a degradação destes e, também, do composto majoritário estragol, cujos teores foram similares em ambos os óleos.

Os constituintes majoritários do óleo essencial de *Ocimum basilicum* (Lamiaceae), armazenado por 12 meses às temperaturas variando de  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $25^{\circ}\text{C}$

°C, também não sofreram degradação acentuada. Porém, constituintes desse mesmo óleo em menores quantidades oscilaram em seu conteúdo significativamente (ROSADO et al., 2013). É importante que as condições do armazenamento não afetem as características químicas do óleo essencial de *O. selloi*, para que não comprometa sua qualidade química e, conseqüentemente, sua atividade biológica.

#### **4.2 Efeito do óleo essencial de *O. selloi* sobre larvas de *S. frugiperda***

A atividade inseticida do óleo essencial de *O. selloi* ainda é pouco explorado sobre lepidópteras praga, porém, a sobrevivência das larvas de *S. frugiperda* foi reduzida quando se alimentaram de folhas de milho pulverizadas com óleo essencial de *Piper hispidinervum* (Piperales: Piperaceae) e *Syzygium aromaticum* (Myrtales: Myrtaceae) (CRUZ et al., 2014). O óleo essencial de *Ageratum conyzoides* (Asteraceae) a 2% e 3%, diluído em acetona e pulverizado sobre folhas de milho causou a mortalidade de 100% das larvas de primeiro instar de *S. frugiperda* em 24 horas (LIMA et al., 2010). Por outro lado, o óleo essencial de *O. selloi* foi repelente ao mosquito *Anopheles braziliensis* (Chagas, 1907) (Diptera: Culicidae), além de apresentar baixa toxicidade a mamíferos, não ter risco mutagênico ou ser irritante à pele humana (PAULA; GOMES-CARNEIRO; PAUMGARTTEN, 2003). O composto majoritário do óleo essencial de *O. selloi*, o estragol, apresentou a maior redução do Tempo Letal (TL<sub>99</sub>) em condições de baixa pressão, da traça de grãos armazenados *Plodia interpunctella* (Hübner, 1813) (Pyralidae: Lepidoptera), em comparação com outros monoterpenoides (MBATA; PASCUAL-VILLALOBOS; PAYTON, 2012). Dessa forma, a ação do óleo essencial de *O. selloi* sobre *S. frugiperda* deve ser explorado, com o objetivo de elucidar seu mecanismo de ação sobre

insetos, uma vez que esse óleo essencial foi tóxico a outros artrópodes de interesse para o homem.

#### **4.3 Efeito da fração volátil do óleo essencial sobre larvas de 48 h de idade de *S. frugiperda***

A mortalidade das larvas de *S. frugiperda* em 24 h pode estar relacionada com a toxicidade do óleo essencial de *O. selloi*, onde pode ter atuado no sistema nervoso das lagartas de *S. frugiperda*, apresentando uma ação inseticida de inibição da enzima acetilcolinesterase semelhante aos inseticidas sintéticos, como os carbamatos e organofosforados, que causam efeitos neurotóxicos aos insetos (ISMAN, 2000).

O composto majoritário do óleo essencial de *O. selloi*, o fenilpropanoide estragol, foi tóxico a insetos de grãos armazenados, e estudos revelaram a sua atividade como inibidor misto da enzima acetilcolinesterase (AChE), ligando-se tanto à enzima livre como no complexo enzima-substrato (LOPEZ; CONTRERAS; PASCUAL-VILLALOBOS, 2010; LÓPEZ et al., 2008).

#### **4.4 Inibição da enzima tripsina em *S. frugiperda***

O óleo essencial de *O. selloi* demonstrou exercer baixa atividade inibitória sobre essa família de enzimas digestivas, porém, não do complexo enzimático no geral. A inibição de enzimas do sistema digestivo de insetos é de interesse para o manejo de pragas, uma vez que afeta negativamente o desenvolvimento biológico dos insetos, deixando-os mais vulneráveis ao ataque de predadores, patógenos ou interrompendo seu ciclo de reprodução. No caso do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* (Lamiaceae), afetou a atividade de enzimas como a alfa amilase, proteases e esterases, reduzindo a atividade dessas

enzimas, e prejudicou o desenvolvimento biológico de *Glyphodes pyloalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Pyralidae), uma praga de amoreiras (YAZDANI; SENDI; ALIAKBAR, 2013). Portanto, mais estudos devem ser realizados sobre os efeitos do óleo essencial de *O. selloi* sobre o trato digestivo de *S. frugiperda*, considerando as diferentes enzimas e sítios de ação que esse metabolito secundário provavelmente pode atuar sobre esse organismo vivo.

## 5 CONCLUSÕES

O tempo de armazenamento de 27 meses do óleo essencial de *O. selloi* não alterou o teor do composto majoritário estragol, dos óleos essenciais extraídos em 2011 e 2014.

A concentração de 1 mg de óleo essencial *O. selloi* extraído, em 2011 e 2014.mL<sup>-1</sup> de dieta artificial, foi tóxico às larvas de *S. frugiperda* e causou 100% de mortalidade dos insetos até o tempo de 48 h.

A fração volátil de *O. selloi* apresentou ação inseticida, demonstrando que o tempo de armazenamento do óleo essencial dessa espécie aromática não influenciou na eficácia de controle das larvas de *S. frugiperda* e adultos de *Z. subfasciatus*.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured, 2001. 804 p.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.46, n. 2, p.446-475, Feb. 2008.
- BARROS, E.M.; TORRES, J.B.; BUENO, A.F. Oviposition, development, and reproduction of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) fed on different hosts of economic importance. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.39, n.6, p.996-1001, 2010.
- COSTA, L. C. et al. Yield and composition of the essential oil of *Ocimum selloi* Benth. cultivated under colored netting. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 22, n. 1, p. 34-39, 2010.
- CRUZ, G. et al. Bioactivity of *Piper hispidinervum* (Piperales: Piperaceae) and *Syzygium aromaticum* (Myrtales: Myrtaceae) Oils, with or without Formulated Bta on the biology and immunology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 107, n. 1, p. 144-153, Feb. 2014.
- CRUZ, I. et al. Using sex pheromone traps in the decision-making process for pesticide application against fall armyworm *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in maize. **International Journal of Pest Management**, London, v. 58, n. 1, p. 83-90, 2012.
- 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, p. 463-471, 1963.

ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.95, n.2, p.271-278, 1961.

GREENE, G.; LEPPLA, N.; DICKERSON, W. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology** College Park, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

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

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

ISMAN, M.B.; GRIENEISEN, M.L. Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.19, n.3, p.140-145, 2014.

LIMA, R.K.et al. Caracterização química e atividade inseticida do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. sobre a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797)(Lepidoptera: noctuidae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.26, n.1, p.1-5, 2010.

LOPEZ, M.D.et al. Selection for tolerance to volatile monoterpenoids in *Sitophilus oryzae* (L.), *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Cryptolestes pusillus* (Schonherr). **Journal of Stored Products Research**, Elmsford, v.46, n.1, p.52-58, 2010.

LÓPEZ, M.D.; JORDÁN, M.J.; PASCUAL-VILLALOBOS, M.J. Toxic compounds in essential oils of coriander, caraway and basil active against stored rice pests. **Journal of Stored Products Research**, Elmsford, v.44, n.3, p.273-278, 2008.

MARTINS, E.R.et al. Essential oil in the taxonomy of *Ocimum selloi* Benth. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.8, n.1, p. 29-32, 1997.

MBATA, G. N.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J.; PAYTON, M. E. Comparative Mortality of Diapausing and Nondiapausing Larvae of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) exposed to monoterpenoids and low pressure. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 105, n. 2, p. 679-685, Apr. 2012.

MOUMITA, M.; DATTA, A. K. The basils: a review. **Plant Archives**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 473-483, 2007.

PAULA, J. P. de; GOMES-CARNEIRO, M. R.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 88, n. 2/3, p. 253-260, 2003.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Version 3.0.2. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Software.

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**, Stanford, v. 57, p. 405-424, 2012.

ROSADO, L.D.S.et al. Changes in the content and composition of the essential oil of *Ocimum basilicum* L. during storage. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v.25, n.3, p.227-232, 2013.

ROSSI, G.D.et al. Inibição da tripsina de bicho-mineiro do cafeeiro por um fator não-protéico presente em extratos de folhas de mamona. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.34, n. 2, p.361-366, mar./abr. 2010.

YAZDANI, E.; SENDI, J.J.; ALIAKBAR, A. Chemical composition, toxicity and physiological effects of essential oil of *Rosemarinus officinalis* on lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). **Crop Protection**, Guildford, v.2, n. 4, p. 461-476, Dec. 2013.

**CAPITULO 4 Atividade inseticida do óleo essencial de *Ocimum selloi*  
(Lamiaceae) e estragol sobre *Zabrotes subfasciatus*  
(Coleoptera: Bruchidae)**

**RESUMO**

Moléculas oriundas do metabolismo secundário de plantas podem atuar como inseticidas a pragas de grãos armazenados e, assim, serem uma alternativa às moléculas sintéticas atuais. A atividade inseticida do óleo essencial de *Ocimum selloi* (Lamiaceae) foi avaliada sobre *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1833) (Coleoptera: Bruchidae). Adultos de *Z. subfasciatus* foram expostos ao vapor do óleo essencial de *O. selloi*. Análises químicas do óleo essencial de *O. selloi* indicaram a presença de 92,97% do fenilpropanoide estragol, além da presença dos sesquiterpenos  $\beta$ -cariofileno, germacreno D e  $\gamma$ -elemeno que corresponderam a 5,46% do total dos compostos presentes. O óleo essencial de *O. selloi* causou a paralisia de 100% dos adultos de *Z. subfasciatus* expostos até 24h de avaliação do experimento e, no período de avaliação até 48h a fração volátil, causou a morte de mais de 80% dos insetos. O óleo essencial de *O. selloi* possui potencial inseticida à broca do feijão. O estragol, constituinte majoritário do óleo, pode estar relacionado com a ação tóxica observada sobre esse inseto-praga.

Palavras-chave: Broca do feijão. Fenilpropanoide. Terpenos. Toxicidade. Fração volátil.

### ABSTRACT

Molecules derived from the secondary metabolism of plants can act as an insecticide to pests of stored products, thus being an alternative to current synthetic molecules. We evaluated the insecticidal activity of *Ocimum selloi* (Lamiaceae) essential oil over *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1833) (Coleoptera: Bruchidae). *Z. subfasciatus* adults were exposed to *O. selloi* essential oil vapor. Chemical analysis of the *O. selloi* essential oil indicated the presence of 92.97% of phenylpropanoid estragole, in addition to sesquiterpene  $\beta$ -caryophyllene, germacrene D, and  $\gamma$ -elemene, which correspond to 5.46% of the total of compounds present. The *O. selloi* essential oil caused the paralysis of 100% of the *Z. subfasciatus* adults exposed for 24 hours, and the evaluation period of 48 hours exposed to the volatile fraction caused the death of more than 80% of the insects. The *O. selloi* essential oil has insecticide potential for bean drill. The estragole, major constituent of the oil, could be related to the toxicity observed on this insect pest.

Keywords: Bean drill. Phenylpropanoid. Terpenes. Toxicity. Volatile fraction.

## 1 INTRODUÇÃO

O feijão é uma das mais importantes fontes de proteína para o povo brasileiro e também para grande parte da América Latina e México, além de apresentar elevado conteúdo energético quando comparado a outros gêneros alimentícios. Na cultura do feijoeiro [*Phaseolus* sp. (Fabaceae)], a praga *Z. subfasciatus* (Bohemann, 1833) (Coleoptera: Bruchidae) é considerada a maior praga de grãos armazenados em regiões tropicais. Larvas desse coleóptero penetram nos grãos armazenados de feijão e causam danos como a perda de massa, redução do valor nutritivo e da higiene do produto, perda do poder de germinação e, assim, depreciando a qualidade comercial dos grãos (COSTA et al., 2014).

O controle desta praga tem sido realizado pelo uso de inseticidas fumigantes como fosfeto de alumínio, fosfina de hidrogênio e tetracloreto de carbono. Contudo, embora o controle químico seja eficiente, essa prática é de difícil acesso para os pequenos produtores, em decorrência do elevado custo e possíveis riscos de toxicidade inerentes ao uso de produtos químicos.

Inseticidas botânica, contendo diferentes compostos derivados de plantas podem ter ação na proteção de grãos armazenados, pois são uma alternativa aos inseticidas químicos, que geralmente são mais tóxicos e suscetíveis a provocar efeitos nocivos para aplicadores, consumidores e para o meio ambiente (HUANG et al., 2002; ISMAN, 2000). Dentre compostos promissores, terpenos e fenilpropanoides têm apresentado ação inseticida sobre pragas de grãos armazenados (LOPEZ; CONTRERAS; PASCUAL-VILLALOBOS, 2010; TRIPHATI et al., 2003). Esses compostos estão presentes nos óleos essenciais botânicos e têm sido estudados frente às suas ações repelente, antialimentar, ovicida e por causar efeitos neurotóxicos a insetos (REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2012).

Dentre as diversas famílias botânicas que produzem óleos essenciais, a família Lamiaceae possui alguns gêneros botânicos com potencial para o uso na agricultura, como o *Ocimum* spp (BAKKALI et al., 2008). O óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth (Lamiaceae) demonstrou toxicidade para diferentes pragas agrícolas, agindo como repelente ou neurotóxico (LOPEZ; CONTRERAS; PASCUAL-VILLALOBOS, 2010; PAULA; GOMES-CARNEIRO; PAUMGARTTEN, 2003).

Objetivou-se avaliar o potencial inseticida do óleo essencial de *O. selloi* sobre a broca do feijão *Z. subfasciatus*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção do óleo essencial

Plantas de *O. selloi* foram cultivadas em canteiros localizados no Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras (21°14' 43S 44 °59' 59W, média anual de precipitação de 1530 mm, temperatura média de 20,4 °C e 919 m altitude), Minas Gerais, Brasil. Os canteiros foram adubados com esterco bovino na dose de 3,0 kg.m<sup>2</sup> e irrigados periodicamente 4 vezes por semana.

Exsicatas da espécie foram depositadas no herbário da UFLA, com o número de referência ESAL 7474. Folhas de *O. selloi* foram coletadas no verão de 2014 pela manhã, de plantas com seis meses de idade. O óleo essencial foi extraído das folhas frescas por destilação por arraste a vapor, em destilador Marconi MA480, por 90 minutos (COSTA et al., 2010). O óleo essencial foi purificado por decantação e tratamento com sulfato de magnésio anidro. O sal foi removido por filtração simples e o óleo essencial foi armazenado em freezer a -20 °C, até a realização dos ensaios biológicos e análises químicas.

## 2.2 Análises químicas do óleo essencial

As análises do óleo essencial foram realizadas no Laboratório do Horto de Plantas Medicinais da UFLA. Para a análise quantitativa do óleo volátil, utilizou-se um 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 (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 1:50. Empregou-se 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). Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min e as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 240°C. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, mantida por 1 minuto, seguido por rampa de temperatura de 3 °C/min até 240 °C e de outra 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 ± desvio padrão de 3 amostras injetadas (COSTA et al., 2010).

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 de 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 demais condições experimentais foram as mesmas das análises quantitativas.

Os constituintes químicos foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à co-injeção de uma solução padrão de *n*-alcanos

(C8-C20, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, USA), co-injeção com substância de referência (estragol, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI e de literatura (ADAMS, 2001). Os índices de retenção foram calculados, usando-se a equação de Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção citados em literatura (ADAMS, 2001).

### **2.3 Criação de *Z. subfasciatus***

Os insetos usados no experimento foram obtidos da criação massal do Laboratório de Seletividade do Departamento de Entomologia da UFLA. *Zabrotes subfasciatus* foi criado em grãos de feijão sem tratamento químico.

### **2.4 Efeito da fração volátil do óleo essencial de *O. selloi* sobre *Z. subfasciatus***

O experimento foi realizado, utilizando adultos de *Z. subfasciatus*, com a idade de 1 a 5 dias, após a emergência em grãos de feijão. Os insetos foram expostos à fração volátil do óleo essencial de *O. selloi*. Empregaram-se discos de papel-filtro impregnados com 5 µL do óleo essencial de *O. selloi*, os quais foram depositados no fundo de um tubo de vidro (8 cm altura x 2 cm de diâmetro). A exposição dos besouros à fração volátil do óleo essencial foi feita, por meio de uma ponte de papel de filtro perfurado introduzida a 1 cm acima dos discos impregnados com óleo. O tubo foi tampado com um chumaço de algodão. Os insetos ficaram sem alimentação até o final do período de avaliação do experimento (48 horas).

O ensaio foi composto por dois tratamentos: (T1) - 5 µL do óleo essencial de *O. selloi*; (T2) controle - 5 µL de água destilada, os quais foram

impregnados nos discos e imediatamente preparados os tubos. O ensaio foi realizado em condições controladas (temperatura de  $25 \pm 2$  °C,  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa e fotofase de 12 horas). O delineamento foi inteiramente casualizado, com 5 repetições por tratamento e 10 insetos por repetição. A avaliação da paralisia dos insetos foi realizada às 8, 16 e 24 horas e da mortalidade às 24 e 48 horas, após o início do experimento. Os dados coletados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas com o teste t de Student ( $p < 0,05$ ), usando o programa estatístico R (pacote laercio) (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013).

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Análises químicas do óleo essencial de *O. selloi***

O óleo essencial de *O. selloi* caracterizou-se pela presença de 9 constituintes químicos que representaram 99,63% da composição química total. O constituinte majoritário identificado foi o fenilpropanoide estragol com 92,97% do teor total. Dos 6,46% dos componentes químicos restantes, 5,46% corresponderam à soma dos sesquiterpenos,  $\beta$ -cariofileno (1,55%), germacreno D (1,73%) e  $\gamma$ -elemeno (2,18%) (Tabela 1).

O óleo essencial de *O. selloi* foi caracterizado pela presença do fenilpropanoide estragol e dos sesquiterpenos  $\beta$ -cariofileno e germacreno D por Costa et al.(2010). Análises químicas do óleo essencial de *O. selloi* realizadas por Costa et al. (2010), Franca et al.(2008) e Martini et al. (2011) corroboram com os resultados do presente estudo em que o teor do estragol do óleo essencial de *O. selloi* é maior que 90% da composição química total.

Tabela 1 Composição química do óleo essencial de *Ocimum selloi* (Lamiaceae)

PICO	CONSTITUINTE	IR*	AREA % ± DP
1	estragol	1193	92,97 ± 0,06
2	$\alpha$ - copaeno	1383	0,26 ± 0,01
3	metileugenol	1405	0,22 ± 0,02
4	$\beta$ -cariofileno	1420	1,55 ± 0,02
5	aloaromadendreno	1460	0,27 ± 0,04
6	germacreno D	1484	1,73 ± 0,01
7	$\gamma$ - elemeno	1496	2,18 ± 0,01
8	germacreno B	1550	0,18 ± 0,02
9	espatulenol	1561	0,07 ± 0,01
TOTAL			99,63 ± 0,02

\*Índice de retenção relativo à série *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>) em coluna HP-5MS na ordem de eluição. DP: desvio padrão (*n*=3). n.i. não identificado.

### 3.2 Exposição dos adultos de *Z. subfasciatus* à fração volátil do óleo essencial de *O. selloi*

A paralisia dos adultos de *Z. subfasciatus*, tratados com vapores do óleo essencial de *O. selloi*, foi de 92 ± 0,26% ( $F = 640,421$ ;  $P = 0,0000$ ). A paralisia ocorreu 8 horas após o início do experimento. A partir de 16 horas até 24 horas (final da avaliação do experimento), a paralisia dos insetos expostos aos óleos essenciais de *O. selloi* foi de 100% ( $F = 789,474$ ;  $P = 0,0000$ ). No tratamento controle (sem óleo essencial), não ocorreu paralisia dos insetos (Figura 1).

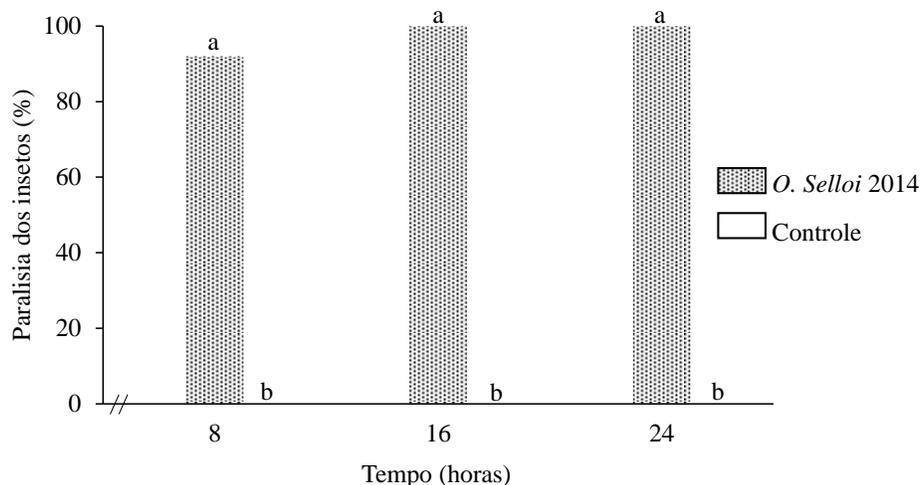


Figura 1 Paralisa de *Zabrotes subfasciatus* expostos no período de 24h ao óleo essencial de *Ocimum selloi* (Lamiaceae)

A paralisia dos besouros causada pelo vapor do óleo essencial de *O. selloi* pode estar associada a uma ação neurotóxica, pois os insetos apresentaram um comportamento similar ao observado a insetos que são submetidos aos efeitos dos inseticidas carbamatos e organofosforados (ISMAN, 2000). O estragol foi tóxico aos insetos de grãos armazenados *Sitophilus oryzae*, (Linnaeus, 1763) (Coleoptera: Curculionidae) e *Callosobruchus maculatus* (Fabricio, 1775) (Coleoptera: Bruchidae). Há evidências científicas de que o modo de ação do estragol se deve à sua atividade como inibidor misto da enzima acetilcolinesterase, ligando-se tanto à enzima livre como ao complexo enzima-substrato (LÓPEZ; CONTRERAS; PASCUAL-VILLALOBOS, 2010).

A mortalidade dos adultos de *Z. subfasciatus*, expostos aos óleos essenciais de *O. selloi*, após 24 horas do início do experimento, foi de  $54 \pm 1,15$  % ( $F = 78,111$ ;  $P = 0,0000$ ). Em 48 horas após o início do experimento, a mortalidade dos insetos foi de  $86 \pm 0,55$  % ( $F = 182,333$ ;  $P = 0,0000$ ), respectivamente. A mortalidade dos insetos no tratamento controle (sem óleo

essencial) foi menor que 10% para ambos os tempos de avaliação do experimento (Figura 2).

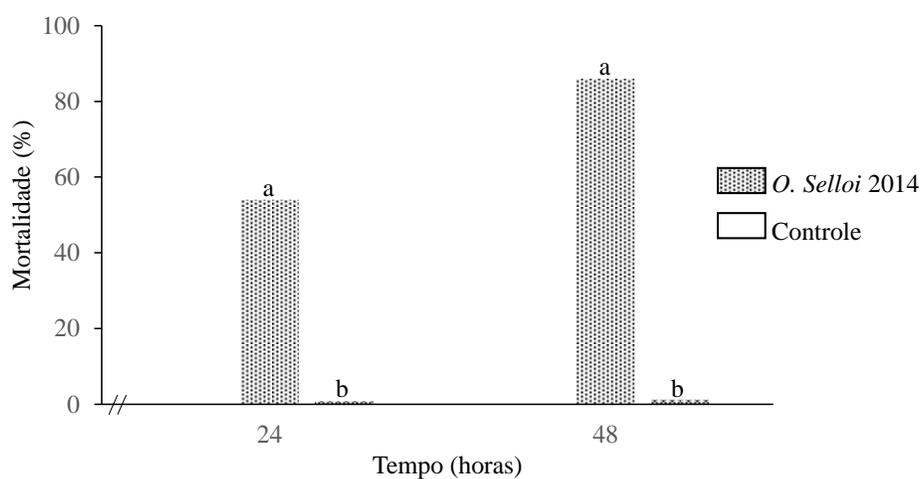


Figura 2 Mortalidade de *Z. subfasciatus* expostos no período de 24h a 48h ao óleo essencial de *O. selloi*

Atoxicidade de óleos essenciais sobre insetos de grãos armazenados tem sido estudada, e constituintes das classes dos sesquiterpenos e fenilpropanoides apresentaram potencial como moléculas inseticidas (CHU et al., 2011; KIM; LEE, 2014; ZHAO et al., 2012). A mortalidade de machos e fêmeas de *Z. subfasciatus* foi de 100% e 50%, após a exposição por 48 horas ao óleo essencial de *Ocimum canun* (Lamiaceae) (WEAVER et al., 1991). Outros estudos evidenciaram a ação inseticida de plantas do gênero *Ocimum* sp. apresentando paralisia dos insetos e, muitas vezes, com evolução para a morte (CHIOU LING; KYU; QING, 2009; NGUEMTCHOUIN et al., 2013).

#### 4 CONCLUSÃO

O fenilpropanoide estragol é o composto majoritário do óleo essencial de *O. Selloi* e corresponde a mais de 92% do teor total. Vapores de 5µL do óleo essencial de *O. Selloi*, impregnados em discos de papel, causam a paralisia do besouro *Z. Subfasciatus* e, em até 48 horas, a morte de mais de 80% dos insetos. Portanto, o óleo essencial de *O. selloi* possui potencial inseticida à broca do feijão.

#### AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

#### REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured, 2001. 804 p.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.
- CHIOU LING, C.; KYU, C.; QING, X.L. Insecticidal activity of Basil oil, trans-Anethole, estragole, and linalool to adult fruit flies of *Ceratitis capitata*, *Bactrocera dorsalis*, and *Bactrocera cucurbitae*. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.107, n.3, p.203-209, 2009.
- CHU, S. S. et al. Chemical composition and toxic activity of essential oil of *Caryopteris incana* against *Sitophilus zeamais*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 42, p. 8476-8480, 2011.

COSTA, J. T. da et al. Effects of different formulations of neem oil-based products on control *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (Coleoptera: Bruchidae) on beans. **Journal of Stored Products Research**, Elmsford, v. 56, p. 49-53, Jan. 2014.

COSTA, L. C. et al. Yield and composition of the essential oil of *Ocimum selloi* Benth. cultivated under colored netting. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 22, n. 1, p. 34-39, 2010.

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, p. 463-471, 1963.

HUANG, Y. et al. Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Stored Products Research**, Elmsford, v. 38, n. 5, p. 403-412, July 2002.

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

KIM, S. I.; LEE, D. W. Toxicity of basil and orange essential oils and their components against two coleopteran stored products insect pests. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Beijing, v. 17, n. 1, p. 13-17, 2014.

LOPEZ, M.D.; CONTRERAS, J.; PASCUAL-VILLALOBOS, M.J. Selection for tolerance to volatile monoterpenoids in *Sitophilus oryzae* (L.), *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Cryptolestes pusillus* (Schonherr). **Journal of Stored Products Research**, Elmsford, v.46, n.1, p.52-58, 2010.

MARTINI, M. G. et al. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Ocimum selloi* and *Hesperozygis myrtooides*. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 6, n. 7, p. 1027-1030, July 2011.

NGUEMTCHOUIN, M.G.M. et al. *Ocimum gratissimum* essential oil and modified montmorillonite clay, a means of controlling insect pests in stored products. **Journal of Stored Products Research**, Elmsford, v.52, p.57-62, Jan. 2013.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Version 3.0.2. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Software.

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**, Stanford, v. 57, p. 405-424, 2012.

TRIPATHI, A.K.et al. Effect of d-limonene on three stored-product beetles. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 96, n. 3, p. 990-995, June 2003.

WEAVER, D.K.et al. The efficacy of linalool, a major component of freshly-milled *Ocimum canum* Sims (Lamiaceae), for protection against postharvest damage by certain stored product Coleoptera. **Journal of Stored Products Research**, Elmsford, v.27, n.4, p.213-220, 1991.

ZHAO, N. N. et al. Evaluation of the toxicity of the essential oils of some common Chinese spices against *Liposcelis bostrychophila*. **Food Control**, Guildford, v. 26, n. 2, p. 486-490, 2012.

**CAPITULO 5 Primeiro registro de *Aethalion reticulatum* (Hemiptera: Aethalionidae) em *Vernonia condensata* (Asteraceae), uma planta medicinal do Brasil**

**RESUMO**

*Vernonia condensata*(Baker, 1875) (Asteraceae) é utilizada como planta medicinal no Brasil, porém, é hospedeira de cigarrinhas pragas em culturas agrícolas. *Aethalion reticulatum*(Linnaeus, 1767) (Hemiptera: Aethalionidae) foi observado em *V. condensata*, no município de Lavras, Minas Gerais, Brasil. Imaturos e adultos de *A. reticulatum* foram coletados de *V. condensata* para identificação, do qual representa o primeiro registro desta cigarrinha nesta planta. A observação de ovos, ninfas e adultos desse inseto na planta mostra que o mesmo completou o seu ciclo biológico, o que indica que *V. condensata* é um potencial hospedeiro para *A. reticulatum*.

Palavras - chave: Boldo. Cigarrinha. Fitoterapia.Praga.

### ABSTRACT

Abstract *Vernonia condensata*(Baker, 1875) (Asteraceae) is a medicinal plant from Brazil considered as a host plant of leafhopper pests in agricultural crops. *Aethalion reticulatum*(Linnaeus, 1767) (Hemiptera: Aethalionidae) was observed in *V. condensata* in Lavras county, Minas Gerais State, Brazil. Immature and adult individuals of *A. reticulatum* were collected from *V. condensata* for identification, which represents the first recording of this pest in this plant. The presence of eggs, nymphs and adults of this insect on the plant shows that *A. reticulatum* has completed its life cycle, indicating that *V. condensata* is a potential host plant for *A. reticulatum*.

Keywords: Boldo. Leafhoppers. Pest.

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Vernonia* sp. (Asteraceae) tem sido estudado, em virtude de propriedades terapêuticas dos óleos essenciais e extratos dessas plantas (KITONDE et al., 2013; SILVA et al., 2012). Compostos bioativos de *Vernonia condensata* Baker, 1875, apresentam atividades anti-inflamatórias, analgésica e antinociceptiva ao homem (RISSO; SCARMINIO; MOREIRA, 2010; SILVA, 2011). Além disso, constituintes como saponinas, alcaloides, taninos, compostos fenólicos e flavonoides, foram detectados nessa espécie (RISSO; SCARMINIO; MOREIRA, 2010). No entanto, essa planta pode sofrer danos ou ser um potencial hospedeiro de insetos pragas, sendo, portanto, de interesse agrícola.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Imaturos e adultos de *Aethalion reticulatum* (Linnaeus, 1767) (Hemiptera: Aethalionidae) foram encontrados em *V. condensata* (Figura 1), em fevereiro de 2013, na cidade de Lavras (21°14' 43 S e 44°59' 59 W, média anual de precipitação de 1530 mm, temperatura média de 20.4°C e 919 m de altitude), Estado de Minas Gerais, Brasil. A espécie desse inseto foi identificada pela comparação morfológica com exemplares do Museu Entomológico da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Brasil.

## 3 RESULTADOS

Insetos foram observados e coletados se alimentando em ramos e galhos de *V. condensata*, no Horto de Plantas Medicinais da UFLA. Abelhas e formigas foram observadas se alimentando dos excrementos liberados por *A. reticulatum* (*honeydew*) (Figura 1: B, C e D).



Figura 1 *Aethalion reticulatum* Linnaeus, 1767 (Hemiptera: Aethalionidae) ovipositando em um galho de *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae) (A). Ninfas de *A. reticulatum* em galhos e ramos de *V. condensata* e insetos se alimentado do honedew excretado pelas cigarrinhas (B e C). Ramo de *V. condensata* parasitado por *A. reticulatum* (seta) (D)

#### 4 DISCUSSÃO

*Vernonia condensata* é uma espécie de interesse para apicultores, em razão de seu potencial de receber visitas de polinizadores como *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera, Apidae) (MODRO et al., 2011). No entanto, essa espécie é hospedeira de *Dilobopterus costalimai* (Young, 1977), *Oncometopia facialis* (Signoret, 1854) e *Bucephalagonia xanthophis* (Berg, 1879), (Hemiptera: Cicadellidae) (BENTO et al., 2008; MILANEZ; PARRA; MAGRI, 2001), cigarrinhas vetores de doenças em culturas agrícolas. Além disso, *V. condensata* é indicada como hospedeira alternativa para criações de

cigarrinhas em laboratório (MILANEZ, 2003). Isto sugere que *V. condensata* é uma fonte de abrigo e alimento, além de local para reprodução de *A. reticulatum* (Figura 1A) e, por isso, potencial hospedeiro desse inseto.

*Aethalion reticulatum* alimenta-se de seiva de plantas, especialmente frutíferas, o que pode prejudicar o crescimento do vegetal e dos frutos. Infestações dessa espécie, em áreas agrícolas, podem ocorrer com perdas na produção (ARAUJO et al., 2010). Esta praga foi, também, recentemente, observada se alimentando de plantas de eucalipto, o que indica sua migração para esse novo hospedeiro e seu potencial risco como praga florestal (MENEZES et al., 2012). A associação de abelhas e formigas com *A. reticulatum* é comum, dos quais essas espécies se beneficiam com o *honeydew* expelido pelas cigarrinhas (Figura 1: B, C e D) (BARONIO; PIRES; AOKI, 2012; BROWN, 1976).

## **5 CONCLUSÃO**

Este trabalho relatou a primeira ocorrência de *A. reticulatum* em *V. condensata*, no município de Lavras, estado de Minas Gerais, Brasil. Nossas observações mostram que essa planta medicinal é um potencial hospedeiro desta cigarrinha, já descrita como praga em culturas agrícolas e florestais.

## **AGRADECIMENTOS**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, V.A.et al. Ultrastructural characterization of the spermatozoa of *Aethalion reticulatum* Linnaeus 1767 (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Aethalionidae). **Micron**, New York,v.41, n.4, p.306-311, 2010.
- BARONIO, G.J.; PIRES, A.C.V.; AOKI, C. *Trigona branneri* (Hymenoptera: Apidae) as a Collector of Honeydew from *Aethalion reticulatum* (Hemiptera: Aethalionidae) on *Bauhinia forficata* (Fabaceae: Caesalpinoideae) in a Brazilian Savanna. **Sociobiology**, Chicago,v.59, n.2, p.407-414, 2012.
- BENTO, J.M.S.et al. Attraction of *Bucephalagonia xanthophis* (Hemiptera: Cicadellidae) to volatiles of its natural host *Vernonia condensata* (Asteraceae). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.65, n.6, p.634-638, 2008.
- BROWN, R.L. Behavioral observations on *Aethalion reticulatum* (hem, aethalionidae) and associated ants. **Insectes Sociaux**, Paris,v.23, n.2, p.99-107, 1976.
- KITONDE, C.K.et al. Antimicrobial activity and phytochemical study of *Vernonia glabra* (steetz) oliv. & hiern. in Kenya. **African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines**, Ile Ife, v.10, n.1, p.149-157, 2013.
- MENEZES, C. W. G. et al. Selectivity of atrazin and nicosulfurom to *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 2, p. 327-334, 2012.
- MILANEZ, J.M. Feeding and survival of citrus sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) on host plants. **Florida Entomologist**, Gainesville,v.86, n.2, p.154-157, 2003.
- MILANEZ, J.M.; PARRA, J.R.P.; MAGRI, D.C. Alternation of host plants as a survival mechanism of leafhoppers *Dilobopterus costalimai* and *Oncometopia facialis* (Hemiptera: Cicadellidae), vectors of the Citrus Variegated Chlorosis (CVC). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.58,n. 4, p.699-702, out./dez. 2001.
- MODRO, A.F.H.et al. Flora of polliniferous importance for *Apis mellifera* (L.) in the region of Viçosa, MG. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v.35, n.5, p.1145-1153, 2011.

RISSE, W.E.; SCARMINIO, I.S.; MOREIRA, E.G. Antinociceptive and acute toxicity evaluation of *Vernonia condensata* Baker leaves extracted with different solvents and their mixtures. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v.48, n.8, p.811-816, 2010.

SILVA, J. B. da. New approaches to clarify antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanol extract from *Vernonia condensata* leaves. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 12, n. 12, p. 8993-9008, 2011.

SILVA, N.C.C.et al. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. **Natural Product Research**, Abingdon, v.26, n.16, p.1510-1514, 2012.