


LUCAS MARTINS LOPES



**ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA-LONGA (*Piper hispidinervum*):  
ALTERNATIVA DE CONTROLE PARA *Sitophilus zeamais*  
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

RIO BRANCO – AC

2020

LUCAS MARTINS LOPES

**ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA-LONGA (*Piper hispidinervum*):  
ALTERNATIVA DE CONTROLE PARA *Sitophilus zeamais*  
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, da Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Dr. Adalberto Hipólito de Sousa  
Coorientadora: Dra. Lêda Rita D'Antonino Faroni  
Coorientadora: Dra. Marilene Santos de Lima

RIO BRANCO – AC

2020

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

---

L864o Lopes, Lucas Martins, 1990 -

Óleo essencial de pimenta-longa (*Piper hispidinervum*): alternativa de controle para *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) / Lucas Martins Lopes; Orientador: Dr. Adalberto Hipólito de Sousa; Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Lêda Rita D'Antonino Faroni e Dr<sup>a</sup>. Marilene Santos de Lima. -2020.

93 f.: il.; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós – Graduação em Produção Vegetal, Doutor em Produção Vegetal, Rio Branco, 2020.

Inclui referências bibliográficas.

1. Sudoeste da Amazônia. 2. Safrol. 3. Gorgulho-do-milho. I. Sousa, Adalberto Hipólito de. (Orientador). II. Faroni, Lêda Rita D'Antonino. (Coorientadora). III. Lima, Marilene Santos de. (Coorientadora). IV. Título.

CDD: 338.1

---

Bibliotecária: Nádia Batista Vieira CRB-119/882

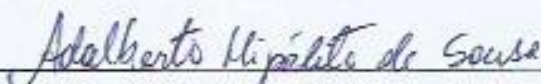
LUCAS MARTINS LOPES

**ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA-LONGA (*Piper hispidinervum*): ALTERNATIVA DE CONTROLE PARA *Sitophilus zeamais* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

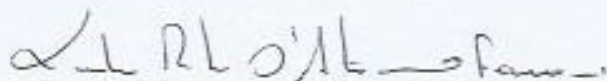
Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, da Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

APROVADA em 13 de maio de 2020.

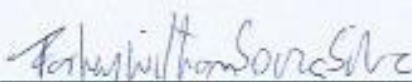
**BANCA EXAMINADORA**



**Dr. Adalberto Hipólito de Sousa (Orientador)**  
Universidade Federal do Acre



**Dra. Leda Rita D'Antonino Faroni (Coorientadora)**  
Universidade Federal de Viçosa



**Dr. Farley William Souza Silva (Membro)**  
Universidade Federal do Acre



**Dr. Eduardo Pacca Luna Mattar (Membro)**  
Universidade Federal do Acre



**Dr. Cristhyan Alexandre Carcia de Carvalho (Membro)**

À minha amada avó Maria Martins Barros,  
por tudo o que ela sempre irá representar

**Dedico.**

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar a Deus, por me conceder o dom da vida.

A Universidade Federal do Acre, pela realização do Curso de Doutorado em Produção Vegetal.

Ao meu orientador, professor Dr. Adalberto Hipólito de Sousa, pela amizade, apoio, dedicação, paciência e orientações no decorrer de toda minha vida acadêmica.

As minhas coorientadoras, Dra. Lêda Rita D'Antonino Faroni e Dra. Marilene Santos de Lima, pelo apoio, orientações e disponibilidade no decorrer do desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Dr. Carromberth Fernandes Carioca, Dra. Ana Cláudia Vieira dos Santos e a Ma. Jamila Farias Mendonça.

Aos colegas do laboratório Mip-Grãos (UFV): Arthur, Maria Suely, Jéssica, Samuel, Fernanda Heleno, Lucas Henrique, Marcus Vinícius e José Geraldo

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Produção vegetal pelos conhecimentos transmitidos.

Aos meus pais, Nelson Santiago e Maria José Martins Barros, por todo amor e carinho durante toda minha vida.

Aos meus irmãos, Giuliano Santiago e Magnum Santiago, pelo amor incondicional.

A minha namorada e companheira de vida, Eliane da Silva Xaxier, por todo apoio, dedicação, cuidado, amor e carinho em todos os momentos.

Aos amigos, Josiane Moura, Josilene Rocha, Roger Ventura, Shyrlene Monnerat, Suely Ribeiro e Thays Lemos pelo companheirismo e amizade durante o curso.

Aos amigos, Moisés Franco, Ediu Carlos, Jefferson Luiz, Nasserala Filho, Leonardo Netto, Thalisson Cunha, Paulo Holanda, Regilene Verçoza, Rennêr Oliveira, Mário Júnior, Chelton Luiz e Júlia Verçoza, que acompanharam a minha trajetória e as lutas que travei para realizar esse sonho.

Enfim, a todos que sempre me apoiaram e incentivaram para a realização desta conquista.

Meu muito obrigado!

“A felicidade que vem fácil, vai fácil. Já a arduamente conquistada é dificilmente destruída...”

(Rikudou Sennin).

## RESUMO

O milho, *Zea mays* L., é um dos mais importantes cereais cultivados e consumidos no mundo, por apresentar potencial produtivo, valor nutricional e multiplicidade de aplicações, assumindo relevante papel socioeconômico. No entanto, o milho está sujeito a perdas quantitativas e qualitativas durante o armazenamento, devido ao ataque de insetos-praga, como o *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). Os óleos essenciais têm se tornado foco de estudos sobre métodos alternativos para o manejo de pragas de produtos armazenados, pois apresentam diversos mecanismos de ação, como mortalidade, repelência, alterações no comportamento do inseto e inibição do seu desenvolvimento e reprodução. O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial inseticida do óleo essencial de *Piper hispidinervum* C. DC., para o controle de populações brasileiras de *S. zeamais*. Esta pesquisa foi realizada em duas etapas, relatadas nos dois capítulos que compõem esta tese. No primeiro capítulo, avaliou-se a toxicidade do óleo essencial de *P. hispidinervum* (OEPH) em onze populações brasileiras de *S. zeamais* e os efeitos subletais do OEPH no comportamento, respirometria e crescimento populacional ( $r_i$ ) dos insetos. No segundo capítulo, investigou-se o efeito subletal do OEPH sobre as taxas de desenvolvimento e crescimento populacional de quatro populações de *S. zeamais*. Adicionalmente, a persistência do resíduo de safrol em grãos de milho tratados com óleo de *P. hispidinervum* foi determinada. Todas as onze populações de *S. zeamais* foram suscetíveis ao OEPH, não exibindo resistência. A exposição subletal ao OEPH influenciou as respostas comportamentais e fisiológicas das populações. As taxas de desenvolvimento e crescimento populacional foram influenciadas negativamente pela exposição subletal ao OEPH. O resíduo do safrol apresenta baixa persistência, com redução de 98,20% após o quinto dia de armazenamento dos grãos de milho. Os resultados demonstraram que o OEPH é uma ferramenta promissora para o controle das populações de *S. zeamais* estudadas.

**Palavras-chave:** Sudoeste da Amazônia. Safrol. Gorgulho-do-milho. Toxicidade. Efeito subletal.



## ABSTRACT

The corn, *Zea mays* L., is one of the most important cereals cultivated and consumed in the world, as it has productive potential, nutritional value and multiple applications, assuming a relevant socioeconomic role. However, maize is prone to quantitative and qualitative loss during storage, due to attacks by insect-pests, such as *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). Essential oils have become the focus of studies on alternative methods for the management of stored product pests, as it has several mechanisms of action, such as mortality, repellency, changes in the insect's behavior and inhibition of its development and reproduction. The objective of this work was to investigate the insecticidal potential of the essential oil of *Piper hispidinervum* C. DC., for the control of brazilian populations of *S. zeamais*. This research was carried out in two steps, described in two chapters that compose this thesis. In the first chapter, the toxicity of the essential oil of *P. hispidinervum* (EOPH) was analyzed in eleven brazilian populations of *S. zeamais* and the sublethal effects of EOPH on the behavior, respirometry and population growth ( $r_t$ ) of the insects. In the second chapter, it was investigated the sublethal effect of EOPH on the development rates and population growth of four populations of *S. zeamais*. Additionally, the persistence of the safrole residue in corn grains treated with *P. hispidinervum* oil was determined. All the eleven *S. zeamais* populations were susceptible to EOPH, showing no resistance. The sublethal exposure to EOPH influenced the populations behavioral and physiological responses. Population development and growth rates were negatively influenced by sublethal exposure to EOPH. Safrole residue has low persistence, with a reduction of 98.20% after the fifth day of corn grains storage. The results showed that EOPH is a promising tool for the control of the *S. zeamais* populations studied.

**Keywords:** Southwestern Amazonia. Safrole. Maize weevil. Toxicity. Sublethal effect.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Plotagem típica de dados não transformados de um bioensaio dose-resposta.....	20
Figura 2 –	Curva que tipicamente resulta da transformação de dose para logaritmos.....	21
Figura 3 –	Diagrama hipotético da relação dose-resposta de um pesticida.....	22
Figura 4 –	Ilustração da dispersão dos dados de mortalidade para dois inseticidas.....	27
Figura 5 –	Taxa respiratória de indivíduos das populações de <i>S. zeamais</i> não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).....	49
Figura 6 –	Massa corporal das populações de <i>S. zeamais</i> .....	50
Figura 7 –	Taxa instantânea de crescimento populacional ( $r_i$ ) das populações de <i>S. zeamais</i> não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).....	51
Figura 8 –	Distância percorrida das populações de <i>S. zeamais</i> não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).....	52
Figura 9 –	Tempo de caminhada das populações de <i>S. zeamais</i> não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).....	52
Figura 10 –	Velocidade de caminhada das populações de <i>S. zeamais</i> não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).....	53
Figura 11 –	Proporção do tempo de caminhada das populações de <i>S. zeamais</i> não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).....	54
Figura 12 –	Decolagem ( $n^\circ$ de insetos que iniciaram o voo) (A) e altura de voo (B) das populações de <i>S. zeamais</i> não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).....	55
Figura 13 –	Emergência acumulada normalizada (%) de quatro populações de <i>S. zeamais</i> não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).....	78
Figura 14 –	Emergência acumulada diária de quatro populações de <i>S. zeamais</i> não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).....	79
Figura 15 –	Total de insetos emergidos de quatro populações de <i>S. zeamais</i> não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).....	80

Figura 16 – Crescimento populacional de quatro populações de <i>S. zeamais</i> não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).....	82
Figura 17 – Perda de massa de grãos (%) aos 70 dias, de quatro populações de <i>S. zeamais</i> não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).....	82
Figura 18 – Persistência do resíduo de safrol em milho tratado com OEPH por contato durante o armazenamento.....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química e concentrações relativas dos compostos identificados no OEPH utilizando análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).....	47
Tabela 2 – Toxicidade residual relativa de <i>P. hispidinervum</i> em adultos de populações brasileiras de <i>S. zeamais</i> . O intervalo de concentração do OEPH foi de 140,00 – 1000,00 $\mu\text{L kg}^{-1}$ (24 h exposição).....	48
Tabela 3 – Composição química e concentrações relativas dos compostos identificados no OEPH utilizando análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).....	76
Tabela 4 – Sumário das análises de regressão não-lineares das curvas de desenvolvimento populacional de <i>S. zeamais</i> .....	77
Tabela 5 – Sumário das análises de regressão não-lineares das curvas de crescimento populacional de <i>S. zeamais</i> .....	81
Tabela 6 – Modelos matemáticos ajustados para os resíduos de safrol em milho tratado com óleo essencial de <i>P. hispidinervum</i> por contato durante o armazenamento.....	83

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1 O INSETO: <i>Sitophilus zeamais</i> .....	16
2.2 INSETICIDAS BOTÂNICOS.....	17
2.3 <i>Piper hispidinervum</i> .....	18
2.4 ESTIMATIVA DOSE-RESPOSTA.....	18
2.5 MODELO PROBIT.....	24
2.5.1 Parâmetros inerentes a análise de probit.....	25
2.5.2 Critérios a serem empregados na seleção do modelo proveniente da análise de probit.....	26
2.6 RAZÃO DE TOXICIDADE.....	27
2.7 INTERVALO FIDUCIAL.....	27
2.8 ESTIMATIVA DOSE-RESPOTA EM BIOENSAIOS DE TOXICIDADE NA ÁREA DE ARMAZENAMENTO DE GRÃOS.....	28
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	29
<b>3 CAPÍTULO I</b> .....	35
<b>TOXICIDADE E EFEITOS SUBLETAIS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Piper hispidivervum</i> SOBRE RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E FISIOLÓGICAS DE POPULAÇÕES DE <i>Sitophilus zeamais</i> (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)</b> .....	35
<b>RESUMO</b> .....	36
<b>ABSTRACT</b> .....	37
3.1 INTRODUÇÃO.....	38
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.2.1 Populações de <i>Sitophilus zeamais</i> .....	40
3.2.2 Obtenção e extração do óleo essencial.....	40
3.2.3 Composição do óleo essencial.....	41
3.2.4 Quantificação absoluta do safrol do óleo essencial.....	41
3.2.5 Bioensaios de toxicidade do OEPH.....	42
3.2.6 Efeito subletal do OEPH sobre a respirometria.....	42

3.2.7 Efeito subletal do OEPH sobre a taxa instantânea de crescimento populacional ( $r_i$ ).....	43
3.2.8 Efeito subletal do OEPH sobre o comportamento locomotor.....	44
3.2.9 Efeito subletal do OEPH sobre o levantamento de voo.....	45
3.2.10 Análises estatísticas.....	46
3.3 RESULTADOS.....	47
3.3.1 Composição do OEPH.....	47
3.3.2 Toxicidade do OEPH.....	47
3.3.3 Taxa respiratória e massa corpórea.....	49
3.3.4 Efeitos subletais do OEPH sobre o ( $r_i$ ).....	50
3.3.5 Efeitos subletais do OEPH sobre o comportamento locomotor.....	51
3.3.6 Efeitos subletais do OEPH sobre a decolagem e a altura de voo.....	54
3.4 DISCUSSÃO.....	56
3.5 CONCLUSÕES.....	59
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>
<b>4 CAPÍTULO II.....</b>	<b>66</b>
<b>TAXAS DE DESENVOLVIMENTO E CRESCIMENTO POPULACIONAL DE POPULAÇÕES DE <i>Sitophilus zeamais</i> (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EXPOSTAS A CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Piper hispidinervum</i>.....</b>	<b>66</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>67</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>68</b>
4.1 INTRODUÇÃO.....	69
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	71
4.2.1 Populações de <i>Sitophilus zeamais</i> .....	71
4.2.2 Obtenção e extração do óleo essencial.....	71
4.2.3 Composição do óleo essencial.....	72
4.2.4 Quantificação absoluta do safrol.....	72
4.2.5 Taxas de desenvolvimento populacional.....	73
4.2.6 Crescimento populacional e perda de massa de grãos.....	74
4.2.7 Persistência do resíduo de safrol.....	74
4.2.8 Análises estatísticas.....	75
4.3 RESULTADOS.....	76

4.3.1 Composição do OEPH.....	76
4.3.2 Taxas de desenvolvimento populacional.....	76
4.3.3 Crescimento populacional e perda de massa de grãos.....	80
4.3.4 Resíduo de safrol.....	83
4.4 DISCUSSÃO.....	85
4.5 CONCLUSÕES.....	88
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>89</b>
<b>5 CONCLUSÃO FINAL.....</b>	<b>93</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A agricultura brasileira vem se destacando com o aumento da produção, principalmente de grãos, obtidos com investimentos em novas tecnologias durante o plantio e colheita (MARTHA JUNIOR et al., 2018). A estimativa da produção brasileira de grãos da safra 2019/2020 é de 251,51 milhões de toneladas, com o milho representando 10,38% do total, cerca de 26,1 milhões (CONAB, 2020).

Entre os fatores que mais contribuem para a baixa produção do milho está o ataque de insetos-praga, que acontece do campo até o armazenamento dos grãos (FARONI; SOUSA, 2006). Os danos causados pelas pragas comprometem o rendimento e a qualidade da produção, causando prejuízos aos agricultores (COPATTI et al., 2013). Dentre as pragas mais importantes para a cultura destacam-se a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) e o gorgulho-do-milho *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae), nas fases de campo e armazenamento, respectivamente (CRUZ et al., 2013).

Durante o armazenamento, a massa de grãos comporta-se como um ecossistema dinâmico, em que a deterioração dos grãos se deve, principalmente, à interação entre agentes bióticos e abióticos (LOECK, 2002). O *S. zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) é uma praga destruidora de grãos, com importância econômica reconhecida em regiões tropicais. O controle deste inseto-praga é tradicionalmente químico e feito através da aplicação de inseticidas piretróides, organofosforados e do fumigante fosfina (PH<sub>3</sub>), (CORRÊA et al., 2011; SOUSA et al., 2014). Contudo, o uso contínuo e indiscriminado desses produtos para o tratamento de grãos tem sido questionado em todo o mundo, por provocar mortalidade em organismos não-alvo, pelos níveis residuais deixados nos alimentos e riscos para a saúde dos consumidores (COSTA et al., 2014; FREITAS et al., 2016).

Em decorrência disso, torna-se indispensável o uso de produtos alternativos aos inseticidas sintéticos, que eliminem as pragas das lavouras, mas que não sejam prejudiciais ao meio ambiente. O uso de inseticidas botânicos destaca-se entre as alternativas de controle (GERIS et al., 2008; SANTOS et al., 2011; SARRIA et al., 2011). Diversas espécies de plantas produzem substâncias que agem na defesa contra insetos, patógenos e microrganismos (SOUSA et al., 2014). Normalmente as substâncias são usadas na forma de pós, extratos ou óleos, os quais são fáceis de serem obtidos e, de modo geral, não apresentam riscos para os aplicadores e



consumidores (GUERRA et al., 2009). Entre as espécies mais utilizadas na produção de óleos essenciais destacam-se as espécies *Piper aduncum* L., 1753 (Pimenta-de-macaco) e *Piper hispidinervum* C. DC., 1917 (pimenta-longa) ambas da família Piperaceae, das quais apresentam óleos ricos em dilapiol e safrol, respectivamente (NEGREIROS; MIQUELONI, 2015).

A utilização de plantas com efeito inseticida tornou-se uma alternativa no controle de pragas, reduzindo impactos econômicos e ambientais. Estudos referentes a essas plantas tornam-se cada vez mais comuns, pois possibilitam associação a outros tipos de controles, como o químico e biológico (BRITO, 2009). Já foram identificados diversos metabólitos secundários com propriedades inseticidas, como terpenóides e limonóides, entre outros, em várias espécies de plantas em todo o mundo (SARRIA et al., 2011). Estes compostos podem apresentar diferentes mecanismos de ação sobre os insetos, destacando-se a mortalidade, repelência, inibição da alimentação, crescimento, desenvolvimento e reprodução (KANDA et al., 2017).

Os óleos essenciais de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* apresentam efeito tóxico para *S. zeamais* por meio da fumigação, contato e aplicação tópica, sendo que o óleo de *P. aduncum* é mais eficaz que o óleo de *P. hispidinervum* pela via de intoxicação por fumigação e contato do que por aplicação tópica (ESTRELA et al., 2006). Também vale ressaltar sua atividade como agente sinérgico em misturas com inseticidas a base de alfa-cipermetrina, beta-cipermetrina, fenpropatina e gama-cialotrina, em bioensaios com *S. frugiperda* (FAZOLIN et al., 2016).

Diante o exposto, o objetivo desta pesquisa foi investigar o potencial inseticida do óleo essencial de *P. hispidinervum* para o controle de populações brasileiras de *S. zeamais*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O INSETO: *Sitophilus zeamais*

No armazenamento de grãos, uma das pragas mais destrutivas é *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae) conhecido popularmente como gorgulho-do-milho. *Sitophilus zeamais* é uma praga de importância primária por atacar grãos intactos, sendo encontrada em todas as regiões quentes e tropicais do mundo. Apresenta infestação cruzada, ou seja, tem capacidade de infestar grãos tanto no campo quanto no armazenamento, além de elevado potencial biótico (LORINI, 2018).

É uma praga polífoga, atacando produtos como trigo, arroz, milho, cevada e triticales (FARONI; SOUSA, 2006; LORINI, 2008). Os adultos de *S. zeamais* são insetos de 3 mm de comprimento, coloração castanho-escura com quatro manchas avermelhadas nos élitros bastante visíveis logo após a emergência, corpo cilíndrico, cabeça prolongada para frente com rostro recurvado onde se inserem as peças bucais, pronoto fortemente pontuado e élitros são densamente estriados (LORINI, 2018; RESS, 1996).

Os adultos são de vida longa, aproximadamente um ano. Cada fêmea chega a ovipositar até 150 ovos, os quais são inseridos, um a um, em pequenas cavidades que faz nos grãos e fechados logo após a oviposição com uma substância gelatinosa secretada pela fêmea (COTTON; WILBUR, 1974; EVANS, 1981).

Após a eclosão dos ovos, o que, em média, leva seis dias em temperatura de 25 °C, as larvas adentram os grãos, onde se alimentam e completam seu estágio larval (quatro ínstaes) dentro do próprio grão, empupando-se a seguir e culminando com a emergência do adulto no seu interior (LOECK, 2002). São canibais dos indivíduos fracos ou pequenos. Por este motivo, raramente emerge mais de um indivíduo adulto de grãos pequenos, como de trigo ou arroz (FARONI; SOUSA, 2006).

O desenvolvimento completo é possível entre 15 °C e 35 °C, em cerca de 35 dias, em condições ótimas, que são 27 °C e 70% (Umidade relativa). As fases jovens apresentam menor viabilidade em grãos com teor de umidade menor que 13%; abaixo de 10%, frequentemente os insetos param de ovipositar. O desenvolvimento é acelerado em grãos com teor de umidade entre 14% e 16% (LORINI et al., 2015).

## 2.2 INSETICIDAS BOTÂNICOS

O uso de inseticidas sintéticos no controle de pragas agrícolas contribui para o aumento da produção, contudo, existe uma série de problemas relacionados ao uso dessas substâncias, dentre os quais a contaminação do ambiente e de pessoas, presença de resíduos nos alimentos, desequilíbrio biológico pela eliminação de inimigos naturais, surgimento de populações de insetos resistentes e aumento no custo de produção (MACHADO et al., 2007; PIMENTEL et al., 2007).

Diante de tais problemas, o interesse por substâncias que apresentem menor risco à saúde humana e ao meio ambiente tem aumentado, além da procura crescente por produtos alimentícios saudáveis e isentos de resíduos (CORRÊA; SALGADO, 2011). Neste contexto, os inseticidas botânicos são considerados importantes alternativas para o controle de pragas agrícolas.

As plantas produzem substâncias a partir de seu metabolismo secundário que agem na defesa contra insetos, patógenos e micro-organismos (POTENZA et al., 2004). De acordo com Rattan (2010) as espécies mais utilizadas como inseticidas, normalmente sintetizam grande diversidade de compostos de defesa moderadamente tóxicos ou menor quantidade de substâncias altamente tóxicas.

Os inseticidas de origem vegetal são utilizados no controle alternativo de diversas pragas em vários países do mundo. Normalmente são usados na forma de pós, extratos ou óleos, os quais são fáceis de serem obtidos e, no geral, sem toxicidade para os aplicadores e consumidores (SILVA et al., 2012).

Os princípios ativos desses inseticidas são normalmente compostos por um complexo conjunto de substâncias produzidas no metabolismo secundário, que podem estar presentes em raízes, folhas e sementes. Já foram identificados mais de 100.000 metabólitos com propriedades inseticidas, tais como, rotenóides, piretróides, alcalóides, terpenóides, flavonóides e quinonas, em aproximadamente 200.000 espécies de plantas em todo o mundo (MACHADO et al., 2007).

Os efeitos tóxicos dos inseticidas botânicos provêm da ação de seus ingredientes ativos no sistema nervoso central dos insetos, interferindo na transmissão normal dos impulsos nervosos, e assim afetando a fisiologia destes de diferentes maneiras (RATTAN, 2010; SANTOS et al., 2015). Esses compostos apresentam múltiplos mecanismos de ação sobre os insetos, destacando-se: mortalidade, repelência, inibição da alimentação, crescimento, desenvolvimento e reprodução (SILVA et al., 2012).

Produtos naturais extraídos de plantas constituem-se em fonte de substâncias bioativas compatíveis com programas de manejo integrado de pragas (MIP), podendo ser um forte aliado a outros métodos de controle de insetos, reduzindo os efeitos negativos ocasionados pela aplicação descontrolada de inseticidas sintéticos (MACHADO et al., 2007).

### 2.3 *Piper hispidinervum*

Piperaceae é representada por plantas herbáceas, arbustos e, raramente, árvores (BERGO et al., 2005). *Piper* se destaca com mais de 700 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais (SAUTER et al., 2012). A pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC., 1917) é uma planta aromática endêmica da Amazônia que possui um grande potencial na produção de óleo essencial (MAIA et al., 1987).

O óleo essencial dessa planta é constituído por safrol, pentadecano, espathulenol biciclogermacreno, P-cimen-8-ol, (E)-carofileno (SAUTER et al., 2012; ANDRÉS et al., 2017; ARAÚJO et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017). O safrol, seu composto majoritário, é um fenilpropanóide utilizado na indústria química para síntese de heliotropina (fixador de fragrâncias) (RAMOS et al., 2014) e butóxido de piperolina - PBO (sinergista de inseticidas) (SOHILAIT; KAINAMA, 2015).

As atividades inseticidas do óleo essencial de *P. hispidinervum* (OEPH) vêm sendo estudadas sobre insetos-praga de grãos armazenados: toxicidade (fumigante e por contato) (ESTRELA et al., 2006; FAZOLIN et al., 2007; ARAÚJO et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017), repelência (OLIVEIRA et al., 2017), redução das taxas de desenvolvimento (PEREIRA et al., 2008) e o efeito residual (PEREIRA et al., 2009; COITINHO et al., 2011). A sua bioatividade é atribuída principalmente aos seus compostos. Devido ao seu potencial inseticida, os óleos essenciais estão sendo propostos como uma alternativa para o controle de pragas de produtos armazenados (CORREA et al., 2015; ILBOUDO et al., 2015).

### 2.4 ESTIMATIVA DOSE-RESPOSTA

Os estudos das alterações causadas pelos pesticidas têm por objetivo estabelecer as relações dose-efeito e dose-resposta que fundamentam todas as considerações toxicológicas necessárias para avaliação do efeito dos mesmos sobre

os organismos alvo. Para uma melhor compreensão da diferença entre os dois tipos de relações, torna-se necessário conceituar dose, efeito e resposta (ARIËNS et al., 1978; HUMBURGUER et al., 1989).

Nas pesquisas entomológicas com pesticidas são consideradas as variáveis dose, concentração e período de exposição. A dose é definida como a quantidade de um produto químico aplicado por unidade de peso do organismo ou área de aplicação (ex:  $\mu\text{g mg}^{-1}$  de peso do corpo, ou  $\text{g ha}^{-1}$ ); a concentração é a quantidade do produto em um volume específico ou receptor (ex:  $\text{mg ml}^{-1}$ , ou  $\text{mg por inseto}$ ) e o período de exposição é o tempo que o receptor fica exposto ao pesticida (ex: dias ou horas (ROBERTSON; PREISLER, 1992).

Os termos efeito e resposta, muitas vezes podem ser usados como sinônimos para denominar uma alteração biológica, num indivíduo ou numa população em relação à dose, concentração ou período de exposição. Contudo, na Toxicologia se diferenciam, utilizando o termo “resposta” para denominar uma alteração biológica (ex: mortalidade, sobrevivência, comportamento) e o termo “efeito” para indicar a proporção de uma população que manifesta uma resposta definida (OGA, 1996).

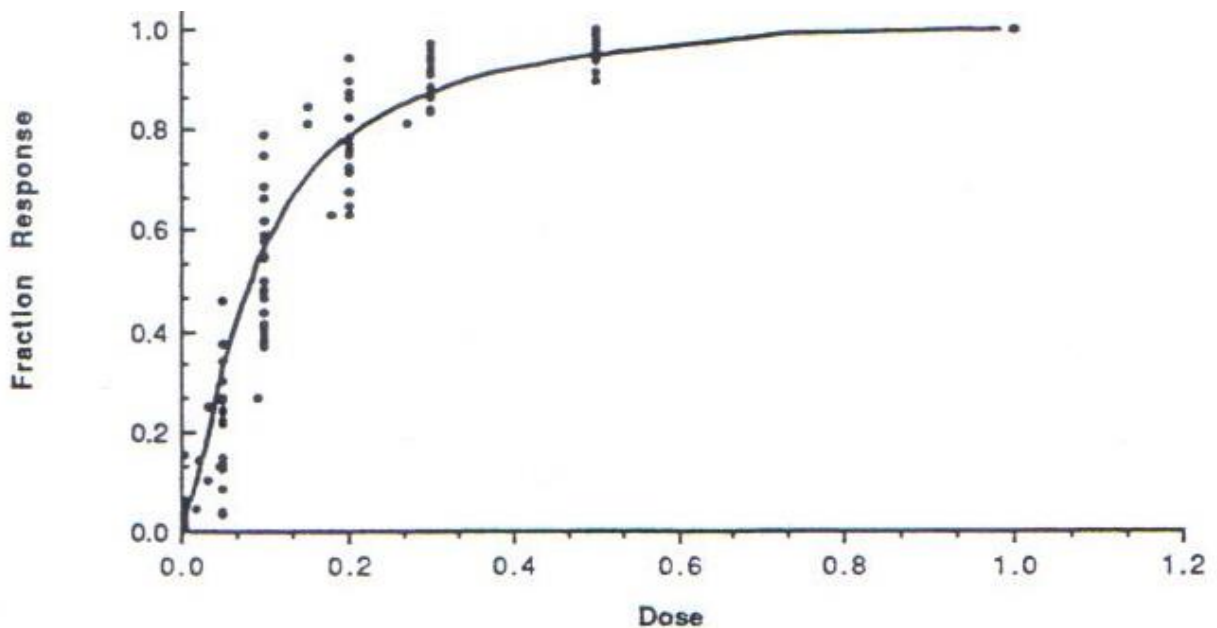
A exposição a um pesticida ou outro tipo de produto, químico ou não, e o espectro dos efeitos destes produtos são referidos normalmente como relação dose-resposta. Para relacionar a resposta obtida com a dose aplicada, uma amostra aleatória de animais, distribuídos em  $m$  grupos de  $n$  indivíduos são submetidos a diferentes níveis de dose e o número de respostas em cada grupo é anotado.

A partir dos valores das doses e das respectivas respostas procura-se identificar a relação entre ambas e com base nesta relação procura-se estimar a dose letal (DL) para um determinado percentual de indivíduos. Alguns termos análogos são encontrados na literatura, como dose efetiva (DE), dose tóxica (DT) e dose inibitória (DI) (LOOMIS, 1976; THRONE et al., 1995).

Para predizer e entender o efeito de uma série de tratamentos (exemplo: doses, concentrações, tempos de exposição) em uma variável de resposta binária a análise de probit é a mais adequada, pois é indicada para bioensaios, cuja relação entre o estímulo e a resposta é uma reta, através da qual tem-se para qualquer valor de “X” um valor de “Y” correspondente (DOMENCICH; MCFADDEN, 1975; RUSSELL et al., 1981).

A interpretação de dados de experimentos que apresentam resposta binária é difícil quando os dados são plotados da forma que são coletados, conforme pode ser observado no exemplo hipotético da Figura 1. Então, uma linha reta é uma ferramenta utilizada por biólogos e estatísticos para explicar uma relação dose-resposta, uma vez que a relação entre a variável independente e a variável dependente se torna mais fácil de ser observada. A transformação das unidades dos eixos X e Y é frequentemente necessária em experimentos entomológicos com pesticidas que produzem resposta binária para ajustar um modelo linear. Quando apenas as unidades do eixo do X são transformadas, a plotagem dos dados se torna mais simétrica, conforme pode ser observado no exemplo hipotético da Figura 2.

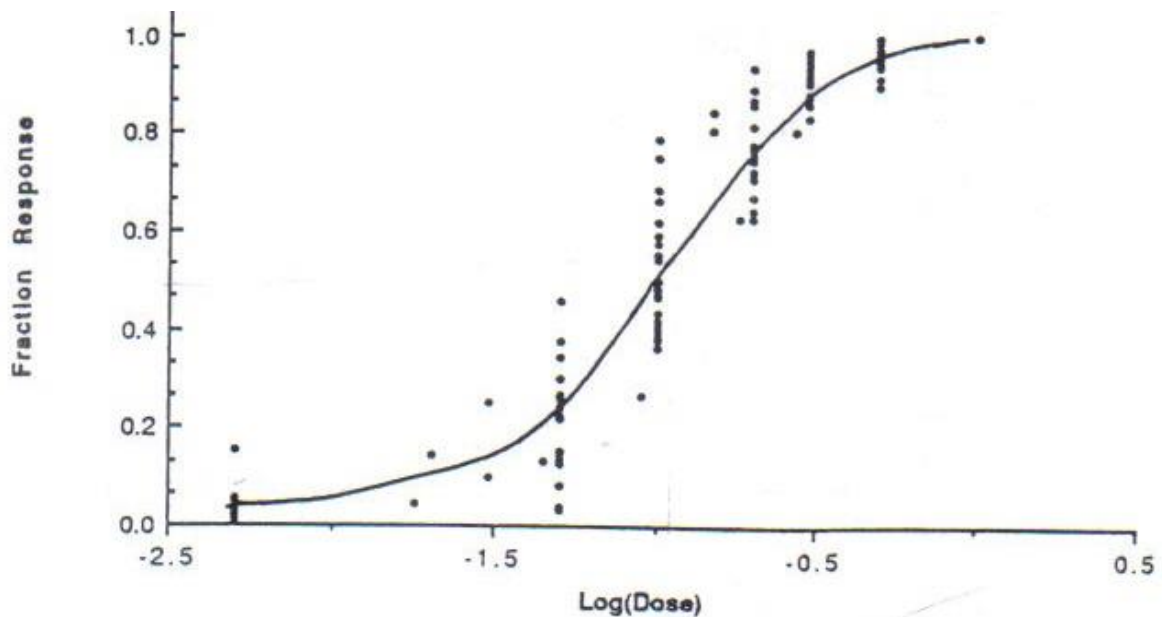
Figura 1 – Plotagem típica de dados não transformados de um bioensaio dose-resposta.



Fonte: Robertson; Preisler (1992).

Figura 2 – Curva que tipicamente resulta da transformação de dose para logaritmos.

Fonte: Robertson; Preisler (1992).



Com relação ao eixo Y, as unidades geralmente são transformadas em probites, logites, ou outras unidades definidas por uma função de distribuição particular. Para bioensaios entomológicos com pesticidas, a transformação mais utilizada para o eixo Y em testes de sensibilidade é o probit (ROBERTSON; PREISLER, 1992).

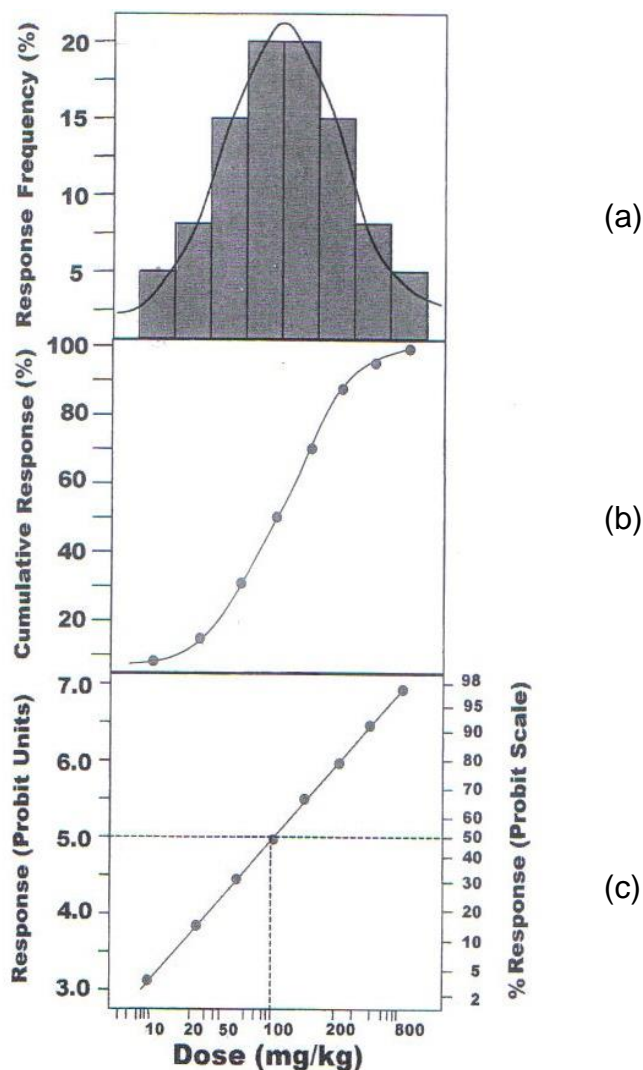
Em testes com pesticidas, os pontos ao longo da linha da regressão são tais que, para uma determinada dose ou concentração no eixo X, existe uma probabilidade de resposta correspondente no eixo Y. A dose ou a concentração que correspondem à probabilidade de resposta são DL ou CL, respectivamente. Por exemplo, a DL<sub>50</sub> ou CL<sub>50</sub> são a dose ou concentração que causam 50% de mortalidade em uma determinada população de insetos. O desenho experimental para estimar uma dada dose letal ou concentração depende do nível de resposta estudado (BURDITT; HUNGATE, 1988; GADDUM, 1933).

O modelo de probit admite a função de distribuição normal padrão. Esta função permite conhecer a distribuição da frequência dos dados em torno da média populacional e, ainda, possibilita o arranjo destes dados numa curva de distribuição acumulada (sigmóide). O histograma de frequência hipotético da Figura 3a mostra a relação dose-resposta, onde as barras representam as percentagens de indivíduos

que morrem em cada dose menos as percentagens de mortos na dose imediatamente inferior.

Observa-se que o menor percentual de indivíduos responderam à menor e maior dose. Por outro lado, maior percentual de resposta é verificado nas doses intermediárias entre estes dois extremos. Esta representação caracteriza uma distribuição normal de frequência. Tal distribuição indica que existem diferenças na susceptibilidade para o produto entre os indivíduos. Animais respondendo no final da extremidade esquerda da curva são considerados hipersusceptíveis e aqueles respondendo na extremidade no final da extremidade direita são considerados resistentes (EATON; KLAASSEN, 2003).

Figura 3 – Diagrama hipotético da relação dose-resposta de um pesticida.



Fonte: Eaton; Klaassen (2003).



Quando o número de indivíduos respondendo a cada dose consecutiva são somados, obtém-se uma resposta acumulada. Se um número de doses suficientemente grande é utilizado com um grande número de animais por doses, obtém-se uma curva sigmóide de dose-resposta (Figura 3b). Na menor dose (6 mg kg<sup>-1</sup>) é tido 1% dos animais. Porém, numa curva de distribuição normal sigmóide como esta, a resposta se aproxima de zero à medida que a dose decresce e aproxima-se de 100 à medida que a dose é elevada, mas teoricamente isto nunca atinge 0% e 100% (HOROWITZ; SAVIN, 2001).

A curva sigmóide tem uma porção relativamente linear entre 16 e 84%. Estes valores representam os limites de 1 desvio padrão da média (e mediana) numa população com uma distribuição normal. Em uma população normalmente distribuída, a média  $\pm$  1 desvio padrão representa 68,3% de “sucesso” (mortalidade da população), a média  $\pm$  2 desvios padrões representam 95,5%, a média  $\pm$  3 desvios padrões representam 99,7% (EATON; KLAASSEN, 2003; LOOMIS, 1976).

Desde que o fenômeno dose-resposta seja normalmente distribuído, é possível converter o estímulo (dose) em percentagem para unidades de desvio padrão a partir da média, ou seja, para desvio equivalente normal (DEN). Convencionou-se que os valores do DEN para uma resposta equivalente a 50% é zero, para 16% é  $-1$ , para 84% é  $+1$ . Em seguida, as unidades da DEN são transformadas em probit pela adição de 5 unidades, de forma a evitar que ocorram números negativos na escala. Assim, quando o DEN é zero o seu correspondente na escala de probit é 5, quando for  $-1$  é 4, quando for  $+1$  é 6, quando for  $-2$  é 3, e quando for  $+2$  é 7 (BAKER; NELDER, 1978; RUSSELL et al., 1977).

Para linearizar os dados consideram-se os valores das abscissas da curva de distribuição acumulada como sendo os valores das ordenadas do sistema cartesiano. Assim, o eixo das ordenadas será composto pelas unidades na escala de probit e em percentagem de resposta, e o eixo das abscissas será composto novamente pelas unidades de dose na escala original ( $10^{\log \text{dose}}$ ). Matematicamente, tal conversão pode ser representada por “Y” na Equação 1, onde “Y” é definido como a abscissa correspondente a uma probabilidade “P” da distribuição normal padrão (FINEY, 1971).

$$Y = F(X - \mu) / \delta \quad (1)$$

Em que F corresponde a função de distribuição; X é a variável dose;  $\mu$  é a média; e  $\delta$  é o desvio padrão.

## 2.5 MODELO PROBIT

A análise de probit é uma técnica estatística utilizada em experimentos que apresentam resposta binária, ou seja, do tipo *sim* ou *não* (RUSSELL et al., 1977). Inicialmente, os valores do eixo das abscissas são logaritmizados para tornar a distribuição dos dados mais simétrica. Na análise de probit admite-se a função de distribuição normal, então a próxima etapa da análise consiste na distribuição normal da frequência dos dados de resposta. Posteriormente, o número de indivíduos respondendo a cada dose consecutiva são somados para obter a resposta acumulada (ROBERTSON; PREISLER, 1992).

O nome probit “unidade de probabilidade” foi dado por Bliss (1934) a uma transformação semelhante, cuja a relação com a Equação 1 é  $Y = \alpha + \beta x$ . O nome probit continua sendo usado ainda hoje, embora computacionalmente adote-se a Equação 1. A forma linear da Equação 1 é representada através da Equação 2, onde  $\alpha$  e  $\beta$  tornam-se os novos parâmetros no lugar de  $\mu$  e  $\delta$ .

$$Y = F(\alpha + \beta x) \quad (2)$$

Em que F corresponde a função de distribuição; x é a variável dose;  $\alpha$  é o intercepto; e  $\beta$  é o coeficiente angular.

A Equação 1 foi obtida por comparação entre as equações 3 e 4. A Equação 3 foi proposta inicialmente para determinar a proporção de indivíduos de uma população que responderão a cada dose. A Equação 4 foi sugerida por Gaddum (1933) para simplificar a Equação 3, considerando que os dados da relação dose-resposta seguem uma distribuição normal cuja média ( $\mu$ ) é 0 e o desvio padrão ( $\delta$ ) é 1.

$$P = \int_{-\infty}^{(X-\mu)/\delta} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp\left\{-\frac{1}{2}u^2\right\} du \quad (3)$$

$$P = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^Y \exp\left\{-\frac{1}{2}u^2\right\} du \quad (4)$$

Em que P é a probabilidade da transformação normal e Y é a abscissa correspondente a uma probabilidade de P.

Em geral, a análise de probit é uma análise de sensibilidade probabilística indicada para bioensaios que produzem resposta binária, cuja relação entre o estímulo e a resposta é uma reta, através da qual tem-se para qualquer valor de “X” um valor de “Y” correspondente.

### 2.5.1 Parâmetros inerentes a análise de probit

Os parâmetros inerentes a uma análise estática são tidos como medidas que descrevem uma característica da população em estudo (PIMENTEL-GOMES, 1984). Na análise de probit, os parâmetros inerentes a análise são a média populacional ( $\mu$ ), desvio padrão ( $\delta$ ), coeficiente angular da reta ( $\beta$ ), intercepto ( $\alpha$ ) e qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

A média populacional ( $\mu$ ) é a soma de todos os resultados de um conjunto de eventos dividida pelo número total de eventos (FERREIRA, 2005). Em estudos sobre a relação dose-resposta de pesticidas, a média corresponde à dose letal para 50% dos indivíduos de uma população. Este valor é um dos principais resultados da análise de probit, visto que corresponde à média da distribuição de tolerâncias ao inseticida. Esta é a concentração que afetaria 50% da população.

O desvio padrão ( $\delta$ ) informa a dispersão dos dados em torno da média. É um valor que quantifica a dispersão dos eventos sob distribuição normal, ou seja, a média das diferenças entre o valor de cada evento e a média central (ZIMMERMANN, 2014). Em termos práticos, quanto menor a dispersão dos dados de mortalidade em torno da média, maior é a uniformidade de resposta dentro da população.

O coeficiente angular ( $\beta$ ) é o valor da tangente do ângulo que uma reta faz com o eixo das abscissas em um sistema de coordenadas cartesianas (FERREIRA, 1996). Este coeficiente indica homogeneidade da resposta dentro da população testada, ou ainda, pode indicar semelhança na variabilidade de resposta entre diferentes populações. Maiores coeficientes angulares indicam menor variação na resposta da população ao inseticida.

O intercepto de uma reta ( $\alpha$ ) é o ponto de intersecção da reta com a ordenada (eixo Y). Equivale ao valor de Y quando X=0. Em pesquisas entomológicas, representa o número de indivíduos que morreriam quando submetidos a uma dose zero, ou seja, aqueles cuja mortalidade se dá por fatores diversos, que não a dose do pesticida. Este

valor pode ser utilizado como indicativo da necessidade da correção dos dados pela fórmula de Abbott (FINNEY, 1971).

Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) é um teste de hipóteses que se destina a encontrar um valor da dispersão para duas variáveis nominais, ou seja, avalia a associação existente entre variáveis qualitativas. É utilizado para testar se a reta é uma representação adequada dos dados (THRONE et al., 1995). Um valor de  $\chi^2$  dentro dos limites da variação aleatória indica concordância satisfatória entre a teoria (reta) e as observações (os dados). Um  $\chi^2$  significativamente grande pode significar uma das seguintes situações: indivíduos testados não reagem de forma independente ou a reta não é adequada para descrever a relação entre dose e probit.

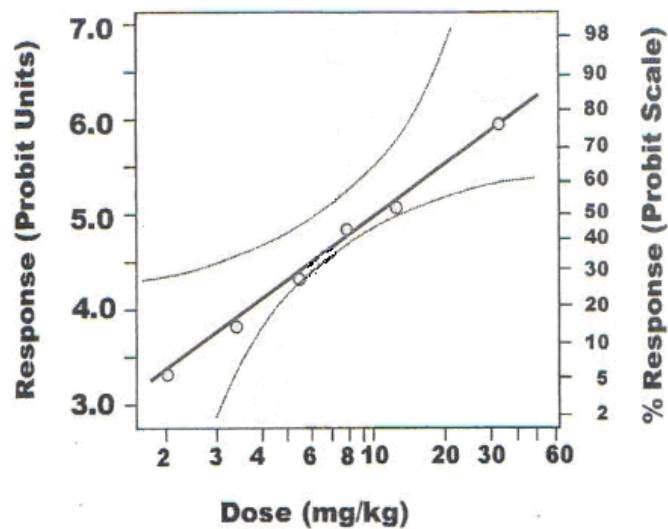
#### 2.5.2 Critérios a serem empregados na seleção do modelo proveniente da análise de probit

Na análise de probit, geralmente não se consegue identificar um único modelo candidato a representar a relação existente entre variável resposta e variáveis independentes. Para decidir qual é o modelo mais apropriado dentre um conjunto de modelos candidatos deve-se observar a probabilidade ( $p$ ), o intervalo de confiança nos extremos da curva, os valores de  $\chi^2$  e os graus de liberdade.

Inicialmente, deve-se selecionar os modelos com maior significância estatística, descartando todos os não significativos. Posteriormente, a dispersão dos dados em torno do modelo de probit deve ser observada. Tal dispersão pode ser medida por meio do teste de  $\chi^2$ , escolhendo-se preferencialmente aqueles que apresentarem valores significativamente baixos. Isso porque valores de  $\chi^2$  significativamente altos podem indicar que a reta não é adequada para descrever a relação dose-resposta.

Adicionalmente, os modelos com menor intervalo de confiança nos extremos da curva devem ser priorizados, pois a maior dispersão dos dados ocorre, geralmente, nestes extremos, conforme mostra o exemplo hipotético (Figura 4). O próximo critério a ser utilizado é a escolhas dos modelos com maiores graus de liberdade (GL), uma vez que o maior GL indica uma maior dimensão da amostra analisada. Por fim, se dois ou mais modelos permanecerem empatados por meio destes critérios, deve-se escolher aquele que apresentar maior significância.

Figura 4 – Ilustração da dispersão dos dados de mortalidade para dois inseticidas.



Fonte: Eaton; Klaassen (2003).

## 2.6 RAZÃO DE TOXICIDADE

A utilização de razões de toxicidade em níveis de respostas específicas, como  $DL_{50}$ ,  $CL_{50}$ , ou  $TL_{50}$ , tornou-se prática padrão como meio de estimar a toxicidade relativa de vários pesticidas visando determinar a suscetibilidade de populações e estudar a extensão das bases genéticas para a resistência de pesticidas (GUEDES et al., 1995; SANTOS et al., 2011; SILVA et al., 2012; SOUSA et al., 2014).

Esta simples estimativa da extensão das diferenças entre grupos tem sido utilizada com crescente frequência, pois o procedimento alternativo, estimativa da potência relativa, baseia-se no pressuposto de que as linhas de regressão comparadas são paralelas (FINNEY, 1971). No entanto, as linhas de regressão não são frequentemente paralelas, principalmente em bioensaios de pesticidas com diferentes modos de ação ou entre populações que estão em processo de se tornarem resistentes a determinado pesticida (ROBERTSON; PREISLER, 1992).

## 2.7 INTERVALO FIDUCIAL

Um intervalo de confiança fiducial é um intervalo de confiança baseado na teoria estatística fiducial que considera parâmetros desconhecidos da população como variáveis aleatórias. Intervalos de confiança fiduciais são usados primariamente em análises de probit (ROBERTSON; PREISLER, 1992). A utilização dos intervalos

fiduciais de confiança para as razões de toxicidade é recomendada, pois uma simples razão ( $DL_{50}$ ,  $CL_{50}$ , ou  $TL_{50}$ ), não fornece nenhuma estimativa de erro envolvido na sua determinação (HOY et al., 1988; ROBERTSON; STOCK, 1985).

Diversos trabalhos na literatura utilizam a metodologia descrita por Robertson e Preisler (1992) para o cálculo dos intervalos fiduciais de confiança para as razões de toxicidade (RTs). Sendo consideradas significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) se os intervalos de confiança das RTs não englobarem o valor 1 (SANTOS et al., 2011; SILVA et al., 2012; SOUSA et al., 2014).

## 2.8 ESTIMATIVA DOSE-RESPOSTA EM BIOENSAIOS DE TOXICIDADE NA ÁREA DE ARMAZENAMENTO DE GRÃOS

O uso da estimativa de concentração-mortalidade (Dose-resposta), em bioensaios de toxicidade na área de armazenamento de grãos, visando estudos sobre toxicidade, susceptibilidade, bases genéticas da resistência, sobrevivência e alterações comportamentais é amplamente utilizado por diversos autores (BARBOSA et al., 2015; GUEDES et al., 2010; HADDI et al., 2015; SOUSA et al., 2016; SOUZA et al., 2018).

A escolha deste método de análise se justifica, pois, a compreensão de uma série de tratamentos (exemplo: doses, concentrações, tempos de exposição), os quais tem uma variável de resposta binária, cuja relação entre o estímulo e a resposta é uma reta é facilmente compreendida através das curvas dose-resposta calculadas através do modelo probit (BLISS, 1934; DOMENCICH; MCFADDEN, 1975; ROBERTSON; PREISLER, 1992; RUSSELL et al., 1981).

Além disso, o uso das  $DL_{50}$ ,  $CL_{50}$ , ou  $TL_{50}$ , ocorre porque os estímulos em torno de 50%, são estimados com maior precisão que aqueles com níveis de percentagem mais extremos. Isso ocorre porque a menor dispersão dos dados de mortalidade ocorre em torno da média, havendo maior dispersão nas extremidades inferior e superior da curva (FINEY, 1971).

## REFERÊNCIAS

- ANDRÉS, M. F.; ROSSA, G. E.; CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; SANTANA, O.; DÍAZ, C. E.; GONZALEZ-COLOMA, A. Biocidal effects of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil and synergism among its main components. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, n. 2, p. 1086-1092, Nov. 2017.
- ARAÚJO, A. M. N.; FARONI, L. R. A.; OLIVEIRA, J. V.; BARBOSA, D. R. S.; BREDÁ, M. O.; FRANÇA, S. M. Lethal and sublethal responses of *Sitophilus zeamais* populations to essential oils. **Journal of Pest Science**, v. 90, n. 3, p. 589-600, June 2017.
- ARIËNS, E. J.; LEHMANN, P. A.; SIMONIS, A. M. **Introducción a la toxicología general**. 1 ed. Ciudad del México: Ed. Diana, 1978. 337 p.
- BAKER, J. R.; NELDER, J. A. **The GLIM manual: release 3 generalised linear interactive modelling manual**. London: Royal Statistical Society, 1978. 174 p.
- BARBOSA, W. F.; DE MEYER, L.; GUEDES, R. N. C.; SMAGGHE, G. Lethal and sublethal effects of azadirachtin on the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). **Ecotoxicology**, v. 24, n. 1, p. 130-142, Jan. 2015.
- BERGO, C. L.; MENDONÇA, H. A.; SILVA, M. R. Efeito da época e frequência de corte de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) no rendimento de óleo essencial. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 35, n. 2, p. 111-117, abr./jun. 2005.
- BLISS, C. I. The method of probits - a correction. **Science**, v. 79, p. 409-10, 1934.
- BRITO, A. R. S. **Extratos de *Cymbopogon nardus* (L.) sobre o parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae)**. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, 2009.
- BURDITT, A. K. Jr.; HUNGATE, F. P. Gamma irradiation as a quarantine treatment for cherries infested by western cherry fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 81, n. 3, p. 859-862, Jun. 1988.
- COITINHO, R. L. B. C.; OLIVEIRA, J. V.; GONDIM, M. G. C. J.; CÂMARA, C. A. G. Toxicidade por fumigação, contato e ingestão de óleos essenciais para *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1885 (Coleoptera: Curculionidae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 172- 178, jan./fev. 2011.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra 2019/2020**: 1º levantamento de grãos. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 2 mar. 2020.
- COPATTI, C. E.; MARCON, R. K.; MACHADO, M. B. Avaliação de dano de *Sitophilus zeamais*, *Oryzaephilus surinamensis* e *Laemophloeus minutus* em grãos de arroz armazenados. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 8, p. 855-860, ago. 2013.

CORREA, Y. D. C. G.; FARONI, L. R. A.; HADDI, K.; OLIVEIRA, E. E.; PEREIRA, E. J. G. Locomotory and physiological responses induced by clove and cinnamon essential oils in the maize weevil *Sitophilus zeamais*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 125, n. 1, p. 31-37, Nov. 2015.

CORRÊA, A. S.; PEREIRA, E. J. G.; CORDEIRO, E. M. G.; BRAGA, L. S.; GUEDES, R. N. C. Insecticide resistance, mixture potentiation and fitness in populations of the maize weevil (*Sitophilus zeamais*). **Crop Protection**, Oxford, v. 30, n. 12, p. 1655-1666, 2011.

CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 4, p. 500-506, out./dez. 2011.

COSTA, J. T. 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**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 49-53, 2014.

COTTON, R.T.; WILBUR, D. A. Insects. In: CHRISTENSEN, C. M. **Storage of cereal grains and their products**. St. Paul, Minnesota, AACCC, p193-231, 1974.

CRUZ, I.; VACILENTE, F. H.; VIANA P. A.; MENDES, S. M. **Risco potencial das pragas de milho e sorgo no Brasil**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. 40 p. (Documentos, 150).

DOMENCICH, T. A.; MCFADDEN, D. **Urban travel demand**. New York: Elsevier, 1975.

EATON, D. L.; KLAASSEN, C. D. Principles of toxicology. In: KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. **Casarett and doull's toxicology: the basic science of poisons**. New York: McGraw-Hill, 2003. p. 6-20.

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

EVANS, D. E. The biology of stored products Coleoptera. In: **Proc. Aust. Dev. Asst. Course on Preservation of Stored Cereals**, p.149-185, 1981.

FARONI, L. R. D. A.; SOUSA, A. H. Aspectos biológicos e taxonômicos dos principais insetos-praga de produtos armazenados. In: ALMEIDA, F. de A. C.; DUARTE, M. E. M.; MATA, E. R. M. C. (Org.). **Tecnologia de armazenagem em sementes**. Campina Grande: UFCG, 2006. p. 371-402.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; FAZOLIN, M.; CATANI, V.; ALÉCIO, M.R.; LIMA, M.S. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C.DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & k.shum sobre *Tenebrio molitor* L. 1758. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 113-120, 2007.



FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; MEDEIROS, A. F. M.; SILVA, I. M.; GOMES, L. P.; SILVA, M. S. F. Synergistic potential of dillapiole-rich essential oil with synthetic pyrethroid insecticides against fall armyworm. **Ciência Rural**, v. 46, p. 382-388, 2016.

FERREIRA, D. F. **Estatística básica**. Lavras: Editora UFLA, 2005. 664 p.

FERREIRA, P. V. **Estatística experimental aplicada à agronomia**. 2. ed. Macéio: EDUFAL, 1996. 606 p.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3. ed. London: Cambridge University Press, 1971. 333 p.

FREITAS, R. S.; FARONI, L. R. A.; SOUSA, A. H. Hermetic storage for control of common bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* (Say). **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 1-5, 2016.

GADDUM, J. H. **Reports on biological standards. 3: Methods of biological assay depending on a quantal response**. London: H.M.S.O., 1933. 46 p.

GERIS, R.; SILVA, I. G. da, SILVA, H. H. G. da, BARISON, A.; RODRIGUES-FILHO, E.; FERREIRA, A. G. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 25-28, jan./fev. 2008.

GUEDES, N. M. P.; TOLLEDO, J.; CORRÊA, A. S.; GUEDES, R. N. C. Insecticide-induced hormesis in an insecticide-resistant strain of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Journal of Applied Entomology**, v. 134, n. 2, p. 142-148, Mar. 2010.

GUEDES, R. N. C.; LIMA, J. O. L.; SANTOS, J. P.; CRUZ, C. D. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 31, n. 2, p. 145-150, Apr. 1995.

GUERRA, A. M. N. de M.; MARACAÇA, P. B.; FREITAS, R. da S. de; SOUSA, A. H.; SOUSA, C. S. M. Atividade inseticida de plantas medicinais sobre *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 1, p. 146-150, jan./mar. 2009.

HADDI, K.; MENDONÇA, L. P.; SANTOS, M. F. dos; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E. E. Metabolic and Behavioral Mechanisms of Indoxacarb Resistance in *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 1, p. 362-369, Feb. 2015.

HOROWITZ, J. L.; SAVIN, N. E. Binary response models: logits, probits and semiparametrics. **Journal of Economic Perspectives**, v. 15, p. 43-56, 2001.

HOY, M. A.; CONLEY, J.; ROBINSON, W. Cyhexatin and fenbutatin-oxide resistance in pacific spider mite (Acari: Tetranychidae): stability and mode of inheritance. **Journal of Economic Entomology**, v. 81, n. 1, p. 57-64, Feb. 1988.

HUMBURGUER, F.; HAYES, J. A.; PELIKAN, E. W. **A guide to toxicology general**. 2. ed. New York: Karger, 1989. 234 p.

ILBOUDO, Z.; DABIRÉ-BINSO, C. L.; SANKARA, F.; NÉBIÉ, R. C. H.; SANON, A. Optimizing the use of essential oils to protect stored cowpeas from *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchinae). **African Entomology**, v. 23, n. 1, p. 94-100, Mar. 2015.

KANDA, D.; KAUR, S.; KOUL, O. A comparative study of monoterpenoids and phenylpropanoids from essential oils against stored grain insects: acute toxins or feeding deterrents. **Journal of Pest Science**, v. 90, n. 2, p. 531-545, Mar. 2017.

LOECK, A. E. Principais pragas que atacam produtos armazenados. In: LOECK, A. E. **Pragas de produtos armazenados**. Pelotas: EGUFPEL, 2002. p.35-59.

LOOMIS, T. A. Numbers in toxicology. In: LOOMIS, T. A. (Ed.). **Essentials of toxicology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1976. p. 13-25.

LORINI, I. Descrição, biologia e danos das principais pragas de grãos e sementes armazenadas. In: LORINI, I.; MIKE, L. H.; SCUSSEL, V. M.; FARONI, L. R. D. (Eds). **Armazenagem de grãos**. Jundiaí: Instituto Bio Geneziz, 2018. p. 363-381.

LORINI, I. Manejo Integrado de Pragas de Grãos de Cereais Armazenados. Passo Fundo: **Embrapa Trigo**, 72p., 2008.

LORINI, I.; KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A. A.; HENNING, F. A. **Manejo integrado de pragas e sementes armazenadas**. Brasília, DF: Embrapa, 2015. 84 p.

MACHADO, L. A.; SILVA, V. B.; OLIVEIRA, M. de O. Uso de extratos vegetais no controle de pragas em horticultura. **O Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 103-106, jul./dez. 2007.

MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L.; LUZ, A. I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; RAMOS, L. S. Espécies de *Piper* da Amazônia rica em safrol. **Química Nova**, v. 10, n. 3, p. 200-204, 1987.

MARTHA JUNIOR, G. B.; ALVES, E. Brazil's agricultural modernization and Embrapa. In: AMANN, E.; AZZONI, C.; BAER, W. **The Oxford Handbook of the Brazilian Economy**. 2018. p. 309-337.

NEGREIROS, J. R. S.; MIQUELONI, D. P. Morphological and phytochemical characterization of *Piper hispidinervum* DC. and *Piper aduncum* L. populations in the state of Acre. **Revista Ceres**, v. 62, 2015.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora, 1996. 515 p.

OLIVEIRA, J. V.; FRANÇA, S. M.; BARBOSA, D. R. S.; DUTRA, K. A.; ARAÚJO, A. M. N.; NAVARRO, D. M. A. F. Fumigation and repellency of essential oils against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in cowpea. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 52, n. 1, p. 10-17, jan. 2017.

PEREIRA, A. C. R. L.; OLIVEIRA, J. V.; GONDIM JUNIOR, M. G. C.; CÂMARA, C. A. G. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 717-724, 2008.

PEREIRA, A. C. R. L.; OLIVEIRA, J. V.; GONDIM JUNIOR, M. G. C.; CÂMARA, C. A. G. Influência do período de armazenamento do caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], tratado com óleos essenciais e fixos, no controle de *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae).]. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 1, p. 319-325, 2009.

PIMENTEL-GOMES, F. **A estatística moderna na pesquisa agropecuária**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1984. 160 p.

PIMENTEL, M. A. G.; FARONI, L. D.; TÓTOLA, M. R.; GUEDES, R. N. C. Phosphine resistance, respiration rate and fitness consequences in stored-product insects. **Pest Management Science**, London, v. 63, n. 9, p. 876-881, Sept. 2007.

POTENZA, M. R.; ARTHUR, V.; FELICIO, J. D.; ROSSI, M. H.; NAKAOKA SAKITA, M.; SILVESTRE, D. de F.; GOMES, D. H. P. Efeito de produtos naturais irradiados sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 4, p. 477-484, out./dez. 2004.

RAMOS, C. S.; BARBOSA, Q. P. S.; VANIN, S. A. Metabolism of safrole by *Heraclides thoas brasiliensis* (Papilionidae). **Journal of the Lepidopterists' Society**, v. 68, n. 4, p. 283-285, Dec. 2014.

RATTAN, R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Protection**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 913-920, Dec. 2010.

REES, D .P. Coleoptera. In: SUBRAMANYAM, B.; HAGSTRUM, D. W. **Integrated Management of Insects in Stored Products**, New York: Marcel Dekker, 1996. p.1-39.

ROBERTSON, J. L.; PREISLER, H. K. **Pesticide bioassays with arthropods**. Boca Raton: CRC Press, 1992. 127 p.

ROBERTSON, J. L.; STOCK, M. W. Toxicological and electrophoretic population characteristics of western spruce budworm, *Choristoneura occidentalis* (Lepidoptera: Tortricidae). **The Canadian Entomologist**, v. 117, n. 1, p. 57-65, Jan. 1985.

RUSSELL, R. M.; ROBERTSON, J. L.; SAVIN, N. E. Polo: a user's guide to multiple probit or logit analysis. **Bulletin of the Entomological Society of America**, v. 23, n. 3, p. 209-213, Sep. 1977.

SANTOS, J. C.; FARONI, L. R. D. A.; SOUSA, A. H.; GUEDES, R. N. C. Fumigant toxicity of allyl isothiocyanate to populations of the red flour beetle *Triblium castaneum*. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 47, n. 3, p. 238-243, July 2011.

SANTOS, A. C. V.; FERNANDES, C. C.; LOPES, L. M.; SOUSA, A. H. Use of plant oils from the southwestern Amazon for the control of maize weevil **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 63, n. 4, p. 67-70, July 2015.

SARRIA, A. L. F.; SOARES, M. S.; MATOS, A. P.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. das G. F. da. Effect of triterpenoids and limonoids isolated from *Cabralea canjerana* and *Carapa guianensis* (Meliaceae) against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Zeitschrift fur Naturforschung**, Berlin, v. 66c, n. 5/6, p. 245-250, June 2011.

SAUTER, I. P.; ROSSA, G. E.; LUCAS, A. M.; CIBULSKI, S. P.; ROEHEC, P. M.; SILVA, L. A. A.; ROTT, M. B.; VARGAS, M. F.; CASSEL, E.; POSER, G. L. Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 40, n. 1, p. 292-295, Nov. 2012.

SILVA, G. N.; FARONI, L. R. A.; SOUSA, A. H.; FREITAS, R. S. Bioactivity of *Jatropha curcas* L. to insect pests of stored products. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 48, p. 111-113, Jan. 2012.

SOHILAIT, H. J.; KAINAMA, H. Synthesis of 1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1-butene-3-one from safrole. **European Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 66-70, Feb. 2015.

SOUSA, A. H.; FARONI, L. R. A.; FREITAS, R. S. Relative toxicity of mustard essential oil insect-pests of stored products. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 27, n. 2, p. 222-226, abr./jun. 2014.

SOUSA, A. H.; FARONI, L. R. D'A.; PIMENTEL, M. A.G.; SILVA, G. N.; GUEDES, R. N. C. Ozone toxicity to *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) populations under selection pressure from ozone. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 65, p. 1-5, Jan. 2016.

SOUZA, L. P. de; FARONI, L. R. D'A.; LOPES, L. M.; SOUSA, A. H.; PRATES, L. H. F. Toxicity and sublethal effects of allyl isothiocyanate to *Sitophilus zeamais* on population development and walking behavior. **Journal of Pest Science**, v. 91, n. 2, p. 761-770, Mar. 2018.

THRONE, J. E.; WEAVER, D. K.; BAKER, J. E. Probit Analysis: Assesing goodness-of-fit basead on backtransformation and residuals. **Journal of Economic Entomology**, v. 88, p. 1513-1516, 1995.

ZIMMERMANN, F. J. P. **Estatística aplicada à pesquisa agropecuária**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Arroz e Feijão, 2014. 582 p.

### 3 CAPÍTULO I

**TOXICIDADE E EFEITOS SUBLETAIS DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Piper hispidivervum* SOBRE RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS  
E FISIOLÓGICAS DE POPULAÇÕES DE *Sitophilus zeamais*  
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

## RESUMO

A pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) é uma planta aromática endêmica da Amazônia que possui grande potencial na produção de óleo essencial. Os óleos essenciais de algumas espécies de *Piper* têm importância comercial para as indústrias farmacêuticas e de fragrâncias, além de demonstrarem propriedades inseticidas devido ao seu rico conteúdo em terpenos, propenilfenóis e alcaloides. O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (OEPH) em onze populações brasileiras de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). Adicionalmente, investigou-se os efeitos das concentrações subletais do OEPH no comportamento (caminhamento e voo), respirometria e crescimento populacional ( $r$ ) das populações de insetos. A toxicidade do OEPH foi determinada por bioensaios de concentração-mortalidade, onde as curvas de mortalidade foram estabelecidas usando concentrações crescentes do OEPH variando de 140,00 a 1000,00  $\mu\text{L kg}^{-1}$ . O comportamento foi avaliado pela distância percorrida, tempo e velocidade de caminhamento, proporção do tempo de caminhamento, altura de voo e decolagem. A respirometria foi avaliada pelo efeito subletal do OEPH sobre taxa respiratória. O ( $r$ ) foi avaliado pelo cálculo das taxas instantâneas de crescimento populacional. Todas as onze populações de *S. zeamais* avaliadas foram susceptíveis ao OEPH, não exibindo resistência. As populações de *S. zeamais* demonstraram diferentes respostas comportamentais e fisiológicas à exposição subletal ao OEPH. Os resultados mostraram que o OEPH apresenta potencial inseticida para controlar populações de *S. zeamais*, entretanto, as respostas comportamentais e fisiológicas dos insetos não devem ser negligenciadas, para que níveis adequados de controle sejam alcançados em programas de manejo de pragas de produtos armazenados.

**Palavras-chave:** Gorgulho-do-milho. Safrol. Controle alternativo. Caminhamento. Respirometria.

## ABSTRACT

The long pepper (*Piper hispidinervum* C. DC.) is an aromatic plant endemic in the Amazon that has great potential in the production of essential oil. The essential oils of some species of *Piper* have commercial importance for the pharmaceutical and fragrance industries, besides demonstrating insecticidal properties due to their rich content in terpenes, propenylphenols and alkaloids. The objective of this study was to evaluate the toxicity of the essential oil of *P. hispidinervum* (EOPH) in eleven Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). Additionally, we investigated the effects of EOPH sublethal concentrations on the behavior (walking and flying), respirometry and population growth ( $r_i$ ) of the insect populations. EOPH toxicity was determined by concentration-mortality bioassays, where mortality curves were established using increasing concentrations of EOPH ranging from 140.00 to 1000.00  $\mu\text{L kg}^{-1}$ . The behavior was evaluated by the walked distance, walking time and speed, proportion of walking time, flight height and take-off. Respirometry was assessed by the sublethal effect of EOPH on the respiratory rate. The  $r_i$  was evaluated by calculating the instantaneous population growth rates. All the eleven *S. zeamais* populations evaluated were susceptible to EOPH, showing no resistance. The populations of *S. zeamais* demonstrated different behavioral and physiological responses to sublethal exposure to EOPH. The results showed that EOPH presents a potential insecticide to control populations of *S. zeamais*, however, the behavioral and physiological responses of insects should not be neglected, so that adequate levels of control are achieved in stored product pest management programs.

**Keywords:** Maize weevil. Safrole. Alternative control. Walking. Respirometry.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O gorgulho-do-milho, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae), é uma das pragas mais destrutivas de grãos armazenados em todo o mundo. O controle deste inseto-praga, tem sido feito principalmente por meio de aplicações de inseticidas organofosforados, piretróides, brometo de metila, atualmente proibido, e fosfina (PH<sub>3</sub>) (SOUSA et al., 2008; PIMENTEL et al., 2012). Contudo o uso contínuo e indiscriminado destes inseticidas resultou no desenvolvimento de populações de insetos-praga resistentes (GUEDES et al., 2006; PIMENTEL et al., 2008; PIMENTEL et al., 2010). Embora eficazes, os inseticidas sintéticos apresentam efeitos indesejáveis sobre organismos não-alvos e desencadeiam preocupações em relação à saúde humana e ao meio ambiente (WHITE; LEESC, 1996; CARVALHO et al., 2012).

Como alternativa à utilização de inseticidas sintéticos, vários métodos de controle têm sido amplamente difundidos, incluindo atmosferas modificadas, pó-inertes, controle biológico, inseticidas botânicos e outras técnicas que podem ser implementadas em manejos integrados de pragas de produtos armazenados (COSTA et al., 2014; SOARES et al., 2015; LOPES et al., 2016; FREITAS et al., 2016). Mais de 100.000 propriedades inseticidas com metabólitos secundários foram identificadas, como alcalóides, terpenóides, flavonóides e quinonas, derivados de aproximadamente 200.000 espécies de plantas no mundo (SOUZA et al., 2018). Estes compostos têm múltiplos mecanismos de ação sobre insetos, particularmente mortalidade, repelência e inibição do crescimento, alimentação, desenvolvimento e reprodução (KANDA et al., 2017).

*Piper* é o maior gênero de Piperaceae, incluindo cerca de 1000 espécies. Os óleos essenciais de algumas espécies de *Piper* têm importância comercial para as indústrias farmacêuticas e de fragrâncias, além de demonstrarem propriedades inseticidas devido ao seu rico conteúdo em terpenos, propenilfenóis e alcalóides (FERRAZ et al., 2010; SILVA et al., 2016; ANDRÉAS et al., 2017). *Piper hispidinervum* C.DC. 1917, também conhecida como pimenta-longa, é um arbusto distribuído pela América do Sul e especialmente predominante no estado do Acre, no Brasil (ROCHA; LIN, 1999). O óleo essencial de *P. hispidinervum* é rico em safrol e sua maior concentração está presente nas folhas, entre 80% a 98%, seguida dos ramos jovens (LIMA et al., 2009; ARAÚJO et al., 2017). O safrol é um fenilpropenóide utilizado para sintetizar o butóxido de piperonila (PBO), um agente sinérgico que estabiliza e



potencializa a ação inseticida dos piretróides naturais (SOUTO et al., 2012; CRUZ et al., 2014). Além disso, estudos anteriores sobre o óleo essencial de *P. hispidinervum*, evidenciaram o seu efeito inseticida sobre diversos insetos-praga como, *S. zeamais* (COITINHO et al., 2011; ARAÚJO et al., 2017), *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) (PEREIRA et al., 2008), *Tenebrio molitor* (L., 1758) (FAZOLIN et al., 2007) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (LIMA et al., 2009).

A maioria dos estudos existentes analisa o efeito letal de inseticidas, incluindo produtos sintéticos e naturais, mas investigações que expliquem os efeitos subletais destes, no comportamento locomotor e aspectos fisiológicos dos insetos ainda são escassas. Os insetos podem exibir uma série de respostas fisiológicas e comportamentais a vários compostos tóxicos em ambientes naturais ou de manejo (GUEDES et al., 2016; SOUSA et al., 2017). Desta forma, a compreensão dos efeitos subletais nos parâmetros comportamentais e fisiológicos podem desempenhar um papel importante no manejo integrado de pragas. O comportamento dos insetos raramente é o foco dos estudos toxicológicos, embora se saiba que os insetos são capazes de mudar seu comportamento em resposta à percepção sensorial dos inseticidas de uma maneira que comprometa a eficiência desses produtos (GUEDES et al., 2011; SOUSA et al., 2017).

A associação de exposições subletais de inseticidas candidatos a uso com as características fisiológicas dos insetos pode ajudar a entender os seus mecanismos de ação (LOCKWOOD et al., 1984; PEKÁR; HADDAD, 2005). Além disso, a taxa respiratória e a massa corporal também podem representar a soma das demandas energéticas dos processos fisiológicos dos insetos necessárias para produzir mecanismos de defesa contra os inseticidas (ARAÚJO et al., 2008; BRAGA et al., 2011; CORREA et al., 2015). Considerando que estas características, influenciam a toxicidade, são válidos os esforços para entender os seus efeitos sobre o comportamento locomotor e as respostas fisiológicas de populações de insetos sob exposições subletais do óleo essencial de *P. hispidinervum*.

Diante o exposto, neste estudo o objetivo foi avaliar a toxicidade do óleo essencial de *P. hispidinervum* sobre onze populações brasileiras de *S. zeamais*. Adicionalmente, investigou-se as respostas comportamentais, fisiológicas e as taxas instantâneas de crescimento populacional ( $r_i$ ) das populações dos gorgulhos expostas aos efeitos subletais do óleo.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os bioensaios foram conduzidos no laboratório de Manejo Integrado de Pragas e no laboratório de Produtos Naturais, Microbiologia e Biotecnologia, da Universidade Federal do Acre – campus Rio Branco e nos laboratórios de Ecotoxicologia e Manejo Integrado de Pragas de Grãos Armazenados, da Universidade Federal de Viçosa – campus Viçosa.

### 3.2.1 Populações de *Sitophilus zeamais*

Onze populações brasileiras de *S. zeamais* coletadas nos municípios de Cristalina, GO; Crixás, GO; Jacarezinho, PR; Juiz de Fora, MG; Londrina, PR; Machado, MG; Picos, PI; Recife, PE; Tunápolis, SC; Uirapuru, GO e Viçosa, MG foram utilizadas. Os insetos foram criados em frascos de vidro de 1,5 L sob temperatura constante ( $27\pm 2$  °C), umidade relativa ( $70\pm 5\%$ ) e escotofase (24 h). Grãos de miho foram utilizados como substrato alimentar, com teor de água de 13% em base úmida (bu), previamente fumigados com fosfina ( $\text{PH}_3$ ) (Gastoxin, Bernado Química, São Vicente, SP, Brasil) e mantidos a  $-18$  °C para evitar reinfestação.

### 3.2.2 Obtenção e extração do óleo essencial

O material vegetal de *P. hispidinervum* foi coletado próximo ao Ramal Iquiri no município de Rio Branco, AC, localizado na latitude  $9^\circ 58' 29''$  (S) e longitude  $67^\circ 48' 36''$  (W) e 153 m de altitude ao nível do mar. A coleta do material vegetal foi realizada no período da manhã durante o mês de junho de 2017. Inicialmente o material vegetal foi coletado com a hipótese de ser *Piper aduncum* L., 1753. Posteriormente, uma análise taxonômica pela Dra. Elsie Franklin Guimarães, do Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (Herbário RB) identificou a espécie como *P. hispidinervum*. Além da classificação botânica, a natureza química do óleo embasa a comprovação da espécie botânica como sendo *P. hispidinervum*. As exsiccatas utilizadas para identificação da espécie botânica encontram-se depositadas no Herbário UFACPZ da Universidade Federal do Acre, sob o número de registro: UFACPZ 20.647.

Foi realizada a triagem do material afim de separar folhas e ramos. As folhas foram secas parcialmente sob condição ambiente, depois foram levadas para estufa a 36 °C para secagem até obter massa constante. A extração do óleo essencial de *P. hispidinervum* (OEPH) foi realizada com a manta aquecedora (0321A28, Quimis, Brasil), balão volumétrico de 5 L e aparelho tipo Clevenger. O OEPH foi separado da emulsão por decantação em um funil de separação e uso de sulfato de sódio anidro P.A (Synth, Brasil). O OEPH obtido foi armazenado em um frasco âmbar a uma temperatura  $4\pm 1$  °C.

### 3.2.3 Composição do óleo essencial

O OEPH foi analisado em Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrofotômetro de Massas (CG-EM) (QP2020, Shimadzu, Japão). As condições cromatográficas foram: coluna capilar SH-Rtx-5MS de 30 cm de comprimento com 0,25 mm de diâmetro e espessura de 0,25  $\mu\text{m}$ , sendo hélio utilizado como gás de arraste com fluxo de  $1,17 \text{ mL min}^{-1}$ , e temperatura do injetor de 220 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 60 °C com aumento de  $2 \text{ °C min}^{-1}$  até 200 °C, e depois de um aumento de  $5 \text{ °C min}^{-1}$  até 250 °C, sendo mantido nessa temperatura por 1 min. O cromatógrafo foi operado em modo full scan com razão de split de 1:20. O tempo total de análise foi de 81 min. Os espectros de massas obtidos foram comparados com os espectros da biblioteca NIST 14 e pelo cálculo do índice de Kovats relativo a uma série de alcanos saturados (C7-C30) (49451-U, Supelco, Bellefonte, PA, EUA).

### 3.2.4 Quantificação absoluta do safrol

A quantificação absoluta do safrol presente no OEPH foi determinada no cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama (CG/DIC) (GC2014, Shimadzu, Japão). Foram injetadas cinco concentrações do safrol (Solução de safrol, Supelco, P.A., Alemanha) 0,25; 0,50; 1,00, 1,50, 2,00  $\text{mg mL}^{-1}$  diluído em metanol, em três repetições. Também foi injetado o OEPH na concentração de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  diluído em metanol (Vetec, UV/HPLC 99,9%, Alemanha) em triplicatas.

As condições cromatográficas para quantificação do safrol foram: coluna capilar (DB-5, Shimadzu, Japão) de 30 cm de comprimento com 0,25 mm de diâmetro interno

e espessura de filme de 0,10  $\mu\text{m}$ , nitrogênio (Air Products, U.P. 99,999%, Brasil) como gás de arraste com fluxo de 1,82  $\text{mL min}^{-1}$ , temperatura do injetor de 220  $^{\circ}\text{C}$  e do detector por ionização em chama de 300  $^{\circ}\text{C}$ . Com razão de split de 1:5. A temperatura inicial da coluna foi de 60  $^{\circ}\text{C}$  com taxa de aumento de 5  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até 120  $^{\circ}\text{C}$  e mantida nessa temperatura por 1 min. O tempo total da análise foi de 12 min.

### 3.2.5 Bioensaios de toxicidade do OEPH

A toxicidade do OEPH para as onze populações de *S. zeamais* foi determinada por bioensaios de concentração-mortalidade. As curvas de mortalidade foram estabelecidas usando concentrações crescentes do OEPH (140; 250; 370; 490; 600; 800 e 1000  $\mu\text{L kg}^{-1}$ ), conforme determinado em testes preliminares.

A aplicação do OEPH foi realizada em 200 g de grãos de milho, através de um aerógrafo de dupla ação, com sistema de mistura interna e depósito por gravidade (modelo BC 60, Steula, São Paulo, Brazil). A pressão de trabalho utilizada na pulverização foi de 15 Psi e o volume de calda aplicado foi de 400  $\mu\text{L}$  para cada 200 g de milho. As unidades experimentais foram compostas por frascos de vidro (2,1 cm de diâmetro x 7,4 cm de altura) contendo 20 g de milho. Em cada frasco de vidro foram acondicionados 20 insetos adultos não sexados, com idade variando de uma a três semanas, sob condições constantes de temperatura ( $27 \pm 2$   $^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa ( $70 \pm 5\%$ ) e escotofase (24 h). Foram utilizadas seis repetições para cada concentração e a mortalidade dos adultos foi avaliada após 24 h do início dos bioensaios. O tratamento controle foi constituído por acetona.

### 3.2.6 Efeito subletal do OEPH sobre a respirometria

O efeito da exposição subletal ao OEPH ( $\text{CL}_{30} = 85,42$   $\mu\text{L kg}^{-1}$ , da população padrão de suscetibilidade) sobre a taxa respiratória foi determinado nas onze populações de *S. zeamais*. A população padrão de suscetibilidade, Cristalina, GO, foi determinada no bioensaio de toxicidade. Inicialmente os insetos foram expostos a concentração subletal do OEPH por 30 min, em placas de petri (9 cm x 2 cm), para posterior transferência para as câmaras respirométricas.

A produção de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (μL de CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup>/inseto) foi mensurada por meio de um respirômetro do tipo CO<sub>2</sub> Analyser TR3C (Sable System International, Las Vegas, EUA), utilizando-se a metodologia adaptada de trabalhos anteriores (GUEDES et al., 2006; SOUSA et al., 2008). Foram utilizadas câmaras respirométricas de 25 mL, cada uma contendo 10 insetos adultos não sexados, conectadas a um sistema completamente fechado.

A produção de CO<sub>2</sub> foi mensurada após o período de 2 h de aclimação dos insetos nas câmaras, na temperatura de 27±2 °C. Para fazer a varredura de todo o CO<sub>2</sub> produzido no interior de cada câmara, procedeu-se à passagem de ar isento de CO<sub>2</sub> em fluxo de 100 mL min<sup>-1</sup> por um período de dois min. Essa corrente de ar faz com que todas as moléculas de CO<sub>2</sub> produzidas passem por um leitor de infravermelho acoplado ao sistema, que continuamente faz a mensuração do CO<sub>2</sub> produzido pelos insetos e acumulado no interior de cada câmara. O controle foi constituído por câmaras respirométricas com insetos expostos a acetona e foi utilizado para normalizar os dados da taxa respiratória de cada população.

Após a mensuração do CO<sub>2</sub>, os insetos foram removidos das câmaras e em seguida foram pesados usando-se uma balança analítica (Sartorius BP 210D, Göttingen, Germany). Os valores da taxa respiratória não foram normalizados pela massa corporal porque este procedimento mascara o efeito individual das variáveis (HAYES, 2001). Foram utilizadas quatro repetições para cada população.

### 3.2.7 Efeito subletal do OEPH sobre a taxa instantânea de crescimento populacional ( $r_i$ )

O efeito da exposição subletal ao OEPH (CL<sub>30</sub> = 85,42 μL kg<sup>-1</sup>) sobre o ( $r_i$ ) foi determinado nas onze populações de *S. zeamais*. Os bioensaios foram realizados em frascos de vidro com capacidade de 0,8 L, contendo 200 g de milho, com teor de umidade de 13% (bu), tratados com 85,42 μL kg<sup>-1</sup> de OEPH. O controle foi constituído por acetona. O OEPH e a acetona foram pulverizados na massa de grãos através de um aerógrafo de dupla ação, com sistema de mistura interna e depósito por gravidade (modelo BC 60, Steula, São Paulo, Brazil). A pressão de trabalho utilizada na pulverização foi de 15 Psi e o volume de calda aplicado foi de 400 μL para cada 200 g de milho.

Os grãos tratados foram infestados com 50 insetos adultos não-sexados, com idade variando de uma a três semanas. Após, os frascos foram armazenados em câmaras climáticas tipo B.O.D., sob condições constantes de temperatura ( $27 \pm 2$  °C), umidade relativa ( $70 \pm 5\%$ ) e escotofase de 24 h. Nestes bioensaios, os insetos não foram removidos. Foram utilizadas quatro repetições para cada tratamento. A progênie adulta foi contabilizada após 60 dias de armazenamento.

A taxa instantânea de crescimento ( $r_i$ ) foi calculada por meio da equação proposta por Walthall e Stark (1997) (Equação 1), utilizado-se o total de insetos obtidos ao final do armazenamento (60 dias) e o número inicial de insetos de cada população.

$$r_i = \frac{\left[ \ln \left( \frac{N_f}{N_0} \right) \right]}{\Delta T} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que  $N_f$  = Número final de insetos;  $N_0$  = Número inicial de insetos; e  $\Delta T$  = Variação de tempo (número de dias em que o ensaio foi executado).

### 3.2.8 Efeito subletal do OEPH sobre o comportamento locomotor

Os bioensaios de caminhada foram realizados em uma sala com iluminação artificial, temperatura controlada ( $27 \pm 2$  °C), entre 8 e 17 h, com metodologia adaptada de Guedes et al. (2009) e Souza et al. (2018). Foram realizados dois bioensaios comportamentais de caminhada em arenas totalmente ou parcialmente (metade) tratadas com OEPH. O caminhada dos insetos de cada população foi observado individualmente durante 10 min em arenas de placas de Petri (9 cm de diâmetro e 2 cm de altura). No interior da placa foi colocado papel filtro (Quanty JP42-Faixa Azul) (9 cm de diâmetro) e suas paredes internas foram revestidas com Teflon® PTFE (DuPont, Wilmington, DE, EUA) para evitar o escape dos insetos.

Para o bioensaio em arena totalmente tratada, o papel filtro foi umedecido com 1 mL de solução do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ) e o controle por 1 mL de acetona. No bioensaio em arena parcialmente tratada, o papel filtro foi umedecido inicialmente com 1 mL de acetona, após este procedimento foi colado acima deste, com cola bastão

comum, metade de um disco de papel filtro umedecido com 1 mL de solução do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).

O movimento de cada inseto dentro das arenas total e parcialmente tratadas foi monitorado por um sistema de rastreamento que consiste de uma câmera CCD que registra e transfere as imagens digitalmente para um computador acoplado (ViewPoint Life Sciences Inc., Montreal, Canadá). Foram utilizadas 20 repetições para cada um dos diferentes tratamentos e populações, sendo cada repetição constituída por um inseto adulto de *S. zeamais* não sexado e com idade variando de uma a três semanas. Os insetos foram colocados individualmente no centro da arena 2 min antes do início dos testes, para o reconhecimento da arena. As características avaliadas para as arenas totalmente tratadas foram: distância percorrida, tempo de caminhamento e velocidade de caminhamento. Para as arenas parcialmente tratadas avaliou-se a proporção do tempo de caminhamento.

### 3.2.9 Efeito subletal do OEPH sobre o levantamento de voo

A metodologia utilizada foi adaptada em conformidade com Perez-Mendoza et al. (1999) e Guedes et al. (2009). A aplicação de  $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$  do OEPH, foi realizada em placas de Petri (9 cm de diâmetro e 2 cm de altura). No interior da placa foi colocado papel filtro (Quanty JP42-Faixa Azul) (9 cm de diâmetro) e suas paredes internas foram revestidas com Teflon® PTFE (DuPont, Wilmington, DE, EUA) para evitar o escape dos insetos.

As placas foram acondicionadas no interior de câmaras de (13 cm de largura × 20 cm de altura), e os insetos foram liberados dentro das placas de Petri na parte inferior das câmaras, as quais tiveram as paredes internas revestidas com Teflon® PTFE (DuPont, São Paulo, Brasil) até 2 cm de altura para evitar que os insetos subissem nestas, e o restante impregnadas com cola entomológica (Bio Controle, São Paulo, Brasil).

Foram utilizadas 20 repetições, para as onze populações, cada uma com 200 adultos não-sexados, com idade variando de uma a três semanas. O tempo de observação foi de 30 min e os parâmetros avaliados foram o número de insetos que iniciaram o voo (decolagem) e a altura de voo. Os testes foram realizados em sala com iluminação artificial, na temperatura de  $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , entre 8 e 17 h. No controle utilizou-se apenas acetona.

### 3.2.10 Análises estatísticas

Os dados de concentração-mortalidade foram submetidos à análise probit (PROC PROBIT; SAS Institute 2011). Os intervalos de confiança para as razões de toxicidade (RTs) foram calculados conforme Robertson et al. (2007), e os valores das concentrações letais (CLs) foram considerados significativamente diferentes se seus intervalos de confiança de 95% não abrangerem o valor 1.

Os dados de taxa respiratória (produção de CO<sub>2</sub>),  $r_i$ , altura de voo e decolagem para as populações nos tratamentos com OEPH e controle foram submetidos à análise de variância (PROC GLM; SAS Institute 2011). Posteriormente, foram realizados testes de agrupamento de médias de Scott-Knott entre as populações ( $P < 0,05$ ) (Scott and Knott 1974) e teste F entre os tratamentos com e sem óleo essencial ( $P < 0,05$ ) (PROC GLM; SAS Institute 2011). Os dados de massa corpórea foram submetidos à análise de variância (PROC GLM; SAS Institute 2011), e agrupados pelo teste de médias de de Scott-Knott (SCOTT; KNOTT, 1974).

Os resultados das variáveis de caminhada (distância percorrida, tempo de caminhada, velocidade de caminhada e proporção de tempo de caminhada) foram submetidos a análises de variância (PROC GLM; SAS Institute, 2011). Foi utilizado o teste de Scott-Knott para determinar as variações comportamentais entre as populações ( $P < 0,05$ ) e teste de F para determinar as variações comportamentais entre as arenas tratadas e parcialmente tratadas com OEPH ( $P < 0,05$ ).



### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Composição do OEPH

A análise cromatográfica mostrou a presença de seis constituintes no OEPH (Tabela 1). O safrol é o composto majoritário, representando 93,0% dos compostos identificados, seguido por bicilogermacreno, pentadecano, espathulenol, p-cimen-8-ol e (E)-carofileno com 2,05; 1,60; 1,46; 1,20 e 0,69%, respectivamente. A concentração absoluta do safrol no OEPH foi determinada através do CG-DIC conforme o tempo de retenção do safrol P.A., onde constatou-se que o safrol representa 85% do óleo essencial.

Tabela 1 – Composição química e concentrações relativas dos compostos identificados no OEPH utilizando análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

Constituinte	IR <sup>1</sup> Literatura	IR <sup>1</sup> Calculado	% Relativa
Safrol	1285	1292	93,00
Bicilogermacreno	1500	1493	2,05
Pentadecano	1500	1498	1,60
Espathulenol	1577	1573	1,46
p-Cimen-8-ol	1179	1184	1,20
(E)-Cariofileno	1417	1415	0,69

IR<sup>1</sup> = Índice de Retenção.

#### 3.3.2 Toxicidade do OEPH

A toxicidade do OEPH foi determinada através de curvas de concentração-mortalidade (Tabela 2). Verificou-se baixa variação na toxicidade entre as populações, com RT  $\leq$  1,91 vezes (CL<sub>50</sub> e CL<sub>95</sub>) variando de 1,00 a 1,91. A população de Cristalina, GO, apresentou o menor valor de CL<sub>50</sub> (255,79  $\mu$ L kg<sup>-1</sup>), e foi utilizada como população padrão de suscetibilidade. O modelo probit foi adequado para analisar os dados de mortalidade, pois foram observados baixos valores de  $\chi^2$  e altos valores de *P* para cada curva de concentração-mortalidade ( $\chi^2 < 5,86$ ; *P* > 0,05). Por outro lado, houve variação da inclinação, nas curvas das populações que não pode ser negligenciada, variando de 3,60 a 6,85. Este fato indica alguma heterogeneidade toxicológica entre essas populações.

Tabela 2 – Toxicidade residual relativa de *P. hispidinervum* em adultos de populações brasileiras de *S. zeamais*. O intervalo de concentração do OEPH foi de 140,00 – 1000,00  $\mu\text{L kg}^{-1}$  (24 h exposição).

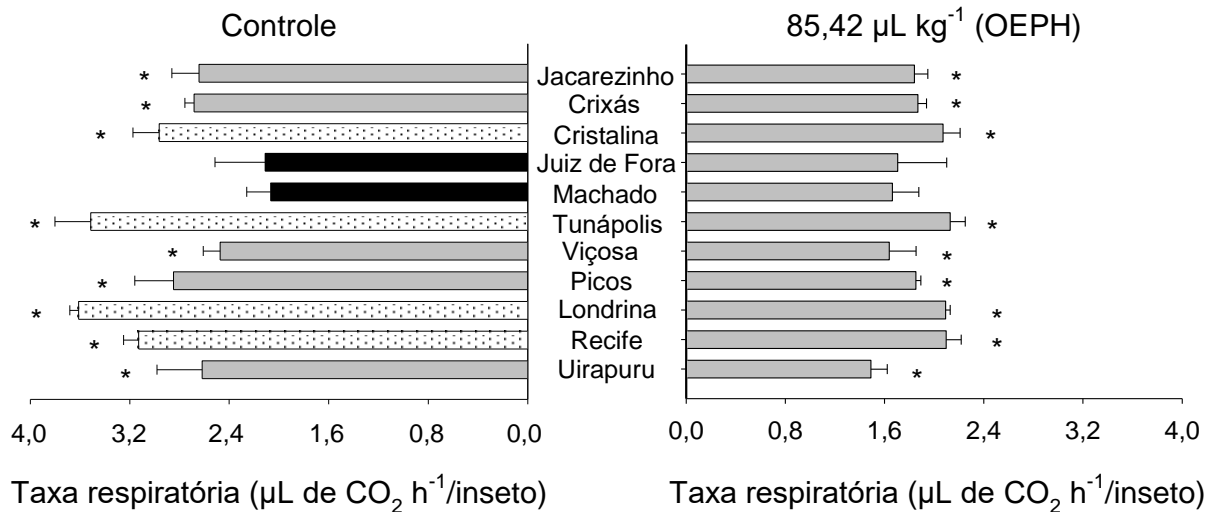
Populações	Inclinação $\pm$ E.P.M. <sup>1</sup>	CL <sub>50</sub> (IF 95%) g L <sup>-1</sup>	RT (IC 95%) CL <sub>50</sub>	CL <sub>95</sub> (IF 95%) g L <sup>-1</sup>	RT (IC 95%) CL <sub>95</sub>	$\chi^2$	P
Cristalina, GO	3,95 $\pm$ 0,32	255,79 (234,56-276,33)	-	667,49 (587,62-789,10)	1,06 (0,88-1,26)	4,69	0,20
Crixás, GO	4,21 $\pm$ 0,33	288,88 (267,23-310,20)	1,13 (0,92-1,39)	710,95 (628,85-835,11)	1,13 (0,92-1,38)	3,76	0,29
Picos, PI	4,27 $\pm$ 0,34	324,28 (301,70-347,39)	1,27 (1,05-1,54)	787,68 (692,73-933,39)	1,25 (1,01-1,53)	4,14	0,25
Viçosa, MG	4,34 $\pm$ 0,34	325,44 (303,00-348,25)	1,27 (1,06-1,53)	778,80 (686,85-918,70)	1,23 (1,02-1,49)	5,85	0,12
Tunápolis, SC	5,92 $\pm$ 0,45	333,47 (314,42-352,32)	1,30 (1,09-1,56)	632,45 (578,57-709,31)	-	2,81	0,42
Uirapuru, GO	4,20 $\pm$ 0,35	336,36 (312,81-360,53)	1,31 (1,10-1,58)	828,06 (724,65-989,55)	1,31 (1,06-1,63)	3,90	0,27
Recife, PE	4,52 $\pm$ 0,36	337,76 (315,46-360,76)	1,32 (1,10-1,59)	781,31 (691,01-918,66)	1,24 (1,01-1,52)	4,08	0,25
Machado, MG	5,16 $\pm$ 0,40	352,60 (331,46-374,31)	1,38 (1,16-1,64)	734,71 (659,90-845,54)	1,16 (0,96-1,40)	5,67	0,13
Londrina, PR	4,89 $\pm$ 0,40	383,20 (359,92-407,99)	1,50 (1,25-1,79)	832,01 (736,24-980,09)	1,32 (1,06-1,63)	4,85	0,18
Jacarezinho, PR	3,60 $\pm$ 0,28	421,43 (387,34-459,56)	1,65 (1,38-1,97)	1206,00 (1023,00-1497,00)	1,91 (1,54-2,36)	4,12	0,25
Juiz de Fora, MG	6,85 $\pm$ 0,53	487,75 (465,72-510,67)	1,91 (1,62-2,25)	847,77 (780,09-944,90)	1,34 (1,12-1,60)	4,15	0,25

<sup>1</sup> Erro Padrão da Média.

### 3.3.3 Taxa respiratória e massa corpórea

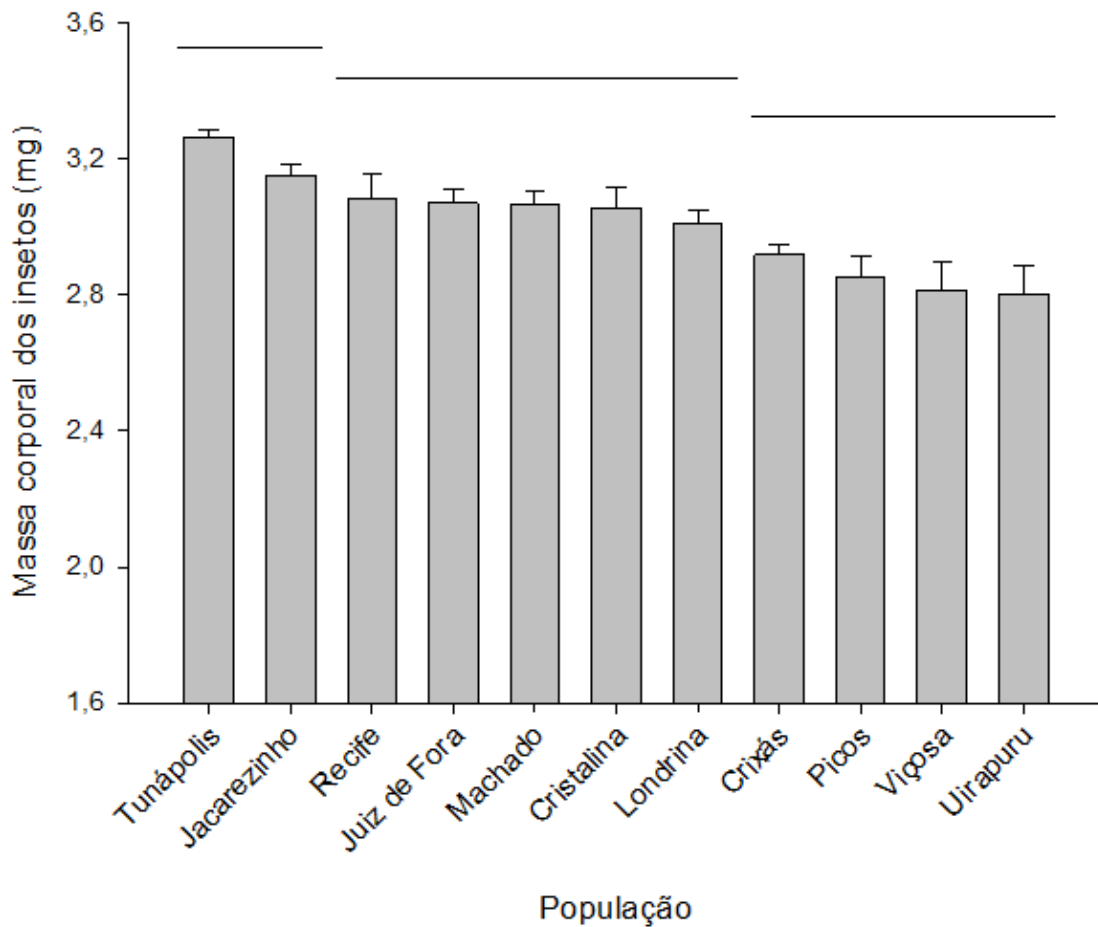
A taxa respiratória ( $\mu\text{L}$  de  $\text{CO}_2$   $\text{h}^{-1}/\text{inseto}$ ) variou significativamente entre as populações de *S. zeamais* ( $F_{10;66} = 5,31$ ;  $P < 0,01$ ) e entre o tratamento com OEPH e controle ( $F_{1;66} = 106,17$ ;  $P < 0,01$ ), mas não houve interação significativa entre estes dois fatores ( $F_{10;66} = 1,34$ ;  $P = 0,23$ ) (Figura 5). De modo geral, todas as populações exibiram redução na taxa respiratória na presença do óleo, com exceção das populações de Juiz de Fora, MG, e Machado, MG, que não diferiram do controle. A massa corporal individual dos insetos (mg), diferiu significativamente entre as populações ( $F_{10;77} = 7,08$ ;  $P < 0,01$ ) (Figura 6). As populações de Uirapuru, GO; Viçosa, MG; Picos, PI e Crixás, GO, exibiram menor massa corporal, quando comparadas com as demais.

Figura 5 – Taxa respiratória de indivíduos das populações de *S. zeamais* não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $\text{CL}_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).



Médias com barras de mesma cor, não diferem entre as populações pelo teste de Scott-Knott ( $P > 0,05$ ) e os asteriscos indicam diferença significativa entre a população exposta e não exposta ao óleo essencial pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

Figura 6 – Massa corporal das populações de *S. zeamais*.

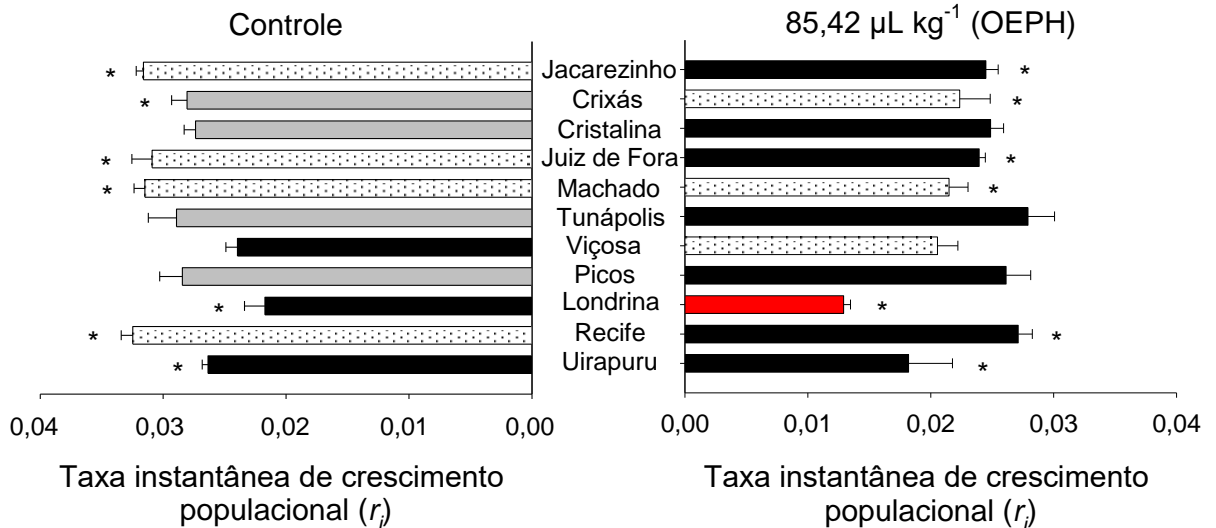


Médias seguidas pelas mesmas barras não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $P > 0,05$ ).

#### 3.3.4 Efeitos subletais do OEPH sobre o ( $r_i$ )

O ( $r_i$ ) variou significativamente entre as populações de *S. zeamais* ( $F_{10;66} = 10,09$ ;  $P < 0,01$ ), entre o tratamento com OEPH e controle ( $F_{1;66} = 66,20$ ;  $P < 0,01$ ), mas não houve interação significativa entre estes dois fatores ( $F_{10;66} = 1,94$ ;  $P = 0,10$ ) (Figura 7). De modo geral as populações apresentaram menor ( $r_i$ ) quando expostas ao OEPH, com exceção das populações Viçosa, MG; Picos, PI e Tunápolis, SC, que não diferiram do controle.

Figura – 7 Taxa instantânea de crescimento populacional ( $r_i$ ) das populações de *S. zeamais* não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).



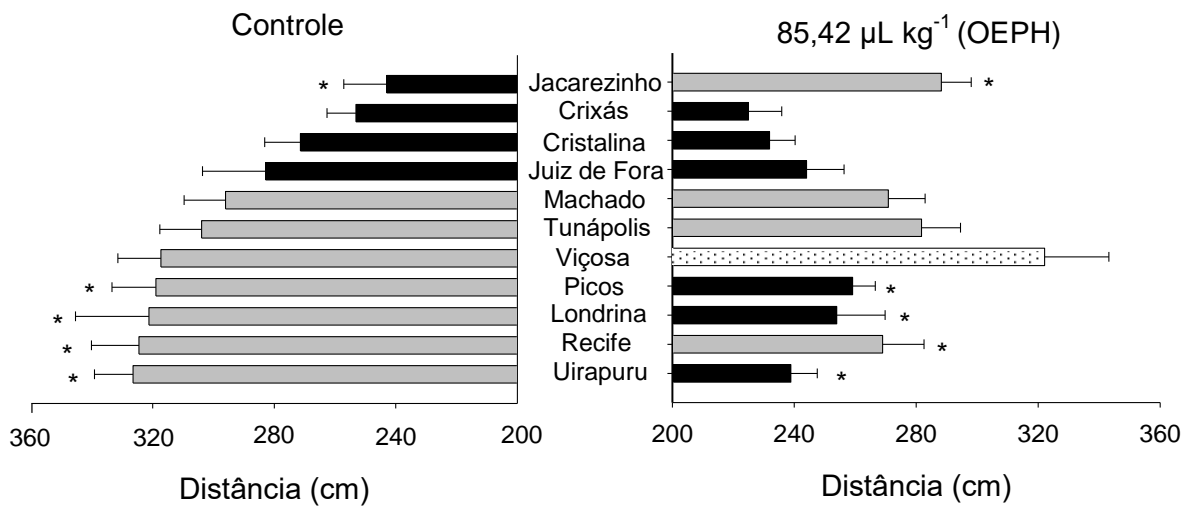
Médias com barras de mesma cor, não diferem entre as populações pelo teste de Scott-Knott ( $P > 0,05$ ) e os asteriscos indicam diferença significativa entre a população exposta e não exposta ao óleo essencial pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

### 3.3.5 Efeitos subletais do OEPH sobre o comportamento locomotor

A distância percorrida variou significativamente entre as populações de *S. zeamais* ( $F_{10;418} = 5,14$ ;  $P < 0,01$ ) e entre o tratamento com OEPH e controle ( $F_{1;418} = 31,80$ ;  $P < 0,01$ ). Foi observada interação significativa entre estes dois fatores ( $F_{10;418} = 3,31$ ;  $P < 0,01$ ) (Figura 8). Foram observadas variações de resposta nas populações quando totalmente expostas ou não ao OEPH. As populações de Uirapuru, GO; Londrina, PR; Picos, PI e Viçosa, MG, percorreram menores distâncias quando expostas ao OEPH, entretanto, a população de Jacarezinho, PR, apresentou maior distância percorrida na presença do OEPH, quando comparada ao controle.

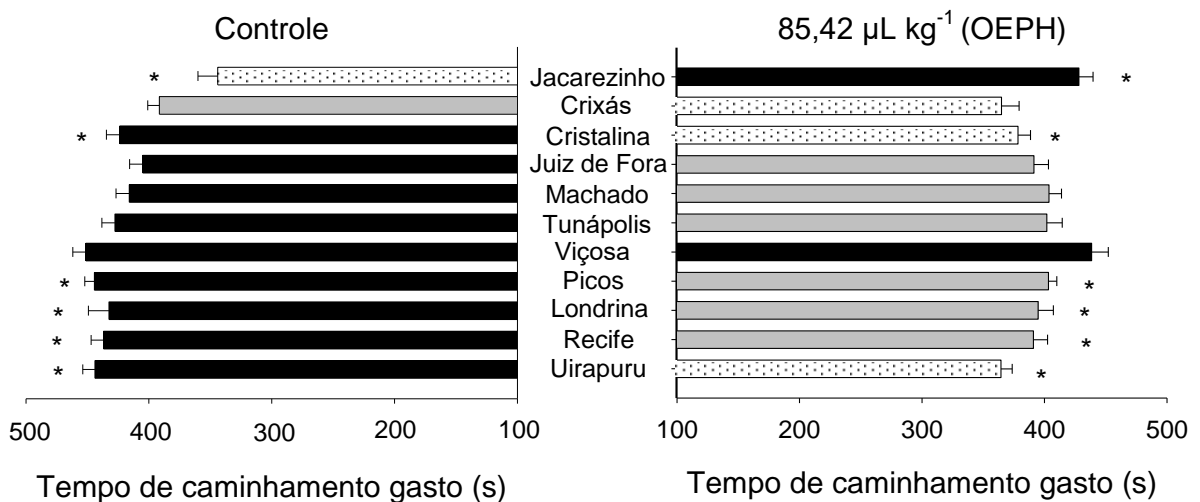
O tempo de caminhada variou significativamente entre as populações de *S. zeamais* ( $F_{10;418} = 4,93$ ;  $P < 0,01$ ) e entre o tratamento com OEPH e controle ( $F_{1;418} = 22,33$ ;  $P < 0,01$ ). Foi observada interação significativa entre estes dois fatores ( $F_{10;418} = 6,23$ ;  $P < 0,01$ ) (Figura 9). O tempo de caminhada foi menor nas populações Uirapuru, GO; Recife, PE; Londrina, PR; Picos, PI e Cristalina, GO, quando expostas ao OEPH. A população de Jacarezinho, PR, obteve maior tempo de caminhada quando exposta ao OEPH, em comparação ao controle.

Figura 8 – Distância percorrida das populações de *S. zeamais* não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).



Médias com barras de mesma cor, não diferem entre as populações pelo teste de Scott-Knott ( $P > 0,05$ ) e os asteriscos indicam diferença significativa entre a população exposta e não exposta ao óleo essencial pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

Figura 9 – Tempo de caminhada das populações de *S. zeamais* não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).

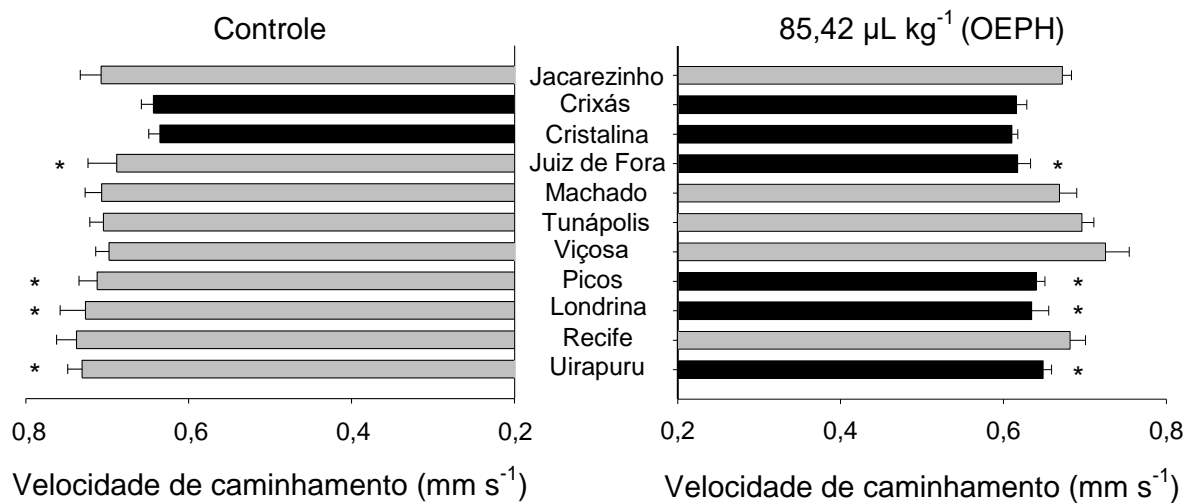


Médias com barras de mesma cor, não diferem entre as populações pelo teste de Scott-Knott ( $P > 0,05$ ) e os asteriscos indicam diferença significativa entre a população exposta e não exposta ao óleo essencial pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

A velocidade de caminhada variou significativamente entre as populações de *S. zeamais* ( $F_{10;418} = 4,52$ ;  $P < 0,01$ ), entre o tratamento com OEPH e controle ( $F_{1;418} = 26,10$ ;  $P < 0,01$ ), mas não houve interação significativa entre estes dois fatores ( $F_{10;418} = 1,57$ ;  $P = 0,11$ ) (Figura 10). Formas observadas variações significativas para as

populações totalmente expostas ou não ao OEPH. No controle, as populações de Cristalina, GO e Crixás, GO, caminharam mais lentamente, porém não diferiram do tratamento com o OEPH. As populações de Juiz de Fora, MG; Londrina, PR; Picos, PI e Uirapuru, GO, apresentaram menor velocidade de caminhada quando expostas ao OEPH, diferindo do controle.

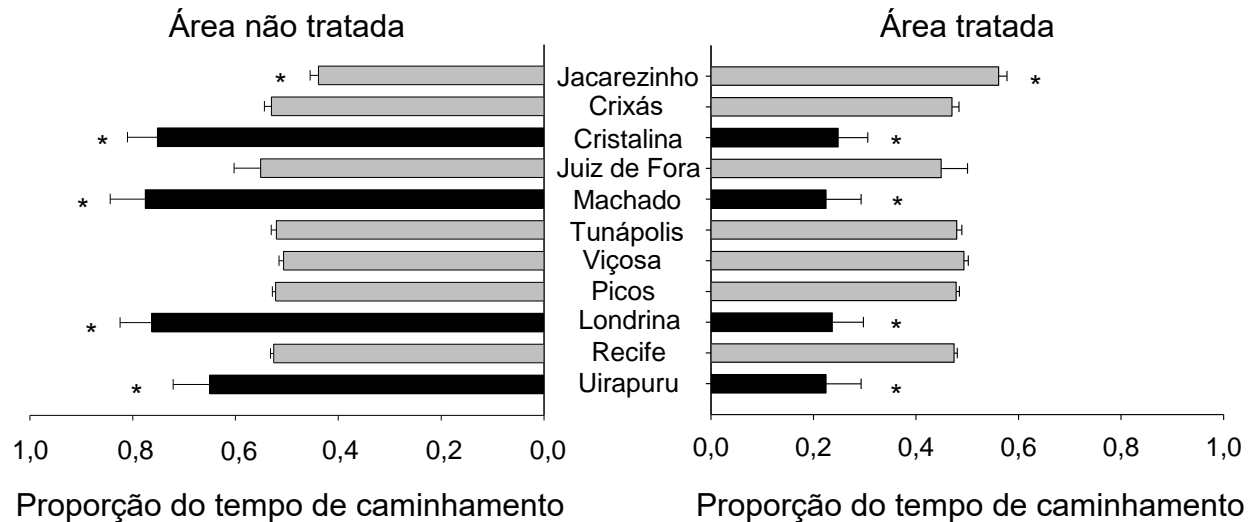
Figura 10 – Velocidade de caminhada das populações de *S. zeamais* não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).



Médias com barras de mesma cor, não diferem entre as populações pelo teste de Scott-Knott ( $P > 0,05$ ) e os asteriscos indicam diferença significativa entre a população exposta e não exposta ao óleo essencial pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

A proporção de tempo de caminhada não variou significativamente entre as populações de *S. zeamais* ( $F_{10;418} = 0,00$ ;  $P = 1,00$ ), mas foi observada variação entre o tratamento com OEPH e controle ( $F_{1;418} = 106,20$ ;  $P < 0,01$ ) e entre estes dois fatores população x exposição ao OEPH ( $F_{10;418} = 15,56$ ;  $P < 0,01$ ) (Figura 11). Foram observadas diferenças significativas entre as populações parcialmente expostas ao OEPH (teste com chance de escolha). As populações de Uirapuru, GO; Machado, MG; Londrina, PR e Cristalina, GO, caminharam por menor tempo proporcionalmente quando expostas ao OEPH, demonstrando assim, uma estratégia comportamental diferente quando comparadas as demais populações que não diferiram da área não tratada. Por outro lado, a população de Jacarezinho, PR, caminhou por maior tempo na área parcialmente tratada, quando comparada ao controle.

Figura 11 – Proporção do tempo de caminhada das populações de *S. zeamais* não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).



Médias com barras de mesma cor, não diferem entre as populações pelo teste de Scott-Knott ( $P > 0,05$ ) e os asteriscos indicam diferença significativa entre a população exposta e não exposta ao óleo essencial pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

### 3.3.6 Efeitos subletais do OEPH sobre a decolagem e a altura de voo

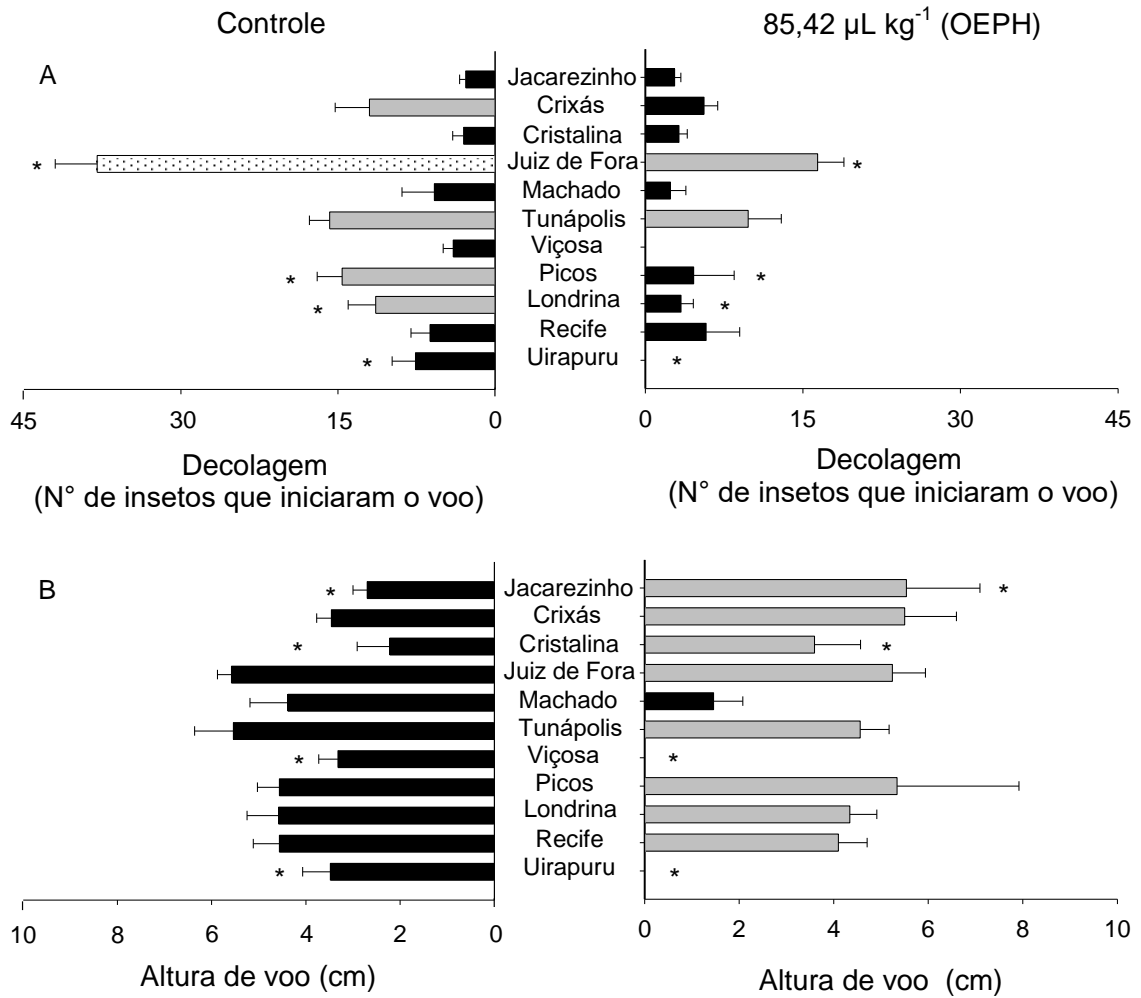
A decolagem variou entre as populações de *S. zeamais* ( $F_{10;88} = 15,94$ ;  $P < 0,01$ ) e entre o tratamento com OEPH e controle ( $F_{10;88} = 31,51$ ;  $P < 0,01$ ). Foi observada interação significativa entre estes dois fatores ( $F_{10;88} = 2,94$ ;  $P < 0,01$ ) (Figura 12A). A altura de voo variou entre as populações de *S. zeamais* ( $F_{10;88} = 4,52$ ;  $P < 0,01$ ) e entre o tratamento com OEPH e controle ( $F_{10;88} = 1,33$ ;  $P < 0,01$ ). Foi observada interação significativa entre estes dois fatores ( $F_{10;88} = 3,01$ ;  $P < 0,01$ ); (Figura 12B).

Foram observadas diferenças significativas para a atividade de levantamento de voo nas populações de *S. zeamais* quando expostas ao OEPH. Em relação a decolagem (nº de insetos que iniciaram o voo) (Figura 12A), as populações de Uirapuru, GO; Londrina, PR; Picos, PI e Juiz de Fora, MG, apresentaram menor atividade de decolagem, quando comparadas ao controle. As demais populações não diferiram para decolagem, quando expostas ou não ao OEPH. Para a altura de voo (Figura 12B), diferentes estratégias de evasão foram observadas. As populações de Uirapuru, GO; Viçosa, MG e Machado, MG, obtiveram as menores médias, embora a população de Machado, MG, não tenha diferido do controle. Por outro lado, as



populações de Jacarezinho, PR e Cristalina, GO, apresentaram maiores alturas de voo, diferindo significativamente do controle.

Figura 12 – Decolagem (nº de insetos que iniciaram o voo) (A) e altura de voo (B) das populações de *S. zeamais* não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).



Médias com barras de mesma cor, não diferem entre as populações pelo teste de Scott-Knott ( $P > 0,05$ ) e os asteriscos indicam diferença significativa entre a população exposta e não exposta ao óleo essencial pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

### 3.4 DISCUSSÃO

Todas as onze populações de *S. zeamais* avaliadas foram susceptíveis ao OEPH, e suas respostas foram relativamente homogêneas, com razões de toxicidade baixas, para as  $CL_{50}$  e  $CL_{95}$  ( $RT \leq 1,91$  vezes). Estes resultados indicam uniformidade de resposta ao bioinseticida e descara qualquer indício de resistência cruzada com pesticidas comerciais, que por sua vez é um fenômeno já relatado em populações brasileiras de *S. zeamais* (RAGOSO et al., 2005; PIMENTEL et al., 2009; CORRÊA et al., 2011a; CORRÊA et al., 2011b; GUEDES et al., 2015; HADDI et al., 2018). A ausência de resistência ao OEPH, também foi relatada em cinco populações de *S. zeamais* ( $CL_{50} < 7,36 \mu\text{L L}^{-1}$  e  $RT \leq 1,6$  vezes) (ARAÚJO et al., 2017). As inclinações das curvas concentração-mortalidade variaram entre as populações (3,60 – 6,85), evidenciando algum indício de heterogeneidade toxicológica entre as populações investigadas. O OEPH não é comumente usado como inseticida de contato para o controle de pragas de grãos, portanto, na ausência de pressão de seleção e resistência cruzada com outros inseticidas, a resposta de toxicidade ao OEPH nas populações avaliadas tende de ser favorável para o seu controle. A toxicidade por contato e fumigação do OEPH para insetos pragas de grãos armazenados (*S. zeamais* e *T. molitor*), já foi relatada na literatura (ESTRELA et al., 2006; FAZOLIN et al., 2007).

Os resultados da respirometria indicaram diminuição da taxa respiratória das populações que estavam subletalmente expostas ao OEPH. A redução da taxa respiratória é uma estratégia fisiológica usada por insetos resistentes à fosfina (PRICE, 1984; PIMENTEL et al., 2007; CORRÊA et al., 2014) e intoxicados com piretróides (UNKIEWICZ-WINIARCZYK; GROMYSZ-KALKOWSKA, 2012; HADDI et al., 2015). Resultados semelhantes foram relatados para populações brasileiras de *S. zeamais* que são resistentes aos inseticidas piretróides e fosfina ( $\text{PH}_3$ ) (CORREA et al., 2015; HADDI et al., 2015; SOUSA, et al. 2016; ARAÚJO et al., 2017). A taxa respiratória pode ser medida por produção de  $\text{CO}_2$  ou consumo de  $\text{O}_2$ . Pequenas mudanças nas respostas respiratórias podem comprometer a eficácia das estratégias de controle, especialmente para populações de insetos que já são resistentes aos inseticidas tradicionais (PIMENTEL et al., 2007; CORRÊA et al., 2014; CORREA et al., 2015). A diminuição da captação de oxigênio por animais envenenados com inseticidas está relacionada à regulação dos processos de fosforilação oxidativa e

desregulação dos processos respiratórios (VIDAU et al., 2009; NICODEMO et al., 2014).

Em relação a massa corporal dos insetos, foram verificadas diferenças significativas entre as 11 populações, com variação de 16%. A alta massa corporal e a taxa de respiração são indicadores de altas reservas de energia e rápida mobilização de energia para sustentar compensações fisiológicas potencialmente conflitantes, como defesas bioquímicas e reprodução (GUEDES et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007; SOUSA et al., 2008). A redução da taxa instantânea de crescimento populacional ( $r_i$ ) das populações expostas a concentrações subletais do OEPH, com exceção de Tunápolis, SC; Viçosa, MG e Picos, PI, reforça a hipótese de que a menor alocação de energia para o desenvolvimento de mecanismos de defesa contra inseticidas pode prejudicar o desempenho reprodutivo desses indivíduos (LONGSTAFF, 1991; FRAGOSO et al., 2005; SOUSA et al., 2008). A massa corporal foi identificada como uma característica de influência sobre o ( $r_i$ ) em populações de *S. zeamais* e, conseqüentemente, com forte relação com a mitigação dos custos adaptativos em algumas populações resistentes a inseticidas (GUEDES et al., 2006; ARAÚJO et al., 2008; BRAGA et al., 2011; CORREA et al., 2015; HADDI et al., 2015; SOUSA et al., 2016).

Os padrões comportamentais (caminhamento e levantamento de voo) das populações de *S. zeamais* foram influenciados pela exposição subletal ao OEPH. Araújo et al. (2017) investigando os efeitos subletais do óleo essencial de *P. hispidinervum* sobre o comportamento (caminhamento e voo) de cinco populações de *S. zeamais*, verificaram diferentes padrões comportamentais. Alterações no padrão comportamental podem ocorrer devido à ação de alguns compostos tóxicos de óleos essenciais ou inseticidas no sistema nervoso, estimulando ou reduzindo a mobilidade dos insetos e, conseqüentemente, alterando as habilidades adicionais para se adaptarem a ambientes tratados com compostos tóxicos (GUEDES et al., 2011; GUEDES et al., 2016; SOUSA et al., 2017; PLATA-RUEDA et al., 2018). As respostas comportamentais a exposição subletal do OEPH foram dependentes das populações, isto revela diferentes estratégias, para reduzir os efeitos da exposição ao óleo.

As populações de Uirapuru, GO e Londrina, PR, tiveram seus padrões de caminhamento (distância percorrida, tempo, velocidade de caminhamento e proporção de tempo de caminhamento), reduzidos na presença do OEPH, embora, a população de Jacarezinho, PR, tenha apresentado maior atividade de voo (altura de

voo) e caminharmento (distância percorrida, tempo de caminharmento e proporção do tempo de caminharmento). Essas características minimizam potencialmente a exposição a inseticidas, principalmente, quando presentes na mesma população de insetos, levando ao surgimento de resistência comportamental (GUEDES et al., 2009; VELASQUEZ et al., 2017). Essa resistência comportamental ou escape comportamental pode ser dependente ou independente de estímulos (GOULD, 1984; LOCKWOOD et al., 1984).

Irritabilidade e repelência são consideradas dois tipos de resistência comportamental dependente do estímulo do inseticida (isto é, requerem estímulo sensorial), para detectar uma substância tóxica e provocar uma resposta de fuga após a detecção, com ou sem contato ao inseticida (GUEDES et al., 2009). No bioensaio comportamental em arenas parcialmente tratadas com OEPH, as populações de Uirapuru, GO; Machado, MG; Londrina, PR e Cristalina, GO, permaneceram por maior tempo na área não tratada com o óleo, evidenciando assim o efeito repelente do OEPH sobre estas populações. Plata-Rueda et al. 2018 investigando os efeitos dos constituintes terpenóides dos óleos essenciais de canela e cravo-da-índia, identificaram propriedades de repelência sobre adultos de *Sitophilus granarius* (L.). A detecção da presença do inseticida no ambiente, pode estar associada à capacidade de aprendizado dos insetos ou à variação genética nos receptores periféricos e nos sistemas de processamento central (GOULD, 1991; LOCKWOOD et al., 1984).

O OEPH é um bioinseticida alternativo promissor, com baixo risco de desenvolvimento de resistência a curto prazo devido à alta suscetibilidade e baixa variabilidade da resposta a este produto. As diferentes respostas comportamentais e fisiológicas das populações expostas subletalmente ao OEPH, evidenciam estratégias para reduzir os efeitos da exposição ao óleo essencial. Portanto, antes de simplesmente substituir os inseticidas comerciais por óleos essenciais, os programas de manejo da resistência de pragas precisam considerar as respostas comportamentais e fisiológicas das populações, além de outras características da história de vida para alcançar níveis de controle satisfatórios.

### 3.5 CONCLUSÕES

As populações brasileiras de *S. zeamais* avaliadas são susceptíveis ao óleo essencial de *Piper hispidinervum*, não exibindo resistência ao produto.

A exposição subletal ao óleo essencial de *P. hispidinervum* influencia as respostas comportamentais e fisiológicas das populações, evidenciando diferentes estratégias de respostas ao seu efeito.

## REFERÊNCIAS

- ANDRÉS, M. F.; ROSSA, G. E.; CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; SANTANA, O.; DÍAZ, C. E.; GONZÁLEZ-COLOMA, A. Biocidal effects of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil and synergism among its main components. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 1086-1092, 2017.
- ARAÚJO, A. M. N.; FARONI, L. R. D.; OLIVEIRA, J. V.; NAVARRO, D. M. A. F.; BARBOSA, D. R. S.; BREDA, M. O.; FRANÇA, S. M. Lethal and sublethal responses of *Sitophilus zeamais* populations to essential oils. **Journal Pest Science**, v.90, p.589-600, 2017.
- ARAÚJO, R. A.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, M. G.A.; FERREIRA, G. H. Enhanced activity of carbohydrate- and lipid- metabolizing enzymes in insecticide-resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 98, p. 417-424, 2008.
- BRAGA, L. S.; CORRÊA, A. S.; PEREIRA, E. J. G.; GUEDES, R. N.C. Face or flee? Fenitrothion resistance and behavioral response in populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 47, p. 161-167, 2011.
- CARVALHO, M. O.; PIRES, I.; BARBOSA, A.; BARROS, G.; RIUDAVETS, J.; GARCIA, A. C.; BRITES, C.; NAVARRO, S. The use of modified atmospheres to control *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus oryzae* on stored rice in Portugal. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 50, p. 49-56, 2012.
- COITINHO, R. L. B. C.; OLIVEIRA, J. V.; GONDIM, M. G. C. J.; CÂMARA, C. A. G. Toxicidade por fumigação, contato e ingestão de óleos essenciais para *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1885 (Coleoptera: Curculionidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p.172- 178, 2011.
- CORREA, Y. D. C. G.; FARONI, L. R. A.; HADDI, K.; OLIVEIRA, E. E.; PEREIRA, E. J. G. Locomotory and physiological responses induced by clove and cinnamon essential oils in the maize weevil *Sitophilus zeamais*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 125, p. 31-37, 2015.
- CORRÊA, A. S.; PEREIRA, E. J. G.; CORDEIRO, E. M. G.; BRAGA, L. S.; GUEDES, R. N. C. Insecticide resistance, mixture potentiation and fitness in populations of the maize weevil (*Sitophilus zeamais*). **Crop Protection**, v. 30, p.1655-1666, 2011a.
- CORRÊA, A. S., TOLLEDO, J., PEREIRA, E. J. G., GUEDES, R. N. C. Bidirectional selection for body mass and correlated response of pyrethroid resistance and fitness in *Sitophilus zeamais*. **Journal of Applied Entomology**, v.135, 285-292, 2011b.
- CORRÊA, A. S.; TOMÉ, H. V. V.; BRAGA, L. S.; MARTINS, G. F.; OLIVEIRA, L. O.; GUEDES, R. N. C. Are mitochondrial lineages, mitochondrial lysis and respiration rate associated with phosphine susceptibility in the maize weevil *Sitophilus zeamais*? **Annals of Applied Biology**, v. 165, p. 137-146, 2014.

COSTA, J. T.; FORIM, M. R.; COSTA, E. S.; SOUZA, J. R.; MONDEGO, J. M.; BOIÇA JUNIOR, A. L. Effects of different formulations of neem oil-based products on control *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (Coleoptera: Bruchidae) on beans. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 49-53, 2014.

CRUZ, G. S.; WANDERLEY-TEXEIRA, V.; OLIVEIRA, J. V.; CORREIA, A. A.; BREDÁ, M. O.; ALVES, T. J. S.; CUNHA, F. M.; TEXEIRA, A. C. C.; DUTRA, K. A.; NAVARRO, D. M. A. F. 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**, v. 107, p. 144-153, 2014.

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

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; FAZOLIN, M.; CATANI, V.; ALÉCIO, M.R.; LIMA, M.S. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C.DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & k.shum sobre *Tenebrio molitor* L. 1758. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 113-120, 2007.

FERRAZ, A. B. F.; BALBINO, J. M.; ZINI, C. A.; RIBEIRO, V. L.; BORDIGNON, S. A.; VON POSER, G. Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three *Piper* species. **Parasitology Research**, v. 107, p. 243-248, 2010.

FRAGOSO, D. B.; GUEDES, R. N. C.; PETERNELLI, L. A. Developmental rates and population growth of insecticide-resistant and susceptible populations of *Sitophilus zeamais*. **Journal of Stored Products Research**, v. 41, p. 271–281, 2005.

FREITAS, R. S.; FARONI, L. R. A.; SOUSA, A. H. Hermetic storage for control of common bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* (Say). **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 1-5, 2016.

FREITAS, R. C. P.; FARONI, L. R. D.; HADDI, K.; JUMBO, L. O. V.; OLIVEIRA, E.E. Allyl isothiocyanate actions on populations of *Sitophilus zeamais* resistant to phosphine: Toxicity, emergence inhibition and repellency. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 69, p. 257-264, 2016b.

GOULD, F. Role of behavior in the evolution of insect adaptation to insecticides and resistant host plants. **Bulletin of the Entomological Society of America**, v. 30, p. 34-51, 1984.

GOULD, F. Arthropod behavior and the efficacy plant protectants. **Annual Review of Entomology**, v. 36, p. 305-330, 1991.

GUEDES, N. M. P.; BRAGA, L. S.; ROSI-DENADAI, C. A.; GUEDES, R. N. C. Desiccation resistance and water balance in populations of the maize weevil *Sitophilus zeamais*. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 64, p. 146-153, 2015.

GUEDES, N. M. P.; GUEDES, R. N. C.; FERREIRA, G. H.; SILVA, L. B. Flight take-off and walking behavior of insecticide-susceptible and - resistant strains of *Sitophilus zeamais* exposed to deltamethrin. **Bulletin of Entomological Research**, v. 99, p. 393-400, 2009.

GUEDES, R. N. C.; GUEDES, N. M. P.; ROSI-DENADAI, C.A. Sub-lethal effects of insecticides on stored-product insects: current knowledge and future needs. **Stewart Postharvest Review**, v. 3, p. 1-5, 2011.

GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E. E.; GUEDES, N. M. P.; RIBEIRO, B.; SERRÃO, J. E. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Physiological Entomology**, v. 31, p. 30-38, 2006.

GUEDES, R. N. C.; SMAGGHE, G.; STARK, J. D.; DESNEUX, N. Pesticide induced stress in arthropod pest for optimized integrated pest management programs. **Annual Review of Entomology**, v. 61, p. 43-62, 2016.

HAYES, J. P. Mass-specific and whole-animal metabolism are not the same concept. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 74, p. 147-150, 2001.

HADDI, K.; MENDONÇA, L. P.; SANTOS, M. F. dos; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E. E. Metabolic and Behavioral Mechanisms of Indoxacarb Resistance in *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 1, p. 362-369, Feb. 2015.

HADDI, K.; VALBON, W. R.; VITERI JUMBO, L. O.; OLIVEIRA, L.O.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E. E. Diversity and convergence of mechanisms involved in pyrethroid resistance in the stored grain weevils, *Sitophilus* spp. **Scientific Reports**, v. 8, pp. 16361, 2018.

KANDA, D.; KAUR, S.; KOUL, O.A comparative study of monoterpenoids and phenylpropanoids from essential oils against stored grain insects: acute toxins or feeding deterrents. **Journal of Pest Science**, v. 90, n. 2, p. 531-545, Mar. 2017.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C.; MELO, B. A.; RODRIGUES, V. G.; GUIMARÃES, P. L. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Amazonica**, v. 39, p. 377-382, 2009.

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

LONGSTAFF, B. C. An experimental study of the fitness of susceptible and resistant strains of *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) exposed to insecticide. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 27, p. 75-82, 1991.

LOPES, L. M.; ARAÚJO, A. E. F.; SANTOS, W. B.; SOUSA, A. H. Population development of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) in landrace bean varieties occurring in southwestern Amazonia. **Journal of Economic Entomology**, v.109, p. 467–471, 2016.



- NICODEMO, D.; MAIOLI, M. A.; MEDEIROS, H. C. D.; GUELF, M.; BALIEIRA, K. V. B.; DE JONG, D.; MINGATTO, F. E. Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, p. 2070-2075, 2014.
- OLIVEIRA, E. E.; GUEDES, R. N. C.; TOTOLA, M. R.; MARCO JR, P. Competition between insecticide-susceptible and resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Chemosphere**, v. 69, p. 17-24, 2007.
- PEKÁR, S.; HADDAD, C. R. Can agrobiont spiders (Araneae) avoid a surface with pesticide residues? **Pest Management Science**, v. 61, p. 1179-1185, 2005.
- PEREZ-MENDOZA, J.; DOVER, B. A.; HAGSTRUM, D. W.; HOPKINS, T. L. Effect of crowding, food deprivation, and diet on flight initiation and lipid reserves of the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 91, p. 317-326, 1999.
- PIMENTEL, M. A. G.; FARONI, L. R. A.; BATISTA, M. D.; SILVA, F. H. Resistance of stored-product insects to phosphine. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, p. 1671-1676, 2008.
- PIMENTEL, M. A. G.; FARONI, L. R. A.; CORREA, A. S.; GUEDES, R. N. C. Phosphine-induced walking response of the lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica*). **Pest Management Science**, v. 68, p. 1368–1373, 2012.
- PIMENTEL, M. A. G.; FARONI, L. R. D'A.; GUEDES, R. N. C.; SOUSA, A. H.; TÓTOLA, M. R. Phosphine resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 45, p. 71-74, 2009.
- PIMENTEL, M. A. G.; FARONI, L. R. A.; SILVA, F. H.; BATISTA, M. D.; GUEDES, R. N. C. Spread of phosphine resistance among Brazilian populations of three species of stored product insects. **Neotropical Entomology**, v. 39, p. 101-107, 2010.
- PIMENTEL, M. A. G.; FARONI, L. D.; TÓTOLA, M. R.; GUEDES, R. N. C. Phosphine resistance, respiration rate and fitness consequences in stored-product insects. **Pest Management Science**, London, v. 63, n. 9, p. 876-881, Sept. 2007.
- PLATA-RUEDA, A.; CAMPOS, J. M.; ROLIM, G. S.; MARTÍNEZ, L. C.; SANTOS, M. H.; FERNANDES, F. L.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C. Terpenoid constituents of cinnamon and clove essential oils cause toxic effects and behavior repellency response on granary weevil, *Sitophilus granarius*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, p. 263-270, 2018.
- PRICE, N. R. Active exclusion of phosphine as a mechanism of resistance in *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 20, p. 163-168, 1984.
- ROBERTSON, J. L.; RUSELL, R. M.; PREISLER, H. K.; SAVIN, N. E. **Bioassays with arthropods**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.

ROCHA, S. F. R.; LIN, C. M. *Piper hispidinervum*: a sustainable source of safrole. In: JANICK, J. (Ed.). **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 1999. p. 479-481.

SAS, 2011. **SAS/STAT(R) 9.3 User´s Guide**. SAS Institute, Cary, NC, USA.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v, 30, p. 507-512. 1974.

SILVA, M. F. R.; BEZERRA-SILVA, P. C. B.; LIRA, C. S.; ALBUQUERQUE, B. N. L.; AGRA NETO, A. C.; PONTUAL, E. V.; MACIEL, J. R.; PAIVA, P. M. G.; NAVARRO, D. M. A. F. Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae). **Experimental Parasitology**, v. 165, p. 64-70, 2016.

SOARES, M. A.; QUINTELA, E. D.; MASCARIN.; G. M.; ARTHURS, S. P. Effect of temperature on the development and feeding behavior of *Acanthoscelides obtectus* (Chrysomelidae: Bruchinae) on dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 61, p. 90-96, 2015.

SOUSA, A. H.; FARONI, L. R. A.; GUEDES, R. N. C. Locomotor behavior of *Sitophilus zeamais* populations under sublethal ozone exposure. **Journal of Pest Science**, v. 90, p. 239-247, 2017.

SOUSA, A. H.; FARONI, L. R. A.; GUEDES, R. N. C.; TÓTOLA, M. R.; URRICH, W. I. Ozone as a management alternative against phosphine-resistant insect-pests of stored products. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 44, p. 379-385, 2008.

SOUSA, A. H.; FARONI, L. R. D'A.; PIMENTAL, M. A. G.; SILVA, G. N.; GUEDES, R. N. C. Ozone toxicity to *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) populations under selection pressure from ozone. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 65, p. 1-5, 2016.

SOUTO, R. N. P.; HARADA, A. Y.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Insecticidal activity of *Piper* essential oils from the Amazon against the fire ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, v. 41, p. 510-517, 2012.

SOUZA, L. P. de; FARONI, L. R. D'A.; LOPES, L. M.; SOUSA, A. H.; PRATES, L. H. F. Toxicity and sublethal effects of allyl isothiocyanate to *Sitophilus zeamais* on population development and walking behavior. **Journal of Pest Science**, v. 91, n. 2, p. 761-770, Mar. 2018.

UNKIEWICZ-WINIARCZYK, A.; GROMYSZ-KAŁKOWSKA, K. Effect of temperature on toxicity of deltamethrin and oxygen consumption by *Porcellio scaber* Latr (Isopoda). **The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, p. 960-965, 2012.

VELASQUEZ, L. P. G.; FARONI, L. R. A.; PIMENTEL, M. A. G.; HELENO, F. F.; PRATES, L. H. F. Behavioral and physiological responses induced by ozone in five Brazilian populations of *Rhyzopertha dominica*. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 72, p. 111-116, 2017.

VIDAU, C.; BRUNET, J. L.; BADIOU, A.; BELZUNCES, L. P. Phenylpyrazole insecticides induce cytotoxicity by altering mechanisms involved in cellular energy supply in the human epithelial cell model Caco-2. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 589-597, 2009.

WALTHAL, W. K.; STARK, J. D. Comparison of two population-level ecotoxicological endpoints: the intrinsic ( $r_m$ ) and instantaneous ( $r_i$ ) rates of increase. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, p. 1068-1073, 1997.

WHITE, N. D. G.; LEESCH, J. G. Chemical control. In: SUBRAMANYAM, B.; HAGSTRUM, D. W. (Ed.). **Integrated management of insects in stored products**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 287-330.

## 4 CAPÍTULO II

**TAXAS DE DESENVOLVIMENTO E CRESCIMENTO POPULACIONAL DE  
POPULAÇÕES DE *Sitophilus zeamais* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)  
EXPOSTAS A CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DO  
ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper hispidinervum***

## RESUMO

Os óleos essenciais têm sido amplamente utilizados como alternativas promissoras para o controle de insetos pragas. No entanto, estudos que investiguem os seus efeitos subletais sobre padrões reprodutivos dos insetos, raramente são foco de investigações. Compreender estes efeitos é fundamental para maximizar a eficácia dos programas de manejo integrado. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito subletal do óleo essencial de *Piper hispidivervum* C. DC. (OEPH) sobre as taxas de desenvolvimento e crescimento populacional de quatro populações de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) e a persistência do resíduo de safrol em grãos de milho tratados com óleo de *P. hispidivervum*. As taxas de desenvolvimento populacional foram determinadas através de curvas de emergência acumulada, diária e total de insetos emergidos. As taxas de crescimento populacional foram determinadas através da contabilização do número de insetos vivos obtidos no substrato de alimentação em diferentes períodos de armazenamento. A persistência do resíduo do safrol foi determinada pelo método de microextração em fase sólida no modo headspace (MEFS-HS). Todas as populações de *S. zeamais* tiveram suas taxas de desenvolvimento, crescimento e total de insetos influenciados negativamente pela exposição subletal ao OEPH, com exceção da população de Crixás, GO, que apresentou sobreposição da curva de crescimento populacional em relação ao controle. O resíduo do safrol teve redução de 98,20%, demonstrando assim sua baixa persistência. Os resultados indicam que o OEPH pode ser considerado potencial inseticida para o controle de *S. zeamais* e utilizado como estratégia para reduzir o desenvolvimento de resistência a inseticidas em programas de manejo integrado.

**Palavras-chave:** Gorgulho-do-milho. Safrol. Reprodução. Controle alternativo.

## ABSTRACT

Essential oils have been widely used as promising alternatives for the control of insect pests. However, studies investigating its sublethal effects on reproductive patterns of insects are rarely the focus of investigations. Understanding these effects is essential to maximize the effectiveness of integrated management programs. The aim of this study was to evaluate the sublethal effect of the essential oil of *Piper hispidivervum* C. DC. (EOPH) on the development rates and population growth of four populations of *Sitophilus zeamais*, Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) and the persistence of safrole residue in corn grains treated with oil of *P. hispidivervum*. The population development rates were determined by using accumulated, daily and total emerged insect curves. The population growth rates were determined by counting the number of insects alive obtained from the feeding substrate in different storage periods. The persistence of safrole residue was determined by the solid phase microextraction method in headspace mode (SPMM-HS). All the *S. zeamais* populations had their development rates, growth and total insects negatively influenced by sublethal exposure to EOPH, with the exception of the population of Crixás, GO, which presented an overlap of the population growth curve in relation to the control. Safrole residue decreased by 98.20%, demonstrating therefore its low persistence. The results indicate that EOPH can be considered a potential insecticide for the control of *S. zeamais* and used as a strategy to reduce the development of resistance to insecticides in integrated management programs.

**Keywords:** Maize weevil. Safrole. Reproduction. Alternative control.

## 4.1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de insetos-praga durante o armazenamento é uma das principais causas de perda qualitativas e quantitativas de grãos. O gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais* (Motschulsky, 1885) (Coleoptera: Curculionidae), é a principal praga do milho armazenado no mundo (RIBEIRO et al., 2020). O controle desse inseto é realizado através da aplicação de inseticidas piretróides, organofosforados e do fumigante fosfina (PH<sub>3</sub>) (SOUSA et al., 2008; PIMENTEL et al. 2012). Entretanto, devido os altos níveis de resistência a esses inseticidas (FRAGOSO et al., 2005; FREITAS et al., 2016; HADDI et al., 2018), estudos sobre métodos alternativos para o controle de pragas de grãos armazenados têm sido amplamente difundidos, como por exemplo, o uso de inseticidas botânicos.

Inseticidas botânicos são usados para o controle alternativo de várias pragas em muitos países (SOUZA et al., 2018). Eles são normalmente usados na forma de pós, extratos ou óleos, fáceis de obter e geralmente inofensivos para o aplicador e os consumidores (RAJENDRAN; SRIRANJINI, 2008). Os óleos essenciais são oriundos do metabolismo secundário das plantas aromáticas, caracterizados por um complexo de compostos e seus constituintes são uma alternativa promissora para a proteção de produtos armazenados (NENAAH et al., 2015).

*Piper hispidinervum* C. DC., 1917, também conhecida como pimenta-longa, é uma planta aromática endêmica da Amazônia que possui um grande potencial na produção de óleo essencial (ROCHA; LIN, 1999; ANDRÉAS et al., 2017). O óleo essencial de *P. hispidinervum* é rico em safrol, um fenilpropanóide utilizado na indústria química para síntese de heliotropina (fixador de fragrâncias) (RAMOS et al., 2014) e butóxido de piperolina - PBO (sinergista de inseticidas) (SOHILAIT; KAINAMA, 2016). Além disso, os efeitos inseticidas do óleo essencial de *P. hispidinervum* (OEPH) sobre insetos-praga de grãos armazenados são relatados por diversos autores, tais como toxicidade (fumigante e por contato) (ESTRELA et al., 2006; FAZOLIN et al., 2007; ARAÚJO et al., 2017), repelência (OLIVEIRA et al.; 2017), redução das taxas de desenvolvimento (PEREIRA et al., 2008) e o efeito residual (PEREIRA et al., 2009; COITINHO et al. 2010).

A maioria das investigações sobre o efeito inseticida de óleos essenciais em pragas de grãos se concentra na toxicidade e repelência (SILVA et al., 2017). Entretanto, os efeitos subletais sobre os padrões reprodutivos, como taxas de

desenvolvimento e crescimento populacional são frequentemente negligenciados. As pragas de produtos armazenados, quando expostas subletalmente a inseticidas sintéticos ou botânicos, podem exibir não apenas efeitos prejudiciais, mas sob certas circunstâncias, também apresentam respostas positivas em sua fisiologia e comportamento (DESNEUX et al., 2007; CORREA et al., 2015; CUTLER; GUEDES, 2017; VITERI JUMBO et al., 2018). Estas respostas recebem o nome de hormese, e embora os mecanismos que explicam essas respostas (benéficas ou prejudiciais) ainda não sejam bem compreendidos, foi descrito que indivíduos subletalmente expostos a inseticidas apresentam alterações em características relevantes como tempo de desenvolvimento, longevidade, fertilidade, fecundidade, locomoção, comunicação sexual, oviposição e alimentação (DESNEUX et al., 2007; GUEDES et al., 2010; VILCA MALLQUI et al., 2014; GUEDES; CUTLER, 2014).

Investigar os efeitos subletais de inseticidas botânicos, sobre os padrões reprodutivos é fundamental para evitar falhas no controle de pragas de grãos armazenados que resultam no surgimento de populações resistentes ou surtos de pragas secundárias (CUTLER; GUEDES, 2017). Diante o exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito subletal do óleo essencial de *P. hispidivervum* sobre as taxas de desenvolvimento e crescimento populacional de quatro populações brasileiras de *S. zeamais*. Adicionalmente, a persistência do resíduo de safrol em grãos de milho tratados com óleo de *P. hispidivervum* foi investigada.



## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os bioensaios foram conduzidos no laboratório de Manejo Integrado de Pragas e no laboratório de Produtos Naturais, Microbiologia e Biotecnologia, da Universidade Federal do Acre – campus Rio Branco e nos laboratórios de Ecotoxicologia e Manejo Integrado de Pragas de Grãos Armazenados, da Universidade Federal de Viçosa – campus Viçosa.

### 4.2.1 Populações de *Sitophilus zeamais*

Quatro populações brasileiras de *S. zeamais* coletadas nos municípios de Cristalina, GO; Crixás, GO; Jacarezinho, PR e Juiz de Fora, MG foram utilizadas neste estudo. A população de Cristalina foi considerada a padrão de suscetibilidade, de acordo com os ensaios toxicológicos realizados no capítulo I.

Os insetos foram criados em frascos de vidro de 1,5 L sob temperatura constante ( $27\pm 2$  °C), umidade relativa ( $70\pm 5\%$ ) e escotofase (24 h). Foram utilizados grãos de miho como substrato alimentar, com teor de água de 13% em base úmida (bu), previamente fumigados com fosfina ( $\text{PH}_3$ ) (Gastoxin, Bernado Química, São Vicente, SP, Brasil) e mantidos a  $-18$  °C para evitar reinfestação.

### 4.2.2 Obtenção e extração do óleo essencial

O material vegetal de *P. hispidinervum* foi coletado próximo ao Ramal Iquiri no município de Rio Branco, AC, localizado na latitude  $9^\circ 58' 29''$  (S) e longitude  $67^\circ 48' 36''$  (W) e 153 m de altitude ao nível do mar. A coleta do material vegetal foi realizada no período da manhã durante o mês de junho de 2017. Inicialmente o material vegetal foi coletado com a hipótese de ser *Piper aduncum* L., 1753. Posteriormente, uma análise taxonômica pela Dra. Elsie Franklin Guimarães, do Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (Herbário RB) identificou a espécie como *P. hispidinervum*. Além da classificação botânica, a natureza química do óleo embasa a comprovação da espécie botânica como sendo *P. hispidinervum*. As exsiccatas utilizadas para identificação da espécie botânica encontram-se depositadas no Herbário UFACPZ da Universidade Federal do Acre, sob o número de registro: UFACPZ 20.647.

Foi realizada a triagem do material afim de separar folhas e ramos. As folhas foram secas parcialmente sob condição ambiente, depois foram levadas para estufa a 36 °C para secagem até obter massa constante. A extração do óleo essencial de *P. hispidinervum* (OEPH) foi realizada com a manta aquecedora (0321A28, Quimis, Brasil), balão volumétrico de 5 L e aparelho tipo Clevenger. O OEPH foi separado da emulsão por decantação em um funil de separação e uso de sulfato de sódio anidro P.A (Synth, Brasil). O OEPH obtido foi armazenado em um frasco âmbar a uma temperatura  $4\pm 1$  °C.

#### 4.2.3 Composição do óleo essencial

O OEPH foi analisado em Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrofotômetro de Massas (CG-EM) (QP2020, Shimadzu, Japão). As condições cromatográficas foram: coluna capilar SH-Rtx-5MS de 30 cm de comprimento com 0,25 mm de diâmetro e espessura de 0,25  $\mu\text{m}$ , sendo hélio utilizado como gás de arraste com fluxo de  $1,17 \text{ mL min}^{-1}$ , e temperatura do injetor de 220 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 60 °C com aumento de  $2 \text{ °C min}^{-1}$  até 200 °C, e depois de um aumento de  $5 \text{ °C min}^{-1}$  até 250 °C, sendo mantido nessa temperatura por 1 min. O cromatógrafo foi operado em modo full scan com razão de split de 1:20. O tempo total de análise foi de 81 min. Os espectros de massas obtidos foram comparados com os espectros da biblioteca NIST 14 e pelo cálculo do índice de Kovats relativo a uma série de alcanos saturados (C7-C30) (49451-U, Supelco, Bellefonte, PA, EUA).

#### 4.2.4 Quantificação absoluta do safrol

A quantificação absoluta do safrol presente no OEPH foi determinada no cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama (CG/DIC) (GC2014, Shimadzu, Japão). Foram injetadas cinco concentrações do safrol (Solução de safrol, Supelco, P.A., Alemanha) 0,25; 0,50; 1,00, 1,50, 2,00  $\text{mg mL}^{-1}$  diluído em metanol, em três repetições. Também foi injetado o OEPH na concentração de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  diluído em metanol (Vetec, UV/HPLC 99,9%, Alemanha) em triplicatas.

As condições cromatográficas para quantificação do safrol foram: coluna capilar (DB-5, Shimadzu, Japão) de 30 cm de comprimento com 0,25 mm de diâmetro interno

e espessura de filme de 0,10  $\mu\text{m}$ , nitrogênio (Air Products, U.P. 99,999%, Brasil) como gás de arraste com fluxo de 1,82  $\text{mL min}^{-1}$ , temperatura do injetor de 220  $^{\circ}\text{C}$  e do detector por ionização em chama de 300  $^{\circ}\text{C}$ . Com razão de split de 1:5. A temperatura inicial da coluna foi de 60  $^{\circ}\text{C}$  com taxa de aumento de 5  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até 120 $^{\circ}\text{C}$  e mantida nessa temperatura por 1 min. O tempo total da análise foi de 12 min.

#### 4.2.5 Taxas de desenvolvimento populacional

Os bioensaios foram realizados em frascos de vidro com capacidade de 0,8 L, contendo 200 g de milho, com teor de umidade de 13% (bu), expostos a concentração subletal do OEPH, 85,42  $\mu\text{L kg}^{-1}$  (CL<sub>30</sub> da população Cristalina, GO). O controle foi constituído por acetona. O OEPH e a acetona foram pulverizados na massa de grãos através de um aerógrafo de dupla ação, com sistema de mistura interna e depósito por gravidade (modelo BC 60, Steula, São Paulo, Brazil). A pressão de trabalho utilizada na pulverização foi de 15 Psi e o volume de calda aplicado foi de 400  $\mu\text{L}$  para cada 200 g de milho.

Os grãos foram infestados com 50 insetos adultos não-sexados das quatro populações, com idade variando de uma a três semanas. Posteriormente, os frascos foram armazenados em câmaras climáticas tipo B.O.D., sob condições constantes de temperatura ( $27\pm 2$   $^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa ( $70\pm 5\%$ ) e escotofase de 24 h. Após 13 dias, os insetos foram removidos dos frascos, conforme o método descrito por Trematerra et al. (1996). Quatro repetições foram utilizadas para cada população. A progênie adulta obtida no substrato de alimentação foi contabilizada e removida em dias alternados a partir da primeira emergência.

A emergência acumulada normalizada foi analisada inicialmente nas populações. A soma da emergência de insetos foi acumulada a partir da emergência inicial e resultou na soma da emergência acumulada (SEa, % dia), calculada por  $SEa = \sum SEd$ . Os dados de emergência acumulada foram analisados porque os erros experimentais são mais propensos tomando-se apenas os dados de avaliação da emergência de insetos em dias alternados, devido a influência dos tempos de amostragem (TREMATERRA et al., 1996; SOUSA et al., 2009; LOPES et al., 2016). Adicionalmente, o total de insetos emergidos para as quatro populações expostas ou não ao OEPH foi contabilizado.

#### 4.2.6 Crescimento populacional e perda de massa de grãos

Os bioensaios de crescimento populacional foram conduzidos em frascos de vidro com capacidade de 0,8 L, contendo 200 g de milho, com teor de umidade de 13% (bu), expostos a concentração subletal do OEPH,  $85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$  ( $\text{CL}_{30}$  da população Cristalina, GO). O controle foi constituído por acetona. O OEPH e a acetona foram pulverizados na massa de grãos através de um aerógrafo de dupla ação, com sistema de mistura interna e depósito por gravidade (modelo BC 60, Steula, São Paulo, Brazil). A pressão de trabalho utilizada na pulverização foi de 15 Psi e o volume de calda aplicado foi de  $400 \mu\text{L}$  para cada 200 g de milho.

Os grãos foram infestados com 50 insetos adultos não-sexados das quatro populações, com idade variando de uma a três semanas. Posteriormente, os frascos foram armazenados em câmaras climáticas tipo B.O.D., sob condições constantes de temperatura ( $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ), umidade relativa ( $70 \pm 5\%$ ) e escotofase de 24 h. Neste bioensaio, os insetos não foram removidos. Quatro repetições foram utilizadas para cada população. O número de insetos vivos obtidos no substrato de alimentação foi contabilizado com 0, 30, 60 e 70 dias do início dos bioensaios. Adicionalmente, a perda de massa dos grãos foi aferida aos 70 dias após o início dos testes.

#### 4.2.7 Persistência do resíduo de safrol

Os grãos de milho foram tratados por contato com o OEPH na concentração  $667,49 \mu\text{L kg}^{-1}$ , que corresponde a concentração de safrol de  $623,48 \mu\text{g kg}^{-1}$ . As concentrações utilizadas correspondem a concentrações letais do OEPH para matar 95% da população Cristalina ( $\text{CL}_{95}$ ) (Capítulo 1). O OEPH foi pulverizado com um aerógrafo de dupla ação, com sistema de mistura interna e depósito por gravidade (modelo BC 60, Steula, São Paulo, Brazil). A pressão de trabalho utilizada na pulverização foi de 15 Psi e o volume de calda aplicado foi de  $400 \mu\text{L}$  para cada 200 g de milho. As unidades experimentais foram compostas por frascos de vidro com capacidade de 0,8 L (8 cm de diâmetro x 15 cm de altura) contendo 200 g de milho.

Após o tratamento do milho, os grãos foram mantidos pelo período de exposição de 24 h. Após o período de exposição, os grãos foram transferidos para sacos de náilon (12 cm x 16 cm) e armazenados sob condições constantes de temperatura ( $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e umidade relativa ( $70 \pm 5\%$ ). A análise do resíduo do safrol foi

realizada pelo método otimizado de microextração em fase sólida no modo headspace (MEFS-HS/CG-DIC), conforme (FERRAZ, 2018), nos períodos de armazenamento de 5, 10, 26, 60 e 90 dias. A persistência de safrol foi calculada pela curva de calibração do método MEFS-HS. Diferentes modelos matemáticos foram testados para explicar a degradação do resíduo de safrol. A escolha do modelo foi realizada com base no coeficiente de determinação ( $R^2$ ), na estimativa da raiz quadrada do erro médio (RQEM) (mais próximo de zero) e a significância ( $P < 0,05$ ).

#### 4.2.8 Análises estatísticas

Os dados de emergência acumulada normalizada, emergência diária e número de insetos vivos foram submetidos a análises de regressões não-lineares, utilizando o procedimento de ajustes de curvas do software SigmaPlot, versão 13.1 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, EUA). Para o número total de insetos emergidos e perda de massa de grãos foram submetidos à análise de variância (PROC GLM; SAS Institute 2011).

Posteriormente, foram realizados testes comparação de médias entre as populações ( $P < 0,05$ ) (TUKEY, 1949) e teste de F entre os tratamentos com e sem óleo essencial ( $P < 0,05$ ) (PROC GLM; SAS Institute 2011). As curvas de persistência do resíduo de safrol no milho foram submetidos à análise de regressão, utilizando o procedimento de ajuste de curva no SigmaPlot, versão 13.1 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, EUA).

## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 Composição do OEPH

Foram identificados seis constituintes no OEPH através da análise cromatográfica (Tabela 3). O safrol é o composto majoritário, totalizando 93,0% dos compostos identificados, seguido por biciclogermacreno, pentadecano, espathulenol, p-cimen-8-ol e (E)-carofileno com 2,05; 1,60; 1,46; 1,20 e 0,69%, respectivamente. A concentração absoluta do safrol no OEPH foi determinada através do CG-DIC conforme o tempo de retenção do safrol P.A., onde constatou-se que o safrol representa 85% do óleo essencial.

Tabela 3 – Composição química e concentrações relativas dos compostos identificados no OEPH utilizando análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

Constituinte	IR <sup>1</sup> Literatura	IR <sup>1</sup> Calculado	% Relativa
Safrol	1285	1292	93,00
Biciclogermacreno	1500	1493	2,05
Pentadecano	1500	1498	1,60
Espathulenol	1577	1573	1,46
p-Cimen-8-ol	1179	1184	1,20
(E)-Cariofileno	1417	1415	0,69

IR<sup>1</sup> = Índice de Retenção.

### 4.3.2 Taxas de desenvolvimento populacional

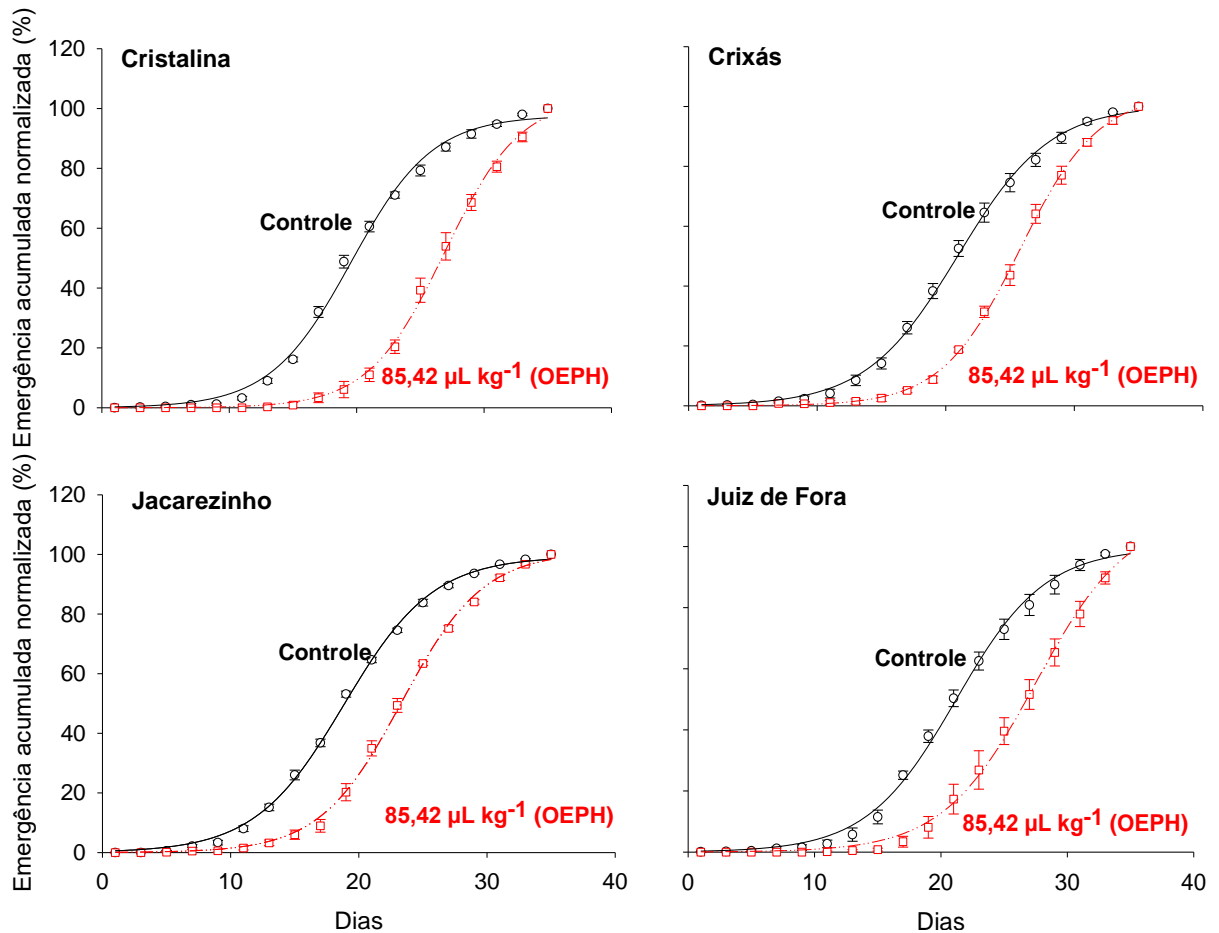
O modelo sigmóide de três parâmetros ( $y = a/1 + \exp(-(x-b)/c)$ ) foi o que ajustou à emergência acumulada normalizada dos adultos das populações de *S. zeamais* ( $P < 0,0001$ ;  $R^2 = 0,99$ ; Tabela 4 e Figura 13). Foram observadas diferenças significativas entre as curvas de emergência acumulada das populações expostas as concentrações subletais do OEPH, não ocorrendo sobreposição das mesmas em relação aos controles. De modo geral, todas as estimativas dos pontos de inflexão (parâmetro  $b$ ) foram maiores nas populações expostas ao OEPH, sugerindo uma emergência mais tardia dos insetos (Tabela 4 e Figura 13). As variações do parâmetro  $b$  nas populações de Cristalina, GO; Juiz de Fora, MG; Jacarezinho, PR e Crixás, GO, em relação ao controle, foram de 33%, 30%, 24% e 23% respectivamente.

Tabela 4 – Sumário das análises de regressão não-lineares das curvas de desenvolvimento populacional de *S. zeamais*.

Variável (Figura)	Modelo	População	Tratamento	Parâmetros estimados ( $\pm$ E. P. M.)			G. I. erro	F	R <sup>2</sup>		
				A	b	c					
Emergência acumulada normalizada (Figura 13)	$f = a / (1 + \exp(-(x-b)/c))$	Cristalina	Controle	97,64 $\pm$ 1,43	19,59 $\pm$ 0,20	3,19 $\pm$ 0,17	15	2562,50	0,99		
			85,42 $\mu$ L kg <sup>-1</sup> (OEPH)	103,89 $\pm$ 2,16	26,01 $\pm$ 0,19	2,99 $\pm$ 0,13	15	4601,12	0,99		
		Crixás	Controle	100,37 $\pm$ 1,11	20,95 $\pm$ 0,15	3,58 $\pm$ 0,12	15	6310,82	0,99		
			85,42 $\mu$ L kg <sup>-1</sup> (OEPH)	104,28 $\pm$ 1,06	25,76 $\pm$ 0,10	3,04 $\pm$ 0,07	15	14632,46	0,99		
		Jacarezinho	Controle	99,34 $\pm$ 0,83	18,85 $\pm$ 0,12	3,48 $\pm$ 0,10	15	7682,27	0,99		
			85,42 $\mu$ L kg <sup>-1</sup> (OEPH)	100,86 $\pm$ 1,23	23,35 $\pm$ 0,14	3,19 $\pm$ 0,11	15	6658,73	0,99		
		Juiz de Fora	Controle	99,55 $\pm$ 1,64	21,19 $\pm$ 0,22	3,52 $\pm$ 0,17	15	2925,45	0,99		
			85,42 $\mu$ L kg <sup>-1</sup> (OEPH)	110,84 $\pm$ 3,40	27,51 $\pm$ 0,31	3,68 $\pm$ 0,17	15	3694,30	0,99		
		Emergência diária (Figura 14)	$y = a \exp(-0,5((x-b)/c)^2)$	Cristalina	Controle	27,67 $\pm$ 1,63	18,97 $\pm$ 0,34	5,07 $\pm$ 0,34	15	98,92	0,93
					85,42 $\mu$ L kg <sup>-1</sup> (OEPH)	10,73 $\pm$ 0,68	27,87 $\pm$ 0,41	5,35 $\pm$ 0,45	15	104,42	0,93
				Crixás	Controle	35,15 $\pm$ 1,49	21,69 $\pm$ 0,30	6,13 $\pm$ 0,30	15	170,60	0,96
					85,42 $\mu$ L kg <sup>-1</sup> (OEPH)	22,17 $\pm$ 1,10	26,70 $\pm$ 0,29	5,00 $\pm$ 0,30	15	164,74	0,96
Jacarezinho	Controle			35,01 $\pm$ 1,28	18,71 $\pm$ 0,25	5,94 $\pm$ 0,25	15	231,13	0,97		
	85,42 $\mu$ L kg <sup>-1</sup> (OEPH)			25,16 $\pm$ 1,39	23,25 $\pm$ 0,32	5,03 $\pm$ 0,32	15	122,07	0,94		
Juiz de Fora	Controle			31,85 $\pm$ 1,92	21,89 $\pm$ 0,43	6,23 $\pm$ 0,44	15	84,29	0,92		
	85,42 $\mu$ L kg <sup>-1</sup> (OEPH)			18,42 $\pm$ 0,57	28,68 $\pm$ 0,33	7,02 $\pm$ 0,36	15	380,58	0,98		

\* Todos os parâmetros estimados foram significativos a  $P < 0,05$  pelo teste t de Student. Todos os modelos foram significativos a  $P < 0,05$  pelo teste F de Fisher.

Figura 13 – Emergência acumulada normalizada (%) de quatro populações de *S. zeamais* não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).



Os símbolos representam as médias de quatro repetições. As barras de erro representam o erro padrão da média.

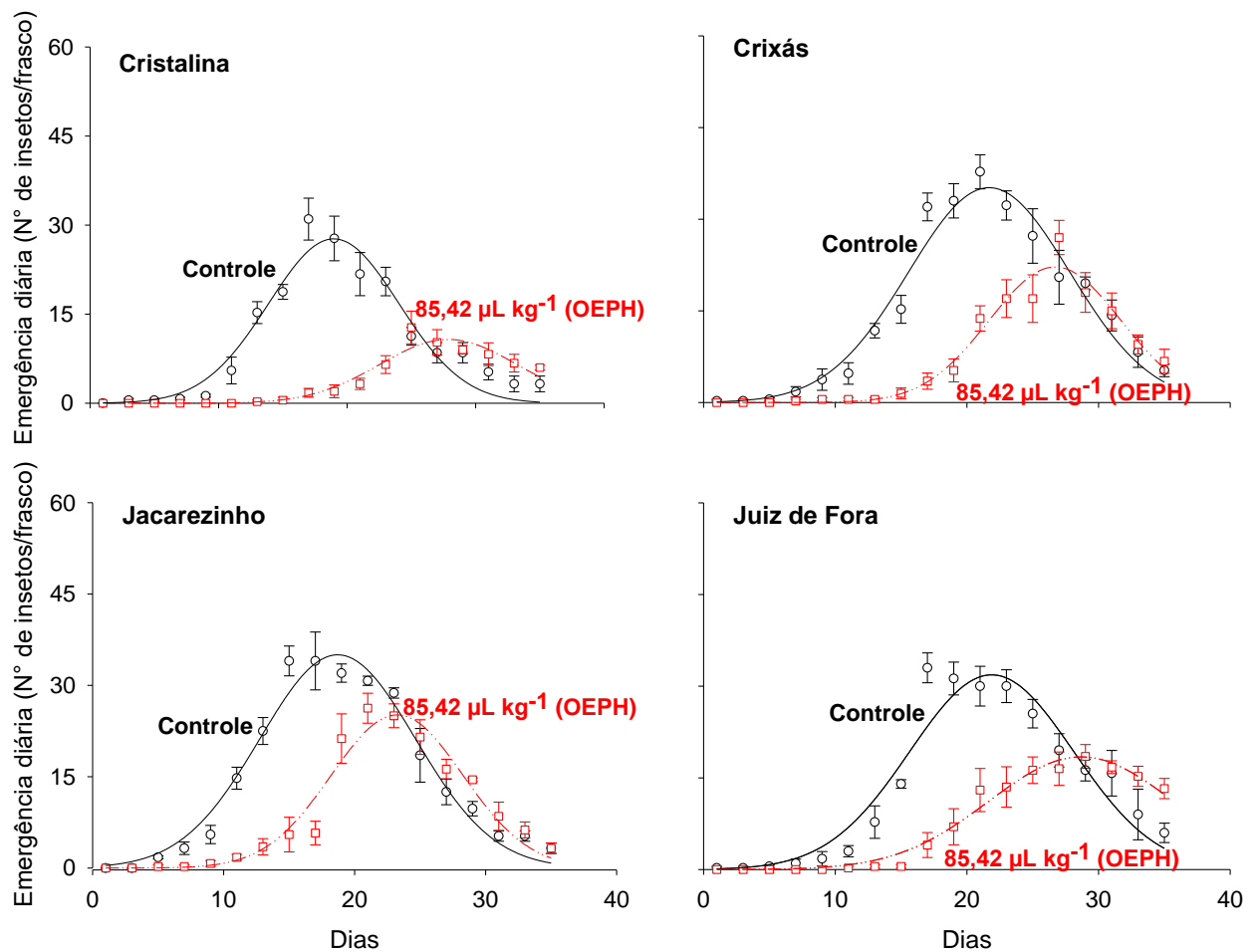
O modelo gaussiano com três parâmetros ( $y = a \exp(-0.5((x-b)/c)^2)$ ) foi o que melhor se ajustou a emergência diária das populações de *S. zeamais* ( $P < 0,0001$ ;  $R^2 > 0,91$ ; Tabela 4 e Figura 14). Foram observadas diferenças significativas entre as curvas de emergência diária das populações expostas as concentrações subletais do OEPH, não ocorrendo sobreposição das mesmas em relação aos controles. As estimativas para o pico máximo da emergência diária (parâmetro  $a$ ) foram menores em todas as populações expostas ao OEPH, evidenciando a menor emergência de insetos adultos (Tabela 4 e Figura 14). As variações do parâmetro  $a$  nas populações de Cristalina, GO; Juiz de Fora, MG; Crixás, GO e Jacarezinho, PR, em relação ao controle, foram de 61%, 42%, 37% e 28% respectivamente.

As estimativas sobre os dias necessários para atingir o pico máximo de emergência (parâmetro  $b$ ) foram maiores nas populações expostas ao OEPH,



evidenciando que as ocorrências dos picos populacionais foram mais tardias em comparação com os controles (Tabela 4 e Figura 14). As variações do parâmetro  $b$  nas populações de Cristalina, GO; Juiz de Fora, MG; Jacarezinho, PR e Crixás, GO, em relação ao controle, foram de 47%, 31%, 24% e 23% respectivamente.

Figura 14 – Emergência diária de quatro populações de *S. zeamais* não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).

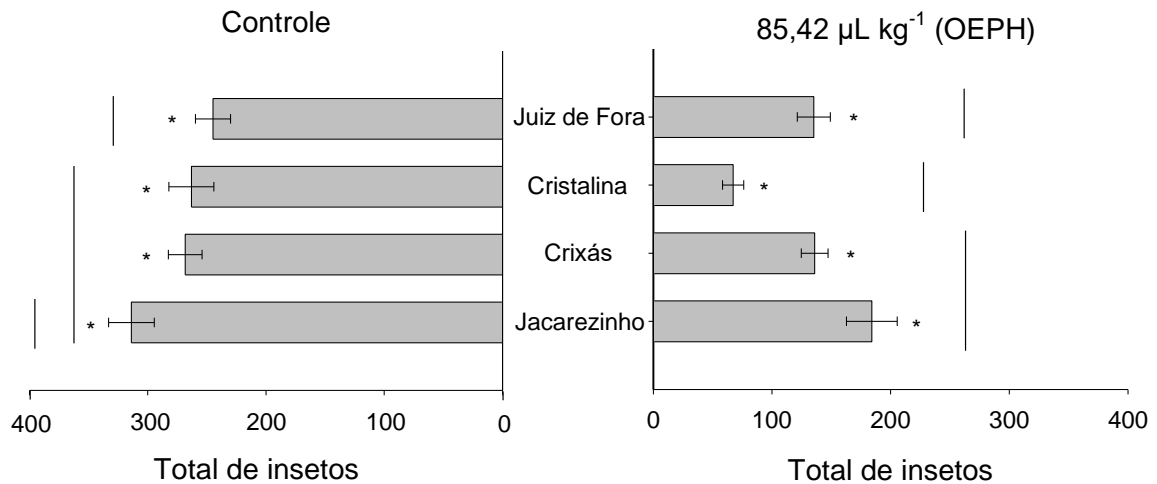


Os símbolos representam as médias de quatro repetições. As barras de erro representam o erro padrão da média.

O total de insetos emergidos variou significativamente entre as populações de *S. zeamais* ( $F_{3;24}=9,81$ ;  $P<0,01$ ), entre o tratamento com OEPH e controle ( $F_{1;24}=159,31$ ;  $P<0,01$ ), mas não houve interação significativa entre estes dois fatores ( $F_{3;24}=2,77$ ;  $P=0,06$ ) (Figura 15). De modo geral, o total de insetos emergidos foi menor nas populações expostas ao OEPH em comparação ao controle. A população de

Cristalina, GO, apresentou o menor número de insetos emergidos ( $67,25 \pm 8,93$ ), quando comparada as demais expostas ao OEPH (Figura 15).

Figura 15 – Total de insetos emergidos de quatro populações de *S. zeamais* não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).



Médias com barras na mesma altura não diferem entre as populações pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ) e os asteriscos indicam diferença significativa entre a população exposta e não exposta ao OEPH pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

#### 4.3.3 Crescimento populacional e perda de massa de grãos

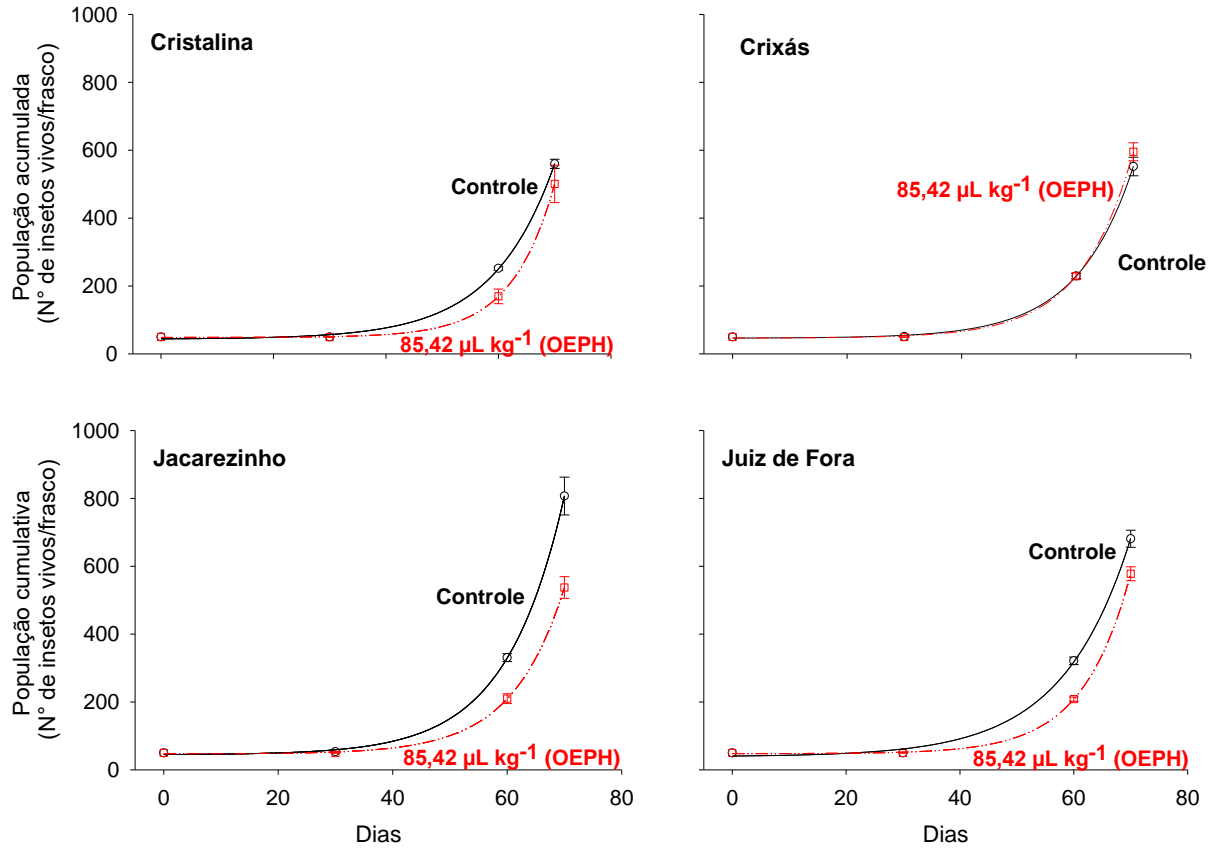
O modelo de crescimento exponencial de três parâmetros ( $y = a + b \cdot \exp(c \cdot x)$ ) foi o que melhor se ajustou ao crescimento populacional (insetos vivos) das populações de *S. zeamais* ( $P < 0,05$ ;  $R^2 = 0,99$ ; Tabela 5 e Figura 16). Foram observadas variações substanciais nas curvas de crescimento populacional das populações expostas as concentrações subletais do OEPH, não ocorrendo sobreposição das mesmas em relação aos controles, com exceção da população de Crixás, GO, (Figura 16). As populações de Cristalina, GO; Jacarezinho, PR e Juiz de Fora, MG, tiveram redução no crescimento populacional semelhante as taxas de desenvolvimento populacional. A perda de massa de grãos aos 70 dias variou significativamente entre as populações de *S. zeamais* ( $F_{3;24} = 10,37$ ;  $P < 0,01$ ), mas não houve variação entre o tratamento com OEPH e controle ( $F_{1;24} = 0,08$ ;  $P = 0,79$ ) e na interação significativa entre estes fatores ( $F_{3;24} = 1,80$ ;  $P = 0,17$ ) (Figura 17).

Tabela 5 – Sumário das análises de regressão não-lineares das curvas de crescimento populacional de *S. zeamais*.

Variável (Figura)	Modelo	População	Tratamento	Parâmetros estimados ( $\pm$ E. P. M.)			G. l. erro	F	R <sup>2</sup>
				a	b	C			
População acumulada (Figura 16)	$y = a + b \cdot \exp^{(c \cdot x)}$	Cristalina	Controle	43,51 $\pm$ 7,11	0,85 $\pm$ 0,32	0,09 $\pm$ 0,01*	1	1088,47	0,99
			85,42 $\mu$ L kg <sup>-1</sup> (OEPH)	48,49 $\pm$ 1,56*	0,04 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,00*	1	14947,40	0,99
		Crixás	Controle	46,25 $\pm$ 3,25	0,40 $\pm$ 0,10	0,10 $\pm$ 0,00*	1	3182,00	0,99
			85,42 $\mu$ L kg <sup>-1</sup> (OEPH)	46,50 $\pm$ 3,70	0,24 $\pm$ 0,06	0,11 $\pm$ 0,00*	1	4115,95	0,99
		Jacarezinho	Controle	44,32 $\pm$ 5,90	0,78 $\pm$ 0,19	0,10 $\pm$ 0,00*	1	3297,52	0,99
			85,42 $\mu$ L kg <sup>-1</sup> (OEPH)	46,86 $\pm$ 3,32*	0,21 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,00*	1	4082,61	0,99
		Juiz de Fora	Controle	38,82 $\pm$ 12,66	1,86 $\pm$ 0,91	0,08 $\pm$ 0,00*	1	572,54	0,99
			85,42 $\mu$ L kg <sup>-1</sup> (OEPH)	47,68 $\pm$ 2,43*	0,12 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,00*	1	8765,08	0,99

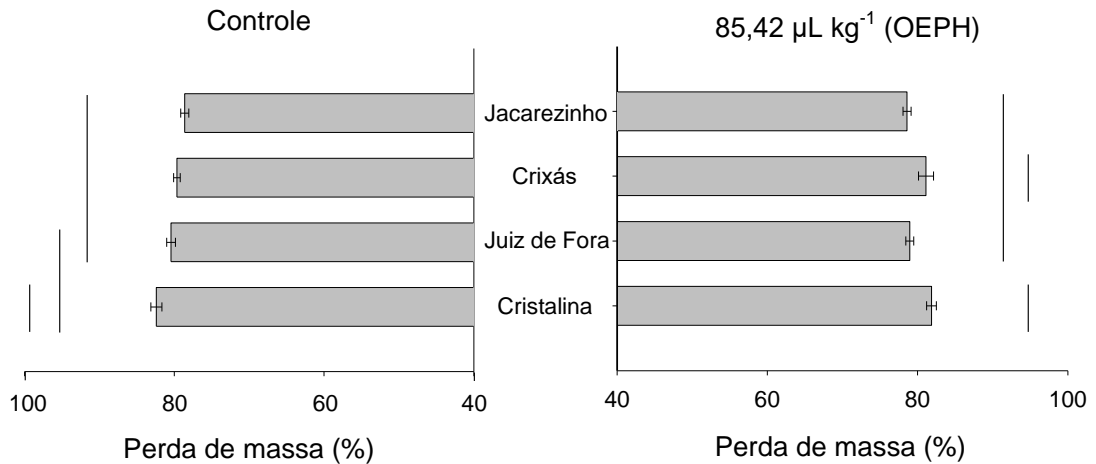
\* Parâmetros estimados significativos a  $P < 0,05$  pelo teste t de Student. Todos os modelos foram significativos a  $P < 0,05$  pelo teste F de Fisher.

Figura 16 – Crescimento populacional de quatro populações de *S. zeamais* não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).



Os símbolos representam as médias de quatro repetições. As barras de erro representam o erro padrão da média.

Figura 17 – Perda de massa de grãos (%) aos 70 dias, de quatro populações de *S. zeamais* não expostas (controle), e expostas a concentração subletal do OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ).



Médias com barras na mesma altura não diferem entre as populações pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

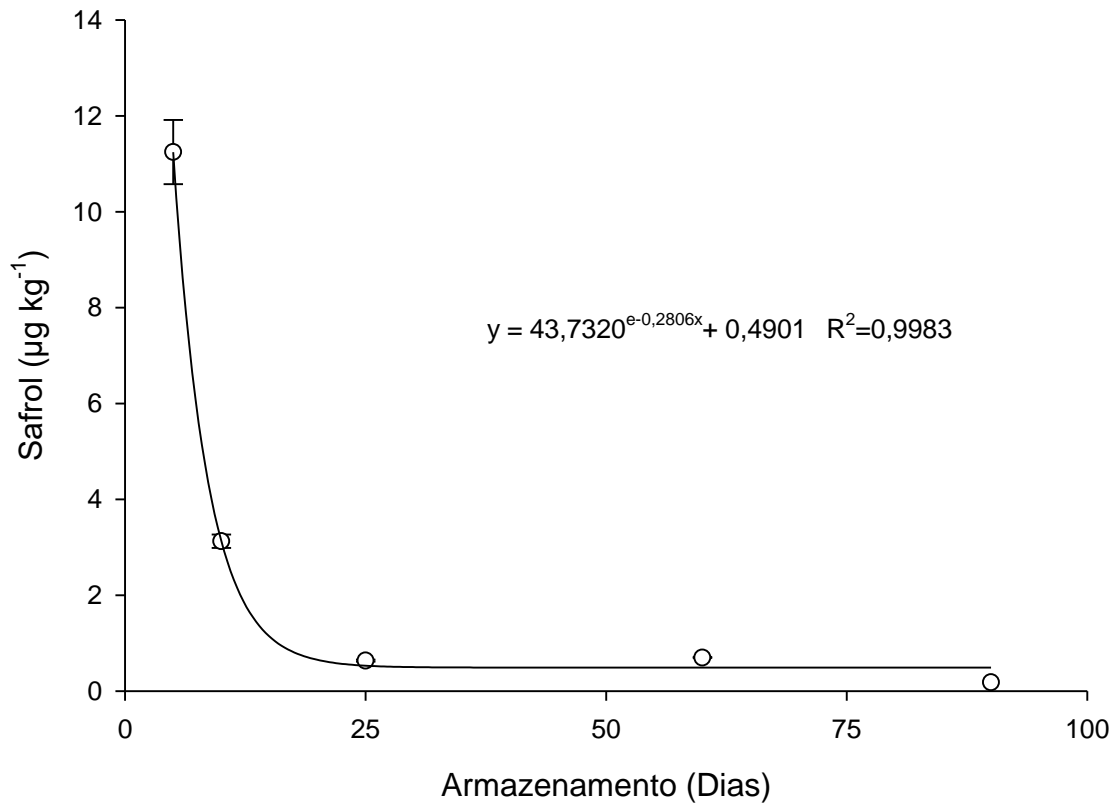
#### 4.3.4 Resíduo de safrol

A degradação do resíduo de safrol nos grãos de milho tratados com OEPH por contato, no período de armazenamento, foi explicada por diferentes modelos matemáticos de regressão ajustados (Tabela 6). Nos grãos tratados, o modelo ajustado foi o exponencial ( $y = ae^{-bx} + c$ ) (Figura 18), com os valores de  $R^2$  de 0,9983; RQEM de 0,1723 e  $P$  de 0,0017. As concentrações detectadas para os grãos tratados por contato foram de 11,2441  $\mu\text{g kg}^{-1}$  no quinto dia e 0,1833  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para 90 dias. Observou-se redução de 98,20% da concentração de safrol presente nos grãos após cinco dias de armazenamento.

Tabela 6 – Modelos matemáticos ajustados para os resíduos de safrol em milho tratado com óleo essencial de *P. hispidinervum* por contato durante o armazenamento.

Tratamento	Modelo	Equação	$R^2$	RQEM	$P$
	Linear	$y = - 0,0845x + 6,3884$	0,4309	3,1405	0,2288
	Quadrático	$y = 0,0029x^2 - 0,3559x + 9,4685$	0,6563	2,4406	0,3437
Contato	Exponencial	$y = 43,7320e^{-0,2806x} + 0,4901$	0,9983	0,1723	0,0017
	Potencial	$y = 442,664 (1 + x)^{-2,0510}$	0,9954	0,2834	0,0001
	Logaritmo	$y = - 0,9699 \ln (x - 4,9992) + 4,3262$	0,9902	5,0454	0,0098

Figura 18 – Persistência do resíduo de safrol em milho tratado com OEPH por contato durante o armazenamento.



#### 4.4 DISCUSSÃO

O OEPH é rico em safrol, representando (93,0%) dos compostos identificados, conforme revelou a análise cromatográfica (GS-EM). O safrol já foi relatado como composto majoritário no óleo essencial de *P. hispidinervum*, com concentrações maiores que 90% na região amazônica (FAZOLIN et al., 2007) ou entre 77% a 90% em plantas cultivadas no sul do Brasil (NASCIMENTO et al., 2008; RIVA et al., 2011; SAUTER et al., 2012). Os demais compostos minoritários identificados no OEPH também foram relatados por outros autores como o pentadecano (SAUTER et al. 2012), o biciclogermacreno e (E)-carofileno (SAUTER et al., 2012; Andrés et al., 2017; Araújo et al., 2017) espathulenol (Araújo et al., 2017; Oliveira et al., 2017) e o P-cimen-8-ol (Andrés et al., 2017; Oliveira et al., 2017). A atividade bioinseticida do OEPH sobre pragas de grãos armazenados já foi descrita na literatura (PEREIRA et al., 2008; COITINHO et al., 2011; ARAÚJO et al., 2017), sendo atribuída principalmente a ação dos seus compostos.

A exposição subletal ao OEPH ( $CL_{30} = 85,42 \mu\text{L kg}^{-1}$ ), influenciou negativamente as taxas de desenvolvimento populacional e o total de insetos emergidos das quatro populações brasileiras de *S. zeamais*. Os menores valores de emergência diária, total de insetos emergidos e o maior tempo necessário para a ocorrência do pico populacional entre as quatro populações, levaram a uma menor emergência acumulada normalizada e menor crescimento populacional dessas populações, com exceção da população de Crixás, GO, que apresentou sobreposição da curva crescimento populacional em relação ao controle. Efeitos negativos da exposição subletal de populações de insetos a óleos essenciais sobre características biológicas, tais como as taxas de desenvolvimento, crescimento populacional e emergência total de insetos pragas de grãos armazenados já foram relatados por diversos autores (FREITAS et al., 2016; SILVA et al., 2017; SOUZA et al., 2018; VITERI JUMBO et al., 2018).

Apesar da exposição subletal ao OEPH ter reduzido significativamente o desenvolvimento das populações de insetos, na indústria de armazenamento de grãos, ela não pode erradicá-las completamente. A utilização de CLs subletais mais eficientes, poderia promover a erradicação completa dos insetos. Os efeitos subletais podem agir nas populações de insetos reduzindo o seu tempo de vida, taxas de desenvolvimento e crescimento populacional, fertilidade, fecundidade, alimentação,

oviposição, provocando deformidades e alterações comportamentais (LEE, 2000; FRANÇA et al., 2017). A exposição subletal a inseticidas sintéticos ou botânicos pode causar mudanças na homeostase dos insetos, permitindo assim, a sua sobrevivência (GUEDES et al., 2011). Embora os danos causados às pragas sejam mantidos por várias gerações, a intensidade da pressão de seleção poderia contribuir para o surgimento de populações de insetos resistentes (APPLEBY; CREDLAND, 2004; LOPES et al., 2016; SOUZA et al., 2018). Alguns inseticidas podem modular a atividade não apenas em enzimas de desintoxicação nos insetos vivos, mas também de enzimas responsáveis pelo metabolismo digestivo e energético. A atividade de desintoxicação aprimorada é frequentemente associada à resistência a inseticidas, mas a atividade de enzimas do metabolismo digestivo e energético também pode ser importante na mitigação dos custos adaptativos geralmente associados à resistência a inseticidas (FEYEREISEN, 2005; GUEDES et al., 2006; GUEDES et al., 2011). Uma estratégia para impedir o surgimento de biótipos resistentes é a combinação de vários métodos de controle (PANDA; KHUSH, 1995).

Desta forma, os resultados deste estudo indicam que o OEPH pode ser considerado um bioinseticida potencial para o controle de *S. zeamais* e pode ser incluído em estratégias para minimizar a probabilidade de desenvolvimento de resistência a inseticidas sintéticos. Vale ressaltar que o uso de diferentes inseticidas para os quais os insetos não apresentam resistência cruzada pode contribuir substancialmente para diminuir a velocidade de desenvolvimento da resistência (SUBRAMANYAM; HAGSTRUM, 1996; SOUSA et al., 2009). Assim, o uso rotacional de inseticidas pode minimizar o surgimento de genótipos resistentes e colocar os indivíduos em desvantagem adaptativa (SOUZA et al., 2018).

O decréscimo na persistência do resíduo de safrol com o prolongamento do período de armazenamento do milho foi evidente, com redução de (98,20%) após cinco dias de armazenamento. As concentrações de safrol utilizadas no tratamento do milho são menores que os limites de concentração permitidos pela ANVISA (1,00 mg kg<sup>-1</sup>) (Resolução (RDC) nº 2 de 15 de janeiro de 2007) e União Europeia (1,00 mg kg<sup>-1</sup>) (Resolução (EC) nº 1334 de 16 de dezembro de 2008) para bebidas e alimentos. O efeito residual do OEPH já foi analisado sobre *S. zeamais*, em grãos de milho durante o período de armazenamento de 120 dias e foi constatado baixo efeito residual, com mortalidade inferior a 17,5% após 30 dias do armazenamento (COITINHO et al., 2010). A baixa persistência de inseticidas botânicos em produtos armazenados, já foi



relatada na literatura (ISMAN, 2000; PEREIRA et al., 2009; LU et al., 2013; ISMAN; GRIENEISEN, 2014). A rápida degradação dos óleos essenciais é explicada pela instabilidade química dos seus constituintes, em decorrência de reações de oxidação, isomerização, ciclização ou desidrogenação que são desencadeadas por enzimas ou por outras moléculas, como o oxigênio (FRANZ et al., 2010; SILVESTRE et al., 2019). A temperatura, a luz e a disponibilidade de oxigênio atmosférico também influenciam a estabilidade dos óleos essenciais (TUREK; STINTZING, 2013).

A redução das taxas de desenvolvimento e crescimento populacional das populações expostas a concentração subletal do OEPH, demonstram a atividade bioinseticida deste óleo. Compreender os efeitos subletais de inseticidas sintéticos ou naturais, sempre deve ser foco em estudos toxicológicos, pois as exposições subletais dos insetos são provavelmente mais frequentes do que as letais em ambientes de armazenamento (GUEDES et al., 2011). Independentemente do tipo de inseticida usado, os efeitos letais e subletais devem ser totalmente explorados, e essas informações devem ser utilizadas nas tomadas de decisão de manejo integrado de pragas.

#### 4.5 CONCLUSÕES

A exposição subletal ao óleo essencial de *P. hispidinervum* reduz as taxas de desenvolvimento e crescimento populacional das quatro populações estudadas.

O resíduo do safrol apresenta baixa persistência, com redução de 98,20% após o quinto dia de armazenamento dos grãos de milho.

## REFERÊNCIAS

- ANDRÉS, M. F.; ROSSA, G. E.; CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; SANTANA, O.; DÍAZ, C. E.; GONZÁLEZ-COLOMA, A. Biocidal effects of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil and synergism among its main components. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 1086-1092, 2017.
- APPLEBY, J. H.; CREDLAND, P. F. Environmental conditions affect the response of West African *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) populations to and resistant cowpeas. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 40, p. 269–287, 2004.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC nº 2, Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes. 2007.
- ARAÚJO, A. M. N.; FARONI, L. R. D.; OLIVEIRA, J. V.; NAVARRO, D. M. A. F.; BARBOSA, D. R. S.; BRENDA, M. O.; FRANÇA, S. M. Lethal and sublethal responses of *Sitophilus zeamais* populations to essential oils. **Journal Pest Science**, v.90, p.589-600, 2017.
- COITINHO, R. L. B. C.; OLIVEIRA, J. V.; GONDIM-JUNIOR, M. G. C.; CÂMARA, C. A. G. Persistência de óleos essenciais em milho armazenado, submetido à infestação de gorgulho do milho. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1492-1496, 2010.
- COITINHO, R. L. B. C.; OLIVEIRA, J. V.; GONDIM, M. G. C. J.; CÂMARA, C. A. G. Toxicidade por fumigação, contato e ingestão de óleos essenciais para *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1885 (Coleoptera: Curculionidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p.172- 178, 2011.
- CORREA, Y. D. C. G.; FARONI, L. R. A.; HADDI, K.; OLIVEIRA, E. E.; PEREIRA, E. J. G. Locomotory and physiological responses induced by clove and cinnamon essential oils in the maize weevil *Sitophilus zeamais*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 125, p. 31-37, 2015.
- CUTLER, G.C.; GUEDES, R. N. C. Occurrence and significance of insecticide-induced hormesis in insects. In: DUKE, S.O., KUDESK, P., SOLOMON, K. (Eds), **Pesticide dose: effects on the environment and target and non-target organisms**. American Chemical Society, Washington, 2017. pp. 101-119.
- DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J-M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 81-106, 2007.
- FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; CATANI, V.; ALÉCIO, M. R.; LIMA, M. S. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Schum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 113-120, 2007.
- FEYEREISEN, R. Insect cytochrome P450. In: GILBERT, L. I.; IATROU, K.; GILL, S. S. (Eds). **Comprehensive molecular insect science**. Elsevier, Oxford, 2005, pp. 1–77.

- FERRAZ, M. S. S. **Potencial inseticida do óleo essencial de *Piper hispidinervum* sobre *Callosobruchus maculatus* e qualidade de feijão-caupi**. 2018. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Viçosa, MG, 2018.
- FRAGOSO, D. B.; GUEDES, R. N. C.; PETERNELLI, L. A. Developmental rates and population growth of insecticide-resistant and susceptible populations of *Sitophilus zeamais*. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 41, p. 271–281, 2005.
- FRANÇA, S. M. de; BRENDA, M. A.; BARBOSA, D. R. S.; ARAUJO, A. M. N.; GUEDES, C. A. The sublethal effects of insecticides in insects. In: SHIELDS, V. D. C. (Ed). **Biological control of pest and vector insects**. InTech, Rijeka, 2017, pp. 23-39.
- FREITAS, R. C. P.; FARONI, L. R. D.; HADDI, K.; JUMBO, L. O. V.; OLIVEIRA, E.E. Allyl isothiocyanate actions on populations of *Sitophilus zeamais* resistant to phosphine: Toxicity, emergence inhibition and repellency. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 69, p. 257-264, 2016.
- GUEDES, R. N. C.; CUTLER, G.C. Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. **Pest Management Science**, v. 70, p. 690-697, 2014.
- GUEDES, R. N. C.; GUEDES, N. M. P.; ROSI-DENADAI, C.A. Sub-lethal effects of insecticides on stored-product insects: current knowledge and future needs. **Stewart Postharvest Review**, v. 3, p. 1-5, 2011.
- GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E. E.; GUEDES, N. M. P.; RIBEIRO, B.; SERRÃO, J. E. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Physiological Entomology**, v. 31, p. 30-38, 2016.
- GUEDES, N. M. P.; TOLLEDO, J.; CORRÊA, A.S.; GUEDES, R. N. C. Insecticide-induced hormesis in an insecticide-resistant strain of the maize weevil. **Journal of Applied Entomology**, v.134, p. 142-148, 2010.
- HADDI, K.; VALBON, W. R.; VITERI JUMBO, L. O.; OLIVEIRA, L.O.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E. E. Diversity and convergence of mechanisms involved in pyrethroid resistance in the stored grain weevils, *Sitophilus* spp. **Scientific Reports**, v. 8, pp. 16361, 2018.
- LEE, C. Y. Sublethal effects of insecticide on longevity, fecundity, and behaviour of insect pests: a review. **Bioscience Journal**, v. 11, p. 107-112, 2000.
- LOPES, L. M.; ARAÚJO, A. E. F.; SANTOS, W. B.; SOUSA, A. H. Population development of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) in landrace bean varieties occurring in southwestern Amazonia. **Journal of Economic Entomology**, v.109, p. 467–471, 2016.
- NASCIMENTO, F. R.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; LIMA, R. K.; SALGADO, A. P. S. P.; GUIMARÃES, L. G. L. The effect of long-pepper essential oil (*Piper hispidinervum* C. DC.) and of Tween®; 80 emulsifier on the mycelial growth of *Alternaria alternate* (Fungi: hyphomycetes). **Acta Amazônica**, v. 38, 503-508, 2008.

NENAAH, G. E.; IBRAHIM, S. I. A.; AL-ASSIUTY, B. A. Chemical composition, insecticidal activity and persistence of three Asteraceae essential oils and their nanoemulsions against *Callosobruchus maculatus* (F.). **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 61, p. 9-16, 2015.

OLIVEIRA, J. V.; FRANÇA, S. M.; BARBOSA, D. R. S.; DUTRA, K. A.; ARAÚJO, A. M. N.; NAVARRO, D. M. A. F. Fumigation and repellency of essential oils against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in cowpea. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, p. 10-17, 2017.

PEREIRA, A. C. R. L.; OLIVEIRA, J. V.; GONDIM JUNIOR, M. G. C.; CÂMARA, C.A.G. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 717-724, 2008.

PEREIRA, A. C. R. L.; OLIVEIRA, J. V.; GONDIM JUNIOR, M. G. C.; CÂMARA, C. A. G. Influência do período de armazenamento do caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], tratado com óleos essenciais e fixos, no controle de *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae). **Ciência Agrotecnologia**, v.33, p. 319-325, 2009.

PIMENTEL, M. A. G.; FARONI, L. R. A.; CORREA, A. S.; GUEDES, R. N. C. Phosphine-induced walking response of the lesser grain borer (*Rhyzoperta dominica*). **Pest Management Science**, v. 68, p.1368–1373, 2012.

RAJENDRAN, S.; SRIRANJINI, V. Plant products as fumigants for stored product insect control. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 44, p. 126-135, 2008.

RAMOS, C. S.; BARBOSA, Q. P. S.; VANIN, S. A. Metabolism of safrole by *Heraclides thoas brasiliensis* (Papilionidae). **Journal of the Lepidopterists' Society**, v. 68, p. 283-285, 2014.

REGULATION, E. C. Nº. 1334/2008 of the European Parliament and of the Council. **Official Journal of the European Communities**, p. 34-50, 2008.

RIBEIRO, I. A. T. A.; SILVA, R.; SILVA, A. G. S.; MILET-PINHEIRO, P.; PAIVA, P. M. G.; NAVARRO, D. M. A. F.; SILVA, M.V.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. S. Chemical characterization and insecticidal effect against *Sitophilus zeamais* (maize weevil) of essential oil from *Croton rudolphianus* leaves. **Crop protection**, v. 29, p. 105043, 2020.

RIVA, D.; SIMIONATTO, E. L.; WISNIEWSKI, J.; SALERNO, A. R.; SCHALLENBERGER, T. H. Adaptation studies of *Piper hispidinervum* C. DC. (long pepper) species in Itajaí Valley - SC by the chemical composition of essential oil obtained by microwave and traditional hydrodistillation. **Acta amazonica**, v. 41,p. 297-302, 2011.

ROCHA, S. F. R.; LIN, C. M. *Piper hispidinervum*: a sustainable source of safrole. In: Janick, J., (Ed.), Perspectives on new crops and new uses. **ASHS Press**, Alexandria, 1999. pp 479-481.

SAS, 2011. **SAS/STAT(R) 9.3 User´s Guide**. SAS Institute, Cary, NC, USA.

SAUTER, I. P.; ROSSA, G. E.; LUCAS, A. M.; CIBULSKI, S. P.; ROEHE, P. M.; ALVES da SILVA, L. A.; ROTTA, M. B.; VARGAS, R. M. F. Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 292-295, 2012.

SILVA, S. M.; HADDI, K.; VITERI JUMBO, L. O.; OLIVEIRA, E. E. Progeny of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*, is affected by parental exposure to clove and cinnamon essential oils. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.163, p. 220-228, 2017.

SOHILAIT, H. J.; KAINAMA, H. Synthesis of 1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1-butene-3- one from safrole. **European Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 3, p. 66-70, 2016.

SOUSA, A. H.; FARONI, L. R. A.; GUEDES, R. N. C.; TÓTOLA, M. R.; URRICH, W. I. Ozone as a management alternative against phosphine-resistant insect-pests of stored products. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 44, p. 379-385, 2008.

SOUSA, A. H.; FARONI, L. R. A.; PIMENTEL, M. A. G.; GUEDES, R. N. C. Developmental and population growth rates of phosphine-resistant and - susceptible populations of stored product insect-pests. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 45, p. 241–246, 2009.

SOUZA, L. P.; FARONI, L. R. D.; LOPES, L. M.; SOUSA, A. H.; PRATES, L. H. F. Toxicity and sublethal effects of allyl isothiocyanate to *Sitophilus zeamais* on population development and walking behavior. **Journal Pest Science**, v. 91, p. 761-770, 2018.

SUBRAMANYAM, B.; HAGSTRUM, D. W. Resistance measurement and management. In: SUBRAMANYAM, B.; HAGSTRUM, D. W., (Ed.). **Integrated management of insects in stored products**. Marcel Dekker, New York, 1996. p. 331–397.

PANDA, N.; KHUSH, G. S. Host plant resistance to insects. **CAB International**, Wallingford, 1995.

TREMATERRA, P.; FONTANA, F.; MANCINI, M. Analysis of development rates of *Sitophilus oryzae* (L.) in five cereals of the genus *Triticum*. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 32, p. 315–322, 1996.

TUKEY, J. W. Comparing individual means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 5, p. 99-114, 1949.

VILCA MALLQUI, K. S.; VIEIRA, J. L.; GUEDES, R. N. C.; GONTIJO, L. M. Azadirachtin-induced hormesis mediating shift in fecundity-longevity trade-off in the mexican bean weevil (Chrysomelidae: Bruchinae). **Journal of Economic Entomology**, v. 107, p. 860-866, 2014.

VITERI JUMBO, L. O.; HADDI, K.; FARONI, L. R. D.; HELENO, F. F.; PINTO, F. G.; OLIVEIRA, E. E. Toxicity to, oviposition and population growth impairments of *Callosobruchus maculatus* exposed to clove and cinnamon essential oils. **PloS one**, v. 13, p. 1-15, 2018.

## 5 CONCLUSÕES FINAIS

As populações brasileiras de *Sitophilus zeamais*, apresentaram uniformidade de resposta ao óleo essencial de *Piper hispidinervum*, indicando ausência de resistência ao biopesticida.

Os efeitos subletais do óleo essencial de *P. hispidinervum*, promoveram diferentes respostas fisiológicas e comportamentais nas populações investigadas.

As taxas de desenvolvimento e crescimento populacional das quatro populações de *S. zeamais*, foram reduzidas pela exposição a concentração subletal do óleo essencial de *P. hispidinervum*.

Houve redução de 98,20% do safrol aplicado nos grãos de milho, após o quinto dia de armazenamento.