

YENIS DEL CARMEN GONZALEZ CORREA

**RESPOSTA DE POPULAÇÕES DE *Sitophilus zeamais*  
À EXPOSIÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS  
DE CRAVO E DE CANELA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2011

YENIS DEL CARMEN GONZALEZ CORREA

**RESPOSTA DE POPULAÇÕES DE *Sitophilus zeamais*  
À EXPOSIÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS  
DE CRAVO E DE CANELA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2011.

---

**Prof. Eliseu José Guedes Pereira**  
Co-orientador

---

**Prof. Olinto Liparini Pereira**

---

**Lêda Rita D'Antonino Faroni**  
Orientadora

*Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado.*

(Roberto Shinyashiki)

*A meus pais Manuel e Juana;  
A meus irmãos Jael e Manuel;  
A meu esposo Nelson;  
Aos meus filhos Esteban, Daniela e Sofia;  
Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

*E depois de olhar a minha dissertação pronta e respirar aliviada, só tenho a agradecer a todos que colaboraram para que este sonho se tornasse realidade! E é com imenso prazer e satisfação que eu agradeço a cada um...*

*A Deus, pelo dom da vida, e por sempre iluminar a minha vida.*

*À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, pela oportunidade.*

*À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Lêda Rita D'Antonino Faroni, pela orientação e oportunidade.*

*Aos professores Raül N. Guedes e Eliseu Guedes, pela sua disposição em colaborar para o meu trabalho como co-orientadores.*

*Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, pelos ensinamentos.*

*Aos componentes da banca de dissertação, pela cordialidade ao convite e forma como dela participaram.*

*Aos meus pais, Manuel (in memoriam) e Juana, que acreditaram e me deram total apoio para aproveitar a oportunidade de fazer o mestrado.*

*Ao meu esposo Nelson e a meus filhos Esteban, Daniela e Sofia, obrigado por tudo... pelo apoio moral, pelas possíveis soluções para os meus problemas complexos na reta final da elaboração da dissertação, pela paciência e compreensão ilimitadas, pelo carinho de todos os dias, porque eu sei que não tem sido fácil! Obrigada por tudo! Amo vocês!*

*Ao meu amigo Romenique sempre ficarei grata, jamais vou esquecer o quanto ajudou da melhor maneira possível para que meu trabalho tivesse resultados confiáveis, mas com um carinho especial e recíproco.*

*À Cris, pela tolerância e amizade incondicional nos meus altos e baixos emocionais desde o início do experimento até a defesa, que me deu várias “ajudinhas” para deixar minhas figuras e apresentações mais bonitas e apresentáveis!*

*Às novas amigadas, Cristina, Adalberto, Romenique, Rodrigo, Marta, Juliana, Tales, André, Deize, Marcela, Gutierrez, Augusto, Alisson, Marlize, Juliana Andrea e Natália, que deram o maior suporte ao longo deste ano, tiraram dúvidas, ensinaram a desenvolver e a resolver quando parecia que estava dando tudo errado, além de colaborarem para a realização de meu trabalho, agradeço pelas boas risadas!!!*

*Ao Alberto, pela colaboração nos experimentos de caminhada e respirometria.*

*E a todos que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho, meu muito obrigada!*

## **BIOGRAFIA**

YENIS DEL CARMEN GONZALEZ CORREA, filha de Antônio Gonzalez Galeano e Juana Correa Genes, nasceu em Lórica, Córdoba-Colômbia. Em fevereiro de 1991, iniciou curso de Agronomia na Universidade de Córdoba, Montería, Córdoba - Colômbia, graduando-se Engenheira Agrônoma em dezembro de 1997. Em março de 2009, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Lêda Rita D'Antonino Faroni, submetendo-se à defesa de tese no dia 25 de fevereiro de 2011.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>4</b>
2.1. Populações de <i>Sitophilus zeamais</i> .....	4
2.2. Óleos essenciais de cravo e de canela.....	4
2.3. Bioensaios de curvas concentração-resposta e tempo-resposta .....	4
2.4. Bioensaios comportamentais.....	5
2.5. Bioensaio de respirometria.....	7
2.6. Bioensaio de taxa instantânea de crescimento (ri).....	8
2.7. Análises estatísticas .....	9
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>11</b>
3.1. Bioensaios de curvas concentração-resposta e tempo-resposta .....	11
3.2. Bioensaios comportamentais.....	15
3.2.1 Caminhamento em arena completamente tratada.....	15
3.2.2 Caminhamento em arena parcialmente tratada (irritabilidade).....	18
3.3. Bioensaio de respirometria.....	19
3.4. Bioensaio de taxa instantânea de crescimento populacional (ri).....	21

<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>29</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>30</b>

## RESUMO

GONZALEZ CORREA, Yenis del Carmen, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Resposta de populações de *Sitophilus zeamais* à exposição dos óleos essenciais de cravo e de canela.** Orientadora: Lêda Rita D'Antonino Faroni. Co-orientadores: Raul Narciso Carvalho Guedes e Eliseu José Guedes Pereira.

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a toxicidade, comportamento locomotor, taxa de crescimento populacional e taxa respiratória em insetos adultos de populações brasileiras de *Sitophilus zeamais* submetidas à exposição dos óleos essenciais de cravo e de canela. A toxicidade dos óleos foi testada em diferentes concentrações (0,18; 0,35; 0,71; 1,41 e 2,12  $\mu\text{L cm}^{-2}$ ) de uma mistura de cada óleo essencial diluído em acetona (6:4 v/v). As unidades experimentais foram constituídas por placas de Petri (6 x 1,2 cm) contendo papel filtro umedecidos com a mistura. Posteriormente, foram acrescentados às placas 20 adultos de *Sitophilus zeamais* de diferentes populações, as quais foram coletadas nas cidades de Guarapuava (PR), Guaxupé (MG), Coimbra (MG), Piracicaba (SP) e Cristalina (GO). A mortalidade dos insetos foi avaliada a cada três horas até completar 108 horas. A toxicidade dos óleos essenciais de cravo e de canela foi obtida através da estimativa das concentrações letais para 50 (CL<sub>50</sub>) e 95% (CL<sub>95</sub>) e tempo letal para 50% (TL<sub>50</sub>) dos adultos de *Sitophilus zeamais*, em bioensaios de concentração e tempo-resposta. As curvas de concentração e tempo mortalidade foram usadas para calcular as respectivas razões de toxicidade (RT). O comportamento locomotor dos insetos adultos das diferentes populações foi estudado em dois ensaios de caminamento, um em superfície completamente tratada e outro em superfície parcialmente tratada (1/2) com cada um dos óleos essenciais. As concentrações utilizadas nos bioensaios comportamentais foram 0,64  $\mu\text{L cm}^{-2}$  para o óleo essencial de cravo e 1,23  $\mu\text{L cm}^{-2}$  para o óleo essencial de canela, que correspondem à CL<sub>95</sub> para a população mais susceptível aos óleos (Guaxupé). As características comportamentais avaliadas foram distância percorrida, velocidade de

caminhamento, tempo de repouso e número de paradas. Adicionalmente, foram avaliadas as taxas de crescimento populacional (ri), as taxas respiratórias (produção de CO<sub>2</sub>) e massa corpórea das cinco populações de *Sitophilus zeamais*. Observou-se que a CL<sub>95</sub> para o óleo essencial de cravo variou em ordem crescente de 0,64 a 2,44 µL cm<sup>-2</sup> para Guaxupé, Cristalina, Coimbra, Piracicaba e Guarapuava, respectivamente. Já para o óleo de canela, a variação foi de 1,23 a 6,84 µL cm<sup>-2</sup> para Guaxupé, Piracicaba, Coimbra, Cristalina e Guarapuava, respectivamente. As TL<sub>50</sub> dos óleos essenciais de cravo e de canela reduziram à medida que a concentração destes óleos foi aumentada. Os maiores valores de TL<sub>50</sub> foram encontrados para a população de Piracicaba, tanto para cravo quanto para canela. As características comportamentais de caminhamento (distância percorrida, velocidade e tempo de repouso) na área tratada variaram entre os óleos e populações. Entretanto, os insetos das populações apresentaram irritabilidade aos dois óleos, e sua permanência foi maior nas superfícies não tratadas. A toxicidade dos óleos essenciais afetou a taxa respiratória dos insetos na maioria das populações, reduzindo a produção de CO<sub>2</sub>, principalmente no tratamento com óleo de cravo. Houve variação nas taxas de crescimento das populações em resposta ao tratamento dos grãos com os óleos, sendo que algumas populações sofreram maior efeito do outras, porém em doses acima de 2 µL/g nos grãos, ambos os óleos levaram a taxas de crescimento populacionais nulas ou quase nulas. Assim, com os resultados obtidos nesta pesquisa pode-se concluir que os óleos essenciais de cravo e de canela têm um significativo efeito por contato na mortalidade de *Sitophilus zeamais*, sendo uma alternativa ao uso de inseticidas tradicionais.

## ABSTRACT

GONZALEZ CORREA, Yenis del Carmen, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Responses of *Sitophilus zeamais* populations to exposure to the essential oils of clove and cinnamon.** Adviser: Leda Rita D'Antonino Faroni. Co-advisers: Raul Narciso Carvalho Guedes and Eliseu Jose Guedes Pereira.

The present study was designed to evaluate the toxicity, locomotory behavior, population growth rate and respiratory rate in adult insects of Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* subjected to exposure to the essential oils of cloves and cinnamon. The populations were collected in the cities of Guarapuava (PR), Guaxupé (MG), Coimbra (MG), Piracicaba (SP), and Cristalina (GO). The toxicity of the oils was tested at different concentrations (0.18, 0.35, 0.71, 1.41 and 2.12  $\mu\text{L cm}^{-2}$ ) diluted in acetone (6:4 v/v). The experimental unit consisted of Petri dishes (6 x 1.2 cm) containing filter paper impregnated with essential oil. Twenty adults of *Sitophilus zeamais* were transferred to dishes, and mortality was assessed every three hours for 108 hours. Lethal concentrations  $\text{LC}_{50}$  and  $\text{LC}_{95}$ , and lethal time  $\text{LT}_{50}$  were estimated for adults of *Sitophilus zeamais* using concentration- and time-mortality bioassays, and used to calculate the toxicity ratio (TR) of the oils for each population. The locomotory behavior of the insects was evaluated in two bioassays using arenas with surfaces completely and partially (half) treated with each of the essential oils. The concentrations used were 0.64 and 1.23  $\mu\text{L cm}^{-2}$  for clove and cinnamon oils, respectively, which correspond to the  $\text{LC}_{95}$  for the most susceptible population (Guaxupé). Behavioral parameters measured were distance walked, walking speed, resting time, and number of stops. Additionally, we assessed population growth rates (ri), respiration rates ( $\text{CO}_2$  production) and body mass for the populations studied. It was observed that the  $\text{LC}_{95}$  for the essential oil of cloves varied from 1.23 to 6.84  $\mu\text{L cm}^{-2}$ , and the ascending order of susceptibility of the populations was Guaxupé, Cristalina, Coimbra, Piracicaba and Guarapuava. For cinnamon oil,  $\text{LC}_{95}$  values varied from 0.64 to 2.44  $\mu\text{L cm}^{-2}$  for

Guaxupé, Piracicaba, Coimbra, Cristalina and Guarapuava.  $LT_{50}$  values for the essential oils reduced as their concentration increased, and with the population of Piracicaba showing the highest  $LT_{50}$  values for both clove and cinnamon oils. Locomotory parameters (distance, speed and resting time) in the treated area varied with the oils and populations. However, insects from all populations showed irritability to the two oils, preferring to stay in the untreated surfaces. The toxicity of the essential oils affected the respiratory rate of the insects reducing the  $CO_2$  output, especially cinnamon oil. When maize grains were treated with the oils, some populations experienced higher reduction in the instantaneous growth rate than others in, but at concentrations above 2  $\mu L/g$  in the grains, both oils led to zero population growth rates. Thus, with the results obtained in this study we can conclude that the essential oils of cloves and cinnamon have a significant effect on mortality by contact of and represent an alternative to using traditional insecticides.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de grãos nas diferentes regiões do mundo tem aumentado nas últimas décadas, destacando-se o Brasil como um dos maiores produtores mundiais. A estimativa de produção brasileira para a safra 2010/2011 é de 149,41 milhões de toneladas, volume 0,1% superior ao da safra anterior. O milho e a soja contribuem substancialmente para o aumento da produção de grãos no Brasil, tendo atingido 55,97 e 68,67 milhões de toneladas, respectivamente, na safra 2009/2010, o que corresponde a 83,51% da produção anual de grãos do país (CONAB, 2011). Todavia, com o aumento na produção de grãos, têm sido evidenciadas perdas durante os processos de pré-processamento e armazenamento devido à falta e à ineficiência de estruturas armazenadoras. Normalmente, o armazenamento é feito em condições inadequadas, ocorrendo redução da qualidade dos grãos ocasionada principalmente pelo ataque de insetos (Anderson et al., 1990; Fernandes & Sousa-Filho, 2001).

Entre os insetos-praga de maior impacto na pós-colheita, encontra-se o gorgulho-do-milho, *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae), uma das pragas mais destrutivas dos grãos. Registra-se que as maiores dificuldades para o manejo e controle do gorgulho-do-milho se devem às características da praga, tais como seu grande número de hospedeiros, elevado potencial biótico, grande capacidade de penetração no interior de grãos e possibilidade de infestação tanto no campo quanto nas unidades armazenadoras (Faroni & Sousa, 2006). Adicionalmente, as primeiras fases de desenvolvimento ocorrem e se completam no interior dos grãos (Costa et al., 2006).

Nas últimas décadas, uma das formas de controle mais comuns do *S. zeamais* tem sido o uso do fumigante fosfeto de alumínio. O uso indiscriminado desse inseticida, cujo princípio ativo é a fosfina, representa um grande risco de desenvolvimento de resistência a esse produto, pois o uso contínuo de um determinado inseticida durante muito tempo, aliado a técnicas de aplicação inadequadas, provoca aumento da pressão

de seleção de indivíduos resistentes (McKenzie, 1996). No Brasil, já foram detectadas raças ou populações de *S. zeamais* resistentes à fosfina (Guedes et al., 1995) e aos principais inseticidas de contato (organofosforados e piretróides). Pesquisas recentes demonstraram que existem diferenças entre as populações brasileiras de *S. zeamais* na sua capacidade de resistência à fosfina associada a alguns caracteres fisiológicos, especialmente à taxa respiratória (Pimentel et al., 2007; 2009).

Salienta-se que o *S. zeamais* é um inseto-praga que ataca constantemente produtos grãos de milho e seus subprodutos sob condições de armazenamento. Por tal motivo, a frequência e a intensidade de uso dos inseticidas químicos tradicionais conduzem ao fracasso no controle, pois a rotação de inseticidas é prejudicada pelo número reduzido de ingredientes ativos. Dessa forma, é imprescindível que novas formas de controle sejam desenvolvidas e uma delas está no emprego de inseticidas botânicos. As plantas possuem substâncias secundárias que podem agir como fatores de defesa contra insetos, patógenos e microrganismos (Potenza et al., 2004). Alguns autores relatam que já foram identificados cerca de 100.000 metabólitos secundários em mais de 200.000 espécies de plantas, tais como alcalóides, terpenóides, flavonóides e quinonas, os quais possuem ação inseticida e se encontram nos óleos essenciais (Vendramim e Castiglioni, 2000; Potenza et al., 2004).

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis orgânicos produzidos como metabólitos secundários nas plantas, constituídos por hidrocarbonetos (monoterpenos e sesquiterpenos) e compostos oxigenados (álcoois, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas e fenóis) (Guenther, 1972; Nerio et al., 2009). Estes metabólitos secundários podem ser extraídos de sementes, caules, folhas e flores por meio de destilação por arraste a vapor, apresentando um grande potencial de uso por suas atividades antioxidantes, fungicidas, bactericidas e inseticidas (Carson & Riley, 1995, Hammer et al., 1999; Chao & Young, 2000; Santurio et al., 2007; Nerio et al., 2010).

Os óleos essenciais apresentam múltiplos modos de ação sobre os insetos, tais como toxicidade aguda, repelência, redução da alimentação, inibição do crescimento, limitações no desenvolvimento e na reprodução (Coats, 1994). Pesquisas com óleos vegetais têm sido realizadas com o fim de verificar a ação repelente e fumigante no controle de insetos-praga de produtos agrícolas durante o armazenamento (Tsao et al., 2002; Maier et al., 2006; Rajendran e Sriranjini, 2008; Paes, 2008). Todavia, o uso de óleos essenciais para o manejo de insetos-praga de grãos armazenados tem sido limitado (Jones et al., 2003).

O óleo essencial de espécies vegetais pertencentes às famílias Asteraceae, Ranunculaceae, Myrtaceae, Brassicaceae, Umbelliferae, Piperaceae, Labiatae, Lauraceae e Verbenaceae tem demonstrado repelência contra insetos da ordem Coleoptera (Nerio et al 2010). Dentre as espécies vegetais que produzem óleos essenciais com potencial inseticida para o controle de pragas, encontram-se o cravo da índia (*Syzygium aromaticum*) e a canela (*Cinnamomum zeylanicum*). O cravo pertence à família Myrtaceae e é originário da Indonésia, sendo cultivado em diversos países como Brasil e na região do Caribe. Seu óleo essencial, rico em eugenol, é empregado na odontologia devido às propriedades antissépticas. A canela (*Cinnamomum zeylanicum*) pertence à família Lauraceae, sendo originária do Sri Lanka. A parte externa do seu tronco é empregada como especiaria, seu óleo essencial é rico em cinamaldeído. Embora as espécies mencionadas produzam óleos essenciais e sua composição apresente compostos com propriedades inseticidas, pouco se conhece a respeito da eficácia destes óleos no controle de insetos-praga de produtos armazenados.

Em decorrência do exposto, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a toxicidade dos óleos essenciais de cravo e de canela para populações de *S. zeamais* e o comportamento locomotor, o crescimento populacional e a taxa respiratória de adultos deste inseto em resposta à exposição aos óleos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Populações de *Sitophilus zeamais***

Para condução dos bioensaios, foram utilizadas cinco populações de *S. zeamais* coletadas entre 2004 e 2007, provenientes de diferentes localidades dos estados de São Paulo (SP), Goiás (GO), Paraná (PR) e Minas Gerais (MG) (Tabela 1 e Figura 1). Os insetos foram criados e multiplicados em frascos de vidro de 1,5 L, utilizando grãos de milho como substrato alimentar, com teor de água de 13%, base úmida (b.u), em câmaras climáticas tipo B.O.D., sob condições constantes de temperatura de  $27 \pm 2$  °C, umidade relativa de  $75 \pm 5\%$  e escotofase de 24 h.

### **2.2. Óleos essenciais**

Foram utilizados óleos essenciais extraídos do cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) e da canela (*Cinnamomum zeylanicum*). Os óleos foram fornecidos pela Clínica de Doenças de plantas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Foi utilizada acetona em grau analítico (99,8%, Vetec Química Fina, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) como solvente para diluição dos óleos.

### **2.3. Bioensaios de curvas concentração e tempo-resposta**

Inicialmente, foram realizados testes preliminares para estimar a concentração em que não ocorresse mortalidade dos insetos (extremo inferior) e a concentração em que ocorresse maior mortalidade (extremo superior). Com base nos dados obtidos, foram estabelecidas cinco concentrações que variaram entre 0,18 a  $2,12 \mu\text{L cm}^{-2}$  para os bioensaios definitivos. Os insetos foram expostos aos óleos, em cada concentração, por períodos de tempo que variaram de 3 a 108 horas. Ao final de cada período de exposição, foi contabilizado o número de insetos mortos. Com o objetivo de padronizar

a avaliação, os insetos eram considerados mortos quando não respondiam a estímulos provocados por um único toque com a pinça.

Foram utilizadas quatro repetições com 20 insetos adultos cada uma, que constituía a unidade experimental, para cada concentração e cinco populações. Os insetos foram colocados em placas de Petri (60 mm de diâmetro × 10 mm de altura) contendo papel de filtro com 60 mm de diâmetro, vedadas com tecido organza, tendo sido feita a aplicação dos óleos essenciais com uma microsseringa Hamilton<sup>®</sup> (200 µL). Depois de colocados os insetos, as placas foram cobertas com tecido tipo organza para evitar o escape dos insetos. Estas placas foram mantidas em câmaras climáticas do tipo B.O.D., à temperatura de 27±2 °C. A cada três horas os insetos mortos foram contabilizados, até completar 120 horas.

**Tabela 1.** Procedência das populações de *Sitophilus zeamais*.

Código	Cidade	Estado (Abreviação)	Local de coleta	Produto	Mês/Ano
1	Coimbra	Minas Gerais (MG)	Lavoura de milho	Milho	Abr/2007
2	Cristalina	Góias (GO)	Armazém graneleiro	Milho	Dez/2006
3	Guarapuava	Paraná (PR)	Silo metálico	Milho	Ago/2006
4	Guaxupé	Minas Gerais (MG)	Silo metálico	Milho	Ago/2005
5	Piracicaba	São Paulo (SP)	Laboratório	Milho	Ago/2004

#### 2.4. Bioensaios comportamentais

Dois ensaios foram realizados para avaliar a capacidade locomotora dos insetos mediante o uso de arenas totalmente ou parcialmente (metade) tratadas com óleos de cravo e de canela, respectivamente. Foram utilizadas placas de Petri com 13,5 centímetros de diâmetro e dois centímetros de altura, cujo fundo foi recoberto com discos de papel-filtro e as paredes revestidas com Teflon<sup>®</sup> PTFE (Dupont, São Paulo, Brasil) para evitar o escape dos insetos. O disco de papel-filtro foi considerado tratado

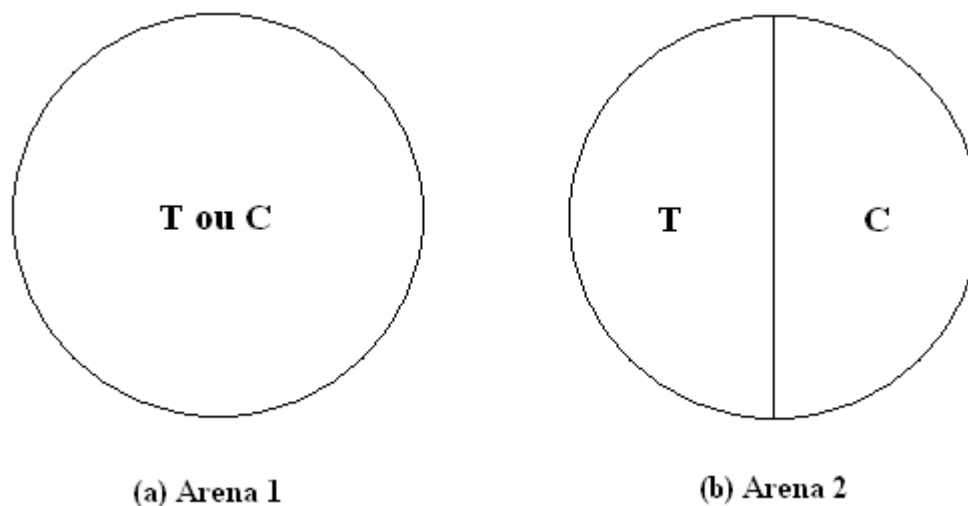
quando embebido com 3 mL da solução com os óleos. As concentrações utilizadas foram de 0,64  $\mu\text{L cm}^{-2}$  para o óleo essencial de cravo e de 1,23  $\mu\text{L cm}^{-2}$  para o óleo essencial de canela. As soluções proporcionavam, após a evaporação do solvente, uma concentração correspondente à  $CL_{95}$  da população (Guaxupé), que foi considerada padrão de susceptibilidade nos testes de bioensaios para os dois óleos essenciais. Em avaliações preliminares, verificou-se que as concentrações utilizadas não foram letais aos insetos para o período de exposição utilizado (10 min). O controle foi tratado apenas com 3 mL do solvente (acetona). Os discos eram tratados em capela de exaustão e deixados secando por um período de 5 a 10 min.

O primeiro ensaio comportamental foi constituído de arenas impregnadas com cada um dos óleos essenciais ou apenas com o solvente (controle) (Figura 1a). As características avaliadas foram distância percorrida, tempo em repouso, velocidade de caminamento e número de paradas na arena. No segundo ensaio, uma única arena foi confeccionada com uma metade da área tratada com cada um dos óleos essenciais e a outra metade não tratada (controle). Inicialmente, inseriu-se no fundo da placa o disco de papel filtro tratado apenas com solvente; em seguida, foi colocada sobre o disco tratado com solvente a metade de um disco tratado com uma solução do óleo essencial (Figura 1b). Para evitar o deslocamento do disco tratado com o óleo, utilizou-se cola branca sobre o disco controle. A característica comportamental avaliada foi o tempo total de permanência do inseto na área tratada comparada com sua permanência na área controle da arena sem óleos.

Em ambos os ensaios, foram utilizados insetos adultos, com aproximadamente 15 dias após a emergência dos grãos. Um único inseto foi colocado no centro da arena e os parâmetros comportamentais, por um período de 10 min, foram monitorados por uma câmera de vídeo acoplada a um computador (ViewPoint Life Sciences Inc., Montreal –

Canadá). As avaliações comportamentais foram realizados a partir das 8 até as 18 h, em sala com iluminação artificial, cuja temperatura média foi de  $27\pm 3$  °C.

O experimento foi delineado inteiramente ao acaso e estruturado em um fatorial (5 populações x 2 óleos) com 20 repetições, cada repetição constituindo um único inseto. A cada repetição, a placa de Petri e os papéis-filtro foram trocados.



**Figura 1.** Arenas de caminamento de *Sitophilus zeamais* no teste com o ViewPoint. (a) Arena com disco impregnado com os óleos (tratado - T) ou com o disco sem óleos embebido com acetona (controle - C); (b) Arena com metade da área tratada (tratado - T) e metade não tratada (controle - C).

## 2.5. Bioensaios de respirometria e massa corpórea

Os ensaios de respirometria foram feitos em condições de laboratório, utilizando-se um respirômetro do tipo CO<sub>2</sub> Analiser TR 2 (Sable System International, Las Vegas, EUA) e metodologia adaptada de Guedes et al. (2006) e Pimentel et al. (2007). Para mensuração da taxa respiratória média (produção de CO<sub>2</sub>), foram utilizados cinco repetições de 20 insetos adultos (não-sexados) de cada população. Os insetos

foram expostos em placas de Petri tratadas ou não com óleos essenciais nas mesmas concentrações utilizadas nos bioensaios de caminhamento, por um período de 10 min. Em seguida, foram acondicionados em câmaras respirométricas, com capacidade volumétrica de 25 mL, conectadas a um sistema completamente fechado. A mensuração da quantidade de CO<sub>2</sub> produzida pelos insetos foi feita três horas depois. 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 600 mL min<sup>-1</sup> por um período de dois minutos. 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 contido no interior de cada câmara. No controle, utilizou-se uma câmara respirométrica sem insetos. Após a mensuração do CO<sub>2</sub>, os insetos foram removidos das câmaras e em seguida pesados em balança analítica modelo Sartorius BP 210D (Göttingen, Germany).

## **2.6. Bioensaios de taxa instantânea de crescimento (ri)**

Este ensaio foi estabelecido utilizando-se um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco de vidro com capacidade de 0,8 L, contendo 250 g de grãos de milho com teor de água de 14% b.u. (base úmida), isentos de pragas e inseticida. Posteriormente, os grãos de milho foram submetidos aos tratamentos com os óleos essenciais de cravo e de canela nas doses de 0, 60, 120, 250, 500 e 1000 µL. Os óleos foram aplicados diretamente sobre os grãos de milho com uma microseringa, tendo sido os grãos homogeneizados por 30 segundos. No tratamento controle, os grãos foram tratados apenas com acetona. Todos os frascos foram expostos ao ar ambiente por 10 min. Em seguida, foram acrescentados a cada frasco, posteriormente fechado com tecido tipo organza, 20 insetos adultos não-sexados, com idade entre 0 a 15 dias após a emergência.

Depois de colocados os insetos, os frascos foram armazenados em câmaras climáticas do tipo B.O.D. a  $27 \pm 2$  °C, umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12 horas. Após 60 dias, foram avaliados o número de insetos vivos e mortos e o peso final da massa de grãos. A taxa instantânea de crescimento populacional ( $r_i$ ) foi calculada, utilizando a equação a seguir (Stark & Bank, 2003).

$$r_i = \frac{\left[ \ln \left( \frac{N_f}{N_0} \right) \right]}{\Delta t}$$

Em que:

$r_i$  = Taxa instantânea de crescimento populacional;

$N_f$  = Número final de insetos vivos;

$N_i$  = Número inicial de insetos vivos; e

$\Delta T$  = Variação de tempo (número de dias em que o ensaio foi realizado).

## 2.7. Análises Estatísticas

Os dados de toxicidade foram submetidos à análise de probit, utilizando-se o procedimento PROBIT do software SAS (SAS Institute, 2002), gerando assim as curvas de concentração-mortalidade e tempo-mortalidade.

Para o caminhamento dos insetos, os dados foram submetidos à análise de variância múltipla (MANOVA) e simples (ANOVA). Em seguida, foram submetidos à análise de sobrevivência, utilizando-se o procedimento de análises de regressão COX (SAS Institute, 2002).

A produção de CO<sub>2</sub> e a massa corpórea de *S. zeamais* foram submetidas à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste LSD (Least Square Difference) ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o procedimento PROC GLM do programa SAS (SAS Institute, 2002). Adicionalmente, foram feitas análises de correlação empregando

o procedimento PROC CORR do SAS (SAS Institute, 2002) entre estas duas variáveis com o intuito de estudar a possível relação entre elas.

Os dados da taxa instantânea de crescimento populacional ( $r_i$ ) foram submetidos à análise de covariância (tratamento com os óleos essenciais e controle  $\times$  população), tendo como covariável as doses, utilizando-se o PROC GLM com procedimento de ANCOVA (SAS Institute, 2002). Em seguida, foi feito o desdobramento dos dados, aplicando-se o teste LSD ( $p < 0,05$ ) para comparar as médias entre os tratamentos com os óleos essenciais (SAS Institute, 2002); finalmente, análise de regressão, utilizando-se o Sigma Plot (SPSS, 2001).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Bioensaio de curvas concentração e tempo-resposta

Os dados de sobrevivência dos adultos de *S. zeamais* variaram significativamente entre os tratamentos com os óleos essenciais de cravo e de canela e o controle ( $\chi^2 = 22,89$ ;  $P < 0,0001$ ); entre as populações do inseto ( $\chi^2 = 18,63$ ;  $P < 0,0001$ ); e entre as concentrações dos óleos ( $\chi^2 = 1239,35$ ;  $P < 0,0001$ ). Estes resultados são indicativos de que os óleos essenciais de cravo e de canela são tóxicos para as populações de *S. zeamais*, e esta toxicidade varia em função da concentração destes óleos, conforme descrito nos resultados a seguir.

Os resultados das curvas de concentração-mortalidade e tempo-mortalidade das populações de *S. zeamais* expostas aos óleos essenciais de cravo e de canela são apresentados na Tabela 2 e na Figura 2. Estas curvas foram utilizadas para identificar a população padrão de susceptibilidade bem como a toxicidade dos óleos essenciais de cravo e de canela para as populações de *S. zeamais*. As  $CL_{50}$  ( $\mu\text{L cm}^{-2}$ ) das populações variaram de 0,46 a 0,92 para cravo e de 0,70 a 1,74 para canela. Já as  $CL_{95}$  ( $\mu\text{L cm}^{-2}$ ) variaram de 0,64 a 3,96 para cravo e de 1,23 a 6,84 para canela.

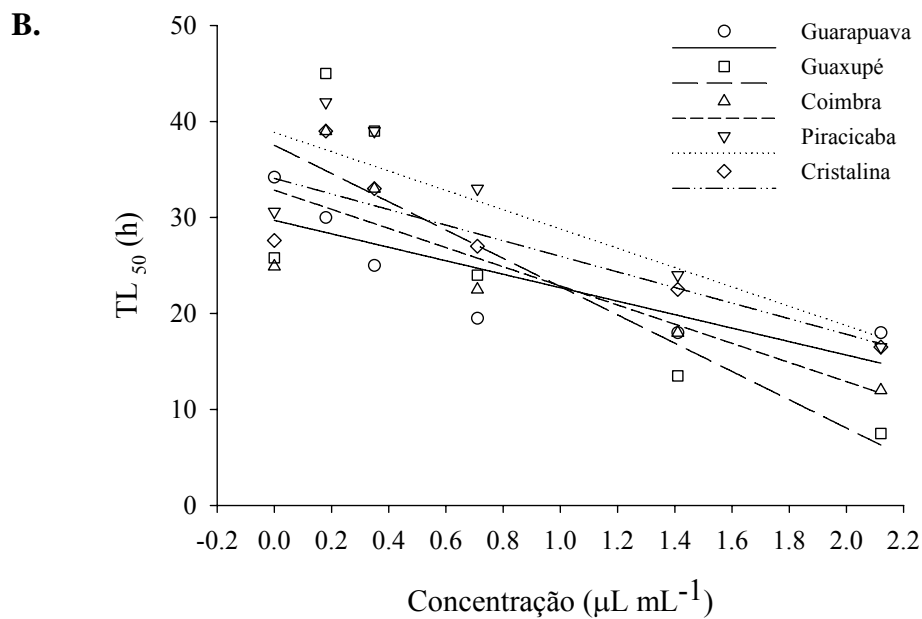
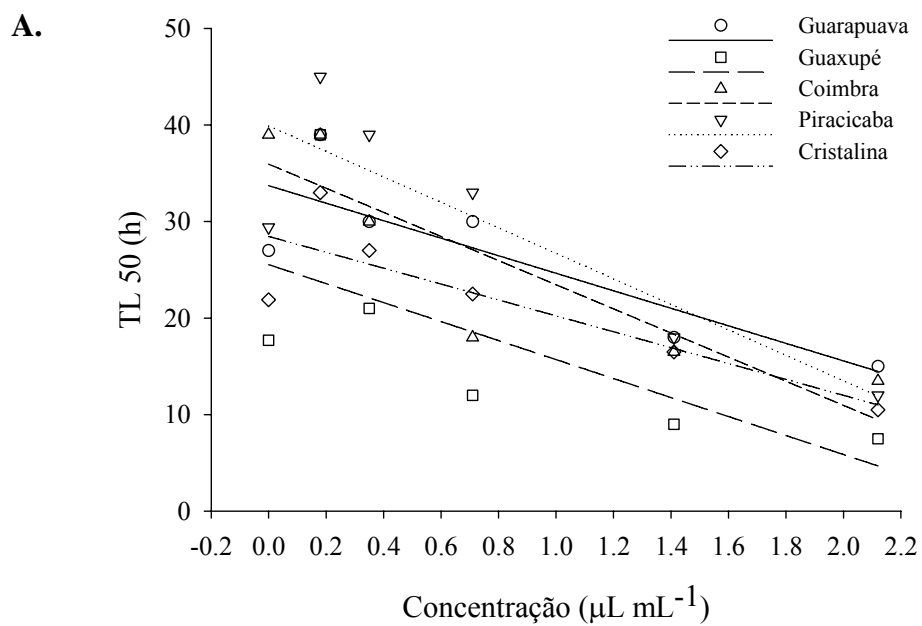
Dentre as populações avaliadas, a população de Guaxupé foi a que apresentou menores valores de  $CL_{50}$  e  $CL_{95}$ , tanto para cravo (0,46 e 0,64  $\mu\text{L cm}^{-2}$ ) como para canela (0,70 e 1,23  $\mu\text{L cm}^{-2}$ ) (Tabela 2). Em decorrência disto, esta população foi considerada padrão de susceptibilidade nos bioensaios com os dois óleos. De um modo geral, observa-se que a razão de toxicidade (RT) para a  $CL_{50}$  em todas as populações foi baixa. Porém, a RT para a  $CL_{95}$  foi, em geral,  $> 2,00$ , indicando que há variação na resposta destas populações à toxicidade dos óleos essenciais de cravo e de canela, sendo necessário adotar doses letais diferentes para cada população.

Com relação ao  $TL_{50}$ , para cada população de *S. zeamais*, observa-se que houve variação em função da concentração utilizada. Na Figura 2, observa-se para ambas as populações que as  $TL_{50}$  dos óleos essenciais de cravo e de canela reduziram à medida que a concentração destes óleos foi aumentada. Os modelos ajustados para representar esta variação encontram-se na Tabela 3. Observa-se ainda na Figura 2 que os maiores valores de  $TL_{50}$  foram encontrados para a população de Piracicaba, tanto para cravo quanto para canela. Com isso, pode-se afirmar neste estudo que esta população é mais tolerante aos efeitos tóxicos dos óleos essenciais de cravo e de canela em relação às demais.

**Tabela 2.** Concentrações letais dos óleos essenciais de cravo (A) e de canela (B) para as populações de *Sitophilus zeamais*.

Tratamento	População	Nº de Insetos	Inclinação ± (EPM)	CL <sub>50</sub> (95% IC) (µL cm <sup>-2</sup> )	RT (95% IC) CL <sub>50</sub>	CL <sub>95</sub> (95 % IC) (µL cm <sup>-2</sup> )	RT (95% IC) CL <sub>95</sub>	χ <sup>2</sup>	Prob.
Cravo	Guaxupé	280	11.0 ± 1.13	0.46 (0.44 – 0.48)	-	0.64 (0.60 – 0.71)	-	2.76	0.25
	Cristalina	260	3.17 ± 0.32	0.65 (0.57 – 0.75)	1.43 (1.24 – 1.65)	2.16 (1.70 – 3.06)	3.36 (2.50 – 4.52)	3.28	0.19
	Coimbra	260	3.13 ± 0.48	0.67 (0.41 – 1.00)	1.45 (1.05 – 2.00)	2.23 (1.37 – 7.33)	3.48 (2.60 – 4.65)	7.70	0.05
	Piracicaba	300	2.57 ± 0.28	0.91 (0.77 – 1.10)	1.98 (1.66 – 2.36)	3.96 (2.78 – 6.76)	6.17 (4.00 – 9.51)	0.24	0.89
	Guarapuava	320	3.88 ± 0.37	0.92 (0.82 – 1.03)	2.00 (1.77 – 2.27)	2.44 ( 2.02 – 3.14)	3.79 (3.01 – 4.76)	4.55	0.21
Canela	Guaxupé	280	6.68 ± 1.21	0.70 (0.44 – 1.07)	-	1.23 (0.88 – 9.58)	-	4.76	0.09
	Piracicaba	380	2.83 ± 0.24	0.91 (0.80 – 1.03)	1.30 (1.09 – 1.56)	3.47 (2.75 – 4.74)	2.83 (1.99 – 4.04)	1.32	0.72
	Coimbra	320	5.10 ± 0.57	0.95 (0.87 – 1.05)	1.37 (1.17 – 1.60)	2.00 (1.69 – 2.55)	1.63 (1.20 – 2.22)	2.05	0.36
	Cristalina	320	4.06 ± 0.47	1.47 (1.32 – 1.65)	2.12 (1.79 – 2.50)	3.74 (3.04 – 5.15)	3.06 (2.16 – 4.31)	4.03	0.26
	Guarapuava	280	2.76 ± 0.37	1.74 (1.74 – 2.16)	2.50 (2.00 – 3.12)	6.84 (4.67 – 12.84)	5.59 (3.29 – 9.49)	4.29	0.23

\* E.P.M.=Erro padrão da média; CL=Concentração letal; IC 95%=Intervalo de Confiança a 95% de probabilidade; RT=Razão de toxicidade para CL50 e CL95; χ<sup>2</sup>=Qui-quadrado; e P=Probabilidade.



**Figura 2.** Toxicidade ( $TL_{50}$ ) dos óleos essenciais de cravo (A) e de canela (B) para populações de *Sitophilus zeamais* em função das concentrações dos óleos. Os símbolos representam as medias das quatro repetições em cada população.

**Tabela 3.** Sumário das equações ajustadas por meio de regressão linear para as curvas de toxicidade (TL<sub>50</sub>) dos óleos essenciais de cravo e de canela em função da concentração destes óleos.

Óleo	Populações	Equações ajustadas	G.L.erro	F	P	R <sup>2</sup>
Cravo	Guarapuava	$\hat{y}=33,71 - 12,49x$	4	14,72	0,03	0,72
	Guaxupé	$\hat{y}=25,52 - 9,84x$	4	3,68	0,13	0,48
	Coimbra	$\hat{y}=35,93 - 12,49x$	4	14,72	0,02	0,79
	Piracicaba	$\hat{y}=39,9 - 13,21x$	4	11,87	0,03	0,75
	Cristalina	$\hat{y}=28,44 - 8,23x$	4	11,11	0,03	0,67
Canela	Guarapuava	$\hat{y}=29,69 - 7,02x$	4	9,66	0,04	0,71
	Guaxupé	$\hat{y}=37,51 - 14,73x$	4	9,52	0,04	0,70
	Coimbra	$\hat{y}=32,83 - 9,97x$	4	8,83	0,04	0,69
	Piracicaba	$\hat{y}=38,85 - 10,0x$	4	12,40	0,02	0,76
	Cristalina	$\hat{y}=34,06 - 8,12x$	4	10,08	0,03	0,72

## 3.2. Bioensaios comportamentais

### 3.2.1. Caminhamento em arena completamente tratada

As características comportamentais das populações de *S. zeamais*, em arenas completamente tratadas com os óleos de cravo e de canela, variaram significativamente entre os óleos (Wilks' Lambda = 0,91 d.f. num/den = 8/564; F = 3,33;  $P < 0,001$ ) e entre as populações do inseto (Wilks' Lambda = 0,87 d.f. num/den = 16/862,16; F = 2,53;  $P < 0,0008$ ). Também foi observada interação significativa entre estes dois fatores (Wilks' Lambda = 0,83 d.f. num/den = 32/1041; F = 1,66;  $P < 0,013$ ).

Estes resultados são apresentados na Tabela 4, onde se observa, por meio do resumo da análise de variância dos dados, que a distância percorrida, a velocidade de caminhamento e o tempo de repouso de *S. zeamais* variaram significativamente entre os óleos essenciais e entre as populações; e que a interação entre estes dois fatores foi significativa para as características avaliadas. No entanto, o número de paradas não

variou significativamente entre os óleos essenciais e as populações. Porém, houve interação significativa entre os óleos essenciais x populações para este parâmetro.

**Tabela 4.** Análises de variância da distância percorrida (cm), velocidade de caminhada ( $\text{cm s}^{-1}$ ), tempo de repouso (s) e número de paradas de insetos das populações de *Sitophilus zeamais* expostas aos óleos essenciais de cravo e de canela.

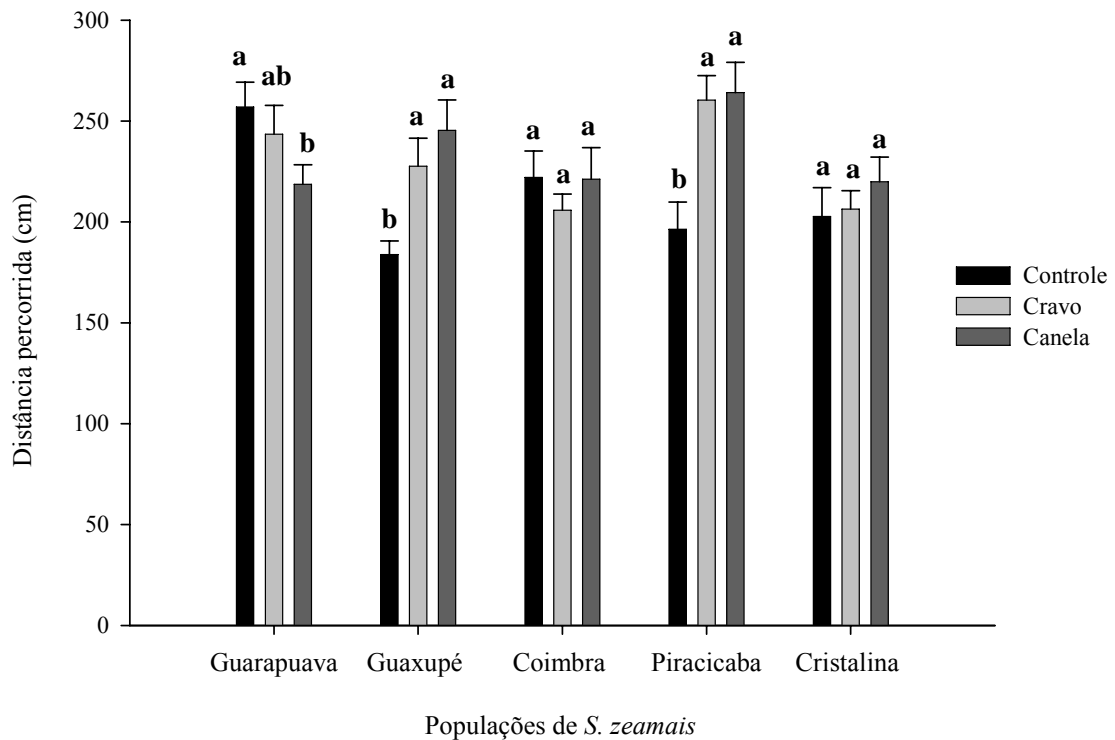
Fonte de Variação	Distância			Velocidade		Tempo em repouso		Nº de paradas	
	GL	F	P	F	P	F	P	F	P
População (Pop.)	4	3,91	0,0041	2,68	0,0319	4,81	0,0009	0,42	0,7960
Óleo	2	4,60	0,0108	4,08	0,0180	8,32	0,0003	2,18	0,1149
Pop. x Óleo	8	3,63	0,0005	3,94	0,0002	3,32	0,0012	2,21	0,0269

A análise de correlação mostrou alta correlação entre a distância percorrida e as demais características avaliadas. Esta correlação foi significativa e positiva entre a distância percorrida e o tempo de repouso ( $r = 0,77$ ;  $P < 0,0001$ ) e entre a distância percorrida e a velocidade de caminhada ( $r = 0,91$ ;  $P < 0,0001$ ); porém foi significativa e negativa entre a distância percorrida e o número de paradas na arena ( $r = -0,42$ ;  $P < 0,0001$ ). Assim, apenas a distância percorrida foi considerada nas análises seguintes, cujas tendências e diferenças são representativas dos demais parâmetros avaliados nestes bioensaios.

Observou-se que a distância percorrida pelos insetos de *S. zeamais* tendeu a aumentar no tratamento com o óleo essencial de canela (Figura 3), exceto para a população de Guarapuava. Nesta população, a distância percorrida pelos insetos de *S. zeamais* nas arenas tratadas com os óleos essenciais foi significativamente menor quando comparada ao controle. Já as populações de Guaxupé e Piracicaba apresentaram comportamento contrário, tendo sido a distância percorrida pelos insetos nas arenas tratadas com os óleos essenciais significativamente maior do que no controle. Porém,

nas populações de Coimbra e Cristalina, não houve diferença significativa entre os tratamentos com os óleos essenciais de cravo e de canela, e o controle.

Quando comparadas as cinco populações de *S. zeamais* em cada um dos tratamentos (óleos essenciais de cravo e de canela, e controle), observou-se que a resposta comportamental apresentada para cada população variou entre estes tratamentos. Na presença do óleo essencial de cravo, as populações que apresentaram maior distância caminhada foram Piracicaba e Guarapuava, que não diferiram entre si para esta característica. As populações com menor valor de distância caminhada neste tratamento foram Coimbra e Cristalina. Em relação à resposta das populações à exposição ao óleo essencial de canela, observou-se que as populações de Piracicaba e Guaxupé foram as que apresentaram maior distância caminhada, no entanto, esta característica foi significativamente maior, em relação às demais, apenas para a população de Piracicaba. As populações de Cristalina e Guarapuava foram as que apresentaram menor valor para esta característica comportamental. Com relação ao controle, verificou-se que as populações de Guarapuava e Guaxupé foram as que apresentaram maior e menor distância percorrida, respectivamente.



**Figura 3.** Distância percorrida (cm) dos indivíduos das populações de *S. zeamais*. Médias seguidas da mesma letra em cada população não diferem entre os tratamentos pelo teste de LSD a 5 % de probabilidade.

### 3.2.2. Caminhamento em arena parcialmente tratada (irritabilidade)

O comportamento dos adultos de *S. zeamais* em arenas parcialmente tratadas com os óleos essenciais de cravo ou de canela foi avaliado por meio de testes de irritabilidade destes óleos aos insetos. Observou-se que o tempo de permanência dos insetos nas áreas tratadas com os óleos essenciais e não tratadas (controle) não diferiu significativamente entre as populações de *S. zeamais* ( $F = 1,78$ ;  $P = 0,1338$ ), tampouco entre os óleos essenciais ( $F = 0,08$ ;  $P = 0,7732$ ). Entretanto, os insetos de cada uma das populações apresentaram irritabilidade aos óleos utilizados no experimento.

Na tabela 5, encontram-se os resultados da proporção média do tempo de permanência dos insetos nas partes tratadas com os óleos essenciais de cravo e de canela e no controle. À exceção da população de Guarapuava, verificou-se que a proporção

média do tempo de permanência dos insetos de *S. zeamais* na porção tratada das arenas com os óleos essenciais, tanto de cravo quanto de canela, foi menor do que na porção não tratada, indicando haver compostos nestes óleos capazes de causar irritabilidade aos insetos.

**Tabela 5.** Proporção média do tempo de permanência de *S. zeamais* nas áreas tratadas com os óleos essenciais de cravo e de canela e não tratadas (controle).

Populações	Óleo de Canela		Óleo de Cravo	
	Controle	Área tratada	Controle	Área tratada
Guarapuava	0,71 ± 0,07 a	0,22 ± 0,05 b	0,74 ± 0,06 a	0,24 ± 0,06 b
Guaxupé	0,58 ± 0,06 a	0,35 ± 0,06 b	0,57 ± 0,06 a	0,35 ± 0,04 b
Coimbra	0,62 ± 0,04 a	0,36 ± 0,05 b	0,73 ± 0,05 a	0,26 ± 0,05 b
Piracicaba	0,76 ± 0,05 a	0,22 ± 0,05 b	0,60 ± 0,07 a	0,32 ± 0,06 b
Cristalina	0,65 ± 0,07 a	0,26 ± 0,07 b	0,73 ± 0,05 a	0,22 ± 0,04 b

\*Médias seguidas por de letras distintas, na linha, em cada um dos óleos diferem significativamente entre si pelo teste LSD ( $P < 0,05$ ).

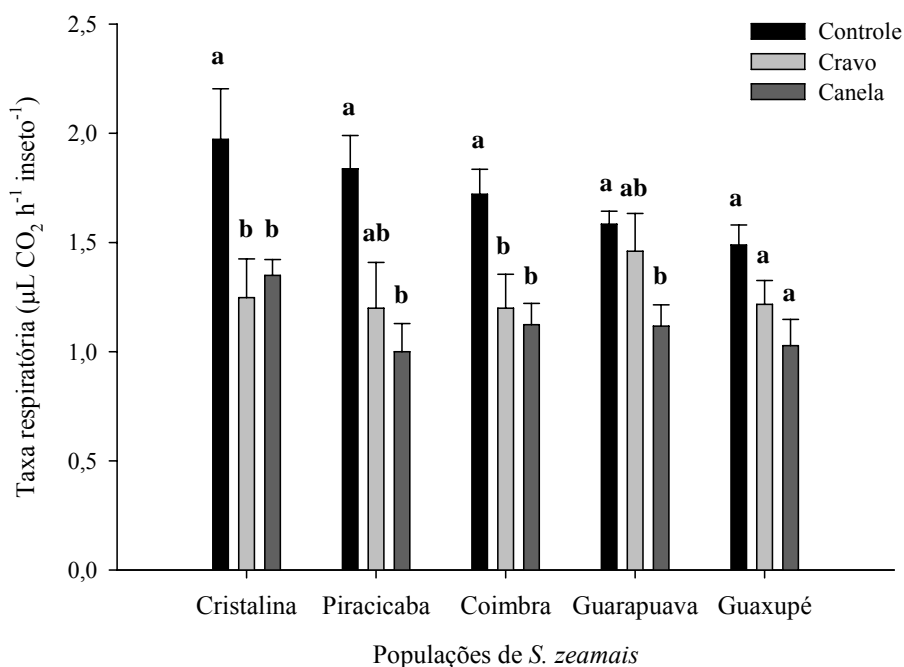
### 3.3. Bioensaios de respirometria

A taxa respiratória, equivalente à liberação de CO<sub>2</sub> pelos insetos, diferiu significativamente entre os tratamentos com os óleos essenciais de cravo e de canela e o controle. Porém, não apresentou diferença significativa entre as populações de *S. zeamais* ( $F_{4,60}=1,53$ ;  $P=0,2046$ ). Também não houve interação entre os tratamentos x populações de *S. zeamais* ( $F_{8,60}=0,97$ ;  $P=0,4685$ ). Na Figura 4, observa-se que em ambas as populações a liberação de CO<sub>2</sub> foi maior que no controle, sendo significativa para as populações de Coimbra, Cristalina, Guarapuava e Piracicaba.

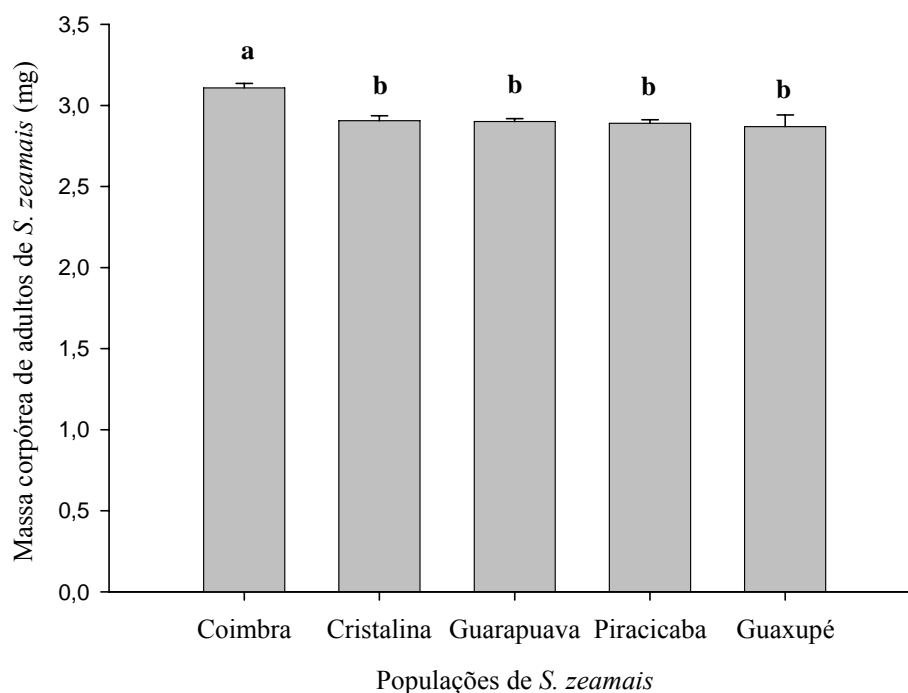
Com relação à massa corpórea dos indivíduos de *S. zeamais*, observou-se variação significativa entre as populações do inseto ( $F_{4,60}=7,59$ ;  $P<0,001$ ). Todavia, não houve variação significativa entre os tratamentos com os óleos essenciais de cravo e de

canela e o controle ( $F_{2,60}=2,63$ ;  $P=0,14$ ), bem como não houve interação significativa entre os tratamentos x populações ( $F_{8,60}=2,85$ ;  $P=0,0095$ ). A população de Coimbra foi a que apresentou maior valor de massa corpórea, sendo este valor significativamente maior em relação aos valores de massa corpórea das demais populações (Figura 5).

Não houve correlação significativa entre a produção de  $\text{CO}_2$  e a massa corpórea dos insetos tanto nos tratamentos com os óleos essenciais de cravo ( $r=0,02$ ;  $P=0,96$ ) e de canela ( $r=0,35$ ;  $P=0,56$ ) como no controle ( $r=0,19$ ;  $P=0,76$ ).



**Figura 4.** Produção de  $\text{CO}_2$  de indivíduos adultos de *Sitophilus zeamais* na presença dos óleos essenciais de cravo e de canela e no controle. Médias seguidas da mesma letra em cada população não diferem entre os tratamentos pelo teste de LSD a 5 % de probabilidade.



**Figura 5.** Massa corpórea de indivíduos adultos de *Sitophilus zeamais* das populações de Coimbra, Cristalina, Guarapuava, Guaxupé e Piracicaba. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre as populações pelo teste de LSD a 5 % de probabilidade.

#### 3.4. Bioensaio de taxa instantânea de crescimento populacional (ri)

Para os dados de taxa instantânea de crescimento das populações de *S. zeamais*, verificou-se diferença significativa entre os tratamentos ( $F_{1,180} = 109,7$ ;  $P < 0,0001$ ); entre as populações ( $F_{4,180} = 174,93$ ;  $P < 0,0001$ ) e entre as doses ( $F_{5,180} = 1367,63$ ;  $P < 0,0001$ ). Também foi verificada interação significativa entre as fontes de variação óleos x populações x doses ( $F_{40,180} = 11,44$ ;  $P < 0,0001$ ).

Na Tabela 6, são apresentados os valores de taxa instantânea de crescimento das populações de *S. zeamais* expostas aos óleos essenciais de cravo e de canela. A população de Guarapuava apresentou valores de taxa instantânea de crescimento significativamente maior do que as demais populações avaliadas, em resposta à exposição tanto ao óleo essencial de cravo como ao óleo essencial de canela. Os menores valores foram observados para a população de Coimbra. De um modo geral, as

taxas instantâneas de crescimento foram menores no tratamento com óleo essencial de cravo do que no tratamento com o óleo essencial de canela. Tal resultado pode ser um indicativo de que o óleo essencial de cravo possua maior efeito inibitório sobre o crescimento populacional de *S. zeamais*.

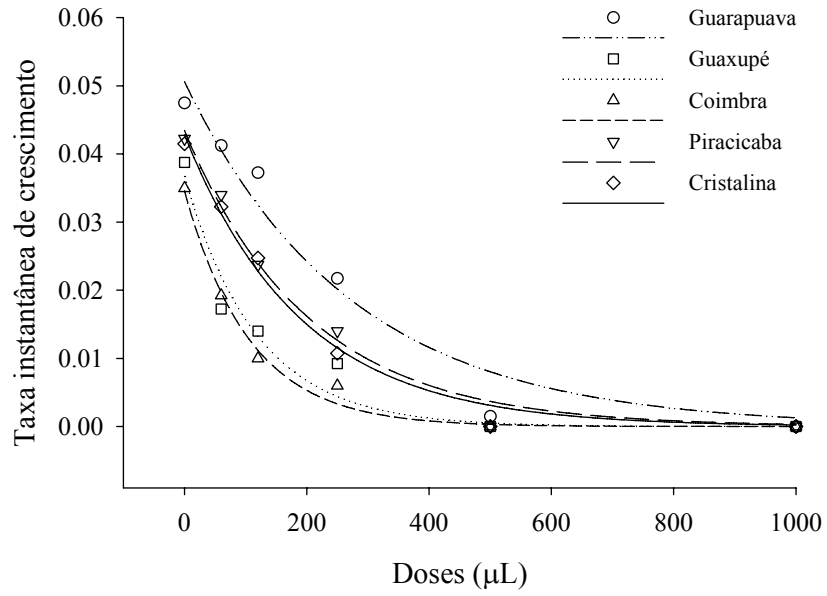
Na Figura 6, estão representados os valores da taxa instantânea de crescimento populacional das populações de *S. zeamais* em função do aumento na dose utilizada dos óleos essenciais de cravo e de canela. Observou-se que a taxa instantânea de crescimento reduziu com o incremento na dose em ambas as populações, tanto para o óleo essencial de cravo como para o óleo essencial de canela. A taxa instantânea de crescimento reduziu de 0,041 para 0,000 no óleo essencial de cravo e de 0,044 para 0,000 no óleo essencial de canela ao longo do período de armazenamento de 60 dias. Os modelos ajustados para representar esta variação encontram-se dispostos na Tabela 8.

**Tabela 6.** Taxa instantânea de crescimento populacional de *Sitophilus zeamais*.

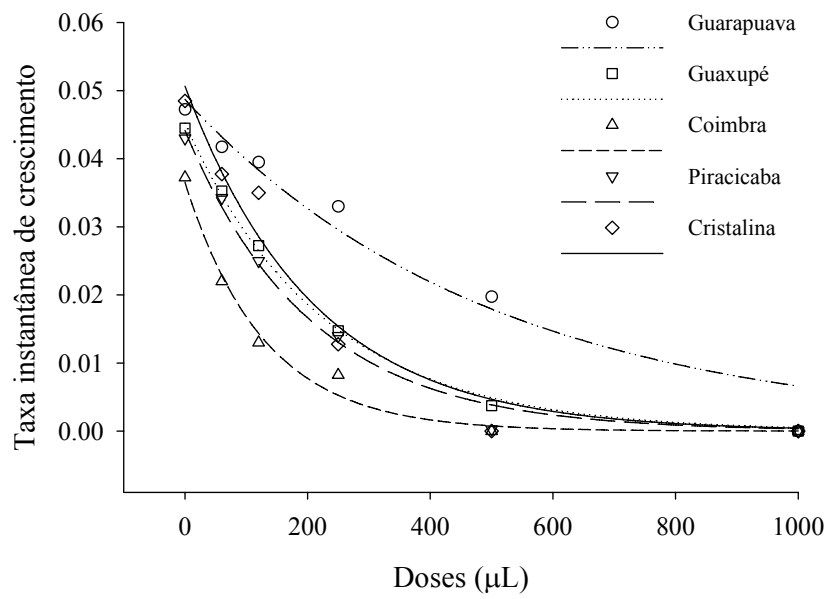
Populações	Cravo	Canela
Guarapuava	0,025 ± 0,0006 Ab	0,030 ± 0,0006 Aa
Guaxupé	0,013 ± 0,0006 Cb	0,021 ± 0,0006 BCa
Coimbra	0,012 ± 0,0006 Cb	0,013 ± 0,0006 Da
Piracicaba	0,019 ± 0,0006 Ba	0,019 ± 0,0006 Ca
Cristalina	0,018 ± 0,0006 Bb	0,022 ± 0,0006 Ba

\*Os valores seguidos por letras maiúsculas distintas na coluna representam diferenças significativas entre as populações e valores seguidos por letras minúsculas distintas na linha representam as diferenças significativas entre os óleos essenciais pelo teste LSD ( $P < 0,05$ ).

A.



B.



**Figura 6.** Taxa instantânea de crescimento populacional dos indivíduos das populações de *Sitophilus zeamais* em função das doses dos óleos de cravo (A) e de canela (B).

**Tabela 7.** Sumário das equações ajustadas para as curvas de taxa instantânea de crescimento de populações de *Sitophilus zeamais* em grãos de milho tratados com os óleos essenciais de cravo e de canela em diferentes doses.

Óleo	Populações	Equações ajustadas	G.L. erro	F	P	R <sup>2</sup>
Cravo	Guarapuava	$\hat{y} = 0,0428\exp(-0,0052x)$	4	353,51	<0,0001	0,99
	Guaxupé	$\hat{y} = 0,0435\exp(-0,0049x)$	4	305,37	<0,0001	0,99
	Coimbra	$\hat{y} = 0,0346\exp(-0,0094x)$	4	392,23	<0,0001	0,99
	Piracicaba	$\hat{y} = 0,0367\exp(-0,0085x)$	4	76,03	0,0010	0,95
	Cristalina	$\hat{y} = 0,0506\exp(-0,0037x)$	4	102,54	0,0005	0,96
Canela	Guarapuava	$\hat{y} = 0,0507\exp(-0,0048x)$	4	112,17	0,0004	0,96
	Guaxupé	$\hat{y} = 0,0442\exp(-0,0049x)$	4	363,80	<0,0001	0,99
	Coimbra	$\hat{y} = 0,0365\exp(-0,0078x)$	4	314,76	<0,0001	0,99
	Piracicaba	$\hat{y} = 0,0452\exp(-0,0044x)$	4	2063,49	<0,0001	0,99
	Cristalina	$\hat{y} = 0,0487\exp(-0,0020x)$	4	91,65	0,0007	0,96

Os parâmetros foram significativos a  $P > 0.05$  pelo teste-t Student.

#### 4. DISCUSSÃO

A atividade inseticida dos óleos essenciais de cravo e de canela utilizados neste experimento apresentou diferenças entre as populações avaliadas. Desse modo, a população de Guaxupé mostrou-se mais susceptível em comparação com as outras populações. Os resultados obtidos confirmaram a hipótese de que existem diferenças na capacidade de tolerar e/ou resposta à composição dos óleos essenciais utilizados neste estudo entre as populações brasileiras de *S. zeamais*, particularmente, os indivíduos provenientes da população de Guaxupé, que exibiu uma menor suscetibilidade aos óleos essenciais. Esse fato pode ser decorrente das características dos compostos químicos presentes na composição de cada óleo essencial, principalmente o eugenol, um dos principais compostos presentes no óleo essencial de cravo (Huang et al., 2002). Estudos prévios desenvolvidos com essas mesmas populações de *S. zeamais* demonstraram que possivelmente o componente genético entre as populações seja determinante na maior resistência à fosfina, o composto químico mais utilizado para o seu controle (Guedes et al., 2006).

Os padrões de resposta à toxicidade e a capacidade locomotora dos insetos em ambas as arenas utilizadas, completa e parcialmente tratadas, apresentaram variação entre as populações, embora pareça não ter havido repelência dos óleos essenciais aos insetos. Porém, foi constatada a irritabilidade provocada por cada um dos óleos essenciais de cravo e de canela aos insetos. Os padrões de caminhamento observados nos insetos das populações utilizadas neste estudo podem estar associados às diferenças existentes no metabolismo das populações que levam à produção de diferentes compostos capazes de influenciar no comportamento dos insetos (Guedes et al., 2006; Guedes *et al.*, 2009a). Essa variação interpopulacional deve ser causada por diferenças nos processos sensoriais dos insetos, podendo levar a uma intensificação ou redução de processos como a taxa respiratória. Essas mudanças podem funcionar como mecanismo

de defesa aos efeitos deletérios provocados pelos inseticidas (Haynes, 1988; Hoy et al., 1998; Desneux et al., 2007). Na espécie *Oryzaephilus surinamensis* também foi observado que os indivíduos procuraram fugir da área tratada com o inseticida para evitar o contato com o mesmo (Watson & Barson, 1996). As modificações no comportamento podem ser estímulo-dependentes, em que o inseticida pode causar irritação nos indivíduos e, com isso, ocorrer fuga da área tratada (McKenzie, 1996). Este pode ser o caso de algumas populações de *S. zeamais* que exibiram uma maior velocidade na área tratada, provavelmente para fugir dessa área mais rapidamente. Por outro lado, resultados encontrados por Beckel et al. (2004) demonstraram que adultos de *Rhizopertha dominica* resistentes à deltametrina reduziram a velocidade sobre a superfície tratada com esse inseticida para evitar ou diminuir o contato com o inseticida.

Os resultados dos bioensaios comportamentais mostraram aumento da distância caminhada, velocidade de caminamento e tempo de repouso das cinco populações, como resposta induzida pela exposição aos diferentes óleos essenciais. Guedes et al. (2008) relataram redução de mobilidade de *Liposcelis bostrychophila* e *L. entomophila* em arenas de concreto parcial (metade) ou totalmente tratadas com  $\beta$ -ciflutrina, clorfenapir e piretrinas. De acordo com Haynes (1988), alguns compostos inseticidas podem estimular ou até mesmo reduzir a mobilidade, afetando o comportamento locomotor dos insetos. Os inseticidas podem deixar os insetos sem coordenação ou até mesmo promover convulsões, podendo interferir significativamente na reprodução, na localização de presas ou alimento, na dispersão, migração e alimentação destes indivíduos (Haynes, 1988).

A toxicidade dos óleos essenciais varia com a taxa respiratória dos insetos (Cotton, 1932), que pode ser mensurada pela produção de CO<sub>2</sub> ou consumo de O<sub>2</sub> (Emekci et al., 2002; 2004; Mitcham et al., 2006). Neste trabalho, a produção de CO<sub>2</sub> dos insetos apresentou variação em resposta aos óleos essenciais de cravo e de canela, e

a massa corpórea apresentou variação entre as populações. Não houve correlação significativa entre a produção de CO<sub>2</sub> e a massa corporal dos adultos de *S. zeamais*. Tal resultado pode ser devido ao fato de não ter ocorrido variação significativa na taxa respiratória dos insetos entre as populações. Estes resultados indicam que, na presença dos óleos essenciais tanto de cravo quanto de canela, os insetos das diferentes populações de *S. zeamais* podem reduzir suas taxas respiratórias, o que pode ser um mecanismo de defesa da espécie para escapar aos efeitos tóxicos dos óleos.

A taxa instantânea de crescimento (ri), que mede o desempenho demográfico das populações, mostrou diferença significativa entre os óleos essenciais, as populações e as doses testadas. A volatilização e a degradação dos óleos essenciais de cravo e de canela podem ser um obstáculo à proteção e ao controle de grãos armazenados contra insetos praga. No entanto, para aplicação de óleos essenciais é necessário o desenvolvimento de tecnologias que permitam maior permanência dos compostos junto à massa de grãos, aumentando assim a eficiência de controle e manutenção da preservação dos grãos. Os óleos concentrados, que foram altamente eficientes na proteção da massa de grãos, e o efeito na mortalidade de adultos de *S. zeamais* podem estar associados à ação de contato e à ingestão dos óleos essenciais, características estas observadas em bioensaios com óleos essenciais (Shaaya et al., 1997; Huang et al., 2002; Lee et al., 2003).

A atividade dos óleos sobre a emergência dos insetos adultos de *S. zeamais* pode estar associada à toxicidade dos óleos voláteis, reduzindo a eclosão de larvas devido à toxicidade apresentada pelos voláteis sobre os ovos (Schmidt et al., 1991) ou pela absorção dos compostos mais abundantes pelos ovos, afetando assim os processos biológicos associados ao desenvolvimento embrionário (Gurusubramanian & Krishna, 1996). As atividades dos óleos essenciais no desenvolvimento larval, em concentrações subletais, ocasionam graves alterações morfológicas na metamorfose e pode inibir a emergência dos adultos de *S. zeamais*. Por isso, óleos voláteis são classificados como

reguladores de crescimento de insetos (RCI) na fase adulta (Khater & Shalaby, 2008; Khater & Khater, 2009; Khater et al., 2009). Adicionalmente a outros trabalhos (Santurio et al., 2007; Nerio et al., 2009) em que é apresentado o potencial da utilização de óleos essenciais de cravo e de canela, seja por contato, repelência ou fumigante, verificou-se, neste estudo, que os óleos essenciais de cravo e de canela poderão tornar-se uma alternativa aos inseticidas convencionais pela redução da taxa de crescimento populacional.

Considerando os resultados obtidos neste estudo, o uso dos óleos essenciais de cravo e de canela contra o *S. zeamais* permite inferir que estes óleos venham a ser uma alternativa para uso nos programas de manejo desse inseto em unidades armazenadoras.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelos resultados obtidos neste trabalho e considerando os objetivos propostos, conclui-se que:

(i) Existem variações entre as populações de *S. zeamais* para responder aos óleos essenciais utilizados neste estudo, particularmente, a população proveniente de Guaxupé, que exibiu uma maior tolerância aos óleos essenciais. O óleo essencial de cravo pode apresentar compostos tóxicos mais abundantes, já que necessita de menor período de exposição para controlar insetos adultos de *S. zeamais*.

(ii) Os óleos essenciais não provocaram um efeito repelente sobre os insetos das populações avaliadas. Contudo, os insetos das diferentes populações apresentaram irritabilidade aos dois óleos utilizados. O comportamento de caminamento dos insetos nas áreas tratadas com os óleos essenciais de cravo e de canela é variável entre as populações, sendo evidenciado por um aumento na distância percorrida, velocidade de caminamento e tempo de repouso das cinco populações.

(iii) O padrão da taxa respiratória entre as populações indica que o grau de tolerância à toxicidade dos óleos essenciais pode estar associado ao metabolismo respiratório dos insetos, onde estes respiraram menos quando expostos aos óleos essenciais.

(iv) Os óleos essenciais de cravo e de canela promoveram redução na taxa de crescimento populacional do *S. zeamais*, e esta redução foi proporcional ao aumento na dose dos óleos utilizada.

(v) Trabalhos futuros deverão ser desenvolvidos com o intuito de explorar o potencial efeito por contato e fumigante que tanto o óleo essencial de cravo quanto o óleo essencial de canela possam exibir pelo uso com misturas, dosagem e sobre outros insetos-praga que atacam os grãos armazenados.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson, K.; Schurle, B.; Reed, C.; Pedersen, J. An economic analysis of producers decisions regarding insect control in stored grain. **North Central Journal of Agricultural Economics**, Urbana, v.12, p.23-29, 1990.

Beckel, H.; Lorini, I.; Lázari, S.M.N. Comportamento de adultos de diferentes raças de *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae) em superfície tratada com deltamethrin. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.48, p.115-118, 2004.

Carson, C.F.; Riley, T.V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of applied bacteriology**, v.78 p.264-269, 1995.

Chao, S.C and Young, D.G.; Screening of inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses, **Journal of Essential Oil Research**, v.12, p.630-649, 2000.

Coats, J. R. Risks from natural versus synthetic insecticides. **Annual Review of Entomology**, v.39 p.489-515, 1994.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira - Grãos Safra 2010/2011 - Quarto Levantamento - Janeiro 2011. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11\\_01\\_06\\_08\\_41\\_56\\_boletim\\_graos\\_4o\\_lev\\_safra\\_2010\\_2011..pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_08_41_56_boletim_graos_4o_lev_safra_2010_2011..pdf). Acesso em 20 de Janeiro de 2011.

Costa, R.R.; Sousa, A.H.; Faroni, L.R.A.; Dhingra, O.D.; Pimentel, M.A.G. Toxicity of mustard essential oil to larvae and pupas of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera:

Curculionidae). **Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Working Conference on Stored-Product Protection**, Campinas: ABRAPOS, p.908-913, 2006.

Cotton, R. T. The relation of respiratory metabolism of insects to their susceptibility to fumigants. **Journal of Economic Entomology**, v.25, n.5, p.1088-1103, 1932.

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.

Emekci, M.; Navarro, S.; Donahaye, J.E.; Rindner, M.; Azrieli, A. Respiration of *Tribolium castaneum* (Herbst) at reduced oxygen concentrations. **Journal of Stored Products Research**, v.38, n.5, p.413-425, 2002.

Emekci, M.; Navarro, S.; Donahaye, E.; Rindner, M.; Azrieli, A., Respiration of *Rhyzopertha dominica* (F.) at reduced oxygen concentrations. **Journal of Stored Products Research**, v.40, n.1, p.27-38, 2004.

Faroni, L.R.A. & Sousa, A. H. Aspectos biológicos e taxonômicos dos principais insetos-praga de produtos armazenados. In: Almeida, F.A.C.; Duarte, M. E. M.; Mata, M. E. R. M. C. **Tecnologia de Armazenagem em Sementes**; Campina Grande: UFCG, p.371-402. 2006.

Fernandes, G.M.B.; Souza Filho, B.F. Armazenamento de sementes de feijão na pequena propriedade. Rio de Janeiro: **PESAGRO**, 5 p., 2001.

Guedes, R.N.C.; Lima, J.O.G.; Cruz, C.D. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **Biological Sciences**, v.31, p. 145-150, 1995.

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, n.1, p.30-38, 2006.

Guedes, R.N.C.; Campbell, J.F.; Arthur, F.H.; Opit, G.P.; Zhu, K.Y.; Throne, J.E. Acute lethal and behavioral sublethal responses of two storedproduct psocids to surface insecticides. **Pest Management Science**, v. 64, p.1314-1322. 2008.

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, n.4, p.393-400, 2009a.

Guenther, E. The essential oils. **Malabar:Krieger**, 427 p., 1972.

Gurusubramanian & Krishna, S.S., The effects of exposing eggs of four cotton insects pests to volatiles of *Allium sativum* (Liliaceae). **Bulletin of Entomological Research**, v.86, p. 29-31, 1996.

Hammer, K.A.; Carson, C.F.; Riley, T.V. Antimicrobial activity of essential oil and other plant extracts. **Journal of applied microbiology**, v.86, p.985-990, 1999.

Haynes, K.F. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. **Annual Review of Entomology**, v.33, p.149-168, 1988.

Hoy, C.W.; Head, G.P.; Hall, F.R. Spatial heterogeneity and insect adaptation to toxins. **Annual Review of Entomology**, v.43, p.571-594, 1998.

Huang, Y.; Chen, S.X.; Ho, S.H. Bioactivities of methyl and allyl disulfide and diallyl trisulfide from essential oil of garlic to two species of stored-product pests, *Sitophilus*

*zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Economic Entomology**, v.93, p. 537-543, 2002.

Jones, O.T.; Phillips, T.W.; Plarre, R. Potential for using semiochemicals to protect Stored Products from insect infestation. **Journal of Stored Products Research**, p.1-25, 2003.

Khater H.F. & Shalaby A.A. Potential of biologically active plant oils to control mosquito larvae (*Culex pipiens*, Diptera: Culicidae) from an Egyptian locality. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.50, p.107-12, 2008.

Khater, H.F., Ramadan, M.Y. and El-Madawy, R.S. Lousicidal, ovicidal and repellent efficacy of some essential oils against lice and flies infesting water buffaloes in Egypt. **Veterinary Parasitology**, v.164, p.257-266, 2009.

Khater, H.F. & Khater, D.F. The insecticidal activity of four medicinal plants against the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). **International Journal of Dermatology**, v.48 p.492-497, 2009.

Lee, S.; Peterson, S.; Chris, J.; Coats, J. R. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. **Journal of Stored Products Research**, v.39, p.77-85, 2003.

Maier, D.E., Hulasare, R., Campabadall, C.A., Woloshuk, C.P., Mason, L. Ozonation as a non-chemical stored product protection technology. **Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Working Conference on Stored-Product Protection**, Campinas: ABRAPOS, p.773-788, 2006.

McKenzie, J.A. The biochemical and molecular bases of resistance: applications to ecological and evolutionary questions. In: McKenzie, J.A (ed). **Ecological and Evolutionary Aspects of Insecticide Resistance**, Academic, Austin, p. 123-147, 1996.

Mitcham, E.; Martin, T.; Zhou, S. The mode of action of insecticidal controlled atmospheres. **Bulletin of Entomological Research**, v.96, n.3, p.213-222, 2006.

Nerio, L.S.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E.E. Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). **Journal of Stored Products Research**, v.45, p.212-214, 2009.

Nerio, L.S.; Olivero-Verbel, J; Stashenko, E. Repellent activity of essential oils: a review. **Bioresourcetechnology**, v.101, p.372-378, 2010.

Paes, J.L.; Faroni, L.R.A.; Martins, M.A.; Dhingra, O.D.; Silva, T.A. Diffusion and sorption of allyl isothiocyanate in the process of fumigation of maize. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, n.3, p.296-301, 2011.

Pimentel, M.A.G.; Faroni, L.R.A.; Tótola, M.R.; Guedes, R.N.C. Phosphine resistance, respiration rate and fitness consequences in stored-product insects. **Pest Management Science**, v.63, n.9, p.876-881, 2007.

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**, v.45, n.1, p.71-74, 2009.

Potenza, M.R.; Arthur, V.; Felicio, J.D.; Rossi, M.H.; Sakita, M.N.; Silvestre, D.F.; Gomes, D.H.P. Efeito de produtos naturais irradiados sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, 71, p.477-484, 2004.

Rajendran, S., Sriranjini, V. Plant products as fumigants for stored-product insect control. **Journal of Stores Products Research**, v.44, p.126-135, 2008.

Santurio, J.M; Santurio, D.F; Pozzatti, P; Moraes, C; Franchin, P.R; Alves, S.H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de Salmonella entérica de origem avícola. **Ciência Rural**, v.37 p.803-808, 2007.

SAS Institute. **SAS/STAT User's Guide**, Version 6.0, Cary: SAS Institute Inc., 2002.

Schmidt, G.H.; Risha, E.M.; El-Nahal, A.K.M. Reduction of progeny of some stored-product Coleoptera by vapours of Acoms calamus oil. **Journal of Stored Products Research**,v.27, n.2, p.121-127, 1991.

Shaaya, E.; Kostjukovski, M.; Eilberg, J.; Sukprakarn, C. Plant oils as fumigants and contact insecticides for the control of stored-product insects. **Journal of Stored Products Research**, v.33, p.7-15, 1997.

SPSS. **Sigma plot User's guide**, Version 7.0 (revised edition), Chicago: SPSS Inc., 2001.

Tsao, R.; Peterson, C.J.; Coats, J.R. Glucosinolate breakdown products as insects fumigants and their effect on carbon dioxide emission of insect. **BMC Ecology**, v.2, n.5, p.1-7, 2002.

Vendramim, J.D.; Castiglione, E. Aleloquímicos, resistência e plantas inseticidas. In: Guedes, J.C., Drester da Costa, I., Castiglione, E. **Bases e Técnicas do Manejo de insetos**. Santa Maria: UFSM/CCR/DFS, Cap. 8, p. 113-128, 2000.

Watson, E.; Barson, G. A laboratory assessment of the behavioural response of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) to three insecticides and the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide. **Journal of Stored Products Research** v.32, p.59-67, 1996.