

ISABEL MOREIRA DA SILVA

**Óleos essenciais no controle de praga e seletividade a organismos não
alvos**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de
Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586o Silva, Isabel Moreira da, 1986-
2016 Óleos essenciais no controle de praga e seletividade a organismos
não alvos / Isabel Moreira da Silva. - Viçosa, MG, 2016.
x, 70f : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Carlos Siqueyuki Sedyama.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Pragas agrícolas - Controle biológico. 2. Manejo integrado de
pragas. 3. Essências e Óleos essenciais. 4. *Diaphania hyalinata*.
5. *Trichospilus pupivorus*. 6. *Apis mellifera*. 7. *Trigona hyalinata*.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia.
Programa de Pós-graduação em Fitotecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 632.96

ISABEL MOREIRA DA SILVA

**Óleos essenciais no controle de praga e seletividade a organismos não
alvos**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 26 de julho de 2016

José Cola Zanuncio
(Coorientador)

Luis Carlos Martínez Castrillón

Pedro Guilherme Lemes Alves

Rosa Angelica Plata Rueda

Carlos Sigueyuki Sediama
(Orientador)

Aos meus pais Antonio Raphael e Maria do Carmo
pelo incentivo, apoio e carinho em todos
os momentos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e sabedoria

Aos meus pais, Antônio Raphael e Maria do Carmo pelo amor, apoio, confiança e incentivo para atingir meus objetivos.

Ao meu irmão, Rafael, pelo companheirismo e amizade.

A minha vó Mirka pelo carinho.

Ao meu orientador Carlos Sigueyuki Sedyama pelos ensinamentos, conselhos e orientação deste trabalho.

Aos conselheiros José Cola Zanuncio, José Eduardo Serrão e Rafael Coelho Ribeiro pelo aprendizado, orientação e sugestões dadas durante o curso.

Aos membros da banca pelas sugestões finais e contribuição para melhoria da qualidade do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Controle Biológico de Inseto, atuais e os que já passaram pelo Laboratório durante o período de mestrado e doutorado, pela ótima convivência, ajuda e aprendizagem.

Aos estagiários do Laboratório de Controle Biológico de Inseto pelo auxílio nos experimentos e ajuda nas manutenções das criações.

Aos amigos de Viçosa, Adriana, Fernandinha, Flavia, Luciana, Lucilene e Nivia pela amizade e carinho em todos os momentos.

Aos funcionários do Apiário pela ajuda na coleta das abelhas.

Aos funcionários do Insetário, Sr. Antonio e Sr. Manuel, pela ajuda durante os experimentos.

A Universidade Federal de Viçosa e o Departamento de Fitotecnia pela oportunidade de desenvolver meu projeto de doutorado.

Aos professores da UFV, grandes mestres, pela contribuição na minha formação profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo concedida.

Aos colegas do curso de pós-graduação.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração desta pesquisa quero apresentar meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

ISABEL MOREIRA DA SILVA, filha de Maria do Carmo Silva e Antônio Raphael da Silva, nasceu na cidade de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, no dia 10 de março de 1986.

Em março de 2005, ingressou no Curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa, Minas Gerais, concluindo-o em janeiro de 2010.

No período de agosto/2007 a julho/2009, durante a graduação, foi bolsista de Iniciação Científica atuando na área de Fruticultura e Controle Biológico de Insetos.

Em agosto de 2010, iniciou o Mestrado em Fitotecnia, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, defendendo a dissertação em julho de 2012.

Em agosto de 2012, iniciou o curso de Doutorado no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se a defesa de tese em 26 de julho de 2016.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
Introdução Geral	1
Objetivo Geral	4
Objetivos específicos	4
Referências	5

Artigo 1

Toxidade de óleos essenciais a <i>Diaphania hyalinata</i> (Lepidoptera: Crambidae) e seletividade ao parasitoide <i>Trichospilus pupivorus</i> (Hymenoptera: Eulophidae)	8
Resumo	9
Introdução	10
Material e Métodos	11
Resultados	14
Discussão	15
Conclusões	18
Agradecimentos	18
Referências	19

Artigo 2

Doses subletais de óleos essenciais afetando o desenvolvimento, ingestão e atividade em grupo de <i>Diaphania hyalinata</i> (Lepidoptera: Crambidae)	28
Resumo:	29
Introdução	30
Material e Métodos	31
Resultados	34
Discussão	35
Conclusões	38

Agradecimentos	38
Referências	39

Artigo 3

Seletividade e resposta comportamental de <i>Apis mellifera</i> Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) e <i>Trigona hyalinata</i> (Lepeletier, 1836) (Hymenoptera: Apidae) a óleos essenciais com potencial inseticida	47
Resumo	48
Introdução	49
Material e Métodos	51
Resultados.....	53
Discussão	54
Conclusões.....	57
Agradecimentos	57
Referências	58
Conclusões Gerais	70

RESUMO

SILVA, Isabel Moreira da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho, 2016. **Óleos essenciais no controle de praga e seletividade a organismos não alvos.** Orientador: Carlos Sigueyuki Sedyama. Coorientadores: José Cola Zanuncio, José Eduardo Serrão, Rafael Coelho Ribeiro.

Diaphania hyalinata (Linnaeus, 1767) (Lepidoptera: Crambidae) é praga chave de Cucurbitaceae e danifica folhas, ramos, brotos e frutos, causando desfolha total da planta em altas populações. Seu controle ocorre basicamente com inseticidas químicos, mas o uso indiscriminado desses produtos pode causar a contaminação ambiental e a morte de organismos benéficos, como inimigos naturais e polinizadores, importantes na agricultura, pelo controle de insetos-praga e pela polinização de plantas cultivadas e silvestres, respectivamente. Alternativas como os inseticidas botânicos e o controle biológico vêm ganhando importância no Manejo Integrado de Pragas (MIP). Inseticidas botânicos são usados, principalmente, por produtores agroecológicos, porém, a toxicidade em organismos não alvo é pouco estudada. O objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência de óleos essenciais sobre imaturos de *D. hyalinata* e a seletividade ao parasitoide *Trichospilus pupivorus* Ferrière, 1930 (Hymenoptera: Eulophidae) e aos polinizadores, *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 e *Trigona hyalinata* (Lepelletier, 1836) (Hymenoptera: Apidae). No primeiro experimento, a toxicidade dos óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho sobre ovos, lagartas (contato, tópico, ingestão) e pupas de *D. hyalinata* e a seletividade a *T. pupivorus* foram avaliadas em diferentes concentrações para a determinação das CL₅₀ e CL₉₀ e o índice de seletividade relativa (ISR₅₀). A fase de ovo de *D. hyalinata* foi a mais sensível aos produtos aplicados com maior toxicidade para o orégano e tomilho. A aplicação tópica foi a menos tóxica para as lagartas de *D. hyalinata*, principalmente, o óleo de gengibre. Os óleos de gengibre, menta e tomilho foram mais tóxicos por ingestão e o orégano por contato a *D. hyalinata*. A fase de pupa foi a menos sensível aos produtos botânicos, em *D. hyalinata* necessitando de maiores concentrações para inviabilizar a emergência de adultos. Os óleos essenciais de gengibre, menta, tomilho e orégano foram seletivos a *T. pupivorus* (ISR₅₀ > 1). A toxicidade desses óleos, a pelo menos, uma fase do ciclo de *D. hyalinata* e a seletividade ao parasitoide *T. pupivorus* possibilita o uso combinado ou sequencial dessas práticas de controle no MIP. No segundo experimento, concentrações subletais dos óleos essenciais

de gengibre, menta, orégano e tomilho foram utilizadas para avaliar o desenvolvimento, deterência alimentar e atividade em grupo de lagartas de *D. hyalinata*. A sobrevivência, viabilidade larval e pupal e o peso das pupas reduziram e a duração do período larval e pupal aumentaram após *D. hyalinata* ingerir folhas tratadas com os óleos de gengibre, menta e tomilho. As lagartas alimentadas com folhas tratadas com orégano não completaram o estágio larval. O óleo de orégano apresentou forte ação antialimentar ($IDA > 80\%$) e os de gengibre, menta e tomilho efeito moderado ($50 < IDA < 80\%$) no teste com e sem escolha. A atividade em grupo de *D. hyalinata* não variou em contato com óleos essenciais. O terceiro experimento avaliou a toxicidade dos óleos de gengibre, menta, orégano e tomilho para *A. mellifera* e *T. hyalinata* e a locomoção desses polinizadores em superfície tratada com esses produtos. Os óleos de orégano e tomilho foram mais tóxicos, principalmente, para *A. mellifera* e os de gengibre e menta apresentaram baixa toxicidade para esses polinizadores. Os óleos foram mais seletivos a *T. hyalinata* que *A. mellifera*. No teste de locomoção, arenas foram tratadas (total ou parcial) com as concentrações CL_{50} dos óleos. No bioensaio com área totalmente tratada, o orégano reduziu a distância percorrida e a velocidade de movimentação e aumentou o tempo de parada para *A. mellifera*, já para *T. hyalinata* estes efeitos foram observados também para o tomilho. Em arena parcialmente tratada, observou irritabilidade para os óleos de gengibre, menta e tomilho para *A. mellifera* e gengibre e tomilho para *T. hyalinata* pelo menor tempo de permanência na área tratada. Os óleos essenciais de gengibre e menta foram mais seletivos para o parasitoide e para ambos polinizadores e com toxicidade a pelo menos uma fase de *D. hyalinata* tendo potencial para o MIP. Devido a toxicidade moderada dos óleos de orégano e tomilho, principalmente, a *A. mellifera* devem ser usados em horário de baixo forrageamento.

ABSTRACT

SILVA, Isabel Moreira da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Essential oils in pest control and selectivity to non-target organisms.** Adviser: Carlos Sigueyuki Sedyama. Co-Advisers: José Cola Zanuncio, José Eduardo Serrão, Rafael Coelho Ribeiro.

Diaphania hyalinata (Linnaeus, 1767) (Lepidoptera: Crambidae) is a key pest of Cucurbitaceae due to the damage caused on leaves, twigs, buds and fruits, which may cause complete plant defoliation in high densities. This pest is controlled mainly with chemical insecticides but the indiscriminate use of these products may cause environmental contamination and death of beneficial organisms, such as natural enemies and pollinators, important for biological control and pollination of crops and wild plants. Alternatives techniques such as botanical insecticides and biological control is becoming more important in Integrated Pest Management (IPM). Botanical insecticides are used mainly by agroecological farmers, but their toxicity to non-target organisms needs further studies. The objective of this work was to verify the effectiveness of essential oils to control *D. hyalinata* of immatures and their selectivity to the parasitoid *Trichospilus pupivorus* Ferriere, 1930 (Hymenoptera: Eulophidae) and the pollinators *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 and *Trigona hyalinata* (Lepeletier, 1836) (Hymenoptera: Apidae). In the first experiment, the toxicity of ginger, mint, oregano and thyme essential oils on *D. hyalinata* eggs, larvae (contact, topic, ingestion) and pupae and their selectivity to *T. pupivorus* were evaluated at different concentrations to determine the CL₅₀ and CL₉₀ and their relative selectivity index (ISR₅₀). The egg stage was the most sensitive to the essential oils with those of oregano and thyme being the most toxics. Topical application was less toxic to the *D. hyalinata* larvae especially for the ginger oil. This oil and those of mint and thyme were more toxic to *D. hyalinata* by ingestion while oregano oil was by contact. Pupae of *D. hyalinata* were less sensitive to the essential oils requiring higher concentrations to prevent adult emergence of this pest. Ginger, mint, thyme and oregano essential oils were selective to *T. pupivorus* (ISR₅₀ > 1). The toxicity of these oils to at least one immature stage of *D. hyalinata* and its selectivity to the parasitoid *T. pupivorus*, make them feasible for combined or sequential use in IPM of this pest. The second experiment had the use of sub-lethal concentrations of ginger, mint, oregano and thyme essential oils to evaluate the development, feeding deterrence index (FDI) and group activity of *D. hyalinata*. Survival, larva and pupa viability and weight of pupae were

reduced while larva and pupa duration of *D. hyalinata* increased with ginger, mint and thyme essential oils. Caterpillars of this pest fed leaves treated with oregano oil did not complete their cycle. The oregano oil showed strong anti-feeding action ($FDI > 80\%$) and the ginger, mint and thyme moderate effects ($50 < FDI < 80\%$) in the tests with and without choice. Group activity of *D. hyalinata* did not change in contact with essential oils. The third experiment evaluated the toxicity of ginger, mint, oregano and thyme oils on *A. mellifera* and *T. hyalinata* and the locomotion behavior of these pollinators in contact with the oils. The oregano and thyme oils were more toxic, especially to *A. mellifera* while the ginger and mint showed lower toxicity to these pollinators. The oils were more selective to *T. hyalinata* than *A. mellifera*. In locomotion test had arenas treated (totally or partially) with LC_{50} concentrations of the oils. In the fully treated area bioassay, oregano reduced the distance walked and the movement speed and increased the periods without movements for *A. mellifera* and these were also observed with thyme oil for *T. hyalinata*. In partially treated arena, irritability of *A. mellifera* was observed with ginger, mint and thyme oils and for *T. hyalinata* with those of ginger and thyme due the shorter period of time they remained on the arena. Ginger and mint oils were more selective for the parasitoid and both pollinators, showing toxicity to at least one life stage of *D. hyalinata* demonstrating their potential for IPM programs. Due to moderate toxicity of oregano and thyme oils, mainly, to *A. mellifera* they should be used when foraging activities of this pollinator is low.

Introdução Geral

As plantas produzem metabólitos secundários, como os óleos essenciais, que podem atuar como sinais de comunicação química e defesa (Pichersky et al., 2006; Elumalai et al., 2010). Os óleos essenciais são compostos principalmente de mono e sesquiterpenos e de fenilpropanoides que conferem suas características organolépticas, podendo apresentar propriedades inseticidas como repelência (Ngoh et al., 1998, Jiang et al., 2012), inibidor de crescimento (Zapata et al. 2009, Elumalai et al., 2010) e toxicidade (Kumar et al., 2011, Jiang et al., 2012). O gengibre [*Zingiber officinale* (Zingiberaceae)], a menta [*Mentha piperita* (Lamiaceae)], o orégano [*Origanum vulgare* (Lamiaceae)] e o tomilho [*Thymus vulgaris* (Lamiaceae)] são plantas com propriedades medicinais difundidas na cultura brasileira e os óleos essenciais extraídos dessas plantas possuem ação deletéria sobre insetos e microrganismos (Elumalai et al., 2010, Kumar et al., 2011, Pavela, 2012). As substâncias bioativas presentes nos óleos essenciais, normalmente, apresentam densidades menores que a água o que facilita a difusão através da membrana celular e as interações com o sítio de ação (Yegen et al., 1998, Rubiolo et al., 2010).

Diaphania hyalinata (Linneus, 1758) (Lepidoptera: Crambidae) praga chave de Cucurbitaceae é encontrada no Caribe (Hernández et al., 1995), América Central (Surís et al., 1997) e América do Sul (Melo et al., 2011). As lagartas alimentam-se de folhas, brotos, ramos e frutos, podendo causar perdas de até 100% (McSorley e Waddill, 1982, HansPetersen et al., 2010). Seu controle é feito com inseticidas sintéticos, porém o uso constante desses produtos pode levar a resistência da praga, contaminações do agrossistema e de organismos não alvos, intoxicação ao aplicador e contaminação dos alimentos (Vianna et al., 2009, Hernández et al., 2011). Medidas alternativas são estudadas no Manejo Integrado de Pragas (MIP) como os inseticidas botânicos e o controle biológico que, geralmente, são menos nocivos ao ambiente e a organismos benéficos (Tavares et al, 2009, Tunca et al., 2012, Silva et al., 2015).

No MIP, os inseticidas botânicos e o controle biológico podem ser usados em conjunto contribuindo para a sustentabilidade da agricultura e para a redução de aplicações de inseticidas sintéticos (Elumalai et al., 2010, Tavares et al., 2011, Pavela, 2012, Silva et al., 2015). No entanto, um método de controle não pode reduzir a eficiência do outro, espera-se que os produtos botânicos sejam mais tóxicos a praga que ao inimigo natural (Charleston et al., 2006, Tunca et al., 2012).

A ação de inimigos naturais, predadores e parasitoides, diminui a necessidade da intervenção humana no controle de praga, além disso o hábito generalista da maioria desses insetos favorece a reprodução no campo (Ribeiro et al., 2013, Tavares et al., 2013, Silva et al., 2015). O endoparasitoide pupal *Trichospilus* sp. destaca-se no controle de pragas com importância agrícola pela eficiência no parasitismo, estabelecimento e adaptação em diferentes hospedeiros (Melo et al., 2011, Ribeiro et al., 2013, Silva et al., 2015). *Trichospilus pupivorus* Ferrière 1930 (Hymenoptera: Eulophidae) é, ainda, pouco conhecido, mas apresenta potencial para o controle de pragas em liberação massal (Tavares et al., 2011, 2013).

Inseticidas botânicos pode ser uma estratégia também para reduzir a contaminação de polinizadores por inseticidas sintéticos, fato que tem sido relacionado a redução das colônias de abelhas, fenômeno conhecido como Distúrbio do Colapso das Colônias (CCD, sigla em Inglês), colocando em risco a produção de produtos apícolas e a polinização (Neumann e Carreck, 2010, Van der Sluijs et al., 2013). O CCD é a dizimação das populações de abelhas, efeito da combinação de fatores como perda de habitat, doenças e uso de agrotóxicos sistêmicos, representando um risco para a manutenção da biodiversidade de plantas nativas e da produção agrícola (Costa et al., 2014).

Abelhas forrageiras são expostas por contato a produtos na superfície de plantas durante a colheita de pólen e néctar ou podem ingerir seiva de plantas originadas de sementes revestidas com inseticida (Chauzat et al., 2006, Girolami et al., 2009). *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 e *Trigona* sp. (Hymenoptera: Apidae) são polinizadores importantes das Cucurbitaceae, uma vez, que plantas dessa família, geralmente, apresentam flores unissexuais com pólen pesado e pegajoso impedindo a transferência pelo vento (Nepi e Pacini, 1993). A primeira espécie é um híbrido entre as abelhas africanas e europeias, conhecidas como africanizadas (Costa et al., 2014), a segunda pertencente a subfamília Meliponinae, conhecidas como abelhas nativas sem ferrão, são importantes na polinização de espécies vegetais silvestres e cultivadas (Serra e Campos, 2010, Carvalho e Del Lama, 2015). Os pesticidas, abamectina, acetamiprida, cartap-cloridrato, clorfenapir, deltametrina e tiametoxam, utilizados em *Cucumis melo* foram tóxicos para as operárias de *A. mellifera* por pulverização direta, dieta contaminada e contato com folhas pulverizadas (Costa et al., 2014), além disso, inseticidas, podem causar alterações comportamentais como irritabilidade e repelência (Desneux et al., 2007).

A avaliação do risco ecológico de inseticidas a polinizadores, em grande parte, é centrada na espécie *A. mellifera* por ser o bioindicador de escolha para outros artrópodes (Costa et al., 2014). Porém, a seletividade de inseticidas botânicos deve ser avaliada separadamente para as abelhas nativas devido as diferenças genéticas entre espécies (Arena e Sgolastra, 2014). Abelhas nativas muitas vezes são negligenciadas em estudos ecotoxicológicos o qual exige atenção devido à sua maior relevância ecológica do que a exótica *A. melífera* (Carvalho e Del Lama, 2015, Jaffe et al., 2016). *Trigona hyalinata* (Lepeletier, 1836) (Hymenoptera: Apidae) é uma espécie nativa importante na polinização, mas com ausência de estudo sobre susceptibilidade a inseticidas. *Trigona* sp. é capaz de dispersar em longas distâncias e colonizar habitats degradados podendo ser considerado um polinizador resgate para compensar o declínio de outros polinizadores nativos em paisagens tropicais degradadas (Jaffe et al., 2016). A perda de uma espécie de abelha polinizadora pode reduzir ou mesmo extinguir espécies vegetais, assim é importante medidas que atendam aos interesses sociais, econômicos e ambientais para a preservação destes organismos (Chauzat et al., 2006; Desneux et al., 2007; Carvalho et al., 2015).

A produção orgânica muitas vezes é dificultada pela pouca formação técnica, com a maioria das pesquisas voltada à agricultura convencional. Inseticidas botânicos degradam rapidamente no ambiente ou desaparecem na folhagem da planta por volatilização, podendo minimizar o contato residual e favorecer a polinização e a atuação de agentes de biocontrole. No entanto, mesmo que considerados naturais, as avaliações de toxicidade não devem ser negligenciadas por serem rotulados como inseticidas de risco reduzido ou como bioinseticidas. Por isso, o conhecimento da seletividade de inseticidas é fundamental para implementação de programas de MIP, buscando produtos prejudiciais às pragas e sem efeito aos organismos benéficos.

A eficiência de controle de *D. hyalinata* e a seletividade ao parasitoide *T. pupivorus* e as abelhas *A. melífera* e *T. hyalinata* aos óleos essenciais de gengibre, menta, tomilho e orégano devem ser avaliadas como passo inicial para promover a inserção desses produtos naturais na realidade de pequenos agricultores ou produtores orgânicos.

Objetivo Geral

Avaliar o potencial de óleos essenciais de plantas para o controle de ovos, lagartas e pupas de *D. hyalinata* e a seletividade ao parasitoide *T. pupivorus* e as abelhas *A. mellifera* e *T. hyalinata*.

Objetivos específicos

- Determinar as toxidades letais (CL₅₀ e CL₉₀) dos óleos essenciais de gengibre, menta, tomilho e orégano sobre ovos, lagartas (contato, ingestão e tópico) e pupas de *D. hyalinata* e avaliar a seletividade para o parasitoide *T. pupivorus*.
- Avaliar o efeito de concentrações subletais dos óleos essenciais de gengibre, menta, tomilho e orégano na sobrevivência e no desenvolvimento de *D. hyalinata*, a deterência alimentar desses óleos e a atividade em grupo das lagartas em contato com superfície tratada com esses produtos.
- Avaliar a seletividade dos óleos de gengibre, menta, tomilho e orégano sobre as forrageiras de *A. melífera* e *T. hyalinata*.
- Avaliar a locomoção de adultos de *A. melífera* e *T. hyalinata* em contato com superfície total e metade tratada com os óleos essenciais de gengibre, menta, tomilho e orégano.

Referências

- Arena M, Sgolastra F. 2014. A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. **Ecotoxicology** 23: 324-334.
- Carvalho AF, Del Lama MA. 2015. Predicting priority areas for conservation from historical climate modelling: stingless bees from Atlantic Forest hotspot as a case study. **Journal of Insect Conservation** 19: 581-587.
- Charleston DS, Kfir R, Dicke M, Vet LE. 2006. Impact of botanical extracts derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on populations of *Plutella xylostella* and its natural enemies: A field test of laboratory findings. **Biological Control** 39: 105-114.
- Chauzat MP, Faucon JP, Martel AC, Lachaize J, Cougoule N, Aubert M. 2006. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. **Journal of Economic Entomology** 99: 253-262.
- Costa EM, Araujo EL, Maia AVP, Silva FEL, Bezerra CES, Silva JG. 2014. Toxicity of insecticides used in the Brazilian melon crop to the honey bee *Apis mellifera* under laboratory conditions. **Apidologie** 45: 34-44.
- Desneux ND, Decourtye A, Delpuech JM. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology** 52: 81-106.
- Elumalai K, Krishnappa K, Anandan A, Govindarajan M, Mathivanan T. 2010. Larvicidal and ovicidal activity of seven essential oil against lepidopteran pest *S. litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal of Recent Scientific Research** 1: 08-14.
- Girolami V, Mazzon L, Squartini A, Mori N, Marzaro M, Di Bernardo A, Greatti M, Giorio C, Tapparo A. 2009. Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. **Journal of Economic Entomology** 102: 1808-1815.
- Hanspetersen HN, Mcsorley R, Liburd OE. 2010. The impact of intercropping squash with non-crop vegetation borders on the above-ground arthropod community. **Florida Entomologist** 93: 590-608.
- Hernández Y, Surís M, López M. 1995. Ciclo de vida y reproducción de *Diaphania hyalinata* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) en condiciones de laboratorio. **Revista de Protección Vegetal** 10: 241-246.
- Hernández R, Guo K, Harris M, Liu TX. 2011. Effects of selected insecticides on adults of two parasitoid species of *Liriomyza trifolii*: *Ganaspidium nigrimanus* (Figitidae) and *Neochrysocharis formosa* (Eulophidae). **Insect Science** 18: 512-520.

- Jaffe R, Castilla A, Pope N, Imperatriz-Fonseca VL, Metzger JP, Arias MC, Jha, S. 2016. Landscape genetics of a tropical rescue pollinator. **Conservation Genetics** 17: 267-278.
- Jiang ZL, Akhtar Y, Zhang X, Bradbury R, Isman MB. 2012. Insecticidal and feeding deterrent activities of essential oils in the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Applied Entomology** 136: 191-202.
- Kumar P, Mishra S, Malik A, Satya S. 2011. Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. **Industrial Crops and Products** 34: 802-817.
- Mcsorley R, Waddill VH. 1982. Partitioning yield loss on yellow squash into nematode and insect components. **Journal of Nematology** 14: 110-118.
- Melo RL, Pratisoli D, Polanczyk RA, Tavares M, Milanez AM, Melo DF. 2011. Ocorrência de *Trichospilus diatraeae* (Hym.: Eulophidae) em broca das cucurbitáceas, no Brasil. **Horticultura Brasileira** 29: 228-230.
- Nepi M, Pacini E. 1993. Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. **Annals of Botany** 72: 527-536.
- Neumann P, Carreck NL. 2010. Honey bee colony losses. **Journal of Apicultural Research** 49: 1-6.
- Ngoh SP, Hoo L, Pang FY, Huang Y, Kini MR, Ho SH. 1998. Insecticidal and repellent properties of nine volatile constituents of essential oils against the American cockroach, *Periplaneta Americana* (L.). **Pesticide Science** 54: 261-268.
- Pavela R. 2012. Sublethal effects of some essential oils on the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisduval). **Journal of Essential Oil Bearing Plants** 15: 144-156.
- Pichersky E, Noel JP, Dudareva N. 2006. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science** 311: 808-811.
- Ribeiro RC, Lemos WP, Castro AA, Poderoso JCM, Serrão JE, Zanuncio JC. 2013. *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae): a potential biological control agent of lepidopteran pests of oil palm in the Brazilian Amazon. **Florida Entomologist** 96: 675-677.
- Rubiolo P, Gorbini B, Liberto SE, Cordero C, Bicchi C. 2010. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. **Flavour and Fragrance Journal** 25: 282-290.
- Serra BDV, de Campos LA. 2010. Entomophilic pollination of squash, *Cucurbita moschata* (Cucurbitaceae). **Neotropical Entomology** 39: 153-159.

- Silva IM, Zanuncio TV, Pereira FF, Wilcken CF, Serrão JE, Zanuncio JC. 2015. Reproduction of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) in the pupae of *Diaphania hialinata* (Lepidoptera: Crambidae) of various ages. **The Florida Entomologist** 98: 1025-1029.
- Surís M, Hernández Y, Lopez M. 1997. Comportamiento poblacional de *Diaphania hialinata* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) en calabaza. **Revista de Protección Vegetal** 12: 39-45.
- Tavares WS, Cruz I, Petacci F, Assis Júnior SL, Freitas SS, Zanuncio JC, Serrão JE. 2009. Potential use of Asteraceae extracts to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae). **Industrial Crops and Products** 30: 384-388.
- Tavares WS, Hansson C, Serrão JE, Zanuncio JC. 2011. First report of *Trichospilus pupivorus* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing pupae of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Entomologia Generalis** 33: 281-282.
- Tavares WS, Hansson C, Serrão JE, Zanuncio JC. 2013. *Trichospilus pupivorus* (Hymenoptera: Eulophidae): first report of parasitism on *Thagana tibialis* (Lepidoptera: Lymantriidae) in Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment** 48: 104-105.
- Tunca H, Kilinçer N, Ozkan C. 2012. Side-effects of some botanical insecticides and extracts on the parasitoid, *Venturia canescens*(Grav.) (Hymenoptera: Ichneumonidae). **Türkiye Entomoloji Dergisi-Turkish Journal of Entomology** 36: 205-214.
- Van der Sluijs JP, Simon-Delso N, Goulson D, Maxim L, Bonmatin JM, Belzunces LP. 2013. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. **Current Opinion in Environmental Sustainability** 5: 293-305.
- Vianna UR, Pratisoli D, Zanuncio JC, Lima ER, Brunner J, Serrão JE. 2009. Insecticide toxicity to *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) females and effect on descendant generation. **Ecotoxicology** 18: 180-186.
- Yegen O, Unlu A, Berger BM. 1998. Einsatz und nebenwirkungen auf bodenmikrobielle aktivitäten des etherischen ols aus *Thymbra spicata* bei der bekämpfung der wurzelhalskrankheit an paprika *Phytophthora capsici*. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz** 105: 602-610.
- Zapata N, Budia F, Vinuela E, Medina P. 2009. Antifeedant and growth inhibitory effects of extracts and drimanes of *Drimys winteri* stem bark against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). **Industrial Crops and Products** 30: 119-125.

Capítulo I

Toxidade de óleos essenciais a *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Crambidae) e seletividade ao parasitoide *Trichospilus pupivorus* (Hymenoptera: Eulophidae)

Toxidade de óleos essenciais a *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Crambidae) e seletividade ao parasitoide *Trichospilus pupivorus* (Hymenoptera: Eulophidae)

Resumo

Diaphania hyalinata (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Crambidae) reduz a produção de Cucurbitaceae por danos em folhas e frutos e destaca-se entre as pragas dessa família. O controle biológico e inseticidas botânicos são utilizados no Manejo Integrado de Pragas (MIP), especialmente, em sistemas agrícolas onde inseticidas sintéticos são limitados como na agricultura orgânica. Efeitos toxicológicos de substâncias de plantas a organismos alvo e não alvos devem ser avaliados antes de serem implantados no MIP. As toxidades dos óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho para ovos, lagartas (contato, tópico, ingestão) e pupas de *D. hyalinata* e a seletividade ao parasitoide *Trichospilus pupivorus* Ferrière 1930 (Hymenoptera: Eulophidae) foram avaliadas e as concentrações CL₅₀ e CL₉₀ e o índice de seletividade relativa (ISR₅₀) desses produtos determinados. Ovos foram mais sensíveis que as lagartas e pupas aos produtos aplicados, com maior toxidade por orégano e tomilho seguido dos óleos de menta e gengibre. A aplicação tópica foi a via menos tóxica a lagarta. Os óleos de gengibre, menta e tomilho foram mais tóxicos por ingestão e o de orégano por contato a lagarta de *D. hyalinata*. A fase de pupa necessitou de maiores concentrações dos óleos essenciais para inviabilizar a emergência de adultos, com maior toxidade do orégano. Os óleos essenciais foram seletivos a *T. pupivorus* (ISR₅₀ > 1). Os óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho foram tóxicos a imaturos de *D. hyalinata* e seletivos a *T. pupivorus* apresentando potencial para o uso em conjunto ou sequencial no MIP.

Palavras-chave: Crambidae, Eulophidae, Manejo Integrado de Praga, Óleos essenciais, Pesticidas naturais

Introdução

Diaphania hyalinata (Linnaeus, 1767) (Lepidoptera: Crambidae), praga chave de Cucurbitaceae, alimenta-se da parte aérea ocasionando injúrias às hastes e brotos, o que pode levar a morte de planta dessa família e prejuízos ao produtor (McSorley e Waddill, 1982, Melo et al., 2011). A redução da área foliar por lagartas de *D. hyalinata* acarreta diminuição no peso e na qualidade de frutos (McSorley e Waddill, 1982).

O controle com inseticidas sintéticos é o mais utilizado na agricultura, mas o uso frequente e o aumento da dosagem de aplicação indevidamente possibilitam o ressurgimento da praga alvo, resíduos em alimentos, contaminação do ambiente, intoxicação a trabalhadores e doenças agudas e crônicas (Prabhaker et al., 2011, An et al., 2015). Inseticidas pulverizados sobre as plantas podem afetar inimigos naturais (Hernandez et al., 2011; González et al., 2013) como o methamidophos e spinosad que reduziram a sobrevivência dos predadores *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) e *Supputius cincticeps* (Stal, 1860) (Heteroptera: Pentatomidae) (Castro et al., 2013). Os inseticidas abamectin e spinetoram apresentaram alta toxicidade aos parasitoides *Neochrysocharis formosa* (Westwood) (Hymenoptera: Eulophidae) e *Ganaspidium nigrimanus* (Kieffer) (Hymenoptera: Figitidae) (Hernández et al., 2011).

A utilização de inseticidas oriundos de plantas vem conquistando o mercado e os produtores pela preferência dos consumidores por produtos orgânicos (Isman et al., 2006, Isman e Miresmailli, 2011). O uso de inseticidas botânicos é uma prática com menor impacto ao meio ambiente e geralmente são mais seguros a saúde do homem que os químicos sintéticos e reduz a aplicação dos agroquímicos sintéticos (Wins-Purdy et al., 2009, Akhtar et al., 2012, Amri et al., 2014). Além disso, a utilização de produtos naturais é uma alternativa de controle de pragas para os agricultores orgânicos (Miresmailli e Isman, 2014). Esses produtos podem afetar o desenvolvimento e a sobrevivência de insetos (Firake e Pande, 2009, Amri et al., 2014), repelir pragas (Wins-Purdy et al., 2009) e atrair inimigos naturais (Azuma e Toyota, 2012). Os múltiplos sítios de ação de inseticidas botânicos diminuem o risco de resistência cruzada e a baixa persistência no ambiente reduz a toxidade a organismos não alvos (Isman e Miresmailli, 2011; Miresmailli e Isman, 2014).

Trichospilus diatraea Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae) parasitou pupas de *D. hyalinata* em campo (Melo et al., 2011) e em laboratório (Silva et al., 2014) indicando que as espécies do gênero podem ser utilizadas no manejo dessa

praga. Embora *T. diatraeae* tenha sido estudado (Silva et al., 2014, 2015). *Trichospilus pupivorus* Ferrière 1930 (Hymenoptera: Eulophidae) é, ainda, pouco conhecido, mas apresenta potencial para o controle de pragas em liberações massais (Tavares et al., 2013). Parasitoides podem ser expostos a pesticida por gotas de pulverização, resíduos sobre folhagem ou através da alimentação de gotículas de água e néctar contaminados (Longley e Stark, 1996) e, indiretamente, durante o desenvolvimento no hospedeiro (Hernandez et al., 2011, González et al., 2013), por isso, inseticidas seletivos são importantes para a integração com o controle biológico de praga (Castro et al., 2013, González et al. 2013).

O gengibre [*Zingiber officinale* (Zingiberaceae)], a menta [*Mentha piperita* (Labiatae)], o orégano [*Origanum vulgare* (Lamiaceae)] e o tomilho [*Thymus vulgaris* (Lamiaceae)], apresentam potencial para controlar pragas agrícolas (Erler e Cetin, 2009, Amri et al., 2014, Vojoudi et al., 2014) mas a toxicidade a *D. hyalinata* não é conhecida. Inseticidas botânicos e o controle biológico podem ser usados em conjunto (González et al., 2012), mas um método não pode reduzir a eficiência do outro. Assim, produtos botânicos devem ser mais tóxicos a praga que a seus inimigos naturais em programas de Manejo Integrado de Pragas (Isman, 2006, Isman e Miresmailli, 2011).

O objetivo foi avaliar a toxicidade dos óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho para ovos, lagartas e pupas de *D. hyalinata* e a seletividade desses produtos ao parasitoide *T. pupivorus*.

Material e Métodos

Local de condução dos experimentos: A pesquisa foi realizada no Laboratório de Controle Biológico de Insetos (LCBI) do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Criação das espécies avaliadas

***Diaphania hyalinata*:** Lagartas foram mantidas em potes plásticos (3,0 L) com tampa furada, vedada com organza e alimentadas, diariamente, com folhas de chuchu [*Sechium edule* (Cucurbitaceae)] da eclosão de suas lagartas até a fase de pré-pupa em sala climatizada $25 \pm 2,2^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10,8\%$, fotofase de 12h. As pré-pupas foram transferidas para embalagens plásticas (3.000 mL) forradas com papel toalha até a pupação e transferidas para gaiolas de madeira com as laterais teladas e fechadas para emergência

dos adultos. Os adultos foram alimentados com solução contendo água e mel (1:1) embebido em algodão e colocado no fundo da gaiola sobre uma placa de Petri. Folhas de abóbora foram colocadas no interior das gaiolas para realização de posturas que foram coletadas e colocadas nos potes plásticos para continuidade da criação.

***Trichospilus pupivorus*:** Adultos de *T. pupivorus* foram mantidos em tubos de vidro (14 x 2,2cm) tampados com algodão com gotículas de mel como alimento. Pupas do *D. hyalinata*, foram retiradas da criação estoque do LCB/UFV e expostas ao parasitismo por fêmeas de *T. diatraeae* na proporção 1:8 (pupa/ parasitoide) por 24 horas à temperatura de $25 \pm 2,2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10,8\%$ e fotofase de 12 horas (Silva et al., 2014).

Obtenção dos óleos botânicos: Óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho foram adquiridos da empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil) extraídos por destilação a vapor da folha (menta e oréganos), das folhas/flores (tomilho) e do rizoma (gengibre). Os constituintes de cada óleo, obtidos através da cromatografia gasosa, foram fornecidos (Tabela 1).

O contato com acetona não causou mortalidade de *D. hyalinata*, em teste comparado com água pura, possibilitando sua utilização como solvente. As concentrações aplicadas dos óleos essenciais sobre os insetos foram estabelecidas em testes preliminares para obter a faixa de mortalidade de 0 até 100%. As concentrações diferenciaram entre os óleos devido ao grau de susceptibilidade e para ajuste da curva de concentração-mortalidade. Os óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho foram diluídos em acetona, minutos antes da montagem dos testes e os experimentos mantidos em sala climatizada à $25 \pm 2,2^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 h.

Bioensaios de toxicidade

Ovos: Vinte ovos de *D. hyalinata*, com 48 h, retirados da criação massal, foram colocados em folha de papel recortada (3 x 3 cm) e, sobre eles, aplicado 50 μL de cada óleo essencial nas concentrações de 0,05; 0,10; 0,25; 0,30; 0,50% para o orégano e tomilho, 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 1,0; 5,0% para o gengibre e a menta e o controle recebeu, apenas, acetona. Em seguida, as folhas de papel foram individualizadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) e deixadas secar ao ar livre por 30 minutos. A viabilidade dos ovos de *D. hyalinata* foi avaliada diariamente por oito dias, tempo suficiente para eclosão das larvas (Amri et al., 2014).

Lagartas (ingestão): Discos com três centímetros de diâmetro de folhas de abóbora foram imersos por 10 segundos em solução com 10 mL do controle (acetona) e em concentrações de 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 10% para o gengibre, 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 % para a menta, orégano e tomilho e deixados secar ao ar livre. Após esse período, um disco e uma lagarta de terceiro instar foram colocados por placa de Petri (9,0 cm) (Scudeler e Santos, 2014). Os discos foliares foram trocados diariamente por novos contaminados ou não (acetona) e a mortalidade das lagartas de *D. hyalinata* avaliada após 72 horas.

Lagartas (contato): Seiscentos microlitros, em concentrações dos óleos de gengibre (1,0; 5,0; 8,0; 10,0; 15,0 e 20%); menta (1,0; 5,0; 8; 10; 15%); orégano (0,5; 1,0; 3,0 e 5%); tomilho (0,5; 1,0; 3,0 e 5%) e o controle (acetona), foram aplicados sobre folhas de papel filtro (90 mm) e deixados secar ao ar livre por 30 minutos. Após esse período, o papel filtro foi colocado no fundo de uma placa de Petri (90 mm) com 10 lagartas de terceiro instar de *D. hyalinata* alimentadas diariamente com folha de chuchu [*Sechium edule* (Cucurbitaceae)]. A mortalidade das lagartas foi avaliada após 48 horas (Amri et al., 2014).

Lagartas (tópico): O bioensaio consistiu na aplicação de um μ L do controle (acetona) e dos óleos de menta, orégano e tomilho (1,0; 5,0; 10,0 e 15,0 %) e gengibre (10, 15, 20, 25, 30 e 35%) no protórax das lagartas de *D. hyalinata*. Em seguida, dez lagartas foram acondicionadas por placa de Petri (9 cm) e alimentadas diariamente com folha de chuchu (discos de 3,0 cm de diâmetro). A mortalidade de *D. hyalinata* foi avaliada após 48 horas (Erler e Cetin, 2009).

Pupas: Pupas de *D. hyalinata* com 48 horas de idade foram imersas por cinco segundos em 5 mL dos concentrados de gengibre (0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25%), menta, orégano e tomilho (0,5; 1,0; 5,0; 10,0 e 15,0 %) ou acetona (controle) e deixadas secar ao ar livre por uma hora para evaporação do solvente. Após este período, as pupas foram acondicionadas em tubos de vidro e a emergência dos adultos acompanhada diariamente por quinze dias (Colpo et al., 2014).

Seletividade a *T. pupivorus* (superfície contaminada): Seiscentos microlitros em concentrações de 1,0; 5,0; 10,0; 15,0% e 20% dos óleos essenciais e o controle (acetona) foram aplicados em papel filtro e deixados secar (1 hora). Após este período, o papel filtro foi colocado no fundo de uma placa de Petri com 10 fêmeas de *T. pupivorus* com 48h de idade. A taxa de mortalidade foi avaliada após 48 horas do início dos experimentos (Hernandez et al., 2011).

Estatística: O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cada concentração (tratamento) composta por quatro (pupas) ou cinco (ovos e lagartas) repetições. Grupos de 20 ovos, 10 lagartas, 10 pupas de *D. hyalinata* e 10 fêmeas de *T. pupivorus* foram formados por repetição.

A viabilidade das posturas e as mortalidades das lagartas e pupas de *D. hyalinata* e adultos de *T. pupivorus* foram corrigidas por Abbott, 1925. Os valores de CL₅₀ e CL₉₀ foram estimados pela análise de Probit (Finney, 1971), utilizando-se o SAS (SAS Institute, 1997) e o índice de seletividade diferencial (ISR₅₀= CL₅₀ do inseticida para o parasitoide/CL₅₀ do inseticida para *D. hyalinata*) calculado.

Resultados

A mortalidade de *D. hyalinata* em diferentes concentrações dos óleos essenciais mostrou ajuste por Probit (X^2 , $P < 0,001$), sendo adequado para estimar os parâmetros de toxicidade. Os óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho foram tóxicos para *D. hyalinata* com ação dependente do estágio, produtos, modo de aplicação e concentração utilizada.

A fase de ovo foi mais susceptível aos óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho do que as lagartas e pupas, como demonstradas pelas menores CL₅₀ e CL₉₀ para *D. hyalinata* (Tabela 2).

Os óleos essenciais de orégano ($X^2 = 77,82$; $df = 5$) e tomilho ($X^2 = 62,33$; $df = 5$) apresentaram a maior toxicidade sobre ovos de *D. hyalinata*, seguido da menta ($X^2 = 94,64$; $df = 5$) e gengibre ($X^2 = 29,11$; $df = 5$). O óleo de orégano foi 2,93 e 6,78 vezes mais tóxico (CL₅₀) que os de menta e gengibre, respectivamente e com toxicidade semelhante ao tomilho (Tabela 2).

A aplicação tópica em lagartas de *D. hyalinata* necessitou de maiores concentrações dos óleos de gengibre ($X^2 = 92,08$; $df = 5$), menta ($X^2 = 66,67$; $df = 5$), orégano ($X^2 = 68,86$ $df = 5$) e tomilho ($X^2 = 55,24$; $df = 5$) para causar 50% e 90% de mortalidade (Tabela 2).

O óleo de orégano foi mais tóxico por contato (superfície contaminada) a lagartas de *D. hyalinata* ($X^2 = 39,02$; $df = 5$).

Os óleos de menta ($X^2 = 49,54$; $df = 5$) e tomilho ($X^2 = 30,91$; $df = 5$) apresentaram maior toxicidade à *D. hyalinata* por ingestão de folhas tratadas (Tabela 2).

O óleo de gengibre foi o menos tóxico a imaturos de *D. hyalinata*, principalmente por aplicação tópica (Tabela 2).

Os óleos essenciais causaram baixa toxicidade em pupas de *D. hyalinata*, principalmente, o gengibre ($X^2= 58,89$; $df= 5$) (Tabela 2).

Os óleos de menta, gengibre, tomilho e orégano foram seletivos para *T. pupivorus* com ISR_{50} de 1,38; 5,40; 6,98 e 8,15 para gengibre, menta, orégano e tomilho, respectivamente (Tabela 3, figura 1).

Discussão

Os óleos essenciais são formados por misturas de substâncias bioativas (Akhtar et al., 2012; Ma et al., 2014, Pavela, 2014) e os diferentes modos de ação dessas substâncias tornam os produtos botânicos vantajosos, pois, reduz a chance de resistência cruzada de praga (Akhtar et al., 2012). A propriedade inseticida dos óleos de gengibre, menta, orégano e tomilho é atribuída, principalmente, aos componentes majoritários encontrados nesses produtos (Cetin et al., 2007) como o zingibereno; mentol, carvacrol e timol. Porém, substâncias sinérgicas em menores concentrações presentes nos óleos como o p-cimeno e linalool podem aumentar a toxidade, como observado para *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae) (Hummelbrunner e Isman, 2001, Ma et al., 2014, Pavela, 2014).

As menores CL_{50} e CL_{90} para ovos que lagartas e pupas de *D. hyalinata* diferem dos observados para *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller, 1839) (Lepidoptera: Pyralidae), *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) e *Tribolium confusum* (du Val) (Coleoptera: Tenebrionidae), os quais foram mais susceptíveis na fase de larvas que ovos (Stamopoulos et al., 2007, Maciel et al., 2010, Amri et al., 2014). Isto pode ocorrer devido as diferenças nas estruturas, na permeabilidade do córion e no número de camadas da membrana vitelínica entre espécies (Smith e Salkeld, 1966), sugerindo uma menor proteção estrutural do ovo de *D. hyalinata* a produtos químicos. A maior susceptibilidade ocorre quando o sistema nervoso do embrião começa a desenvolver (Smith e Salkeld, 1966, Stamopoulos et al., 2007). A difusão de substâncias através do córion pode bloquear o processo de incubação, causar ruptura e inviabilizar os ovos por contato com o embrião ou pela supressão de processos bioquímicos e hormonais que

impedem a eclosão dos insetos (Fagoonee e Lauge, 1981, Moreira et al., 2007, Wins-Purdy et al., 2009).

A maior toxicidade do orégano e tomilho aos ovos de *D. hyalinata* pode ser devido aos maiores pesos moleculares dos constituintes majoritários carvacrol e timol presentes nesses óleos, acarretando maior penetração pelo córion (Stock e Holloway, 1993, Moreira et al., 2007), o que explica, também, a similaridade ovicida entre eles por serem isômeros (Can Baser, 2008). A inviabilidade dos ovos de *D. hyalinata* reduz a população da praga no início do seu ciclo de vida antes de causar danos e evita o desenvolvimento da próxima geração (Wins-Purdy et al., 2009).

A menor toxicidade dos óleos essenciais por aplicação tópica em lagartas sugere baixa penetração cuticular, maior metabolização e/ou eliminação dos compostos tóxicos antes de atingir o sítio de ação (Ahmad et al., 2006), podendo ser considerado uma defesa mecânica (Bisset et al., 2002; Kim et al., 2003) ou fisiológica (Carmona et al., 2011). O óleo essencial de gengibre mostrou ser mais tóxico pela ingestão com ação dos compostos ativos no sistema digestivo em relação à aplicação tópica por absorção passiva (Goñalons e Farina, 2015).

A maior toxicidade do óleo de orégano por contato sugere ação no sistema nervoso e/ou respiratório, por serem as principais vias de intoxicação de substâncias absorvidas pelo tegumento (Kostyukovsky et al., 2002). O carvacrol, substância majoritária desse óleo, foi tóxico para *Thaumetopoea wilkinsoni* Tams. (Lepidoptera: Thaumetopoeidae) (Cetin et al., 2007) e *Euproctis chrysorrhoea* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae) (Erler e Cetin, 2009). O óleo essencial de *Thymus capitatus*, com 66,9% de carvacrol, foi altamente tóxico e causou mortalidade por contato de larvas de *E. ceratoniae* após 6 h de exposição (Amri et al., 2014).

A maior toxicidade dos óleos de tomilho e menta por ingestão sugere ação no sistema digestivo de *D. hyalinata* (Scudeler e Santos, 2014), com efeito direto nas células e tecidos do intestino médio e/ou efeito indireto através do sistema endócrino (Mordue (Luntz) e Nisbet, 2000). Efeitos citotóxicos do óleo de nim, em células do intestino médio, podem alterar a função endócrina em processos fisiológicos desse órgão (Scudeler e Santos, 2014). A redução alimentar de *D. hyalinata* com o aumento das concentrações dos óleos concorda com o observado para *S. littoralis* alimentada com folhas tratadas com timol (Hummelbrunner e Isman, 2001). A toxicidade da menta é atribuída a porcentagem de concentração do mentol e mentona presente nas espécies. *Mentha piperita* [mentona

(25,83%), mentol (26,53%)] foi mais tóxica para larvas de *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) que *M. citrata* [mentona (0 %), mentol (3,82%)] (Kumar et al., 2012). A remoção do mentol dos óleos de *M. piperita* e *M. arvensis* reduziu a ação antialimentar em *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (Akhtar et al., 2012). A padronização dos ingredientes ativos é um dos principais desafios para o uso de pesticidas botânicos mostrando a necessidade de investir em técnicas de manejo e extração (Isman 2006, Kumar et al., 2012).

A menor toxicidade do óleo de gengibre, principalmente, via tópica para *D. hyalinata* sugere uma maior taxa na expressão gênica ou na atividade por enzimas detoxificantes (Bisset, 2002) ou menor lipofilicidade desse óleo, sendo que compostos mais lipofílicos, pela semelhança com a cutícula, penetram em maiores taxas no corpo dos artrópodes (Kin et al., 2003). Diferenças na sensibilidade de óleos essenciais devem-se, também, aos pesos moleculares dos compostos presentes, pois substâncias com pesos moleculares menores possuem maior capacidade de penetração na cutícula (Stock e Holloway, 1993).

O contato dos óleos essenciais com a pupa pode obstruir os espiráculos ou penetrar nos canais traqueais interrompendo total ou parcialmente a respiração, comprometendo a atividade metabólica (Colpo et al., 2014). A atividade pupicida do óleo essencial de menta em *D. hyalinata* concorda com observado para *S. litura* e *M. domestica* com inibição da emergência dos adultos (Firake e Pande, 2009, Kumar et al., 2012). A constituição do tegumento pode afetar a susceptibilidade de insetos a substâncias químicas, pois uma camada cuticular mais impermeável pode dificultar a penetração do óleo em pupas (Croft, 1990). No entanto, as altas concentrações necessárias deste óleo essencial para causar toxicidade em pupas de *D. hyalinata* inviabiliza seu uso.

A seletividade fisiológica ($ISR > 1$) e a baixa toxicidade dos óleos de gengibre, menta, orégano e tomilho a *T. pupivorus* por contato possibilita o uso combinado ou sequencial dos mesmos no manejo integrado de pragas. A aplicação de inseticidas em pupas no campo muitas vezes é dificultada, assim a liberação *T. pupivorus* potencializa o controle de *D. hyalinata*. Os óleos essenciais de orégano e tomilho foram os mais tóxicos a *D. hyalinata* e apresentaram alta seletividade ao *T. pupivorus*. Esses óleos não afetaram, o parasitismo, longevidade e reprodução do parasitoide *Trissolcus basalis* (Wollaston) (Hymenoptera: Scelionidae) (González et al. 2013). A menor toxicidade ao parasitoide pode ser devido à redução na penetração cuticular e na sensibilidade do sítio de ação ou

ao aumento na destoxificação metabólica (Yu, 1987). Isto pode, também, ser devido a mecanismos como o sequestro do produto em tecidos do organismo, aumento na excreção ou por repelência (Georghiou, 1972).

Conclusões

Os óleos de orégano e tomilho foram os mais tóxicos para ovos, lagartas e pupas de *D. hyalinata*, seguidos dos óleos essenciais de menta e gengibre.

O óleo de gengibre foi o menos tóxico para ovos, lagartas e pupas de *D. hyalinata*.

O óleo de orégano foi o mais tóxico por contato a lagartas de *D. hyalinata* e os de gengibre, menta e tomilho por ingestão.

A seletividade ao parasitoide *T. pupivorus* foi maior para o óleo de tomilho, seguido dos de orégano, menta e gengibre.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Referências

- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology** 18: 265-267.
- Ahmad M, Denholm I, Bromilow RH. 2006. Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistance strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. **Pest Management Science** 62: 805-810.
- Akhtar Y, Pages E, Stevens A, Bradbury R, Da Camara CAG, Isman MB. 2012. Effect of chemical complexity of essential oils on feeding deterrence in larvae of the cabbage looper. **Physiological Entomology** 37: 81-89.
- Amri I, Hamrouni L, Hanana M, Jamoussi B, Lebdi K. 2014. Essential oils as biological alternatives to protect date palm (*Phoenix dactylifera* L.) against *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Chilean Journal of Agricultural Research** 74: 273-279.
- An XH, Ji XF, Jiang JH, Wang YH, Wu CX, Zhao XP. 2015. Potential dermal exposure and risk assessment for applicators of chlorothalonil and chlorpyrifos in cucumber greenhouses in China. **Human and Ecological Risk Assessment** 21: 972-985.
- Azuma H, Toyota, M. 2012. Floral scent emission and new scent volatiles from *Acorus* (Acoraceae). **Biochemical Systematics and Ecology** 41: 55-61.
- Bisset JA. 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. **Revista Cubana de Medicina Tropical** 54: 202-219.
- Carmona D, Lajeunesse MJ, Johnson MTJ. 2011. Plant traits that predict resistance to herbivores. **Functional Ecology** 25: 358-367.
- Castro AA, Corrêa AS, Legaspi JC, Guedes RNC, Serrão JE, Zanuncio JC. 2013. Survival and behavior of the insecticide-exposed predators *Podisus nigrispinus* and *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae). **Chemosphere** 93:1043-1050.
- Can Baser KH. 2008. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. **Current Pharmaceutical Design** 14: 3106-3119.
- Cetin H, Erler F, Yanikoglu AA. 2007. Comparative evaluation of *Origanum onites* essential oil and its four major components as larvicides against the pine processionary moth, *Thaumetopoea wilkinsoni* Tams. **Pest Management Science** 63: 830-833.

- Colpo JF, Jahnke SM, Füller T. 2014. Insecticidal potential of vegetable oil extracts on *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s 16: 182-188.
- Croft BA. 1990. Arthropod biological control agents and pesticides. New York: Wiley-Interscience, 723p.
- Erler F, Cetin H. 2009. Components from the essential oils from two *Origanum species* as larvicides against *Euproctis chrysorrhoea* (Lepidoptera: Lymantriidae). **Journal of Agricultural and Urban Entomology** 26: 31-40.
- Fagoonee I, Lauge G. 1981. Noxious effects of neem extract of *Crocidolomia binotalis*. *Phytoparasitica* 92: 111-118.
- Finney DJ. 1971. Probit Analysis. Cambridge University Press, London
- Firake DM, Pande R. 2009. Impact of camphor and mentha oil on biology of the tobacco caterpillar *Spodoptera litura* (Fabricius). **Current Biology** 3: 88-92.
- Georghiou GP. 1972. The evolution of resistance to pesticides. **Annual Review of Ecology and Systematics** 3: 133-168.
- Goñalons CM, Farina WM. 2015. Effects of sublethal doses of imidacloprid on young adult honeybee behavior. **PLoS One** 10: e0140814.
- González JOW, Laumann RA, Silveira S, Moraes MCB, Borges M, Ferrero AA. 2012. Lethal and sublethal effects of four essential oils on the egg parasitoids *Trissolcus basalis*. **Chemosphere** 92: 608-615.
- Hernandez R, Guo K, Harris M, Liu TX. 2011. Effects of selected insecticides on adults of two parasitoid species of *Liriomyza trifolii*: *Ganaspidium nigrimanus* (Figitidae) and *Neochrysocharis formosa* (Eulophidae). **Insect Science** 18: 512-520.
- Hummelbrunner LA, Isman MB. 2001. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 49: 715-720.
- Isman MB, Miresmailli S. 2011. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochemistry Reviews** 10: 197-204.
- Isman MB. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology** 51: 45-66.

- Longley M, Stark 1996. Analytical techniques for quantifying direct, residual, and oral exposure of an insect parasitoid to an organophosphate insecticide. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 57: 683-690.
- Kim EH, Kim HK, Choi DH, Ahn YJ. 2003. A acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). **Applied Entomology and Zoology** 38: 261-266.
- Kostyukovsky M, Rafaeli A, Gileadi C, Demchenko N, Shaaya E. 2002. Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. **Pest Management Science** 58: 1101-1106.
- Kumar P, Mishra S, Malik A, Satya S. 2012. Efficacy of *Mentha piperita* and *Mentha citrata* essential oils against housefly, *Musca domestica* L. **Industrial Crops and Products** 39: 106-112.
- Ma Wei-Bin, Feng Jun-Tao, Jiang Zhi-L, Wu Hua, Ma Zhi-Qing, Zhang Xing. 2014. Fumigant activity of eleven essential oil compounds and their selected binary mixtures against *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research** 113: 3631-3637.
- Maciel MV, Morais SM, Bevilaqua CML, Silva RA, Barros RS, Sousa RN, Sousa LC, Brito ES, Souza-Neto MA. 2010. Chemical composition of *Eucalyptus* spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. **Veterinary Parasitology** 167: 1-7.
- Mcsorley R, Waddill VH. 1982. Partitioning yield loss on yellow squash into nematode and insect components. **Journal of Nematology** 14: 110-118.
- Melo RL, Pratisoli D, Polanczyk RA, Tavares M, Milanez AM, Melo DF. 2011. Ocorrência de *Trichospilus diatraeae* (Hym.: Eulophidae) em broca das cucurbitáceas, no Brasil. **Horticultura Brasileira** 29: 228-230.
- Miresmailli S, Isman MB. 2014. Botanical insecticides inspired by plant-herbivore chemical interactions. **Trends in Plant Science** 19: 29-35.
- Mordue (Luntz) AJ, Nisbet AJ. 2000. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 29: 615-632.
- Moreira MF, Dos Santos AS, Marotta HR, Mansur JF, Ramos IB, Machado EA, Souza GH, Eberlin MN, Kaiser CR, Kramer KJ, Muthukrishnan S, Vasconcellos AM. 2007.

- A chitin-like component in *Aedes aegypti* eggs shells, eggs and ovaries. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 37: 1249-1261.
- Pavela R. 2014. Acute, synergistic and antagonistic effects of some aromatic compounds on the *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lep., Noctuidae) larvae. **Industrial Crops and Products** 60: 247-258.
- Prabhaker N, Castle SJ, Naranjo SE, Toscano NC, Morse JG. 2011. Compatibility of two systemic neonicotinoids, imidacloprid and thiamethoxam, with various natural enemies of agricultural pests. **Journal of Economic Entomology** 104: 773-781.
- SAS. Institute Sas, User`s guide: statistics. SAS Institute Cary, NC, USA. 1997.
- Schuler MA. 1996. Plant cytochrome P450 monooxygenases. **Critical Reviews in Plant Sciences** 15: 235-284.
- Scudeler EL, Santos DC. 2014. Side effects of neem oil on the midgut endocrine cells of the green lacewing *Ceraeochrysa claveri* (Navás) (Neuroptera: Chrysopidae). **Neotropical Entomology** 43: 154-160.
- Silva IM, Zanuncio TV, Pereira JMM, Wilcken CF, Pereira FF, Serrão JE, Zanuncio JC. 2014. Density of *Trichospilus diatraea* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Crambidae) pupae. **Annals of the Entomological Society of America** 107: 826-831.
- Silva IM, Zanuncio TV, Pereira FF, Wilcken CF, Serrão JE, Zanuncio JC. 2015. Reproduction of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) in the pupae of *Diaphannia hialinata* (Lepidoptera: Crambidae) of various ages. **The Florida Entomologist** 98: 1025- 1029.
- Smith EH, Salkeld EH. 1966. The use and action of ovicides. **Annual Review of Entomology** 11, 331-368.
- Stamopoulos DC, Damos D, Karagianidou G. 2007. Bioactivity of five monoterpenoid vapours to *Tribolium confusum* (du Val) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Stored Products Research** 43: 571-577.
- Stock D, Holloway PJ. 1993. Possible mechanisms for surfactant-induced foliar uptake of agrochemicals. **Pesticide Science** 38: 165-177.
- Tavares WS, Hansson C, Serrão JE, Zanuncio JC. 2013. *Trichospilus pupivorus* (Hymenoptera: Eulophidae): first report of parasitism on *Thagana tibialis* (Lepidoptera: Lymantriidae) in Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment** 48: 104-105.

- Yu SJ. 1987. Biochemical defense capacity in the spined soldier bug (*Podisus maculiventris*) and its lepidopterous prey. **Pesticide Biochemical Physiology** 28: 216-223.
- Vojoudi S, Esmaili M, Farrokhi M, Saber M. 2014. Acute toxicity of kaolin and essential oils from *Mentha pulegium* and *Zingiber officinale* against different stages of *Callosobruchus maculatus* under laboratory conditions. **Archives of Phytopathology and Plant Protection** 47: 285-291.
- Wins-Purdy AH, Whitehouse C, Judd GJR, Evenden ML. 2009. Effect of horticultural oil on oviposition behaviour and egg survival in the *Obliquebanded leafroller* (Lepidoptera: Tortricidae). **Canadian Entomologist** 141: 86-94.

Tabela 1. Nome comum, Nome científico (Família), componentes majoritários e parte do vegetal extraídos os óleos essenciais usados no controle de imaturos *Diaphania hyalinata* (Linnaeus, 1767) (Lepidoptera: Crambidae) e na seletividade a *Trichospilus pupivorus* (Hymenoptera: Eulophidae)

Nome comum	Nome científico (Família)	Componentes majoritários (%)	Parte
Gengibre	<i>Zingiber officinale</i> (Zingiberaceae)	Zingibereno (33%), beta-sesquifelandreno (12%), β -bisabolenos (10%), canfeno (8%), mirceno (7%)	Rizoma
Menta	<i>Mentha piperita</i> (Labiatae)	Mentol (55%), mentona (25%), acetato de metilo (10%)	Folha
Orégano	<i>Origanum vulgare</i> (Lamiaceae)	Carvacrol (70%), p-cimeno (15%), timol (4,3%)	Folha
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i> (Lamiaceae)	Timol (50%), p-cimeno (40%), linalool (6,0%)	Folha/flor

Tabela 2- Toxidade dos óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho para ovos, lagartas e pupas de *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Crambidae)

Óleo essencial	n	CL ₅₀ (IC) (%)	CL ₉₀ (IC) (%)	X ²
Ovos				
Gengibre	600	0,95 (0,81-1,12)	2,12 (1,64-3,57)	29,11
Menta	600	0,41 (0,35-0,47)	1,15 (0,95-1,49)	94,64
Orégano	500	0,14 (0,11-0,16)	0,35 (0,30-0,43)	77,82
Tomilho	500	0,16 (0,14-0,17)	0,38 (0,32-0,48)	62,33
Lagarta Ingestão				
Gengibre	250	2,85 (2,35-3,43)	9,66 (7,46-13,83)	90,55
Menta	200	1,09 (0,91-1,27)	2,96 (2,26-4,09)	49,54
Orégano	200	0,96 (0,78-1,14)	2,70 (2,13-4,00)	42,60
Tomilho	200	0,89 (0,67-1,08)	2,20 (1,72-3,46)	30,91
Lagarta Contato (Superfície contaminada)				
Gengibre	300	5,92 (5,30-6,53)	11,18 (9,91-13,15)	93,59
Menta	250	2,98 (2,53-3,44)	7,36 (6,19-9,26)	90,67
Orégano	200	0,40 (0,30-0,48)	1,24 (0,92-2,10)	39,02
Tomilho	200	1,31 (1,12-1,54)	3,00 (2,44-3,98)	88,73
Lagarta Tópico				
Gengibre	300	29,11 (27,52-30,89)	44,77 (40,73-51,25)	92,08
Menta	200	3,35 (2,78-3,95)	7,08 (5,85-9,23)	66,67
Orégano	200	1,79 (1,52-2,07)	3,44 (2,91-4,34)	68,86
Tomilho	200	3,07 (2,63-3,49)	6,08 (5,18-7,71)	55,24
Pupas				
Gengibre	280	8,06 (6,95-9,10)	17,89 (15,14-23,02)	58,89
Menta	200	5,31 (4,05-6,43)	12,75 (10,18-18,61)	33,12
Orégano	200	1,82 (1,33-2,36)	6,53 (4,66-11,19)	43,89
Tomilho	200	2,84 (2,04-3,60)	7,19 (5,46-11,59)	28,13

n= número de indivíduos, CL= concentração letal para 50% e 90% de mortalidade, IC= intervalo de confiança a 95%, X²= qui-quadrado. Nível de significância de P<0,0001.

Tabela 3. Toxidade dos óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho por contato para *Trichospilus pupivorus* (Hymenoptera: Eulophidae)

Óleo essencial	n	CL ₅₀ (IC) (%)	CL ₉₀ (IC) (%)	X ²	ISR ₅₀
Gengibre	250	8,16 (6,81-9,52)	15,10(12,40-21,83)	31,75	1,38
Menta	250	16,09 (15,48-16,60)	18,76 (18,07-19,88)	63,09	5,40
Orégano	250	2,79 (2,49-3,16)	4,26 (3,68-5,30)	55,95	6,98
Tomilho	250	10,68 (10,05-11,32)	13,21(12,27-15,15)	29,24	8,15

n= número de indivíduos, CL= concentração letal para 50% e 90% de mortalidade, IC= intervalo de confiança a 95%, X²= qui-quadrado, Nível de significância de $P < 0,0001$.

Índice de seletividade relativa (ISR₅₀ = CL₅₀ do tratamento para parasitoide/CL₅₀ para praga).

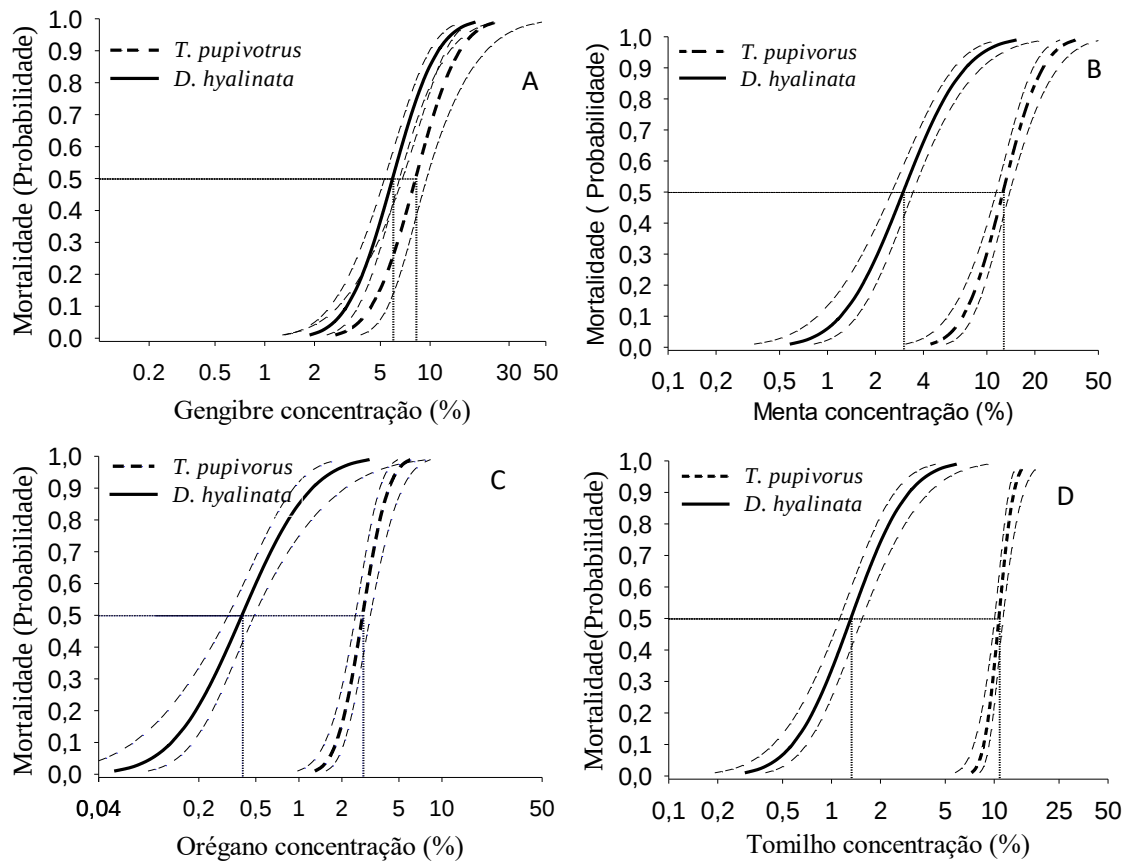


Figura 1. Mortalidade de lagartas do terceiro ínstar de *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Crambidae) e fêmeas de *Trichospilus pupivorus* (Hymenoptera: Eulophidae) em contato com diferentes concentrações dos óleos essenciais de gengibre (A), menta (B), orégano (C) e tomilho (D)

Capítulo II

Doses subletais de óleos essenciais afetando o desenvolvimento, ingestão e atividade em grupo de *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Crambidae)

Doses subletais de óleos essenciais afetando o desenvolvimento, ingestão e atividade em grupo de *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Crambidae)

Resumo:

Inseticidas botânicos podem reduzir a dependência de pesticidas químicos convencionais e impactos ao ambiente e a saúde em programas de manejo de pragas. Concentrações subletais desses inseticidas podem afetar a fisiologia e o comportamento de insetos. O desenvolvimento e a sobrevivência; a deterrence alimentar e a atividade em grupo de *Diaphania hyalinata* (Linnaeus, 1767) (Lepidoptera: Crambidae) exposta a concentrações subletais dos óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho foram avaliados. No teste de ingestão, lagartas desse Lepidoptera foram alimentadas com folhas de abóbora tratadas com concentrações subletais (CL₁₀) dos óleos essenciais a partir do segundo ínstar e a sobrevivência e o desenvolvimento larval e pupal avaliados. No teste de deterrence alimentar, a porcentagem de consumo de folhas de abóbora, após imersão em soluções com concentrações subletais (CL₂₅) dos óleos essenciais por lagartas de *D. hyalinata* em testes com e sem chance de escolha foi avaliada pelo IDA (índice de deterrence alimentar). Na atividade em grupo, as formas de movimento, incluindo caminhamento, movimentos de partes do corpo e as interações de lagartas em superfície contaminada com as CL₂₅ dos óleos de gengibre, menta, orégano e tomilho foram registradas. A viabilidade larval e pupal e o peso das pupas foram menores e a duração do período larval e pupal maior para *D. hyalinata* com folhas tratadas com concentrações subletais dos óleos de gengibre, menta e tomilho e aquelas alimentadas com folhas tratadas com orégano não completaram o estágio larval. A ação alimentar foi, fortemente, inibida pelo óleo essencial de orégano e, moderadamente, pelos os de gengibre, menta e tomilho nos testes com e sem escolha. Os óleos essenciais não alteraram a atividade em grupo de *D. hyalinata*. Os óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho apresentam potencial para serem utilizados no manejo integrado de *D. hyalinata*.

Palavras-chave: Atividade em grupo, bioinseticida, concentrações subletais, índices de deterrence alimentar, Lepidoptera, sobrevivência.

Introdução

O aumento da resistência de pragas, impacto em organismos não alvos e resíduos nos alimentos, associados ao uso indiscriminado de inseticidas químicos, aumentam a importância de medidas alternativas para controlar pragas. Inseticidas botânicos são eficazes, seguros e ecologicamente aceitáveis, usados, principalmente, em sistemas agroecológicos, onde químicos sintéticos são proibidos (Pavela et al., 2016, Zhao et al., 2016).

Plantas produzem metabólitos secundários importantes, incluindo óleos essenciais, para sua sobrevivência e manutenção (Cespedes et al., 2015). O papel dos óleos essenciais está relacionado à sua volatilidade atuando na comunicação química e defesa (Isman et al., 2011, Yazdani et al., 2014). Plantas com ação inseticida podem afetar o comportamento e o desenvolvimento de insetos (Martinez e Van Emden, 2001), inibindo ou reduzindo a alimentação (Jiang et al., 2012) e atuando como repelentes (Mordue (Luntz) Nisbet 2000), fumigantes (Ma et al., 2014) ou atrativos (Bakkali et al., 2008).

Óleos essenciais são constituídos por compostos lipossolúveis com densidades geralmente menores que a água, como monoterpenos e sesquiterpenos (Rubiolo et al., 2010). Essas substâncias podem se difundir, facilmente, pela membrana celular e penetrarem na cutícula dos insetos (Bakkali et al., 2008, Rubiolo et al., 2010). Componentes majoritários de óleos essenciais, normalmente, determinam suas propriedades biológicas, mas aqueles encontrados em baixas porcentagens podem agir sinergicamente e melhorar a eficácia dos constituintes principais (Hummelbrunner e Isman, 2001). Além disso, misturas complexas desses compostos reduzem a possibilidade de desenvolvimento de pragas resistentes (Feng e Isman, 1995).

A mortalidade da praga por agrotóxicos é bem estudada, porém, doses subletais podem afetar a fisiologia e o comportamento de insetos e devem ser consideradas na análise do impacto desses compostos (Packiam et al., 2014, Ribeiro et al., 2015). Concentrações subletais de óleos essenciais sobre as pragas podem afetar o desenvolvimento, a reprodução e a taxa de alimentação sendo a mortalidade em poucas horas, geralmente, necessita de maiores concentrações (Pavela et al., 2008, Roel et al., 2010, Tavares et al., 2013). Efeito subletais podem aumentar a duração dos estádios, inibir o crescimento e a muda e causar perda de peso e anomalias morfológicas e mortalidade (Roel et al., 2010; Pavela, 2012). Extratos botânicos podem manter a densidade

populacional de praga abaixo do nível de dano econômico e conservar os inimigos naturais no ambiente, por serem, geralmente, menos tóxicos aos agentes de controle biológico que inseticidas sintéticos (Tavares et al., 2009).

O gengibre [*Zingiber officinale* (Zingiberaceae)]; menta [*Mentha piperita* (Lamiaceae)]; orégano [*Origanum vulgare* (Lamiaceae)] e tomilho [*Thymus vulgaris* (Lamiaceae)] são plantas com propriedades medicinais difundidas na cultura brasileira e ação deletéria sobre insetos e microrganismos (Abad et al., 2007, Akhtar et al., 2012, Ribeiro et al., 2015). Efeitos de concentrações subletais sobre os insetos-praga devem ser estudados para aumentar o potencial de uso de inseticida botânicos.

Diaphania hyalinata (Linnaeus, 1767) (Lepidoptera: Crambidae), praga chave, de Cucurbitaceae, se alimenta de folhas, brotos, ramos e frutos e causa danos severos em altas densidades populacionais (McSorley e Waddill, 1982, HansPetersen et al., 2010) sendo controlada, basicamente, com pesticidas sintéticos. O uso de inseticidas botânicos no manejo dessa praga é uma alternativa sustentável com menor impacto ambiental e podendo ser usados por produtores agroecológicos ou convencionais reduzindo a aplicação de químicos sintéticos.

O objetivo foi avaliar a sobrevivência, o desenvolvimento, a deterrência alimentar e a atividade em grupo de lagartas de *D. hyalinata* submetidas a concentrações subletais dos óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho.

Material e Métodos

Criação de *Diaphania hyalinata*

Lagartas foram mantidas em potes plásticos (3.000 mL) com tampa furada, vedada com tecido organza e alimentadas, diariamente, com folhas de chuchu [*Sechium edule* (Cucurbitaceae)] da eclosão até a fase de pré-pupa em sala climatizada a $25 \pm 2,2^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10,8\%$, fotofase 12 h. As pré-pupas foram colocadas em embalagens plásticas (3.000 mL) forradas com papel toalha até a pupação e colocadas em gaiolas com laterais teladas e fechadas para emergência dos adultos. Os adultos de *D. hyalinata* foram alimentados com solução nutritiva embebida (água + mel) em algodão colocado no fundo da gaiola em uma placa de Petri. Folhas de abóbora (Cucurbitaceae) foram colocadas no interior das gaiolas para realização de posturas e coletadas após 48h para continuidade da criação (Silva et al., 2015).

Obtenção do material

Os óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho foram adquiridos da empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda e extraídos por destilação a vapor das folhas (menta e oréganos), folhas/flores (tomilho) e do rizoma (gengibre). Os constituintes de cada óleo obtidos pela cromatografia gasosa foram fornecidos (Tabela 1).

Tabela 1. Nome comum (Nom. Com.), nome científico (Nom. Cient.), família e componentes majoritários dos óleos de gengibre, menta, orégano e tomilho

Nom. Com.	Nom. Cient.	Família	Componentes majoritários (%)
Gengibre	<i>Zingiber officinale</i>	Zingiberaceae	Zingibereno (33%), beta-sesquifelandreno (12%), β -bisaboleno (10%), canfeno (8%), mirceno (7%)
Menta	<i>Mentha piperita</i>	Labiatae	Mentol (55%), mentona (25%), acetato de metilo (10%)
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Lamiaceae	Carvacrol (70%), p-cimeno (15%), timol (4,3%)
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i>	Lamiaceae	Timol (50%), p-cimeno (40%), linalool (6,0%)

Concentrações dos óleos essenciais utilizadas

A atividade por contato (atividade em grupo) e ingestão (desenvolvimento larval e deterência) de lagartas de *D. hyalinata*, expostas às concentrações de 0,5; 1; 5; 10 e 15% dos óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho, foram avaliadas e as CL₁₀ e CL₂₅ (Tabela 2) dos óleos estimada pela análise de Probit (Finney, 1971) com o programa SAS (SAS Institute, 1997).

Experimentos

1. Ingestão de concentrações subletais dos óleos essenciais sobre o desenvolvimento de *D. hyalinata*

Folhas de abóbora foram coletadas e discos de 9 cm² retirados das mesmas e, cada um, imersos em cinco mL por dez segundos em concentração subletal (CL₁₀) dos óleos essenciais de gengibre, menta, orégano, tomilho ou acetona (controle) (Tabela 2). Os discos foliares foram deixados secar ao ar livre por 30 minutos e oferecidos, diariamente, às lagartas a partir do segundo ínstar de *D. hyalinata* até a fase de pré-pupa. Uma lagarta de *D. hyalinata* e um disco tratado foram colocados por placa de Petri (9 cm) constituindo uma repetição. A sobrevivência, duração larval, duração pupal, porcentagem de pupação, peso das pupas e a porcentagem de emergência foram avaliados. Pupas com 24 horas de

idade foram pesadas (Roel et al., 2010). O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos (quatro óleos essenciais e o controle) com 30 repetições cada.

2. Deterrência alimentar

As propriedades fagoinibidoras dos óleos essenciais foram avaliadas em dois bioensaios, com e sem chance de escolha. Vinte e um discos (9 cm²) de folhas de abóbora foram imersos por dez segundos por concentrações (CL₂₅) de cada óleo essencial (Tabela 2). Após a imersão, os discos foram deixados secar por uma hora para evaporação do solvente. No teste com chance de escolha (n= 21 por tratamento), um disco de folha de abóbora tratado com óleo essencial e o outro com acetona (marcados para diferenciação) foram dispostos de maneira oposta em uma placa Petri (12 x 1,5 cm) (Zapata et al., 2009). Nos testes sem escolha (n= 21), um disco tratado ou não foi oferecido a cada vez as lagartas de segundo ínstar de *D. hyalinata* no centro da arena (placa de Petri). Após 24 horas, os restos dos discos foliares foram recolhidos e secos a 70 °C até peso constante, em grupos de três, correspondendo a uma repetição. Um disco para o teste e outro como alíquota foram utilizados para se determinar a massa seca dos mesmos após desidratados, obtendo-se a diferença entre a alíquota e o disco consumido pelas lagartas. O índice de deterrência alimentar foi calculado por $IDA = (C - T) / (C + T) \times 100$; onde C e T foram os pesos das folhas consumidas do controle e tratadas, respectivamente, com ou sem chance de escolha (Hummelbrunner e Isman, 2001). A deterrência alimentar foi classificada em classes de atividade com valores de IDA < 0= preferência alimentar, IDA= 0,1 - 30% efeito neutro, IDA= 30,1 - 80% repelência moderada e IDA= 80,1 - 100% repelência forte (Ribeiro et al., 2015).

3. Atividade em grupo

Quinhentos microlitros, por concentração subletal de cada óleo essencial (Tabela 2), ou acetona (controle) foram aplicados por papel filtro (9 cm de diâmetro) (CL₂₅) e deixados secar ao ar livre por 30 minutos. Grupos de dez lagartas de *D. hyalinata* foram colocados por placa de Petri (9,0 cm de diâmetro) forrada com papel filtro tratado. A atividade de grupo por 10 minutos (Tomé et al., 2015) foi avaliada pela variação de pixels entre duas imagens subsequentes do grupo em intervalos 10⁻² seg (Δ pixels/s x 10⁻²), correspondendo à soma de qualquer alteração na posição com um sistema de vídeo-rastreamento com câmara digital CCD (ViewPoint LifeSciences, Montreal, QC, Canada) automatizado. A duração dos períodos de inatividade das lagartas ou com movimento

lento ou rápido foram gravados. Os movimentos do grupo foram registrados, incluindo partes do corpo, caminhadas e interações entre os indivíduos (Tomé et al., 2012). Oito repetições por tratamento (quatro óleos + controle) foram avaliadas.

Análise estatística

Os valores de CL₅₀ e CL₉₀ foram estimados pela análise de Probit (Finney, 1971), utilizando-se o SAS (SAS Institute, 1997).

A curva de sobrevivência no teste de ingestão foi obtida por estimadores de Kaplan-Meier gerados a partir da percentagem de lagartas sobreviventes até a fase de pré-pupa. A duração dos períodos larval e pupal e o peso das pupas foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%, com o software estatístico SAS (SAS Institute, 1997).

As porcentagens de IDA foram transformadas em arco seno $\sqrt{(x/100)}$, submetidas à análise de variância e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) com software estatístico SAS (SAS Institute, 1997).

Os dados da atividade em grupo foram submetidos a análise de variância, e quando significativas, as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados

Ingestão de concentrações subletais sobre o desenvolvimento de *D. hyalinata*:

As concentrações subletais dos óleos essenciais reduziram a sobrevivência larval de *D. hyalinata* (Figura 1). A porcentagem de mortalidade foi maior para lagartas alimentadas com folhas tratadas com orégano e semelhante para os óleos de gengibre, menta e tomilho (Tabela 3).

As lagartas alimentadas com doses subletais do óleo essencial de orégano teve 100% de mortalidade (Figura 1; Tabela 3).

Os óleos essenciais de gengibre, menta e tomilho prolongaram os estádios larvais de *D. hyalinata* ($p < 0,05$) (Tabela 3). As lagartas alimentadas com as folhas tratadas com orégano não completaram o ciclo com sobrevivência de $5,24 \pm 0,22$ dias (Figura 1).

A duração da fase de pupa foi maior ($p < 0,05$) com $9,67 \pm 0,18$ a $11,92 \pm 0,34$ dias, e a porcentagem de lagartas que empuparam menores, 43,33 a 93,3%, com os óleos de gengibre, menta, orégano e tomilho (Tabela 3).

Os pesos das pupas foram menores para as lagartas que alimentaram com folhas tratadas com concentrações subletais dos óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho ($p \leq 0,05$) variando de 0,073 a 0,113mg (Tabela 3). Os tratamentos com os óleos não diferenciaram os pesos das pupas entre si.

A porcentagem de emergência dos adultos foi inferior para os tratamentos com os óleos essenciais com 80; 57; 58 e 53% para o controle, gengibre menta e tomilho respectivamente (Tabela 3).

Deterência alimentar

Concentrações subletais dos óleos essenciais de gengibre, menta e tomilho proporcionaram moderada deterência alimentar ($30,1 > IDA > 80\%$) e o orégano forte deterência ($IDA > 80\%$) nos bioensaios com e sem chance de escolha para lagartas de *D. hyalinata* (Tabela 4). A inibição alimentar foi maior no teste sem escolha (Tabela 4).

Atividade em grupo

Os óleos essenciais de gengibre, menta, tomilho e orégano não afetaram a atividade do grupo de *D. hyalinata* sob exposição por contato ($0,14 \pm 0,03$ pixels/s x 10^{-2} ; $F = 2,23$, $P = 0,08$). A duração do movimento em grupo foi semelhante entre os tratamentos com $9,902 \pm 0,21$ minutos inativas ($F = 1,13$; $P = 0,36$), $0,097 \pm 0,21$ minutos sob movimento lento ($F = 1,12$; $P = 0,36$) e $0,002 \pm 0,0003$ minutos em movimento rápido ($F = 1,98$; $P = 0,12$).

Discussão

Lagartas de *D. hyalinata* tiveram a taxa de sobrevivência, consumo alimentar e desenvolvimento reduzidos com alimentação de folhas de abóbora tratadas com os óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho. Óleos essenciais são formados por hidrocarbonetos com grupos funcionais com atividade inseticida (Bakkali et al., 2008, Rehman et al., 2016), a rapidez de ação desses produtos é dependente da composição química (Akhtar et al., 2012, Rehman et al., 2016). A ação inseticida dos óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho a *D. hyalinata* está relacionada, principalmente, aos constituintes majoritários presentes nesses óleos como o zingibereno (33%); mentol (55%) e mentona (25%); carvacrol (70%) e timol (50%). No entanto, ação sinérgica com substâncias em menores concentrações como o p-cimeno e linalool pode aumentar o

potencial de ação desses compostos (Hummelbrunner e Isman, 2001, Ma et al., 2014, Pavela, 2014).

A menor sobrevivência de *D. hyalinata* com gengibre, menta, orégano e tomilho, em concentrações subletais, sugere potencial de redução da população dessa praga. As reduções da sobrevivência larval e da taxa de natalidade de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) acima de 75% (Pavela, 2012) foram observadas para os óleos de orégano e tomilho (Pavela, 2012). Concentrações subletais do óleo de nim reduziram a taxa de pupação de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) em decorrência do menor consumo alimentar na fase larval (Roel et al., 2010). Além disso, produtos botânicos tendem a ser seletivos aos predadores e parasitoides que podem auxiliar no controle de insetos-pragas (Tavares et al., 2009).

A mortalidade de 100% de *D. hyalinata* alimentadas com folhas tratadas com o orégano sugere toxicidade pelo composto majoritário carvacrol ou ação sinérgicas desse com outras substâncias presentes no óleo dessa planta (Cetin et al., 2007), reduzindo a alimentação ou atuando no sistema digestivo (Mordue (Luntz) e Nisbet, 2000). A inibição do crescimento de lagartas de *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) pelo carvacrol na dose DL_{10} (Hummelbrunner e Isman, 2001) confirma o potencial de controle desse composto mesmo em baixa dose. O óleo essencial de orégano afetou os índices nutricionais de larvas de quarta instar de *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) reduzindo o teor de proteína, hidratos de carbono e lipídios e mostrou efeitos irreversíveis sobre os processos metabólicos (Yazdani et al., 2014).

A maior duração da fase larval de *D. hyalinata* alimentada com as concentrações subletais dos óleos de gengibre, menta e tomilho pode ter ocorrido devido à atuação de substâncias botânicas sobre os quimiorreceptores, estimulando as células deterrentes ou bloqueando os fagoestimuladores e inibindo a alimentação (Mordue (Luntz) e Nisbet 2000). O prolongamento da fase larval pode ser indicativo de toxidade crônica ou menor adequação ao substrato alimentar tratado (Hummelbrunner e Isman, 2001, Pavela et al., 2008). O desenvolvimento mais longo de insetos herbívoros aumenta o período de exposição a inimigos naturais, especialmente, na fase jovem (Hummelbrunner e Isman, 2001).

A maior duração do período pupal de *D. hyalinata* pode estar relacionada a mesma causa do prolongamento larval, o menor consumo de folhas tratadas com os óleos essenciais acarretou redução na ingestão de nutrientes e produção de energia atrasando o

desenvolvimento (Sadek, 2003, Zapata et al., 2009). Deformação das pupas não foi observada para *D. hyalinata* sob o efeito dos óleos essenciais, porém foram registradas anomalias em pupas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner 1818 (Lepidoptera: Erebididae) e *Helicoverpa armigera* Hübner, 1805 (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com nim (Mourão et al., 2014, Packiam et al., 2014), indicando que as substâncias presentes nesses óleos não afetaram a síntese de quitina, como o inseticida botânico a base de nim (Mordue (Luntz) e Nisbet 2000).

Pupas de *D. hyalinata* mais leves mostram reflexo da redução da alimentação ou menor eficiência na conversão dos alimentos ingeridos e digeridos em biomassa (Nathan et al., 2006) como observado para *S. littoralis* alimentadas com dieta tratada com azadiractina (Martinez e Van Emden, 2001). A menor eficiência em converter alimento em biomassa para o crescimento pode ser devido às larvas desviarem energia da biomassa para a desintoxicação (Kumar et al., 2008). A redução alimentar pode diminuir, também, o desenvolvimento dos oócitos e acarretar infertilidade em adultos (Packiam et al., 2014). Extratos de sementes de *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae) e *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae) reduziram o peso de pupas de *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) e *H. armigera*, respectivamente (Satyan et al., 2009, Abbasipour et al., 2010).

A menor emergência de adultos nos tratamentos com os óleos de gengibre, menta e tomilho mostra efeito semelhante ao de extratos de *Bidens sulphurea* e *Acisanthera* sp. para *A. gemmatalis* s (Tavares et al., 2013). A emergência de adultos menores e menos reprodutivos de insetos pragas pode reduzir o potencial de danos às culturas (Tavares et al., 2013).

A atividade alimentar, de moderada a forte, para lagartas de *D. hyalinata* alimentadas com folhas tratadas com concentrações subletais dos óleos essenciais de menta, gengibre, tomilho e orégano, pode ser atribuída às substâncias presentes nesses óleos levando o inseto a movimentar-se para longe (Isman et al., 2011). Os componentes químicos presentes principalmente no orégano, que apresentou forte atividade biológica, podem ter agido sobre as lagartas bloqueando os fagoestimuladores e inibindo a alimentação. Isto se deve ao fato de substâncias de plantas poderem bloquear o efeito estimulante da glicose, sacarose e inositol em quimiorreceptores celulares de insetos (Zapata et al., 2009). Alguns alimentos podem afetar a locomoção e ser fagoinibidor, o que indica um efeito pós-digestivo crônico (Messchendorp et al., 2000). A ação deterrente

de óleos pode estar associada com a inibição ou redução do crescimento de lagartas de *D. hyalinata* como observado para *S. littoralis* (Sadek, 2003). Substâncias podem ser classificadas como repelentes (repelem o inseto sem fazer contato com o material), supressoras (inibem a atividade de morder após o contato) ou deterrentes (impedem que o inseto continue alimentar após a ingestão do material) (Schoonhoven et al., 1982; Chapman, 1974) sugerindo que óleos de gengibre menta, orégano e tomilho apresentam características supressoras e/ou dissuasivas.

Irritabilidade e alteração na atividade em grupo de *D. hyalinata* não foram comprovadas, quando lagartas estiveram em contato com óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho, por não causarem estímulos excitatório dos indivíduos, semelhante ao observado pelo contato de azadiractina em abelhas (Tomé et al., 2015).

Conclusões

Os óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho em concentrações subletais reduziram a sobrevivência e emergência de adultos; prolongaram o desenvolvimento de lagartas e pupas e reduziu o peso de pupas de *D. hyalinata*.

O óleo de orégano apresentou forte ação antialimentar e os de gengibre, menta e tomilho moderada para lagartas de *D. hyalinata* em testes com e sem escolha.

Os óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho não alteraram a atividade em grupo de lagartas de *D. hyalinata*.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da bolsa de estudos, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte a pesquisa.

Referência

- Abad M, Ansuategui M, Bermejo P. 2007. Active antifungal substances from natural sources. **Arkivoc** 7: 116-145.
- Abbasipour H, Mahmoudvand M, Rastegar F, Basij M. 2010. Insecticidal activity of *Peganum harmala* seed extract against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Bulletin of Insectology** 63: 259-263.
- Akhtar YL, Pages E, Stevens A, Bradbury R, Camara CAG, Isman MB. 2012. Effect of chemical complexity of essential oils on feeding deterrence in larvae of the cabbage looper. **Physiological Entomology** 37: 81-91.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils-a review. **Food and Chemical Toxicology** 46: 446-75.
- Céspedes CL, Alarcon JE, Aqueveque P, Seigler DS, Kubo I. 2015. In the search for new secondary metabolites with biopesticidal properties. **Israel Journal of Plant Sciences** 62: 216-228.
- Cetin H, Erler F, Yanikoglu AA. 2007. A comparative evaluation of *Origanum onites* essential oil and its four major components as larvicides against the pine processionary moth, *Thaumetopoea wilkinsoni* Tams. **Pest Management Science** 63, 830-833.
- Chapman RF. 1974. The chemical inhibition of feeding by phytophagous insects: a review. **Bulletin of Entomological Research** 64, 339-363.
- Feng R, Isman MB. 1995. Selection for resistance to azadirachtin in the green peach aphid, *Myzus persicae*. **Experientia**, 51: 831-834.
- Hanspetersen HN, Mcorley R, Liburd OE. 2010. The impact of intercropping squash with non-crop vegetation borders on the above-ground arthropod community. **Florida Entomologist** 93: 590-608
- Hummelbrunner LA, Isman MB. 2001. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 49: 715-720.
- Isman MB, Miresmailli S, Machial C. 2011. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochemistry Reviews** 10: 197-204.

- Jiang ZL, Akhtar Y, Zhang X, Bradbury R, Isman MB. 2012. Insecticidal and feeding deterrent activities of essential oils in the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Applied Entomology** 136: 191-202.
- Kumar NS, Murugan K, Zhang W. 2008. Additive interaction of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus and azadirachtin. **BioControl** 53: 869-880.
- Ma Wei-Bin, Feng Jun-Tao, Jiang Zhi-L, Wu Hua, Ma Zhi-Qing, Zhang Xing. 2014. Fumigant activity of eleven essential oil compounds and their selected binary mixtures against *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research** 113: 3631-3637.
- Martinez SS, Van Emden HF. 2001. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by Azadirachtin. **Neotropical Entomology** 30: 113-125.
- Mcsorley R, Waddill VH. 1982. Partitioning yield loss on yellow squash into nematode and insect components. **Journal of Nematology** 14: 110-118.
- Messchendorp L, Gols G, Van Loon J. 2000. Behavioral observations of *Pieris brassicae* larvae indicate multiple mechanisms of action of analogous drimane antifeedants. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 95: 217-227.
- Mordue (Luntz) AJ, Nisbet AJ. 2000. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its actions against insects. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira** 29: 615-632.
- Mourão SA, Zanuncio JC, Tavares WS, Wilcken CF, Leite GLD, Serrão JE. 2014. Mortality of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) caterpillars post exposure to a commercial neem (*Azadirachta indica*, Meliaceae) oil formulation. **The Florida Entomologist** 97: 555-561.
- Nathan SS, Sehoon K. 2006. Effects of *Melia azedarach* L. extracts on the teak defoliator *Hyblea punea* Cramer (Lepidoptera: Hyblaede). **Crop Protection** 25: 287-291.
- Packiam SM, Baskar K, Ignacimuthu S. 2014. Feeding deterrent and growth inhibitory activities of PONNEEM, a newly developed phytopesticidal formulation against *Helicoverpa armigera* (Hubner). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine** 4: S323-S328.
- Pavela R, Vrchotova N, Será B. 2008. Inhibitory growth effect of extracts from *Reynoutria* spp. plants against *Spodoptera littoralis* Larvae. **Agrociencia** 42: 573-584.

- Pavela R, Zabka M, Bednar J, Triska J, Vrchotova N. 2016. New knowledge for yield, composition and insecticidal activity of essential oils obtained from the aerial parts or seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Industrial Crops and Products** 83: 275-282.
- Pavela R. 2012. Sublethal effects of some essential oils on the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisduval). **Journal of Essential Oil Bearing Plants** 15: 144-156.
- Pavela R. 2014. Acute, synergistic and antagonistic effects of some aromatic compounds on the *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lep., Noctuidae) larvae. **Industrial Crops and Products** 60: 247-258.
- Rehman R, Hanif MA, Mushtaq Z, Al-Sadi AM. 2016. Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: A review. **Food Reviews International** 32: 117-160.
- Ribeiro RC, Zanuncio TV, Ramalho FS, Da Silva CAD, Serrão JE, Zanuncio JC. 2015. Feeding and oviposition of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) with sublethal concentrations of ten condiments essential oils. **Industrial Crops and Products** 74: 139-143.
- Roel AR, Dourado DM, Matias R, Porto KRA, Bednaski AV, Costas RB. 2010. The effect of sub-lethal doses of *Azadirachta indica* (Meliaceae) oil on the midgut of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). **Revista Brasileira de Entomologia** 54: 505-510.
- Rubiolo P, Gorbini B, Liberto SE, Cordero C, Bicchi C. 2010. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. **Flavour and Fragrance Journal** 25: 282-290.
- Sadek MM. 2003. Antifeedant and toxic activity of *Adhatoda vasica* leaf extract against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). **Journal of Applied Entomology** 127: 396-404.
- SAS. Institute Sas, User`s guide: statistics. SAS Institute Cary, NC, USA. 1997.
- Satyan RS, Malarvannan S, Eganathan P, Rajalakshmi S, Parida A. 2009. Growth inhibitory activity of fatty acid methyl esters in the whole seed oil of madagascar Periwinkle (Apocyanaceae) against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology** 102: 1197-1202.
- Schoonhoven LM. 1982. Biological aspects of antifeedants. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 31: 57-69.

- Silva IM, Zanuncio TV, Pereira FF, Wilcken CF, Serrão JE, Zanuncio JC. 2015. Reproduction of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) in the pupae of *Diaphannia hialinata* (Lepidoptera: Crambidae) of various ages. **The Florida Entomologist** 98: 1025 -1029.
- Tavares WS, Freitas SS, Teles AM, Graef CFF, De Assis Júnior SS, Lião LM, Serrão JE, Zanuncio JC. 2013. Potential of aromatic and medicinal plant extracts from Cerrado biome to control the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas** 12: 372-384.
- Tavares WS, Cruz I, Petacci F, Assis Júnior SL, Freitas SS, Zanuncio JC, Serrão JE. 2009. Potential use of Asteraceae extracts to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae). **Industrial Crops and Products** 30: 384-388.
- Tomé HVV, Barbosa WF, Corrêa AS, Gontijo LM, Martins GF, Guedes RNC. 2015. Reduced-risk insecticides in Neotropical stingless bee species: impact on survival and activity. **Annals of Applied Biology** 167: 186-196.
- Tomé HVV, Martins GF, Lima MAP, Campos LAO, Guedes RNC. 2012. Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **PLoS One** 7: e38406.
- Yazdani E, Sendi JJ, Hajizadeh J. 2014. Effect of *Thymus vulgaris* L. and *Origanum vulgare* L. essential oils on toxicity, food consumption, and biochemical properties of lesser mulberry pyralid *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Plant Protection Research** 54: 53-61.
- Zapata N, Budia F, Vinuela, E, Medina, Pilar. 2009. Antifeedant and growth inhibitory effects of extracts and drimanes of *Drimys winteri* stem bark against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). **Industrial Crops and Products** 30: 119-125.
- Zhao XM, Xi X, Hu Z, Wu WJ, Zhang JW. 2016. Exploration of novel botanical insecticide leads: synthesis and insecticidal activity of beta-Dihydroagarofuran derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 64: 1503-1508.

Tabela 2. Concentrações subletais dos óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho para os bioensaios de crescimento (CL₁₀), deterrence alimentar (CL₂₅) e atividade em grupo (CL₂₅) em lagartas de *Diphanía hyalinata* (Lepidoptera: Crambidae)

Tratamentos	CL ₁₀ [*] (%)	IC 95%	CL ₂₅ [*] (%)	IC 95%
Gengibre	0,84	0,57-1,11	1,50	1,14-1,85
Menta	0,42	0,26-0,55	0,66	0,49-0,80
Orégano	0,34	0,20-0,47	0,56	0,38-0,70
Tomilho	0,36	0,17-0,51	0,55	0,33-0,72

* IC= Intervalo de confiança a 95%

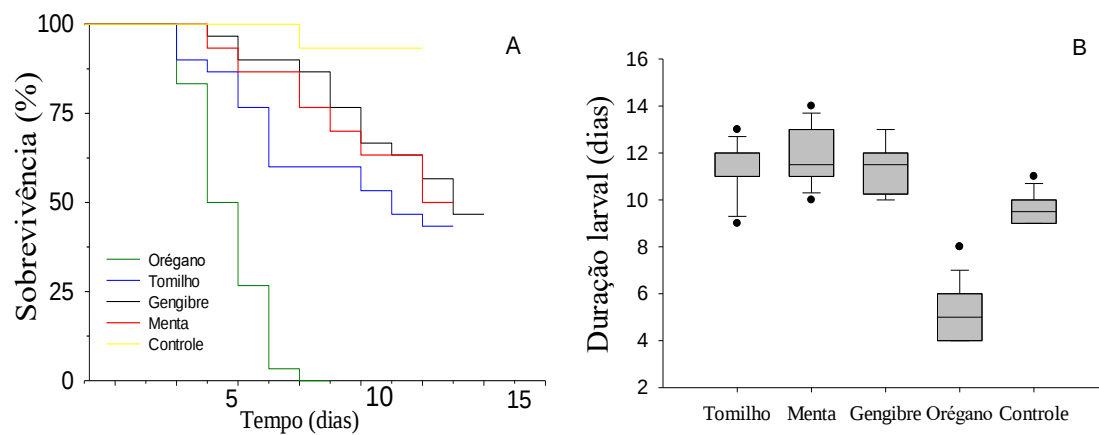


Figura 1. Sobrevivência estimada por Kaplan- Meier (A) e duração larval (dias) (B) de lagartas de *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Crambidae) alimentadas com concentrações subletais (CL₁₀) dos óleos essenciais de gengibre, menta, tomilho e orégano.

Tabela 3. Tabela 3. Duração larval (Dur. Lar.); porcentagem de mortalidade larval (% Mort. Larval); duração pupal (Dur. Pupal); porcentagem de pupação (% pupas); peso das pupas (P. pupas) (mg) e porcentagem de emergência dos adultos (% emerg) (médias $\pm$ EP) de lagartas de *Diphanía hyalinata* (Lepidoptera: Crambidae) com concentrações subletais (CL₁₀) dos óleos essenciais de gengibre, menta, tomilho e orégano

Trat.	Dur.larval ¹ (dias)	% Mort. Larval	Dur. Pupal (dias)	% pupas	P. pupas (mg)	% emerg.
Controle	7,67 $\pm$ 0,15 a	6,66	9,67 $\pm$ 0,18 a	93,33	0,113 $\pm$ 0,02 a	80
Gengibre	10,73 $\pm$ 0,59 b	50,00	11,42 $\pm$ 0,30 b	50,00	0,073 $\pm$ 0,004b	57
Menta	11,07 $\pm$ 0,27 b	53,33	11,92 $\pm$ 0,34 b	46,67	0,083 $\pm$ 0,003 b	58
Tomilho	10,53 $\pm$ 0,30 b	56,67	11,25 $\pm$ 0,29 b	43,33	0,079 $\pm$ 0,004 b	53
Orégano	*	100	NA	0	NA	NA

Trat. = Tratamento. EP = erro padrão

¹ Testes com lagartas a partir do segundo instar e só foram selecionadas as lagartas que completaram o estágio larval.

* Não completou o estágio larval; NA= Não avaliado.

Valores com mesma letra por coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 4. Índices de deterrência alimentar (IDA $\pm$ erro padrão) sob o efeito de concentrações subletais dos óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho, a lagartas de segundo ínstar de *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Crambidae) em laboratório, sem e com chance de escolha.

Tratamentos	Sem escolha	Com escolha	Atividade biológica
Gengibre	56,64 $\pm$ 5,88 A	37,70 $\pm$ 4,31 A	Moderado
Menta	74,82 $\pm$ 3,88 B	56,70 $\pm$ 2,55 B	Moderado
Orégano	94,36 $\pm$ 1,05 C	84,25 $\pm$ 0,82 C	Forte
Tomilho	76,89 $\pm$ 3,89 B	57,78 $\pm$ 3,24 B	Moderado

Valores com mesma letra por coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Capítulo III

Seletividade e resposta comportamental de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) e *Trigona hyalinata* (Lepeletier, 1836) (Hymenoptera: Apidae) a óleos essenciais com potencial inseticida

Seletividade e resposta comportamental de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) e *Trigona hyalinata* (Lepeletier, 1836) (Hymenoptera: Apidae) a óleos essenciais com potencial inseticida

Resumo

Óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho apresentam ação inseticida e podem ser usados, principalmente, em cultivo orgânico, onde sintéticos são proibidos. Porém a toxicidade desses produtos a abelhas é pouco conhecida. Forrageiras de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 e *Trigona hyalinata* (Lepeletier, 1836) (Hymenoptera: Apidae) foram expostas por contato, ingestão e tópico em diferentes concentrações dos óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho para se obter os valores das CL₅₀ e CL₉₀. O orégano e o tomilho foram os mais tóxicos por contato e tópico, principalmente, para *A. mellifera* e a menta e o gengibre apresentaram baixa toxicidade para ambas as espécies de polinizadores. No teste de ingestão não foi possível calcular as CL₅₀ e CL₉₀ por não ter observado a alimentação da dieta contaminada e houve mortalidade de todas as abelhas nas concentrações avaliadas. *Trigona hyalinata* foi menos sensível aos óleos essenciais testados que a *A. mellifera*. No teste de locomoção dois ensaios foram avaliados, arenas total ou parcialmente tratadas com as concentrações CL₅₀ dos óleos essenciais. Em área totalmente tratada, o orégano reduziu a distância percorrida e a velocidade de movimentação e aumentou o tempo e o número de paradas de *A. mellifera*, já para *T. hyalinata* houve aumento da distância percorrida e velocidade e redução do número de parada para os óleos essenciais de orégano e tomilho. Em arena parcialmente tratada observou irritabilidade para os óleos de gengibre, menta e tomilho para *A. mellifera* e gengibre e tomilho para *T. hyalinata* pelo menor tempo de permanência na área tratada. Não houve repelência dos óleos essenciais para ambas as espécies de polinizadores. Os óleos essenciais de gengibre e menta foram seletivos para *A. mellifera* e *T. hyalinata*.

Palavras-chave: Apidae, óleos essenciais, plantas inseticidas, polinização, seletividade

Introdução

Cucurbitaceae, geralmente, apresenta flores unissexuais com pólen pesado e pegajoso, impedindo a transferência pelo vento (Nepi e Pacini, 1993; Costa et al., 2014) sendo a polinização dependente de insetos como as abelhas *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 e *Trigona* spp. (Hymenoptera: Apidae) (Serra e Campos, 2010, Singh et al., 2014). A primeira espécie é um híbrido entre as abelhas africanas e europeias, conhecidas como africanizadas (Singh et al., 2014), a segunda pertencente a subfamília Meliponinae conhecidas como abelhas nativas sem ferrão, são importantes na polinização de espécies silvestres e cultivadas (Serra e Campos, 2010, Carvalho e Del Lama, 2015).

Abelhas prestam serviços cruciais na propagação de plantas, no entanto, estão em declínio em alguns países, inclusive no Brasil, provavelmente efeito da combinação de fatores como perda de habitat, patógenos e o uso intensivo de agrotóxicos (Tomé et al., 2012, Costa et al., 2014). A redução das colônias de abelhas, conhecida como Distúrbio do Colapso das Colônias (CCD, sigla em inglês) coloca em risco a polinização e a produção de produtos apícolas como mel, cera, própolis e geleia real (Barth, 2004; Matos et al., 2014).

As abelhas são expostas aos inseticidas pelo contato da superfície de plantas contaminadas durante a colheita do pólen e néctar ou ingerindo seiva de plantas originadas de sementes revestidas com inseticida sistêmico (Chauzat et al., 2006; Girolami et al., 2009). Os pesticidas abamectin, acetamiprida, cartap-cloridrato, clorfenapir, deltametrina e tiametoxam, utilizados em *Cucumis melo* (Cucurbitaceae) foram tóxicos para operárias de *A. mellifera* por pulverização direta, dieta contaminada e contato com folhas pulverizadas (Costa et al., 2014). Larvas de *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836 (Apidae: Meliponini) alimentadas com dieta contaminada com o inseticida imidacloprido apresentaram elevada mortalidade e comprometimento da mobilidade dos adultos (Tomé et al., 2012).

A contaminação de abelhas por inseticidas pode afetar a reprodução, aprendizado, forrageamento e o crescimento com a má formação da pupa e falha na emergência de adultos (Koskor et al. 2009, Belzunces et al. 2012) ou alterar o comportamento dos insetos pela irritabilidade e repelência (Tomé et al., 2012, Xavier et al., 2015). A presença de resíduos em pólen, néctar e cera interferem na qualidade e valor de mercado (Dively e Kamel, 2012).

Inseticidas botânicos, no controle de pragas agrícolas (Erler e Cetin, 2009, Vojoudi et al., 2014), são vantajosos por, geralmente, serem menos tóxicos a organismos não alvos e ao ambiente, em razão da rápida degradação ou por desaparecerem das folhagens da planta por volatilização, minimizando o contato residual a polinizadores e agentes de controle biológico

(Ismam, 2000). No entanto, apesar do termo natural, algumas substâncias presentes em plantas são repelentes e tóxicas as abelhas (Singh e Upadhyay, 1993, Carayon et al., 2014). Extratos de *Petroselinum sativum* (Apiaceae), *Laurus nobilis* (Lauraceae), *Plantago psyllium* (Plantaginaceae) foram seletivos, mas os de *Cicer arietinum* (Fabaceae) e *Myristica fragrans* (Myristicaceae) mataram 80 e 70%, respectivamente, dos indivíduos de *Apis mellifera syriaca* (Zaitoun, 2007). O bioensetecida spinosad foi tóxico a *M. quadrifasciata* em doses inferiores à de campo (Tomé et al., 2015a). Assim, produtos botânicos não devem ser isentos de avaliação toxicológica.

A vulnerabilidade de *A. mellifera* a pesticidas tem sido estudada (Albo et al., 2003; Costa et al., 2014), mas o efeito destes produtos em abelhas nativas sem ferrão, como a *Trigona hyalinata* (Lepeletier, 1836) (Hymenoptera: Apidae) é escasso, principalmente, com inseticidas botânicos. O desenvolvimento (ovo-adulto) das abelhas sem ferrão, geralmente, é mais longo que a *Apis* spp., e, por isto, seu declínio pode afetar de forma mais severa a sobrevivência destas espécies. As abelhas *T. hyalinata* são polinizadores nativos, com grande importância para manutenção do agrossistema (Slaa, 2006).

O uso em conjunto da seletividade ecológica (minimizar a exposição de organismos não alvos) e fisiológica (inseticidas mais tóxicos às pragas que a organismos não alvos) pode reduzir o efeito deletério de pesticidas em organismo benéficos (Ripper et al. 1951). Mecanismos comportamentais aumentam a capacidade de os insetos evitarem o contato com compostos tóxicos através da fuga após a detecção de substâncias irritantes ou repelentes (Beckel et al., 2004, Tomé et al., 2012). Por isso, conhecer as alterações comportamentais dos insetos em contato com inseticidas são importantes na escolha de produtos seletivos.

Inseticidas botânicos no Manejo Integrado e no Manejo Ecológico de Pragas são geralmente, mais seguros a saúde do homem e ao ambiente do que os sintéticos e representam uma alternativa aos agricultores orgânicos (Isman, 2000; Koul et al, 2008, Erler e Cetin, 2009). Óleos essenciais de gengibre [*Zingiber officinale* (Zingiberaceae)]; menta [*Mentha piperita* (Lamiaceae)]; orégano [*Origanum vulgare* (Lamiaceae)] e tomilho [*Thymus vulgaris* (Lamiaceae)] podem ser usados no controle de insetos-pragas (Erler e Cetin, 2009, Vojoudi et al., 2014), porém o efeito sobre as abelhas, que indiretamente entram em contato, é desconhecido. Dada a importância das abelhas na polinização das culturas e flores silvestres, devem ser tomadas medidas para evitar declínio da população.

O objetivo foi determinar as toxidades letais (CL₉₀) e (CL₅₀) dos óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho, usados no controle de praga, e observar os padrões de

locomoção em arenas totalmente e parcialmente tratadas com as CL₅₀ desses produtos para os polinizadores *A. mellifera* e *T. hyalinata*.

Material e Métodos

Coleta das abelhas e obtenção dos óleos essenciais

Operárias forrageiras de *A. mellifera* e *T. hyalinata* foram obtidas de colônias do Apiário da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG e coletadas na entrada das colônias com auxílio de um frasco com boca larga. Os testes foram conduzidos em câmara B.O.D a 32 ± 1 °C e 28 ± 1 °C para *A. mellifera* e *T. hyalinata* respectivamente.

Óleos essenciais de gengibre, menta, oréganos e tomilho foram adquiridos da Ferquima Indústria e Comércio Ltda. (Vargem Grande Paulista – São Paulo, Brasil) extraídos pelo fornecedor em escala industrial por destilação a vapor das folhas (menta e oréganos), folhas/flores (tomilho) e das raízes (gengibre). A Cromatografia dos óleos essenciais foi fornecida pela empresa (Tabela 1).

Bioensaio de toxicidade

As concentrações utilizadas dos óleos de gengibre, menta, orégano e tomilho variaram com o modo de exposição e via de contato com faixa de 0,5 a 25% (v/v). Acetona foi utilizada como solvente, pois não apresentou toxicidade as abelhas em testes preliminares contendo água e acetona pura. As abelhas foram colocadas na geladeira por cinco minutos para facilitar o manuseio antes da montagem dos experimentos.

Exposição dos insetos em superfície contaminada: Papel filtro (9 cm) foi impregnado com 500 µL da solução nos concentrados dos óleos de gengibre, menta, orégano e tomilho e deixados secar à sombra por uma hora. Dez abelhas foram colocadas por pote plástico (250 ml) forrado com o papel filtro tratado. Os potes foram furados na lateral para inserção de um tubo contendo água e mel (1:1) e as tampas perfuradas e recobertas por organza para ventilação. Um chumaço de algodão embebido com água foi colocado no fundo dos recipientes em todos os tratamentos. A mortalidade foi avaliada às 24 e 48h (Moraes et al., 2000).

Exposição tópica: Abelhas foram expostas por 1µL topicamente no mesonoto, entre o 1º e 2º par de pernas, em concentrações pré-estabelecidas dos óleos de gengibre, menta, orégano e tomilho. Dez abelhas foram colocadas por pote plástico (250 mL) nas mesmas condições da aplicação por contato. A mortalidade foi avaliada às 24 e 48h (Gashout e Guzmán-Novoa, 2009).

Exposição por ingestão: As abelhas foram privadas da alimentação por trinta minutos. Os óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho foram incorporados à dieta líquida (água: mel) com o emulsificante Tween[®] 80, 0,01% (v/v), para solubilização. Dez abelhas foram colocadas por pote plástico (250 mL) e a água fornecida em todos os tratamentos. A mortalidade foi avaliada às 24 e 48h (Tomé et al., 2015b).

Bioensaios de Locomoção

Dois bioensaios locomotores foram realizados para *A. mellifera* e *T. hyalinata* em arenas totalmente e parcialmente tratadas com os óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho (Guedes et al, 2009). As arenas foram confeccionadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro), cujo fundo foi recoberto por papel filtro e as paredes revestidas com Teflon[®] PTFE (DuPont, Wilmington, DE, USA) para evitar o escape dos insetos. O papel filtro foi tratado pela aplicação de 500 µL dos óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho na concentração (CL₅₀) estabelecida no teste de contato. O controle teve apenas acetona sobre o papel.

Em ambos os bioensaios as arenas foram levadas ao sistema de rastreamento com câmera de vídeo acoplada a um computador (ViewPoint Life Sciences Inc., Montreal – Canadá) e liberada uma abelha ao centro avaliando o comportamento locomotor por 10 minutos.

O bioensaio, sem chance de escolha, foi constituído de duas arenas, a primeira totalmente tratada com os óleos essenciais e a outra apenas acetona. A distância percorrida, velocidade de movimentação, tempo e número de paradas das abelhas foram avaliados. No bioensaio com chance de escolha, a arena foi confeccionada com metade tratada com o óleo essencial e outra metade não. O tempo de permanência em cada arena foi avaliado.

Análise estatística

No bioensaio de toxicidade, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado constituído de cinco repetições por tratamento (concentrações dos óleos essenciais). Grupos de 10 abelhas foram usados por repetição, totalizando 50 abelhas por concentração testada. Os dados corrigidos pela fórmula de Abbott (Abbott, 1925) foram estimados pela análise de Probit pelo SAS (SAS Institute, 1997) e determinada às concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀) e seus limites de confiança. A tolerância relativa entre as espécies foi calculada pela fórmula $ITR_{50} = CL_{50} \text{ do produto para } T. hyalinata / CL_{50} \text{ produto para } A. mellifera$.

No teste de caminhamento, os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com 14 repetições, cada uma, constituída por uma abelha. A cada repetição o papel filtro e as abelhas foram substituídos. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% para o bioensaio sem chance de escolha e o teste de t a 5% para bioensaio com chance de escolha utilizando-se o software SAS (SAS Institute, 1997).

Resultados

Bioensaio de toxicidade

Contato (superfície contaminada): A toxidade dos óleos essenciais foi, em ordem decrescente, orégano, tomilho, menta e gengibre para *A. mellifera* e *T. hyalinata* às 24 e 48h (Tabelas 2 e 3).

Trigona hyalinata foi 1,10x e 1,29x vezes mais tolerante (ITR₅₀) ao gengibre, 1,62x e 1,73x a menta, 7,52x e 14,10x ao orégano e 3,18x e 3,74x ao tomilho que *A. mellifera* a 24 h e 48h respectivamente (Tabela 4).

Tópico: O óleo essencial de gengibre foi o menos tóxico por aplicação tópica para as abelhas *A. mellifera* e *T. hyalinata*, seguido dos óleos de menta, tomilho e orégano (Tabelas 2 e 3).

Trigona hyalinata foi menos sensível que *A. mellifera* aos óleos de gengibre, menta, orégano e tomilho a 24 e 48h como observado pelo índice de tolerância relativa (ITR₅₀) (Tabela 4).

A aplicação tópica apresentou menor declividade (Slope) da curva de concentração-mortalidade.

Ingestão: A curva concentração-mortalidade para *A. melífera* e *T. hyalinata* não foi determinada devido à alta porcentagem de mortalidade em todas as concentrações. Isso impossibilita a definição real da morte (inanição alimentar ou toxidade caso as abelhas tenham provado o alimento).

Bioensaio de locomoção

Área totalmente tratada: Adultos de *A. mellifera* reduziram a distância percorrida ($F_{1,69} = 2,12$; $p < 0,05$) e a velocidade de caminhamento ($F_{1,69} = 2,72$; $p < 0,05$) e aumentou o número ($F_{1,69} = 6,11$; $p < 0,05$) e tempo de parada ($F_{1,69} = 9,05,71$; $p < 0,05$) em arenas tratadas com o óleo

essencial de orégano. Para os óleos de gengibre, menta e tomilho não houve diferença do controle ($p > 0,05$) para os parâmetros avaliados (Figura 1). Arenas tratadas com os óleos de orégano e tomilho reduziram a velocidade de movimentação e a distância percorrida e aumentou o número de parada de *T. hyalinata*. O tempo em movimento não diferiu entre os tratamentos. Os óleos essenciais de gengibre e menta foram semelhantes ao controle para os parâmetros avaliados (Figura 1). Padrões característicos do caminhar de *A. mellifera* e *T. hyalinata* em arena totalmente tratada são mostrados na Figura 3.

Área parcialmente tratada: Os óleos de gengibre ($t_{1,28} = 4,89$; $p < 0,05$), tomilho ($t_{1,28} = 2,82$; $p < 0,05$) e menta ($t_{1,28} = 2,17$; $p < 0,05$), afetaram o tempo de permanência de *A. mellifera* no hemisfério tratado, permanecendo menor tempo neste, já para o orégano o polinizador permaneceu por uma proporção de tempo semelhante nas duas metades da arena (Figura 2). *Trigona hyalinata* permaneceu menor tempo em arenas tratadas com gengibre ($t_{1,28} = 2,84$; $p < 0,05$) e tomilho ($t_{1,28} = 2,09$; $p < 0,05$) e com tempo semelhante para os óleos de menta e orégano (Figura 2). Padrões característicos do caminhar de *A. mellifera* e *T. hyalinata* em arena totalmente e parcialmente tratada são mostrados na Figuras 4.

Discussão

Bioensaio de toxicidade

Diferenças na toxicidade entre os óleos de gengibre, menta, orégano e tomilho para *A. mellifera* e *T. hyalinata* estão relacionadas dentre outros fatores a taxa de penetração ou atividade de substâncias tóxicas no organismo. A penetração dessas substâncias na cutícula dos insetos é diretamente proporcional a sua lipofilicidade no qual compostos lipofílicos, devido a semelhança com a cutícula, difundem mais facilmente no corpo dos artrópodes (Hornsby et al., 1996, Leite et al., 1998). A concentração e toxicidade dos aleloquímicos bioativos presentes são outros fatores determinantes nesse processo (Isman, 2000, Koul et al., 2008). Ação inseticida de produtos botânicos é atribuída, principalmente, aos terpenos, substâncias encontradas em plantas para proteção de insetos-pragas e patógenos (Erler e Cetin, 2009, Machial et al., 2009, Ribeiro et al., 2015).

A maior toxicidade do óleo de orégano para *A. mellifera* por contato e tópica sugere cautela no uso e a adoção do princípio da seletividade ecológica, aplicando em horário de baixo forrageamento e evitando período de florescimento para minimizar a exposição às abelhas (Joshi e Joshi 2010). A maior toxicidade desse óleo é atribuída ao fato do composto majoritário carvacrol (fenol) ser mais tóxico que o zingibereno (hidrocarboneto) do gengibre e o mentol

(álcool) da menta (Erler e Cetin, 2009). Apesar da toxicidade do orégano para *T. hyalinata* as CLs desse produto são superiores as encontradas no controle de pragas (Cetin et al., 2007; Erler e Cetin, 2009; Yazdani et al., 2014, Ribeiro et al., 2015), indicando baixo grau de contaminação a este polinizador desde que usada nas concentrações corretas.

A toxicidade do tomilho, principalmente para *A. mellifera*, confirma o observado em outros experimentos com redução do movimento das abelhas e na produção de cera (Carayon et al., 2014). O timol, composto ativo, extraído do tomilho é utilizado no controle do ácaro *Varroa destructor* (Charpentier et al., 2013) e do fungo *Nosema ceranae* (Costa et al., 2009) em *A. mellifera*. A concentração tóxica para *T. hyalinata* foi acima das observadas para o controle de praga (Machial et al., 2009; Yazdani et al., 2014). A meia vida residual de inseticidas botânicos é mais curta no campo, assim, o tempo de exposição e o efeito em organismo não alvo serão reduzidos, além de, geralmente, apresentarem menor toxicidade que os sintéticos, como observado para o timol que foi 50 vezes menos tóxico a abelhas que o dimetoato (Albo et al., 2003). Devido à sua volatilidade, os óleos essenciais têm menor persistência em campo, assim, apesar da susceptibilidade a polinizadores um ou mais dias após a aplicação, as abelhas podem não ser susceptíveis ao envenenamento por contato residuais, tal como muitas vezes ocorre com inseticidas convencionais (Isman, 2000).

A baixa toxicidade dos óleos de menta e gengibre as duas espécies de abelhas via tópica e contato pode estar relacionada a ausência de susceptibilidade e/ou a menor taxa de penetração dos metabólitos desses óleos na cutícula das abelhas (Yu, 1987, Leite et al., 1998), conferindo a esse produto maior segurança aos polinizadores quando aplicado. Assim, devem ser preferíveis no controle de pragas durante a floração quando as plantas são visitadas pelas abelhas. O grau de toxicidade de substâncias botânicas para abelhas foi em ordem decrescente do ácido oxálico > orégano e timol > mentol, sendo este último semelhante ao controle (Ebert et al., 2007). Apilife Var® usado no controle de *V. destructor* apresenta mentol em sua composição, porém este composto não foi detectado no cérebro e corpo de abelhas e nem na cera produzida (Carayon et al., 2014). A baixa toxicidade do óleo de menta foi, também, relatada para larvas de *Apis* sp., $CL_{50}=382,8 \mu\text{g/larva}$, enquanto os de tomilho e orégano foram tóxicos com $CL_{50}= 150,7$ e $236,4 \mu\text{g/larva}$, respectivamente (Gashout e Guzmán-Novoa, 2009).

Alteração na cor, sabor e odor observado na dieta contaminada com os óleos de gengibre, menta, orégano e tomilho pode ter afugentado as abelhas e evitado a alimentação. A morte das abelhas neste período sugere inanição alimentar como observado para o óleo de nim que apresentou toxicidade por contato a *A. mellifera*, mas, impossibilitou avaliação por ingestão

pela ausência de alimentação das abelhas por esta via, atribuída a propriedade antialimentar do princípio ativo azadiractina presente no nim (Ladurner et al. 2005). A repelência pode ser em condições de campo, favorável às forrageiras por evitarem plantas tratadas.

A menor declividade (Slope) da curva de concentração-mortalidade para aplicação tópica que por contato sugere diferente susceptibilidade com o modo de aplicação e que adultos de *A. mellifera* e *T. hyalinata* respondem de forma mais homogênea quando em contato com superfície. O declive das curvas pode indicar a potência de um inseticida e o grau de homogeneidade genética envolvidos na tolerância, por exemplo, os genes para as enzimas de desintoxicação na população de ensaio (Rinkevich et al., 2015). Valores altos de declividade da curva indicam que pequenas variações na dose do produto causam grandes variações na mortalidade, resultando em resposta homogênea da população (Kerns e Gaylor 1992). A aplicação de inseticidas com esta resposta é mais nociva a organismos benéficos e deve ser evitada em horário de forrageamento e realizada a calibração correta para reduzir os efeitos sobre os polinizadores no campo.

A susceptibilidade entre *A. mellifera* e *T. hyalinata* aos óleos de gengibre, menta, orégano e tomilho diferem de relatos de que quanto maior a abelha, menos suscetível a pesticida (Moraes et al., 2000, Valdovinos-Núñez et al., 2009). Alterações morfológicas e fisiológicas, presença de enzimas desintoxicantes, níveis de depósitos de gordura e o pH da hemolinfa entre espécies podem explicar a diferença de vulnerabilidade dessas espécies (Ahmad e Johansen 1973, Desneux et al., 2007). A penetração de substâncias e sua translocação até o alvo de ação estão relacionadas, também, a características como espessura, superfície específica e natureza lipofílica da cutícula de cada inseto (Hornsby et al. 1996, Leite et al., 1998).

Bioensaio de caminhamento

A redução da distância percorrida e da velocidade de movimentação e aumento do número de parada de adultos de *A. mellifera* por contato com o óleo de orégano e de *T. hyalinata* com os de orégano e tomilho mostram efeito de arrestância no qual o inseto tende a parar ou tornar os movimentos mais lentos (Desneux et al., 2007). Isto pode ser uma forma do inseto evitar ou diminuir o contato com o inseticida (Beckel et al. 2004) e a quantidade de pesticida acumulada no tarso (Zhai e Robinson 1992). A elevada toxicidade e o efeito residual de inseticidas podem causar redução na movimentação (Tillman e Mulrooney, 2000). *Apis mellifera* apresentou déficit locomotor após a exposição a dose subletal de três piretroides e um neonicotinoide e esta ação foi atribuída ao efeito das substâncias no sistema nervoso central

(cérebro e em outros gânglios) prejudicando informações de comando e locomoção (Charreton et al., 2015).

O menor tempo de permanência em arenas tratadas com gengibre, menta e tomilho para *A. mellifera* e gengibre e tomilho para *T. hyalinata* sugere mudança de comportamento e irritabilidade reduzindo a permanência desses polinizadores em áreas tratada com os óleos essenciais (Desneux et al., 2007). O comportamento de irritabilidade a inseticida pode estar associado à resposta neurotóxica do organismo (Haynes, 1988). Após o contato com a superfície contaminada, os insetos podem ser estimulados a mudar o comportamento e deixar o ambiente (Watson e Barson 1996). Esta característica aliada a menor toxicidade dos óleos de gengibre e menta pode resultar em menor toxicidade às abelhas em campo. A ausência no tempo de parada para o óleo de orégano pode estar relacionada a rápida intoxicação, alterando seu comportamento, no qual o polinizador parou mais vezes levando a proporção de tempo semelhante nas duas metades da arena.

Conclusões

Os óleos de menta e gengibre foram seletivos para *A. mellifera* e *T. hyalinata*. Os óleos de orégano e tomilho por serem moderadamente tóxicos, principalmente, para *A. mellifera* devem ser usados com cautela e de preferência fora da floração.

Trigona hyalinata foi menos sensível aos óleos de gengibre, menta, orégano e tomilho que a espécie *A. mellifera*.

O contato em arenas tratadas com as concentrações subletais dos óleos de orégano e tomilho reduziram a distância percorrida e a velocidade de movimentação e aumentou o número de parada de *T. hyalinata*. O óleo de orégano reduziu a velocidade e a distância percorrida e aumentou o tempo e número de parada para *A. mellifera* em arena tratada.

Os óleos essenciais não repeliram os polinizadores. Os óleos de gengibre, menta e tomilho causaram irritabilidade para *A. mellifera* e os de gengibre e tomilho em *T. hyalinata* pela menor permanência das abelhas em arenas tratadas com as concentrações subletais desses óleos.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da bolsa de estudos, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte a pesquisa.

Referências

- Ahmad Z, Johansen C. 1973. Selective toxicity of carbophenotion and thricloroform to the honey bee and the alfalfa leaf cutting bee. **Environmental Entomology** 2: 27-30.
- Albo GN, Henning C, Ringuelet J, Reynaldi FJ, De Giusti MR, Alippi AM. 2003. Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American foulbrood disease in honey bees. **Apidologie** 34: 417-427
- Barth OM. 2004. Melissopalynology in Brazil: A review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. **Scientia Agricola** 61: 342-350.
- Beckel H, Lorini I, Lázari SMN. 2004. Comportamento de adultos de diferentes raças de *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera, Bostrichidae) em superfície tratada com Deltamethrin. **Revista Brasileira de Entomologia** 48: 115-118.
- Belzunces LP, Tchamitchian S, Brunet JL. 2012. Neural effects of insecticides in the honey bee. **Apidologie** 4: 348-370.
- Carayon JL, Téné N, Bonnafé E, Alayrangues J, Hotier L, Armengaud C, Treilhou M. 2014. Thymol as an alternative to pesticides: persistence and effects of Apilife Var on the phototactic behavior of the honeybee *Apis mellifera*. **Environmental Science and Pollution Research** 21: 4934-4939.
- Carvalho AF, Del Lama MA. 2015. Predicting priority areas for conservation from historical climate modelling: stingless bees from Atlantic Forest hotspot as a case study. **Journal of Insect Conservation** 19: 581-587.
- Cetin H, Erler F, Yanikoglu AA. 2007. Comparative evaluation of *Origanum onites* essential oil and its four major components as larvicides against the pine processionary moth, *Thaumetopoea wilkinsoni* Tams. **Pest Management Science** 63: 830-833.
- Charpentier G, Vidau C, Ferdy JB, Tabart J, Vetillard A. 2013. Lethal and sub-lethal effects of thymol on honeybee (*Apis mellifera*) larvae reared in vitro. **Pest Management Science** 70: 140-147.
- Charreton M, Decourtye, Henry M, Rodet G, Sandoz JC, Charnet P, Collet C. 2015. A locomotor deficit induced by sublethal doses of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in the honeybee *Apis mellifera*. **PLoS One** 10: e0144879.
- Chauzat MP, Faucon JP, Martel AC, Lachaize J, Cougoule N, Aubert M. 2006. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. **Journal of Economic Entomology** 99: 253-262.
- Costa C, Lodesani M, Maistrello L. 2009. Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of *Nosema ceranae* and on the longevity of honeybees (*Apis mellifera* L.) in laboratory conditions. **Apidologie** 41: 141-150.
- Costa E.M, Araujo EL, Maia AVP, Silva FEL, Bezerra CES, Silva JG. 2014. Toxicity of insecticides used in the Brazilian melon crop to the honey bee *Apis mellifera* under laboratory conditions. **Apidologie** 45: 34-44.
- Desneux ND, Decourtye A, Delpuech JM. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology** 52: 81-106.

- Dively GP, Kamel A. 2012. Insecticide residues in pollen and nectar of a cucurbit crop and their potential exposure to pollinators. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 40: 4449-4456.
- Ebert TA, Kevan PG, Bishop BL, Kevan SD, Downer RA. 2007. Oral toxicity of essential oils and organic acids fed to honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Apicultural Research** 46: 220-224.
- Erler F, Cetin H. 2009. Components from the essential oils from two *Origanum* species as larvicides against *Euproctis chrysorrhoea* (Lepidoptera: Lymantriidae). **Journal of Agricultural and Urban Entomology** 26: 31-40.
- Gashout HA, Guzmán-Novoa E. 2009. Acute toxicity of essential oils and other natural compounds to the parasitic mite, *Varroa destructor*, and to larval and adult worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Apicultural Research** 48: 263-269.
- Girolami V, Mazzon L, Squartini A, Mori N, Marzaro M, Di Bernardo A, Greatti M, Giorio C, Tapparo A. 2009. Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. **Journal of Economic Entomology** 102:1808-1815.
- Guedes NMP, Guedes RNC, Ferreira GH, Silva LB. 2009. Flight take-off and walking behavior of insecticide-susceptible and resistant strains of *Sitophilus zeamais* exposed to Deltamethrin. **Bulletin of Entomological Research** 99: 393-400.
- Haynes K. 1988. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. **Annual Review of Entomology** 33: 149-168.
- Hornsby AG, Wauchope R, Herner AE. 1996. Pesticide properties in the environment. New York; Springer: 227p.
- Isman MB. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection** 9: 603-608.
- Joshi NC, Joshi PC. 2010. Foraging behaviour of *Apis* spp. on apple flowers in a subtropical environment. **New York Science Journal** 3: 71-76.
- Kerns DL, Gaylor MJ. 1992. Insecticide resistance in field populations of the cotton aphid (Homoptera: Aphididae). **Journal of Economic Entomology** 85: 1-8.
- Koskor E, Muljar R, Drenkhan K, Karise R, Bender A, Viik E, Luik A, Mand M. 2009. The chronic effect of the botanical insecticide Neem EC on the pollen forage of the bumble bee *Bombus terrestris* L. **Agronomy Research** 7: 341-346.
- Koul O, Walia S, Dhaliwal GS. 2008. Essential Oils as green pesticides: Potential and constraints. **Biopesticides International** 4: 63-84.
- Ladurner E, Bosch J, Kemp WP, Maini S. 2005. Assessing delayed and acute toxicity of five formulated fungicides to *Osmia lignaria* Say and *Apis mellifera*. **Apidologie** 36: 449-460.
- Leite GLD, Picanço M, Guedes RNC, Gusmão MR. 1998. Selectivity of insecticides with and without mineral oil to *Brachygastra lecheguana* (Hymenoptera: Vespidae): a predator of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Ceiba** 39: 3-6.
- Machial CM, Shikano I, Smirle M, Bradbury R, Isman MB. 2009. Evaluation of the toxicity of 17 essential oils against *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae) and *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science** 66: 1116-1121.

- Matos VR, Alencar SM, Santos FAR. 2014. Pollen types and levels of total phenolic compounds in propolis produced by *Apis mellifera* L. (Apidae) in an area of the semiarid region of Bahia, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 86: 407-418.
- Moraes SS, Bautista ARLE, Viana BF. 2000. Avaliação da toxicidade aguda (DL50 e CL50) de inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) Hymenoptera: (Apidae): via de contato. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 29: 31-37.
- Nepi M, Pacini E. 1993. Pollination, pollen viability and pistil receptivity in Cucurbita pepo. **Annals of Botany** 72: 527-536.
- Ribeiro RC; Zanuncio TV; Ramalho FD; da Silva CAD; Serrao JE; Zanuncio JC. 2015. Feeding and oviposition of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) with sublethal concentrations of ten condiments essential oils. **Industrial Crops and Products** 74: 139-143.
- Rinkevich FD, Margotta JW, Pittman JM, Danka R.G, Tarver, M.R, Ottea, J.A., Healy, K.B. 2015. Genetics, synergists, and age affect insecticide sensitivity of the honey bee, *Apis mellifera*. **PLoS One** 10: e0139841.
- Ripper WE, Greenslade RM, Hartley GS. 1951. Selective insecticides and biological control. **Journal of Economic Entomology** 44: 448-449.
- SAS, Institute Sas, User`s guide: statistics. SAS Institute Cary, NC, USA. 1997.
- Serra BDV, de Campos LA. 2010. Entomophilic pollination of squash, *Cucurbita moschata* (Cucurbitaceae). **Neotropical Entomology**: 39, 153-159.
- Singh G, Upadhyay RK. 1993. Essential oils: A potent source of natural pesticides. **Journal of Scientific Industrial Research** 52: 676-683.
- Singh J, Yadav S, Chhuneja PK. 2014. Foraging behaviour and role of *Apis mellifera* Linnaeus in pollination of Cucumis melo L. **Journal of Experimental Zoology** 17: 213-217.
- Slaa EJ. 2006. Population dynamics of a stingless bee community in the seasonal dry lowlands of Costa Rica. **Insectes Sociaux** 53: 70 -79.
- Tillman PG, Mulrooney J.E. 2000. Effect of selected insecticides on the natural enemies *Coleomegilla maculata* and *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae), *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae), and *Bracon mellitor*, *Cardiochiles nigriceps*, and *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae) in cotton. **Journal of Economic Entomology** 93: 1638- 1643.
- Tomé HVV, Martins GF, Lima MAP, Campos LAO, Guedes RNC. 2012. Imidacloprid-Induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata* anthidioides. **PLoS One** 7: e38406.
- Tomé HVV, Barbosa WF, Martins GF, Guedes RNC. 2015a. Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: Regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. **Chemosphere** 124: 103-109.
- Tomé HVV, Barbosa WF, Corrêa AS, Gontijo LM, Martins GF, Guedes RNC. 2015b. Reduced-risk insecticides in Neotropical stingless bee species: impact on survival and activity. **Annals of Applied Biology** 167: 186-196.
- Valdovinos-Núñez GR, Quezada-Euán JGG, Ancona-Xiu P, Moo-Valle H, Carmona A, Sánchez ER. 2009. Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) **Journal of Economic Entomology** 102: 1737-1742.

- Vojoudi S, Esmaili M, Farrokhi M, Saber M. 2014. Acute toxicity of kaolin and essential oils from *Mentha pulegium* and *Zingiber officinale* against different stages of *Callosobruchus maculatus* under laboratory conditions. **Archives of Phytopathology and Plant Protection** 47: 285-291.
- Watson E, Barson G. 1996. A Laboratory assessment of the behavioural responses of three strains of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) to three Insecticides and the insect repellent N, N-diethyl-m-toluamide. **Journal of Stored Products Research** 32: 59-67.
- Yazdani E, Sendi JJ, Hajizadeh J. 2014. Effect of *Thymus vulgaris* L. and *Origanum vulgare* L. essential oils on toxicity, food consumption, and biochemical properties of lesser mulberry pyralid *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Plant Protection Research** 54: 53-61.
- Yu SJ. 1987. Biochemical defense capacity in the spined soldier bug (*Podisus maculiventris*) and its lepidopterous prey. **Pesticide Biochemical Physiology** 28: 216-223.
- Xavier VM, Message D, Picanço MC, Chediak M, Santana Júnior PA, Ramos RS, Martins J C. 2015. Acute toxicity and sublethal effects of botanical insecticides to honey bees. **Journal of Insect Science** 15: 137.
- Zaitoun ST. 2007. The effect of different Mediterranean plant extracts on the development of the great wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) and their toxicity to worker honeybees *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) under laboratory conditions. **Journal of Food, Agriculture & Environment** 5: 289-294.
- Zhai J, Robinson WH. 1992. Measuring Cypermethrin resistance in the *German cockroach* (Orthoptera: Blattellidae). **Journal of Economic Entomology** 85: 348-351.

Tabela 1. Nome comum, nome científico e família, componentes majoritários e parte do vegetal utilizado para extrair os óleos essenciais testados sobre *Apis mellifera* e *Trigona hyalinata* (Hymenoptera: Apidae)

Nome comum	Nome científico (Família)	Componentes majoritários (%)	Parte
Gengibre	<i>Zingiber officinale</i> (Zingiberaceae)	Zingibereno (33%), beta-sesquifelandreno (12%), β -bisaboleno (10%), canfeno (8%), mirceno (7%)	Rizoma
Menta	<i>Mentha piperita</i> (Labiatae)	Mentol (55%), mentona (25%), acetato de metilo (10%)	Folha
Orégano	<i>Origanum vulgare</i> (Lamiaceae)	Carvacrol (70%), p-cimeno (15%), timol (4,3%)	Folha
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i> (Lamiaceae)	Timol (50%), p-cimeno (40%), linalool (6,0%)	Folha/flor

Tabela 2. Toxidade dos óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho para *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) via contato e tópico por 24 e 48h

	M. exp.	n	T	CL ₅₀ (IC)	CL ₉₀ (IC)	Slope	X ²
Gengibre	Contato	350	24h	22,01(20,89-23,01)	26,53 (25,22-28,56)	15,80 ± 2,23	50,22
		350	48h	17,19 (14,69-18,91)	28,14 (24,26-41,08)	5,99 ± 1,46	16,82
	Tópico	300	24h	17,98 (15,09-19,68)	27,41 (24,73-34,18)	7,00 ± 1,57	19,84
		250	48h	14,40 (12,09-16,78)	33,42 (26,58-50,52)	2,49± 0,36	47,62
Menta	Contato	350	24h	13,35 (12,21-14,28)	17,24 (16,03-19,23)	11,52 ± 1,87	38,00
		300	48h	11,19(10,24-12,02)	14,38 (13,27-16,37)	11,75 ± 2,04	33,17
	Tópico	300	24h	12,58 (8,22-14,62)	25,50 (21,14-46,44)	4,17 ± 1,20	11,73
		300	48h	12,28 (9,71-14,38)	29,11 (23,38-44,58)	3,42± 0,65	27,25
Orégano	Contato	300	24h	0,95 (0,71-1,24)	3,22 (2,31-5,31)	2,42 ± 0,33	53,00
		250	48h	0,42 (0,29-0,50)	1,35 (0,99-2,34)	2,55 ± 0,47	29,15
	Tópico	300	24h	2,03 (1,32-2,87)	9,88 (6,47-19,61)	1,86 ± 0,30	39,14
		250	48h	1,29 (0,79-1,83)	4,39 (2,85-11,88)	2,41±0,58	17,29
Tomilho	Contato	300	24h	2,61(2,05-3,15)	6,39 (5,16-8,75)	3,30 ± 0,47	48,50
		250	48h	1,19 (0,94-1,53)	2,75 (2,02-4,6)	3,53 ± 0,58	36,81
	Tópico	300	24h	3,30 (2,13-4,38)	9,84 (7,54-14,36)	2,50 ± 0,36	47,62
		250	48h	1,78 (1,19-2,41)	5,81 (4,26-8,85)	2,49±0,36	47,62

M. exp= modo de exposição, n= número de indivíduos, T= tempo de avaliação, IC= intervalo de confiança a 95%, X²= quiquadrado. Nível de significância de P <0,0001.

Tabela 3. Toxidade dos óleos essenciais de gengibre, menta, tomilho e orégano para *Trigona hyalinata* (Hymenoptera: Apidae) via contato e tópico por 24 e 48h

	M. exp.	n	T	CL ₅₀ (IC)	CL ₉₀ (IC)	Slope	X ²
Gengibre	Contato	400	24h	24,17 (22,36-25,88)	38,01 (34,12-45,42)	6,52 ± 0,94	47,28
		350	48h	22,19(20,41-23,97)	35,19(30,90-45,17)	6,04 ± 1,13	31,82
	Tópico	400	24h	32,65(29,26-37,14)	77,22 (61,86-109,66)	3,42±0,43	63,90
		400	48h	31,44 (27,64-36,62)	90,81 (69,18-140,09)	2,78±0,350	63,11
Menta	Contato	400	24h	21,61 (20,20-22,96)	30,74 (28,20-35,29)	8,37 ± 1,19	49,81
		350	48h	19,37 (18,08-20,51)	26,57 (24,75-29,51)	9,33 ± 1,23	57,18
	Tópico	400	24h	16,38 (14,21-18,26)	35,97 (30,82-45,95)	3,75±0,51	52,71
		350	48h	13,20 (10,97-15,27)	43,30 (34,55-61,67)	2,48±0,32	59,31
Orégano	Contato	300	24h	7,14 (6,08-8,13)	10,87 (9,47-13,31)	7,00 ± 1,08	41,72
		300	48h	5,92 (5,06-6,70)	10,07 (8,82-12,18)	5,55 ± 0,80	48,69
	Tópico	300	24h	4,57 (3,37-5,79)	20,01 (15,04-30,32)	1,63±0,17	61,05
		300	48h	3,45 (2,55-4,49)	21,23 (15,67-32,06)	1,63±0,17	87,57
Tomilho	Contato	250	24h	8,29 (6,90-9,51)	18,15 (15,29-23,81)	3,76 ± 0,56	45,24
		300	48h	4,45 (3,28-5,64)	13,59(10,67-18,91)	2,02 ± 0,26	61,42
	Tópico	300	24h	6,53 (4,91-8,12)	30,41 (22,82-47,06)	1,92 ± 0,25	58,22
		300	48h	5,24(3,93-6,57)	26,03(19,77-38,45)	1,84 ± 0,21	73,24

M. exp= modo de exposição, n= número de indivíduos, T= tempo de avaliação, IC= intervalo de confiança a 95%, X²= quiquadrado. Nível de significância de P <0,0001.

Tabela 4. Índices de tolerância relativa (ITR₅₀) dos óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho para adultos de *Apis mellifera* e *Trigona hyalinata* (Hymenoptera: Apidae)

Óleo essencial	ITR ₅₀ (Th./Am.)	
	24h	48h
	Contato	
Gengibre	1,10	1,29
Menta	1,62	1,73
Orégano	7,52	14,10
Tomilho	3,18	3,74
	Tópico	
Gengibre	1,82	2,18
Menta	1,30	1,07
Orégano	2,25	2,67
Tomilho	1,98	2,94

Índice de tolerância relativa (ITR₅₀= CL₅₀ para *T. hyalinata* / CL₅₀ para *A. mellifera*).

Th./Am= *T. hyalinata*/ *A. mellifera*.

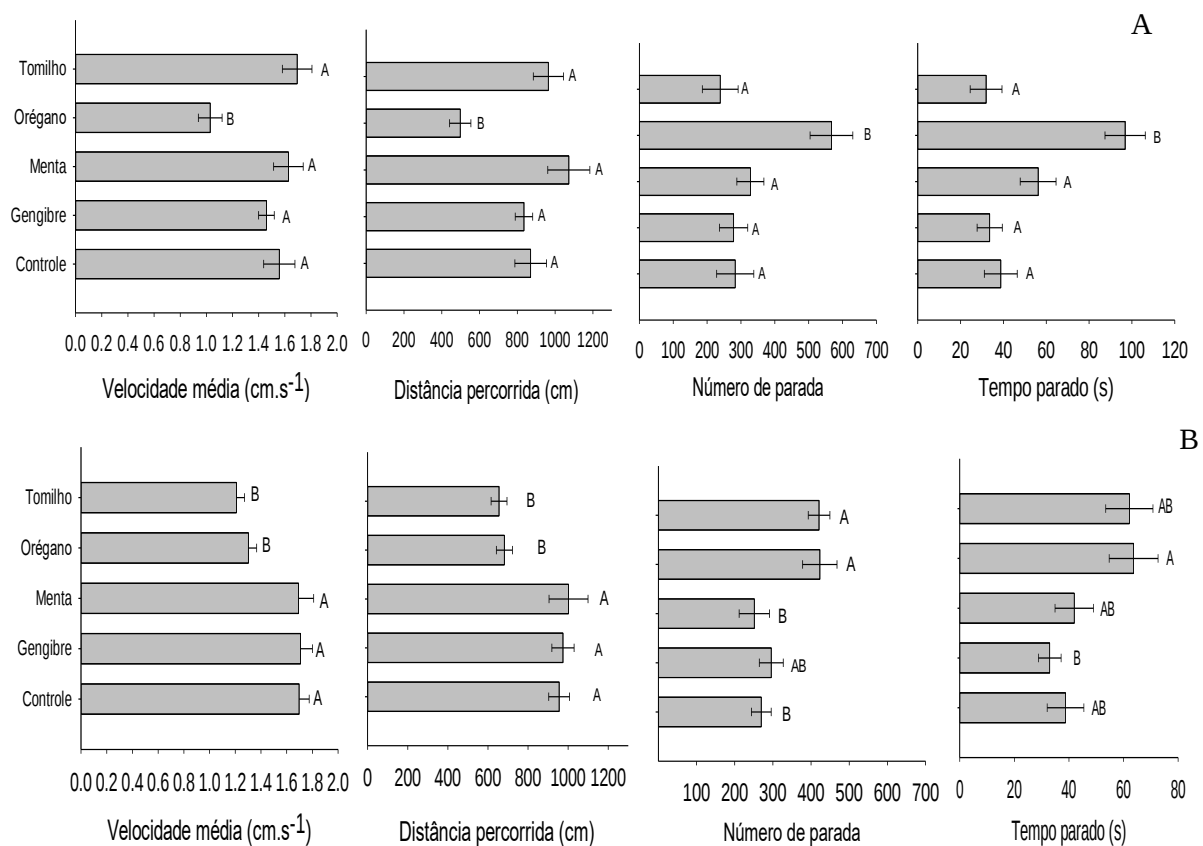


Figura 1. Velocidade média, distância percorrida, número de parada e tempo parado de adultos de *Apis mellifera* (A) e *Trigona hyalinata* (B) (Hymenoptera: Apidae) em bioensaios sem chance de escape expostas por contato a concentrações subletais de quatro óleos essenciais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

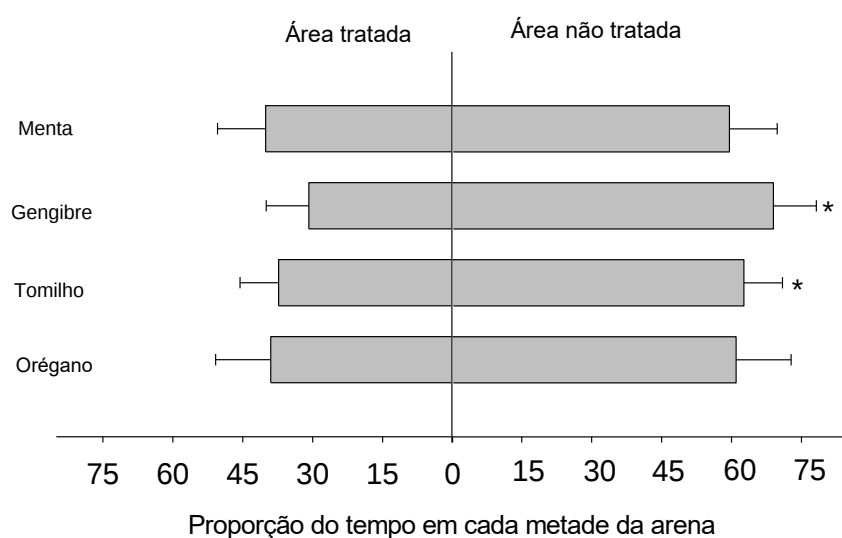
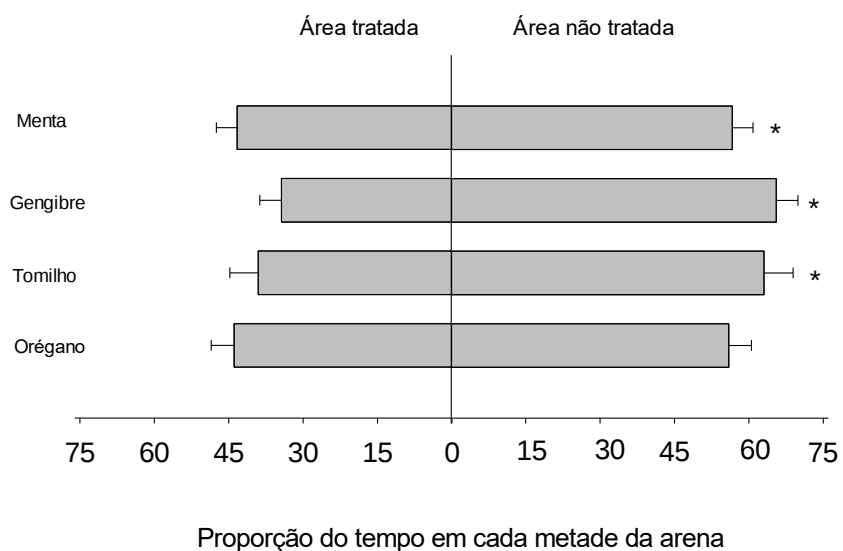


Figura 2. Proporção de tempo (média $\pm$ erro padrão) que os adultos de *Apis mellifera* (A) e *Trigona hyalinata* (B) (Hymenoptera: Apidae) permaneceram em cada metade de arena tratada ou não com óleos essenciais. * O asterisco indica que a proporção de tempo em que o inseto permaneceu nesta metade da arena foi maior que na outra metade de acordo com o teste t a $P < 0,05$.

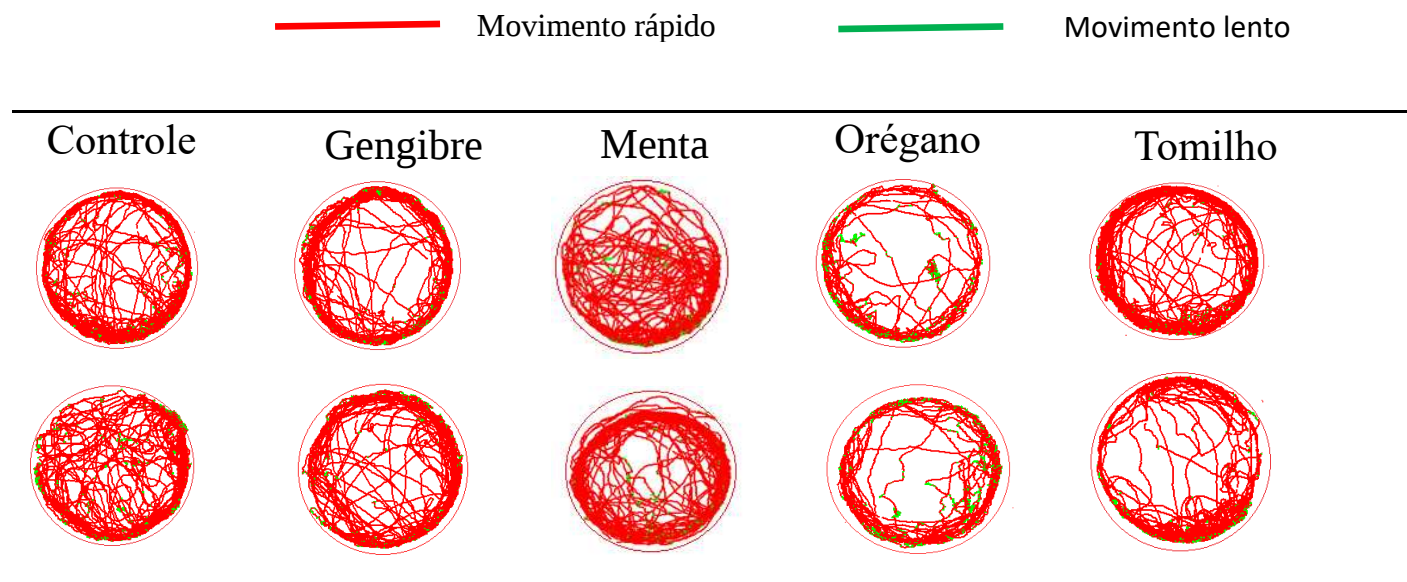


Figura 3. Representação da movimentação de adultos de *Apis mellifera* (A) e de *Trigona hyalinata* (Hymenoptera: Apidae) (B) sem chance de escape em arena tratada com CL₅₀ de quatro óleos essenciais. * As CL₅₀ foram obtidas pela exposição por superfície contaminada.

Conclusões Gerais

Os óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho foram tóxicos principalmente a ovos e lagartas de *D. hyalinata*. As pupas desse lepidoptera foram menos afetadas necessitando de maiores concentrações para a inviabilização da emergência dos adultos.

Os óleos de gengibre, menta, orégano e tomilho foram seletivos ao parasitoide *T. pupivorus*. A toxicidade desses óleos a pelo menos uma fase do ciclo de *D. hyalinata* e sua seletividade ao parasitoide *T. pupivorus* indica potencial para o uso combinado ou sequencial do controle biológico e óleos essenciais no Manejo Integrado de Pragas.

A ingestão de concentrações subletais dos óleos de gengibre, menta e tomilho reduzem a sobrevivência, a porcentagem de emergência e o peso de pupas e aumentou a duração larval e pupal de *D. hyalinata*.

O óleo essencial de orégano apresentou forte ação antialimentar e os de gengibre, menta e tomilho apresentaram efeito moderado, reduzindo a alimentação de lagartas de *D. hyalinata*.

Apis mellifera foi mais sensível aos óleos essenciais de gengibre, menta, orégano e tomilho que a abelha nativa *T. hyalinata*.

Os óleos de orégano e tomilho foram os mais tóxicos, principalmente, para *A. mellifera* e o gengibre e a menta apresentaram baixa toxicidade para *A. mellifera* e *T. hyalinata* em contato com superfície contaminada.

O contato em arenas tratadas com concentrações subletais dos óleos de orégano e tomilho reduziram a distância percorrida e a velocidade de movimentação e aumentou o número de parada de *T. hyalinata*. O óleo de orégano reduziu a velocidade e a distância percorrida e aumentou o tempo e número de parada para *A. mellifera*.

Os óleos de gengibre, menta e tomilho causaram irritabilidade para *A. mellifera* e os de gengibre e tomilho a *T. hyalinata* pela menor permanência das abelhas em arenas tratadas com concentrações subletais desses óleos.