



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

WEVERTTON MARLLON ANSELMO

**ATIVIDADE INSETICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE
Sitophilus zeamais MOTS. (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

RECIFE
2021

WEVERTTON MARLLON ANSELMO

**ATIVIDADE INSETICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE
Sitophilus zeamais MOTS. (COLEOPTERA:CURCULIONIDAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração:
Biotecnologia em recursos naturais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro

RECIFE
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Anselmo, Wevertton Marllon

Atividade inseticida de óleos essenciais sobre *Sitophilus zeamais* mots. (Coleoptera: Curculionidae) / Wevertton Marllon Anselmo. – 2021.

89f. : il., col.

Orientadora: Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Recife, 2021.

Inclui referências.

1. Inseticidas vegetais 2. Pragas agrícolas - Controle biológico 3. Óleos essenciais 4. *Sitophilus zeamais* 5. *Myrciaria floribunda* I. Navarro, Daniela Maria do Amaral Ferraz (orient.) II. Título.

581.64

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021 - 379

WEVERTTON MARLLON ANSELMO

**ATIVIDADE INSETICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE
Sitophilus zeamais MOTS. (COLEOPTERA:CURCULIONIDAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em: 22/11/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr^a. Lidiane Pereira de Albuquerque (Examinadora Externa)
Universidade Federal do Piauí

AGRADECIMENTOS

À professora Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro pela orientação, incentivo e dedicação prestada no presente trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Ecologia Química que ajudaram, prestaram serviços e auxiliaram para realização de diversas funções desenvolvidas, especialmente Beatriz, Suyana, Camila Soledade, Liderlânio Araújo, Edna Barboza, Priscila, Fábio e Jéssica Nascimento.

A Júlio César técnico do laboratório de Ecologia Química pela ajuda, auxílio, companheirismo e incentivo na execução de experimentos.

A todo o pessoal, em especial a Patrick e a Ana Patrícia, do Departamento de Bioquímica pela parceria e colaboração na execução de experimentos.

Ao Prof. Thiago Napoleão pela cooperação, sugestão e revisão dos trabalhos.

A Ravelane Oliveira pela compreensão, incentivo e palavras de apoio.

A todos os professores do programa de pós-graduação em biotecnologia pelos ensinamentos.

A todos os meus amigos.

Aos meus pais Antônio Anselmo Filho (in memoriam) e Selma da Silva Anselmo pela força, incentivo, dedicação e conselhos dados.

A minha irmã Wialy Marllan pelas palavras de apoio e atenção.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e ao Departamento de Química Fundamental (DQF) por ceder espaço para realização de experimentos.

RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal de tradicional importância econômica e social. Em condições climáticas tropicais, os insetos assumem particular importância como pragas dos grãos armazenados, com isso os insetos causam diminuição do valor nutricional e desvalorização do valor do produto. As principais pragas de grãos armazenados são membros da ordem Coleoptera, destacando-se o *Sitophilus zeamais* (Motschulsky). O presente estudo objetivou avaliar a atividade inseticida do óleo essencial comercial de *Pothomorphe umbellata* e do óleo essencial das folhas de *Myrciaria floribunda* coletadas do banco de germoplasma da Universidade Federal de Alagoas. Além disso, objetivou desenvolver um produto para o controle de *S. zeamais*. Para isso, primeiramente foi feita a extração do óleo de *M. floribunda* por hidrodestilação à 160°C por 3h. O óleo essencial de *P. umbellata* foi adquirido em loja especializada. Depois os óleos foram caracterizados pelas técnicas de cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Em seguida foram feitos testes de toxicidade por contato, por fumigação, por ingestão e atividade das enzimas digestivas e acetilcolinesterase. A análise da composição química do óleo essencial de *M. floribunda* mostrou que os componentes majoritários são: E-Cariofileno (26,81%); Viridiflorol (6,64%) e α – Selineno (3,58%). Para o OE de *P. umbellata* foi identificado que seus constituintes principais foram: β – Pineno (27,33%), α – Pineno (14,55%) e Linalol (12,03%). O teste de toxicidade fumigante mostrou que em concentrações a partir de 4 μ L/L de ar foram significativamente diferentes em relação ao controle para o OE de *M. floribunda*, já para *P. umbellata*, todas as concentrações foram significativamente diferentes em relação ao controle, exceto a concentração de 2,7 μ L/L. Para o teste de ingestão os resultados mostraram que os dois óleos interferiram na nutrição, causando diminuição da biomassa dos insetos. Nos testes de efeito das enzimas digestivas, vale destacar que o OE de *P. umbellata* reduziu a atividade da amilase nas menores concentrações, no entanto, o OE de *M. floribunda* aumentou a atividade da enzima nas maiores concentrações. Quanto a tripsina não houve alteração. Em relação a acetilcolinesterase foi verificado um aumento da sua atividade nos dois OE. Assim, podemos concluir que os dois OEs apresentam importante atividade inseticida no controle do *S. zeamais* contribuindo assim, para a diminuição de problemas originados por insetos-praga de produtos armazenados em regiões tropicais.

Palavras-chave: bioinseticida; *sitophilus zeamais*; óleos essenciais.

ABSTRACT

Corn (*Zea mays* L.) is a cereal of traditional economic and social importance. In tropical climatic conditions, insects are particularly important as pests of stored grains, with the insects causing a decrease in nutritional value and a devaluation of the value of the product. The main pests of stored grains are members of the order Coleoptera, especially *Sitophilus zeamais* (Motschulsky). The present study aimed to evaluate the insecticidal activity of the commercial essential oil of *Pothomorphe umbellata* and the essential oil of *Myrciaria floribunda* leaves collected from the germplasm bank of the Federal University of Alagoas. In addition, it aimed to develop a product for the control of *S. zeamais*. For this, first, the extraction of oil from *M. floribunda* was performed by hydrodistillation at 160°C for 3h. The essential oil of *P. umbellata* was purchased at a specialized store. Afterwards, the oils were characterized by gas chromatography and gas chromatography techniques coupled with mass spectrometry. Then, toxicity tests were performed by contact, fumigation, ingestion and activity of digestive enzymes and acetylcholinesterase. The analysis of the chemical composition of the essential oil of *M. floribunda* showed that the major components are: E-Caryophyllene (26.81%); Viridiflorol (6.64%) and α - Selinene (3.58%). For the OE of *P. umbellata* it was identified that its main constituents were: β - Pinene (27.33%), α - Pinene (14.55%) and Linalol (12.03%). The fumigant toxicity test showed that concentrations from 4 μ L/L of air were significantly different from the control for the OE of *M. floribunda*, while for *P. umbellata*, all concentrations were significantly different from the control, except for the concentration of 2.7 μ L/L. For the ingestion test, the results showed that the two oils interfered with nutrition, causing a decrease in insect biomass. In the tests of the effect of digestive enzymes, it is noteworthy that the EO from *P. umbellata* reduced the amylase activity at the lowest concentrations, however, the EO from *M. floribunda* increased the enzyme activity at the highest concentrations. As for trypsin, there was no change. Regarding acetylcholinesterase, an increase in its activity was verified in both OE. Thus, we can conclude that the two EOs have important insecticidal activity in the control of *S. zeamais*, thus contributing to the reduction of problems caused by insect pests in products stored in tropical regions.

Keywords: bioinsecticide; *sitophilus zeamais*; essential oils.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 OBJETIVOS	11
1.1.1 Objetivo Geral	11
1.1.2 Objetivo Específicos	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Pragas de Grãos Armazenados	13
2.1.1 Aspectos Gerais do <i>Sitophilus zeamais</i>	13
2.2 Inseticidas Botânicos	15
2.3 Óleos Essenciais	15
2.4 <i>Pothomorphe umbellata</i>	16
2.5 <i>Myrciaria floribunda</i>	17
3. ARTIGO 1	
Insecticidal activity of the essential oil from <i>Pothomorphe umbellata</i> against <i>sitophilus zeamais</i> .	19
4. ARTIGO 2	
Bioatividade do Óleo Essencial de <i>Myrciaria floribunda</i> (myrtaceae) no Controle de <i>Sitophilus zeamais</i> mots. (coleoptera: curculionidae).	44
5. PATENTE	
Formulação Fumigante em Microemulsão Para Controle de <i>Sitophilus Zeamais</i> Usando <i>Myrciaria Floribunda</i> e <i>Pothomorphe Umbellata</i>	65
6. CONCLUSÕES	78
7. REFERÊNCIAS	79

1. INTRODUÇÃO

No setor de produtos armazenados, os insetos-praga são responsáveis por perdas, resultando em redução de peso e volume, prejuízo da germinação, contaminação e perda geral de qualidade dos grãos (LEE et al., 2002). Considerado um cereal de importância econômica para o homem, o milho, para que não perca a sua qualidade, necessita ser armazenado de forma adequada durante o ano todo, a fim de evitar a escassez na entressafra, a oscilação de preços no mercado e os danos causados por pragas (BRACKMANN et al., 2002).

As principais pragas de grãos armazenados são membros da ordem Coleoptera, e dentre os membros dessa ordem, destaca-se o *Sitophilus zeamais* (Motschulsky). Como praga primária de milho armazenado, o gorgulho-de-milho como é conhecido o *S. zeamais* é capaz de penetrar e infestar os grãos intactos, nos quais estágios imaturos se desenvolvem, deixando o milho com menor qualidade e valor (NWOSU & NWOSU I., 2012).

O controle de insetos praga é feito, comumente, com inseticidas fumigantes, aplicando produtos químicos sintéticos, no entanto, com o uso massivo desses inseticidas, muitas populações de insetos adquiriram forte resistência a maioria dos grupos de inseticidas (SINGAB et al., 2014).

Nas últimas décadas, o interesse pelos compostos derivados de plantas se intensificou devido ao seu potencial como alternativa para controlar pragas agrícolas e vetores de doenças. Além disso, a crescente demanda por produtos naturais oriundos de vegetais, em especial os óleos essenciais, tem sido intensificada como uma importante estratégia alternativa para mitigar os efeitos adversos de pragas de grãos armazenados (LIU et al., 2007; KHAWAR et al., 2015; ASHRAF et al., 2020). Alguns aspectos incentivaram a busca por compostos bioativos em plantas: a variedade de metabólitos e seu modo de ação; menor toxicidade a mamíferos do que os dos agentes atualmente utilizados e um baixo impacto ambiental (SENTHIL - NATHAN, 2015; CAMAROTI et al., 2018).

Os óleos essenciais (OEs) são uma mistura de compostos extraídos de plantas aromáticas, principalmente devido a seus compostos químicos como: compostos terpênicos, álcoois, aldeídos, ésteres, éteres e cetonas (KOUL ET AL., 2008; MAHDAVIKIA E SAHARKHIZ, 2015; SADGROVE E JONES, 2015; HAZRATI ET AL., 2018). Eles são conhecidos por sua ampla gama de propriedades biológicas,

como propriedades anti-ulcerogênicas, antiinflamatórias, anticancerígenas, antioxidantes e antimicrobianas (MAJID et al., 2018; PRIYADARSHI et al., 2018). Além disso, os óleos essenciais extraídos de plantas vêm sendo usados como inseticidas para combater ou repelir insetos-praga, sendo considerados uma alternativa aos pesticidas convencionais devido à sua baixa toxicidade (RAWANI et al., 2014).

Há uma gama de trabalhos que demonstram a viabilidade de uso de compostos bioativos obtidos por vegetais no controle e manejo de insetos-praga em produtos armazenados, em especial o *S. zeamais*. O OE de *Mentha longifolia* foi repelente e fumigante (ODEYEMI et al., 2008). O OE de *Citrus sinensis* foi tóxico via fumigação e teve efeito inibitório na enzima acetilcolinesterase em *S. zeamais* (OYEDEJI et al., 2020). O OE extraído de *Mosla chinensis* apresentou atividade fumigante (LU et al., 2020). Já os OEs de *Piper aduncum* L. e *Piper hispidinervum* apresentaram toxicidade via contato e por fumigação em adultos (ESTRELA, 2006).

Myrciaria floribunda é uma planta de porte arbustivo a arbóreo pertencente à família Myrtaceae de ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada na América Central e América do Sul. No Brasil, tem ocorrência confirmada em praticamente todas as regiões (SOBRAL, et al., 2013). É comumente conhecida como ‘camboim’, ‘jabuticabinha’, ‘murta’. Esse vegetal apresenta frutos que quando maduros podem ser consumidos in natura, mas tradicionalmente são coletados e processados em poupa para serem usados na fabricação de doce, geléias e compotas. Além disso, os frutos inteiros ou macerados podem ser usados para a produção de licores e garrafadas (frutos inteiros conservados em aguardente), pelas comunidades locais das regiões litorâneas do Nordeste e Sudeste (LOURENÇO & BARBOSA, 2012; TIETBOHL et al., 2012; 2014).

Estudos revelam que a espécie é uma boa fonte de óleos essenciais, sendo OE extraído de folhas, flores e caule. O OE de *M. floribunda* tem sido estudado como potencial bioinseticida contra insetos-praga como por exemplo *Rhodnius nasutus* (LOPES, 2014), *Dysdercus peruvianus* e insetos fitófagos *Oncopeltus fasciatus* (TIETBOHL et al., 2014). Além disso, o OE de folhas de *M. floribunda* foi capaz de inibir o crescimento bacteriano e inibir a atividade da enzima acetilcolinesterase (TIETBOHL et al., 2014).

Potomorphe umbellata é uma planta herbácea arbustiva pertencente a família piperaceae, conhecida como ‘caapeba’ ou “pariparoba”. No Brasil pode encontrá-la

em todas as regiões do Brasil, principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia (BAGATELA, et al., 2013)).

Diferentes atividades farmacológicas foram verificadas com o uso desse vegetal: antiinflamatório e analgésico (PERAZZO et al. 2005), antibacteriano (ISOBE et al. 2002), antifúngico (RODRIGUES et al. 2012) e antimalárico (AMORIM et al. 1988). Os OEs apresentam dessa planta apresentaram propriedades com atividade inseticida e repelente contra várias espécies de insetos (ISMAN, 2000). Dentre as pragas de grãos armazenados, o OE das folhas de *P. umbellata* apresentou efeito insetistático sobre *Rhyzopertha dominica* e *Sitophilus zeamais* em trigo, através dos bioensaios de superfície de contato, repelência e fumigação (Pauliquevis et al., 2013; 2015).

Ante à importância do *S. zeamais* ao setor de grãos armazenados, e a inópia de formas alternativas mais seguras, é relevante a realização de estudos que avaliem o potencial inseticida de óleos essenciais no controle desse inseto-praga. O presente trabalho foi realizado objetivando estudar a atividade inseticida de óleos essenciais no controle de *S. zeamais*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial inseticida de óleos essenciais de *Pothomorphe umbellata* e *Myrciaria floribunda* contra *S. zeamais*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Identificar e quantificar os compostos presentes nos óleos essenciais de *Pothomorphe umbellata* (comercial) e *Myrciaria floribunda*;
- Avaliar a toxicidade por fumigação de óleos essenciais de *Pothomorphe umbellata* e *Myrciaria floribunda* em adultos de *S. zeamais* sobre adultos;
- Verificar a toxicidade por contato dos óleos essenciais de *Pothomorphe umbellata* e *Myrciaria floribunda* em adultos de *S. zeamais*;
- Avaliar a toxicidade por ingestão de óleos essenciais de *Pothomorphe umbellata* e *Myrciaria floribunda* em adultos de *S. zeamais*;
- Avaliar o efeito dos óleos essenciais na atividade de enzimas digestivas e acetilcolinesterase em adultos de *S. zeamais*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O milho (*Zea mays* L.) é originado da América Central e do México. É um cereal de tradicional importância econômica e social, sendo notável na alimentação da população mundial e brasileira. Configura como a terceira cultura mundialmente entre os cereais, perdendo para o trigo e arroz (MAKATE, 2010; CONAB, 2020). É considerada uma cultura de utilidade industrial, sendo usada nas indústrias de alimentícia e combustível, indústria farmacêutica (produção de óleo e transportador de vitaminas e medicação), na indústria alimentícia (amido, cereais infantis, rações, xarope de frutose, óleo de milho, aditivos alimentares e suplementos alimentares) e indústria cosmética (cosméticos, sabonetes, plásticos biodegradáveis, material absorvente para fraldas) (KLING & EDMEADES, 1997; MORRIS, 2001; YOUNG, 2003; ACHARYA & YOUNG, 2008; MAKATE, 2010; TONGJURA *et al.*, 2010).

A produção total brasileira de milho na safra 2020/2021 ficou estimada em 104,9 milhões de toneladas, para uma área cultivada de 18.442.200 hectares (CONAB 2020). O Brasil configura-se como terceiro maior produtor de milho do mundo, com uma produtividade de cerca de 5.688 kg/ha, sendo a liderança dos Estados Unidos (cerca de 392,5 milhões de toneladas) e China (cerca de 257, 4 milhões de toneladas). A Argentina ocupa a quarta posição, com um volume de produção de quase 43,5 milhões de toneladas (FAO, 2020). O Nordeste brasileiro apresenta uma capacidade de estocagem de cerca de 7 milhões de toneladas de grãos, com uma produção estimada em 12 milhões de toneladas.

A cultura do milho, por suas características fisiológicas, tem elevado potencial produtivo. No entanto, a produtividade média nacional ainda é considerada baixa, cerca de 6.000 kg/ha na 1ª safra e 5.300 kg/ha na 2ª safra (CONAB, 2020).

O estado fisiológico normal do milho pode ser interferido por fatores bióticos e situações de estresse que, em consequência, diminuem a produtividade da cultura. Os fatores bióticos podem propiciar desordens nos processos fisiológicos das plantas, provocando perdas significativas. da lavoura (SOUZA & BARBOSA, 2015).

Dentre os fatores bióticos que interferem na produtividade do milho pode-se citar uma doença, transmitida para as plantas de milho através de um inseto chamado *Dalbulus maidis*, denominada enfezamento vermelho do milho. Essa doença pode provocar redução na produção de grãos, ocasionando em estudos sob condições de casa de vegetação, reduções de 52 a 72% (TOFFANELLI, 2001). Já em ensaios de

campo, a doença reduziu em 70% a produção e 100% em campos comerciais (MASSOLA JÚNIOR, 1998; OLIVEIRA et al., 1998; OLIVEIRA & SABATO, 2018).

2.1 Pragas de Grãos Armazenados

Os danos sofridos pelos grãos armazenados são definitivos e irreversíveis, uma vez que o processo de alimentação das pragas de grãos armazenados causa uma considerável perda de peso, redução de nutrientes e do poder germinativo em sementes (ARAUJO et al., 2001). No setor de armazenamento, os insetos-praga são os principais responsáveis por estas perdas. Este problema é mais importante para os agricultores de subsistência, para os quais os grãos armazenados fazem parte da alimentação básica (SILVA-AGUAYO et al., 2004) e as condições de armazenamento são precárias.

Em condições climáticas tropicais, os insetos assumem particular importância como pragas dos grãos armazenados, pelo fato da massa de grãos constituir-se em ambiente ideal para seu desenvolvimento. Infestações, que se iniciam no campo, e persistindo no armazenamento, ocasionam diminuição do valor nutricional, desvalorização do produto, diminuição do grau de higiene, redução de massa, e promovem o aquecimento da massa de grãos no local da infestação consideráveis no peso e na qualidade dos grãos e sementes (GARCÍA-LARA; BERGVINSON, 2007).

De acordo com o hábito alimentar, os insetos-praga de grãos armazenados podem ser classificados como pragas primárias, capazes de atacar os grãos inteiros e sadios, ou secundárias, que se alimentam dos grãos previamente danificados mecanicamente ou por insetos primários. Entre os grupos de insetos-praga que atacam grãos armazenados, destacam-se as espécies: *S. oryzae* (L.) e *S. zeamais* (Motschulsky). Estas pragas são responsáveis por perdas quantitativas e qualitativas durante o armazenamento dos grãos (LORINI et al., 2002; ALMEIDA et al., 2006).

2.1.1 Aspectos Gerais do *Sitophilus zeamais*

O gorgulho do milho, *S. zeamais* é a praga pós-colheita mais importante economicamente da cultura do milho. Esse inseto apresenta tamanho de aproximadamente 3 mm de comprimento quando adulto e coloração castanho-escuro com manchas avermelhadas nos élitros e com manchas mais claras nas asas anteriores. A cabeça é projetada à frente, na forma de rostro curvado sendo nas fêmeas mais longo e afilado do que nos machos (Fig. 1) (LOECK, 2002; LORINI et al.,

2010). As larvas apresentam coloração amarelo-clara e cabeça escura, já as pupas são brancas com rostro visíveis (GALLO et al., 2002).



Figura 1 – Adulto de *Sitophilus zeamais*
Fonte: Antunes, 2010

No início do ciclo biológico do *S. zeamais* que dura cerca de cinco semanas, a fêmea perfura o grão, geralmente na região do embrião, depositando um ovo e em seguida cobrindo o orifício com uma substância gelatinosa (LANGSI, 2020). A fase embrionária dura, em média, 4 dias. As larvas desenvolvem-se dentro do grão, e transformando-se em pupa ainda no interior do mesmo (GALLO et al., 2002). O período de incubação dura em média de 5 dias, sendo que 27% dos ovos se desenvolvem até a emergência dos adultos, sendo 48% de adultos machos e 52% de fêmeas (LORINI et al., 2010). O ciclo de ovo até adultos é de 34 dias em temperaturas entre 15 e 35°C em condições de 27°C e 70% de umidade relativa (REES, 1996), sendo o período de oviposição é de cerca de 100 dias (LORINI, 2008; GALLO et al., 2002).

Por se alimentarem das partes internas dos grãos, as larvas propiciam redução do peso do grão, resultando na diminuição dos valores nutricionais e econômicos do grão, reduzindo assim a viabilidade da semente (SULEIMAN et al., 2015). O *S. zeamais* pode infectar tanto pela forma larval, que se desenvolve no interior do grão, como pelos adultos (SANTOS & FONTES, 1990), tanto no campo como durante o armazenamento, com diminuição do peso dos grãos acima de 15%, resultando em perdas econômicas de até 60% em seis meses (CONTE, 2013; WEI et al., 2014).

2.2 Inseticidas Botânicos

Durante o processo evolutivo, alguns vegetais desenvolveram mecanismos de defesa através de adaptações defensivas contra herbívoros (MIRESMALLI & ISMAN, 2014). As plantas podem possuir compostos químicos oriundos da síntese de metabólitos secundários menos tóxicos que além da importância para as plantas, esses metabólitos possuem atividade farmacológica e agronômica (DEQUECH et al., 2008; PEREIRA & CARDOSO, 2012). Os metabólitos secundários constituem um conjunto de compostos cujos principais grupos de metabólitos secundários, baseados na estrutura química, são: terpenos, fenóis e compostos nitrogenados (CHOWANSKI et al., 2016).

A flora brasileira é rica e diversificada, oferece opções para a descoberta de novas plantas com atividade inseticida, o que pode significar alternativas de controle de insetos-praga e, conseqüentemente, uma contribuição significativa para o manejo de pragas de grãos armazenados. De modo geral, são utilizadas no formato de pós, óleos e extratos (ROEL, 2001; KRINSKI et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2018).

Nas últimas décadas, no Brasil uma gama de estudos tem demonstrado que os metabólitos secundários provenientes das plantas apresentaram atividade inseticida, caracterizando como uma nova alternativa de controle para pragas de grãos armazenados (LIMA et. al., 2013; BACCI et al., 2015; CAMPOS et al., 2015).

Para o incremento do uso de inseticidas botânicos é necessário a identificação de suas substâncias, pois, se pode conhecer as propriedades desses compostos e a maneira como eles afetam a biologia dos insetos-praga (RATTAN, 2010; CORRÊA & SALGADO, 2011; PIMENTEL, 2012; MENDONÇA, 2019). Alguns compostos oriundos de vegetais atuam no sistema nervoso central dos insetos, sua fisiologia, seu desenvolvimento, sua capacidade alimentar, seu comportamento de oviposição e inclusive causando mortalidade (RATTAN, 2010; COITINHO, 2011; LUCENA et al., 2017).

2.3 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais (OEs) são constituídos por uma mistura complexa de voláteis sob a forma líquida e odorífera provenientes do metabolismo secundário das plantas (NAVARRETE et al., 2011; MILLEZI et al., 2013). Os OEs servem de matéria prima para importantes indústrias: agronômica, farmacêutica, cosmética e alimentos

(SILVEIRA et al., 2012; OOTANI et al., 2013). Por apresentar inúmeros constituintes químicos, os óleos essenciais possuem largo espectro farmacológico, sendo utilizados como antimicrobianos, antiespasmódicos, anti-helmínticos, antiprotozoários, analgésicos, sedativos e anti-inflamatórios (KHALID et al., 2011; MOSTAFA et al., 2018; KAIMOTO et al., 2016).

Quimicamente, a maioria dos óleos essenciais são constituídos por derivados fenilpropanóides e/ou terpenóides (HEINZMANN; SPITZER; SIMÕES, 2017). Esses compostos voláteis, podem interferir toxicamente na bioquímica, na fisiologia digestiva e no comportamento dos insetos (COITINHO, 2011; PRATES & SANTOS, 2002).

Diversos compostos puros e/ou extraídos de óleos essenciais apresentam toxicidade fumigante e de contato contra vários insetos, tais como *S. zeamais* e *S. oryzae*. Podemos citar como exemplos o Eugenol (PRATES et al., 2019), o 1,8 cineol (ARAÚJO, 2014), metil chavicol do óleo (RIBEIRO et al., 2020), (E) – cariofileno de (RAMOS et al., 2013) contra *S. zeamais*.

O efeito fumigante dos óleos essenciais tem sido demonstrado em vários trabalhos. Tapondjou et al. (2005) avaliaram o OE de *Eucalyptus saligna* e obtiveram uma CL₅₀ para *S. zeamais* para fumigação de 0,36 µL cm⁻² de óleo. Usando o óleo essencial de *Ageratum conyzoides* para o controle de *S. zeamais*, Bouda et al. (2001) obtiveram uma LC₅₀ de 0,09% em 24 h.

2.4 *Pothomorphe umbellata*

Pertencente à família Piperaceae, a *Pothomorphe umbellata* também chamada de caapeba ou pariparoba, em virtude de seu uso na medicina popular do Brasil para o tratamento de diversas patologias vem sendo estudada (SPONCHIADO et al., 2007). É um vegetal arbustivo ereto, perene, muito ramificado, com caules articulados, com 1,0 a 2,5 m de altura, apresentando folhas largas. Produz flores pequenas de coloração creme-esverdeado. Se desenvolve do estado do Amazonas ao sul do Brasil, principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia (ANGELY, 1969; LORENZI & MATOS, 2002).

Há diversos trabalhos de natureza etnobotânica onde a *P. umbellata* é citada, expondo sua utilidade em comunidades tradicionais. Pode-se destacar trabalhos relacionados a problemas hepáticos, hipertensivos e gástricos (PASA, 2011; VÁZQUEZ et al., 2014; PEREIRA & PASA, 2020).

Essa espécie apresenta também diversas atividades farmacológicas. Perazzo et al. (2005) utilizando extrato etanólico das folhas de *P. umbellata*, observaram que o mesmo apresentava atividades anti-inflamatória e analgésica. Já Lopes et al. (2013) demonstraram que o extrato etanólico bruto das folhas apresentava atividade antioxidante ($IC_{50} = 1,2 \mu\text{g/mL}$), bem como, o constituinte majoritário (4-nerolidilcatecol, $IC_{50} = 8,6 \mu\text{g/mL}$). Além disso, Isobe et al. (2002) verificaram que o extrato metanólico das partes aéreas de *P. umbellata* e seu principal componente N-benzoilmescalina apresentaram significativa atividade antibacteriana contra *Helicobacter pylori*. Já Rodrigues et al. (2012) verificaram atividade antifúngica das frações de diclorometano e hexano do extrato etanólico da parte aérea, com concentração inibitória mínima (CIM) de $78,13 \mu\text{g/mL}$. Extratos etanólicos de folhas de *P. umbellata* administrado por via oral (250 e 1250mg/kg) ou por via subcutânea (100 e 500mg/kg) evidenciaram atividade antimalárica, reduzindo significativamente os níveis de parasitemia de forma dose-dependente (AMORIM et al., 1988). Além disso, Pauliquevis & Favero (2015) obtiveram efeito fumigante do OE das folhas de *P. umbellata* em *S. zeamais* em trigo. Já Faveto et al. (2013) obtiveram efeito tóxico por contato do OE das folhas de *P. umbellata* contra *Rhyzopertha dominica*.

2.5 *Myrciaria floribunda*

O gênero *Myrciaria* é o maior gênero exclusivamente neotropical da família das plantas Myrtaceae, com um pouco mais de 140 gêneros e 4.630 espécies (SOBRAL et al., 2013). A *Myrciaria floribunda* pode ser encontrada nos estados do Norte, Nordeste (Alagoas, Bahia e Pernambuco), Centro-Oeste, Sudeste e Sul (FLORA DO BRASIL, 2016). Essa espécie é popularmente conhecida no Brasil como Cambuí, Cambuim, Cambiuva, Cambuí-amarelo, Cambuí-Vermelho e Murta (LEMOS et al., 2018). Possui cerca de 5 metros de altura, com inflorescências de flores brancas e frutos de coloração alaranjada ao vermelho escuro quando maduros (LOPÉZ et al., 2006; SOUZA & MORIM, 2008; LOURENÇO & BARBOSA, 2012).

Estudos com *M. floribunda* revelaram que esse vegetal tem grande potencial farmacológico, visto que os compostos bioativos presentes na polpa dos frutos e no óleo essencial das folhas, tem ação no controle de doenças, ação antibactericida e inseticida (RAMOS et al., 2010; THIEBOLT et al., 2014; OLIVEIRA, 2015). O OE das folhas dessa espécie apresenta atividade inseticida para ninfas de *Rhodnius prolixus*, *Oncopeltus fasciatus* e *Dysdercus peruvianus* com efeito tóxico de contato

(THIEBOLT et al., 2012; THIEBOLT et al., 2014). Sendo assim, o OE desse vegetal apresenta potencial inseticida, no entanto, ainda não explorado na literatura contra pragas de grãos armazenados.

3. ARTIGO 1.

INSECTICIDAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL FROM *Pothomorphe umbellata* AGAINST *Sitophilus zeamais*.

Wevertton Marllon Anselmo^a, Camila Soledade de Lira Pimentel^a, Ana Patrícia Silva de Oliveira^b, Thiago Henrique Napoleão^b, Patrícia Maria Guedes Paiva^b, Júlio César Ribeiro De Oliveira Farias De Aguiar^a, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^a

^aLaboratório de Ecologia Química, Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^bDepartamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Corresponding author

E-mail addresses: daniela.navarro@ufpe.br (D.M.d.A.F.Navarro), wevertton.anselmo@afogados.ifpe.edu.br (W.M.Anselmo)

ABSTRACT

Essential oils (EOs) are substances of a plant origin capable of serving as insecticides. Various pests can be controlled with the use of EOs, especially insects that attack stored grains. *Sitophilus zeamais* is an important pest of stored corn. *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) was selected to determine its insecticidal potential against *Sitophilus zeamais* using the EO from the leaves of this plant. Analyses were conducted of the chemical composition of the EO, its toxicity by fumigation, contact and ingestion and its *in vitro* effect on the activity of the enzymes amylase, trypsin and acetylcholinesterase (AChE). The results revealed the presence of 29 compounds accounting for 95.16% of the components of the EO. The major constituents were β -pinene (31.72%), α -pinene (13.46%), linalool (13.41%), limonene (10.22%) and α -phellandrene (4.45%). The toxicity test by fumigation revealed that the EO increased the mortality rates of the pest in a dose-dependent manner after seven days, with a LC₅₀ of 5.8 μ L/L of air. No mortality was found during the contact test. The EO exhibited an antinutritional effect, hindering the feeding of the insect, as evidenced by the changes in the growth rate and conversion efficiency of ingested food beginning at 62.5 μ L/g. The EO from *P. umbellata* did not alter the activity of trypsin but reduced the activity of amylase and increased the activity of AChE. Therefore, the essential oil from the leaves of *P. umbellata* can serve as an alternative in the control of *S. zeamais*.

Keywords: Bioinsecticide, Integrated Grain Pest Management, Alternative Control

1. INTRODUCTION

Corn, *Zea mays* (L.), is a staple food product in Brazil and other countries due to its carbohydrate content and high energy content (Guzmán-Maldonado et al., 1996). Known as an important grain for humans, corn requires adequate storage with the avoidance of damage caused by pests so that it does not lose its quality (Brackmann et al., 2002).

The world production of corn in the 2019/2020 harvest was approximately 1.1 billion tons (Fao, 2019). Brazil is the third largest producer of corn, with a production of 104.9 million tons in the 2020/2021 harvest, losing only to the United States (393 million tons) and China (257 million tons) in the 2019/2020 harvest (Conab, 2020).

Sitophilus zeamais, known as the maize weevil, is one of the major pests of corn. This cosmopolitan insect attacks different crops, such as wheat and rice, as well as processed foods. The maize weevil is an important pest of stored grains in neotropical regions, as it has considerable potential for attacking grains both in the field and during storage, causing losses of around 10% (Tripathi, 2018). Under particular climatic conditions, the maize weevil is a fundamentally important stored grain pest due to the fact that grains constitute the ideal location for its development. This pest causes reductions in nutritional value, the value of the product and grain size as well as the heating of the grain mass at the infestation site, which contributes to an increase in the respiratory activity of the grain mass, leading to the greater consumption of dry matter and, consequently, the rapid deterioration of the product (Faroni, 1992).

The control of pests is commonly performed with fumigating insecticides, which, although effective, have some undesirable effects, such as toxicity to the applicators of the insecticides, residue on grains and the possibility of creating resistant pest populations through natural selection (Coitinho et al., 2010). Therefore, the study of novel insecticides that are less harmful to the environment has become increasingly relevant.

Plants synthesize a vast, diversified variety of organic compounds, many of which are bioactive. These compounds are traditionally known as secondary metabolite compounds – specifically essential oils (EOs), which are often distributed in a differential manner among taxonomic groups within the vegetal kingdom. Various EOs have proved to be useful for agricultural applications, especially the control of the pests *Drosophila suzukii* (De Souza et al., 2021), *Sitophilus zeamais* (Chagas et al., 2002; Coitinho et al., 2010; Mossi et al., 2011; Ferreira et al. 2018), *Callosobruchus*

maculatus (Dutra et al., 2016; Ya-Ali et al., 2020), *Rhyzopherta dominicae* (Kellouche et al., 2010; Hamdi et al., 2015) and *Tribolium castaneum* (Liang et al., 2021).

Various pure and/or extracted compounds of EOs are toxic to different insects, such as *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus oryzae*, through fumigation or direct contact. Some examples of such compounds are eugenol extracted from *Eugenia caryophyllata* (Prates et al., 2019), 1.8 cineol from *Eucalyptus globulus* (Araújo, 2014), methyl chavicol from the oil of *Croton rudolphianus* (Ribeiro et al., 2020), (E)-caryophyllene from *Croton argyrophyllus* (Ramos et al., 2013) and D-limonene against *Dysmicoccus brevipes* (Martins, 2016). Moreover, Coats et al. (1991) discovered that the exposure of *S. oryzae* to linalool and D-limonene for 24 h had an LC₅₀ of 14 and 19 ppm, respectively, and the LC₅₀ of myrcene and α -terpineol were 100 ppm. Lee et al. (2001) found different doses of fumigating toxicity to *S. oryzae* for linalool (LC₅₀ = 39.2 μ L/L of air), limonene (LC₅₀ = 61.5 μ L/L of air) and terpineol (LC₅₀ = 69.1 μ L/L of air). These compounds can serve as an alternative to phosphine, which is widely used throughout the world but does not have satisfactory action due to the development of resistant stored grain pests through natural selection (Pimentel, 2010). Considering their low cost as well as their safety to humans and the environment, these substances can be used in the form of dry powders, extracts and EOs. Essential oils and/or extracts of a plant origin have been researched in integrated management programs, especially for the control of *Sitophilus* (Brito et al., 2006; Almeida et al., 2005; Rajendran and Sriranjini, 2008).

The fumigating effect of essential oils has been demonstrated for the control of stored grain pests, such as *S. zeamais* and *S. oryzae*. Tapondjou et al. (2005) evaluated the EO from *Eucalyptus saligna* and found an LC₅₀ for *S. zeamais* of 0.36 μ L cm⁻² of oil by fumigation. Using the essential oil from *Ageratum conyzoides* for the control of *S. zeamais*, Bouda et al. (2001) obtained an LC₅₀ of 0.09% in 24 h. EOs from *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* also have a fumigating effect on *S. zeamais* (Estrela et al., 2006).

EOs can serve as repellents of pests, such as *S. zeamais*. Using rosemary oil (*Lippia gracillis*), Coitinho et al. (2006) achieved a repellence rate of 97.3%. The oils from *Azadirachta indica* (Jilani and Saxena, 1990), *Lippia organoides*, *Eucalyptus citriodora* (Nerio et al., 2009), *Laurus nobilis*, *Citrus bergamia* Risso, *Foeniculum vulgare* and *Lavandula hybrida* (Cosimi et al., 2009) repelled adult forms of *S. zeamais*,

Besides mortality and repellence, EOs can affect the emergence of adult forms of pests. Nukenine et al. (2010) achieved a 100% reduction in the emergence of populations of *S. zeamais* using the EO from *Plectranthus glandulosus* at a concentration of 20 $\mu\text{L} \cdot 40\text{g}^{-1}$ of infested corn. Asawalam and Hassanali (2006) found a reduction of up to 100% in the emergence of adult forms of *S. zeamais* when applying 750 mg of the EO from *Vernonia amygdalina Delile* to 250 g of corn grains.

Potomorphe umbellata (synonym: *Piper umbellatum*) (Piperaceae) is a plant belonging to Brazilian flora, known locally as 'caapeba' or 'pariparoba'. This bush reaches four meters in height and develops from the state of Amazonas to the southeastern region of the country, mainly in the states of Bahia, São Paulo, Minas Gerais and Espírito Santo (Angely, 1969). The species has diverse pharmacological activities. Using the ethanolic extract from *P. umbellata*, Perazzo et al. (2005) found anti-inflammatory and analgesic properties. Lopes et al. (2013) demonstrated that the crude ethanolic extract and its major constituent (4-nerolidylcatechol) exhibited prominent antioxidant activity ($\text{IC}_{50} = 1.2$ and $8.6 \mu\text{g/mL}$, respectively). Isobe et al. (2002) found that the methanolic extract from *P. umbellata* and its major component (N-benzoyl mescaline) exhibited significant antibacterial activity against *Helicobacter pylori*. Rodrigues et al. (2012) determined the antifungal action of the dichloromethane and hexane fractions of the ethanolic extract, reporting a minimum inhibitory concentration of $78.13 \mu\text{g/mL}$. Ethanolic extracts from the leaves of *P. umbellata* administrated orally (250 and 1250 mg/kg) or subcutaneously (100 and 500 mg/kg) exhibited antimalarial activity, significantly reducing levels of parasitemia in a dose-dependent manner (Amorim et al., 1988).

There are no reports in the literature on the insecticidal activity of the essential oil from *Potomorphe umbellata* against pests that attack stored corn. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the insecticidal activity of the essential oil from *Potomorphe umbellata* for the control of *Sitophilus zeamais*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant Material and Extraction of Essential Oil

The EO from *Potomorphe umbellata* was acquired from the LASZLO AROMATOLOGIA EIRELI company (CNPJ: 07.997.093/0001-10) headquartered in the city of Belo Horizonte, which sells essential oils, cosmetics and fragrance products.

The EO was distilled and then sent to the Chemical Ecology Lab of the Department of Fundamental Chemistry of the Federal University of Pernambuco.

2.2 Analysis of Chemical Composition of Essential Oil

The conditions described by Gibernau et al. (2021) were used for the identification and quantification of the volatile constituents of the EO. We employed the Agilent 5975C Series quadrupole GC/MS system (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) for the identification of the compounds and a GC Thermo Trace Ultra system under the same conditions as the GC/MS analysis for quantification. A DB-5 column was used.

The identification of the compounds was performed by the analysis of the mass spectra of each chromatographic peak, comparison to authentic standards and the calculation of retention indices. The linear retention indices of the components of the oil were calculated using the retention times of each component and the retention times of n-alkanes (C9 and C25) analyzed under the same conditions. The calculated values were compared to indices published in the literature (Adams, 2007; NIST WebBook, 2014)

2.3 Insecticidal Assay

2.3.1 Insects

A colony of *S. zeamais* was reared at the Chemical Ecology Lab of the Department of Fundamental Chemistry of the Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil, in a recipient (capacity: 1.5 L) covered with voile and kept at 28 ± 2 °C, with a 12:12 h (L:D) photoperiod and 70% relative humidity. Males and female (30 to 60 days of age) were used in the assay and fed non-transgenic corn (150 g per recipient).

2.3.2 Assessment of Toxicity by Contact with Essential Oil

The method described by Lira et al. (2015) was used to assess toxicity by contact with the EO from *P. umbellata*. Initially, oil solutions were prepared in 1% (v/v) Tween 80. Concentrations of 20, 83.3 and 166.6 µg/g of insect were used. Next, an aliquot (0.5 µL) of these solutions was applied to the dorsal surface of the thoracic region of the insects using a micropipette. Insects in the negative control group were treated with 0.5 µL of 1% Tween 80 (v/v). Twenty insects were used in each assay and

kept in plastic recipients (4.0 cm in width by 6.0 cm in length). The plastic recipients were kept in the dark at 28 ± 2 °C. The mortality rate was recorded after seven days. Two independent experiments were performed in quintuplicate.

2.3.3 Assessment of Fumigating Toxicity of Essential Oil

The fumigating toxicity of the EO was performed following the method proposed by Chu et al. (2010). For such, the lids of cylindrical plastic recipients (diameter: 4 cm; height: 5 cm; volume: 74 ml) were covered with filter paper previously soaked in 20 μ L of the oil or the compound β -pinene diluted in ethanol (2.7, 5.4, 8, 10.8 and 13.5 μ L/L of air). Filter paper soaked in ethanol alone served as the control treatment. After a 30-second evaporation period, 20 individuals of *S. zeamais* were placed into each recipient and the lids were closed to form a sealed chamber. Polytetrafluoroethylene (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was applied around the paper to avoid contact between it and the insects. After 24 hours of exposure, the insects were transferred to recipients with ambient air and the mortality rate was recorded after seven days. Two independent experiments were performed in quintuplicate.

2.3.4 Assessment of Toxicity by Ingestion of Essential Oil

For this bioassay, an artificial diet was prepared for the insect following the method described by Lira et al. (2015). For such, autoclaved wheat flour (2.0 g; Bunge Alimentos S.A., Benevides, Brazil) was placed in a 5-mL oil solution with 1% Tween 80. Concentrations of 62.5, 125, 250, 500 and 1000 μ L/g were used (μ L of pure oil/g of wheat flour). The control treatment consisted of a diet prepared with 5 mL of a solution composed of autoclaved wheat flour and 1% Tween 80 and ethanol. Next, five aliquots (200 μ L) of the suspension or control treatments were added to Petri dishes of known weight (90 x 100 mm) for the formation of the disc. The dishes containing the flour discs were left in an incubator to dry at 37 °C for 24 hours. The weight the dishes was determined again for the calculation of the mass of the discs. Twenty adult forms of *S. zeamais* of known weight were transferred to each dish. Each assay consisted of four repetitions. After seven days in the dark at 28 ± 2 °C, the mortality rate, weight of the discs and broken insects were recorded. The experiments were performed in quintuplicate.

The feeding deterrence index (FDI) and nutritional parameters were determined using the toxicity results obtained in the ingestion assays. The FDI was determined

using the formula proposed by Isman et al. (1990): $FDI (\%) = 100 \times (C - T)/C$, in which C and T are respectively the consumption of the diet in the control and treatment groups. Using these values, the diets with the oils were classified based on Liu et al. (2007): no feeding restriction ($FDI < 20\%$), weak ($50\% > FDI \geq 20\%$), moderate ($70\% > FDI \geq 50\%$) or strong ($FDI \geq 70\%$) feeding deterrence.

The relative consumption rate (RCR) was calculated as follows: $RCR = (\text{mg of biomass ingested})/(\text{mg of initial insect biomass} \times \text{days})$. The relative biomass gain rate (BGR) was calculated as follows: $BGR = (\text{mg of biomass acquired})/(\text{mg of initial insect biomass} \times \text{days})$. The feed conversion efficiency (FCE) was calculated as follows: $FCE (\%) = 100 \times (\text{biomass acquired})/(\text{food ingested})$. These nutritional parameters were calculated according to Xie et al. (1996).

2.3.5 Preparation of Extracts of *S. zeamais* Adults

Intestinal extracts from *S. zeamais* adults were prepared as described by Napoleão et al. (2013). Adults were removed from the colony and immobilized by cooling at 4°C for 10 min. Next, the intestines of the insects were dissected using a needle, pulling the extremity from the abdomen after the removal of the elytras. The dissected intestines were kept in an ice bath. Fifty intestines were homogenized with 1 mL of a buffer solution (sodium acetate 0.1 M, pH 5.5 or Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0, both containing calcium chloride 0.02 M) using a tissue homogenizer. Insect extracts in Tris buffer were also obtained. The homogenates were centrifuged (9000 g for 15 min at 4°C) and the supernatant corresponded to the intestinal extracts (enzymatic preparations). The protein concentration in the intestinal extracts was determined using the method described by Lowry et al. (1951).

2.3.5.1 Determination of Effects of Essential Oil on Activity of Digestive Enzymes and Acetylcholinesterase

α -Amylase activity was determined according to the method described by Bernfeld (1955). The intestine extract in acetate buffer (15 μ L, 52.5 μ g of protein) was incubated for 30 minutes with 15 μ L of oil at concentrations of 0.9, 1.8, 3.7, 7.5, 15 and 30 ppm or acetate buffer (control). The samples were incubated at 50°C for 10 minutes with 400 μ L of a 1% (p/v) soluble starch solution in sodium acetate 0.1 M (pH 5.5) containing CaCl_2 0.02 M and NaCl 0.15 M. The reaction was interrupted with the addition of 500 μ L of dinitrosalicylic (DNS) acid. The assays were then heated in boiling

water at 100 °C for 6 min and immediately cooled in ice for 15 min. Absorbance was determined at 540 nm. The quantity of reducing sugars was determined using a standard curve of the reaction of different concentrations of glucose ($y = 0.7216x + 0.0216$, in which x is the glucose concentration in μM and y is absorbance) with DNS. The blank of the reaction was performed in the absence of starch.

To determine the effect on trypsin activity, the intestine extract in Tris buffer (15 μL , 200 μg of protein) was previously incubated (15 min) with the oil at concentrations of 0.9, 1.8, 3.7, 7.5, 15 and 30 ppm. Incubation (30 min, 37°C) was then performed with the substrate N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) 8 mM (5 μL) in Tris-HCl 0.1 M (pH 8.0). Tris buffer was used as the control. Trypsin activity was determined by measuring absorbance at 405 nm (KAKADE *et al.*, 1969). One unit of enzymatic activity corresponded to the quantity of enzyme that hydrolyzes 1 μmol of BAPNA per minute. The positive control of the hydrolysis of the substrate was performed by incubation (30 min, 37°C) of bovine trypsin (5 μg) with BAPNA 8 mM (5 μL).

To evaluate the effect on acetylcholinesterase (AChE) activity, 10 μL of whole insect extract (72 μg of protein) were incubated (15 min) with the oil at concentrations of 0.9, 1.8, 3.7, 7.5, 15 or 30 ppm. Next, 20 μL of acetylthiocholine iodine 0.052 M and 200 μL of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid 0.25 mM (DTNB) were added and the assay was incubated at 25 °C for 3 min. The release of thiocholine was then monitored by the determination of absorbance at 405 nm. One unit of AChE activity was defined as the quantity of enzyme that hydrolyzes 1 μmol of acetylthiocholine per minute (ELLMAN *et al.*, 1961).

2.4 Statistical analysis

The data were expressed as mean $\pm$ standard error, which were calculated using GraphPad Prism version 8.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) ($p < 0.05$ indicative of statistical significance), followed by Tukey's test for the identification of significant differences in the comparison of means using the Origin software (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA). The lethal concentration (LC) values necessary to kill 50% of the insects (LC_{50}) and confidence limits were determined by Probit analysis and the data were analyzed by the determination of chi-squared values and degrees of freedom using StatPlus Pro 6.2.5.0.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Chemical Composition of Essential Oil from *Pothomorphe umbellata*

The results of the qualitative and quantitative analyses of the OE are displayed in Table 1. A total of 29 compounds were identified, accounting for 95.16% of the constituents of the oil. The major chemical substances identified were β -pinene (31.72%), α -pinene (13.46%), linalool (13.41%), limonene (10.22%) and α -phellandrene (4.45%). In previous studies, Schmelzer & Gurib-Fakim (2008) found β -pinene (27%), α -pinene (18%), (E)-nerolidol (12%) and β -caryophyllene (10%); Tchoumboungang et al. (2009) found β -caryophyllene (28.2%), (E)-nerolidol (16.5%) and β -pinene (10.8%); and Kambiré (2019) found linalool and (E) β -caryophyllene as the major constituents of the OE from *P. umbellata*.

Table 1 – Constituents identified in essential oil from *Pothomorphe umbellata*

Compound ^a	Retention index		Percentage In area (%)	Standard deviation
	Calculated ^b	Literature ^c		
α -Pinene	932	931	13.46	0.24
Camphene	948	945	0.95	0.05
β -Pinene	974	968	31.72	0.61
Myrcene	988	991	2.01	0.02
α -Phellandrene	1002	1003	4.45	0.06
δ -3-Carene	1008	1009	1.01	0.02
α -Terpinene	1014	1015	0.63	0.01
p -Cymene	1020	1023	3.54	0.03
Limonene	1024	1027	10.22	0.47
1,8-Cineole	1026	1030	2.00	0.02
(Z)- β -Ocimene	1032	1039	2.83	0.06
(E)- β -Ocimene	1044	1049	0.91	0.01
γ -Terpinene	1054	1058	0.86	0.01
Terpinolene	1086	1088	0.86	0.06
Linalool	1095	1100	13.41	0.40

Camphor	1144	1144	0.31	0.02
Terpinen-4-ol	1174	1178	0.17	0.02
α -Terpineol	1186	1191	0.54	0.01
α -Cubebene	1348	1351	0.07	0.01
α -Copaene	1374	1377	0.92	0.02
β -Elemene	1389	1393	0.10	0.02
α -Gurjunene	1409	1411	0.46	0.02
(E)-Caryophyllene	1417	1421	1.29	0.02
Aromadendrene	1439	1441	0.91	0.01
α -Humulene	1452	1455	0.90	0.01
allo-Aromadendrene	1458	1463	0.17	0.01
Amorpha-4,7(11)-diene	1479	1478	0.08	0.01
β -Selinene	1490	1488	0.13	0.01
γ -Patchoulene	1502	1497	0.27	0.02
Total identified			95.16	

^aConstituents listed in order of elution in non-polar DB-5 column. ^bRetention index (RI) calculated by retention time in relation to series of alkanes (C₉-C_{30n}) in 30-m DB-5 capillary column. ^cValues obtained by Adams (2009).

The family Piperaceae has numerous phytochemicals with insecticidal activity (Arnason et al., 2002). *Piper nigrum* L., *P. guineense*, *P. aduncum*, *P. amalago*, *P. mikanianum*, *P. xylosteoides*, *P. tuberculatum*, *P. hispidinervum* and *P. umbellatum* are among the known species of *Piper* with such activity. The main compounds found are piperine, α - and β -pinene, β -caryophyllene, limonene, linalool, safrole, phellandrene and germacrene D (Kéita et al. 2000; Dyer and Palmer, 2004; Scott et al. 2005; Ferraz et al., 2010; Kambiré et al., 2019). Studying the effect of OEs on mites, Araújo (2015) found that dillapiole, bicyclogermacrene, γ -muurolene and 2-epi- β -funebrene were the major constituents in the oils from *P. aduncum*, *P. arboreum*, *P. caldense* and *P. tuberculatum*, respectively.

3.2 Insecticidal Bioassay

3.2.1 Assessment of Toxicity by Contact

In the bioassays of toxicity by contact with adult forms of *Sitophilus zeamais*, the EO from *Piper umbellatum* caused no mortality at any of the concentrations tested (20, 83.3 and 166.6 $\mu\text{g/g}$). Lira et al. (2015) found that the EO from *Alpinia purpurata* also exhibited no toxicity by contact to *S. zeamais*. However, numerous oils exert toxicity by contact to *S. zeamais* and other stored grain pests (Coitinho, 2010; Suthisut et al., 2011; Sampson et al., 2005; Ogendo et al., 2011; Moreira et al. 2007; Fazolin et al. 2007).

3.2.2 Assessment of Fumigating Toxicity

The assay showed that the EO from *P. umbellata* exhibited toxicity via poisoning by fumigation to adult forms of *S. zeamais*. The analysis showed that OE increased the insect mortality rate (Figure 1). Except for the concentration of 2.7 $\mu\text{L/L}$ of air, all concentrations tested differed significantly from the control.

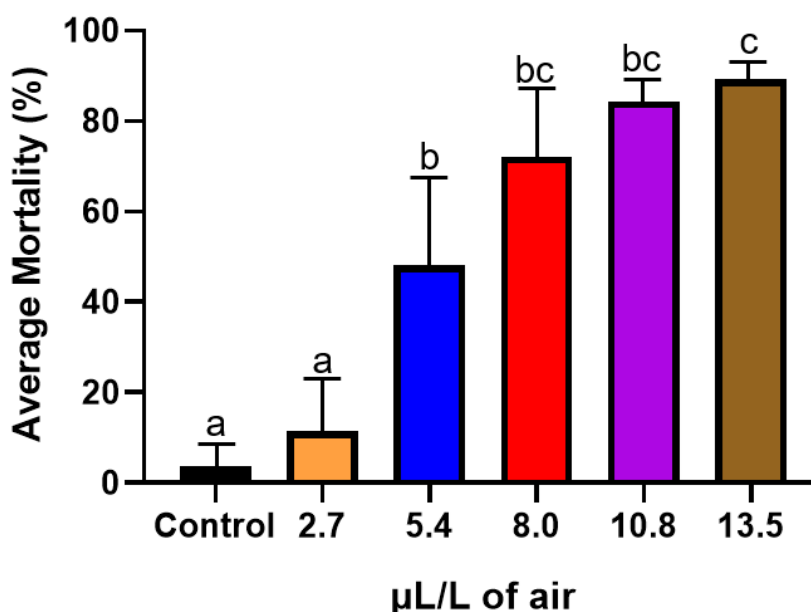


Figure 1 – Toxicity of EO from *P. umbellata* to *Sitophilus zeamais* in fumigation bioassay. Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$) between treatments (Tukey's test). Each bar corresponds to mean $\pm$ SE for each replicate.

The EO from *Piper umbellatum* and its compounds exhibited strong fumigating toxicity to *S. zeamais*. The insect mortality rate increased with the increase in the

concentration of the oil, exhibiting a toxic effect. Several studies have determined the insecticidal and/or fumigating activity of EOs from the genus *Piper* as well as other plants against *S. zeamais*. LIU et al. (2011) found this effect for the EO of the shoots of *Ostericum sieboldii* ($LC_{50} = 13.82 \mu\text{g}/\text{adult}$). Chaubey (2012) showed this effect for the EO from *Piper cubeba* ($LC_{50} = 1.07 \mu\text{l}\cdot\text{cm}^{-3}$ of air). Oyedeji (2020) reported the toxic effect of the EO from *Citrus sinensis*, with an LC_{50} of $80 \mu\text{L}/\text{L}$ of air, which is somewhat higher than the other data presented. Studying *P. aduncum*, Estrela et al. (2006) reported the fumigating effect on *S. zeamais*, with an LC_{50} of 1.32 mL of oil/g of grains. Moreover, the monoterpene 1-8-cineol exhibited toxicity to *S. oryzae*, with an LC_{50} of $14.19 \text{ mg}/\text{L}$ (Mohamed et al., 2008). Therefore, the present results are comparable or even better than findings described in the literature. We also performed the fumigation test with β -pinene and found an LC_{50} of $4.1 \mu\text{L}/\text{L}$ of air, demonstrating that this major constituent of the oil is an excellent fumigant.

3.2.3 Assessment of Toxicity by Ingestion

The ingestion of the EO from *P. umbellata* through the artificial diet resulted in the induction of the mortality of adult forms of *S. zeamais* after seven days in treatments beginning with concentrations of $250 \mu\text{L}/\text{g}$ (Figure 2A). The results also showed that the presence of the oil in the diet interfered with the nutrition of the insects. The growth rate (gain in biomass) (Figure 2B) was negative at all concentrations tested, revealing that the insects did not incorporate nutrients from the diet. The relative consumption rate (Figure 2C) did not differ significantly from the control at any concentration, which indicates no reduction in food ingestion. The conversion efficiency of the foods ingested (Figure 2D) differed significantly from the control in the treatments from 250 to $1000 \mu\text{L}/\text{g}$; the negative values indicated that the insects metabolized their own reserves, leading to a loss of biomass.

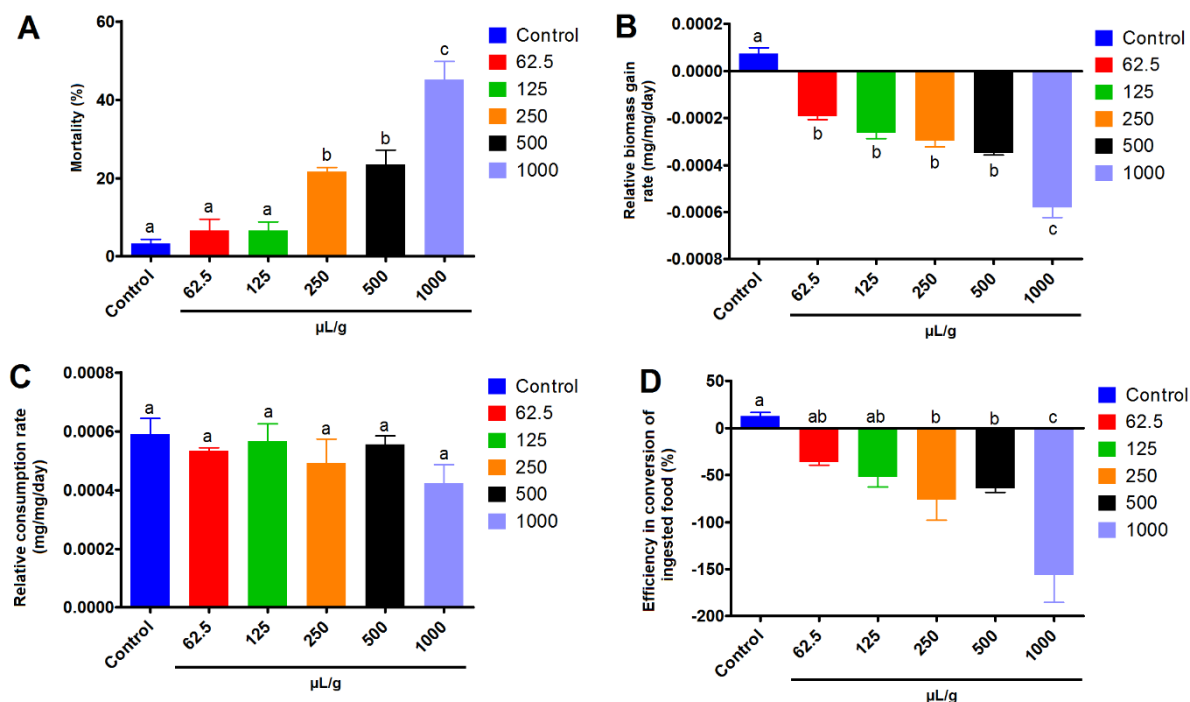


Figure 2 – Assessment of toxicity by ingestion of essential oil from *P. umbellata* (µL of pure oil/g of wheat flour) to adult forms of *S. zeamais*. (A) Mortality rate. (B) Relative biomass gain rate indicates biomass (mg) obtained daily per mg of initial body weight. (C) Conversion efficiency of foods ingested (%) indicates quantity of foods ingested converted into biomass by insects. (D) Relative consumption rate indicates quantity of food consumed (mg) per mg of body weight per day. Each bar corresponds to mean $\pm$ SE of three repetitions.

Some studies evaluating toxicity by ingestion to *Sitophilus* spp. reported changes in biomass and the food conversion efficiency, but with no significant difference in the mortality of the insects in seven days (Rajkumar et al., 2019; Lira et al., 2015; Ribeiro et al., 2020). Analyzing toxicity by ingestion using nanoparticles of *Piper nigrum*, Kumar et al. (2009) found a greater sign of protection of wheat grains from infestation by *S. oryzae* compared to the control group. Moreover, some EOs can result in significant reductions in the longevity, fecundity, vitality, feeding performance and oviposition of insect pests (Rajkumar et al., 2019; Prakash et al., 2013; Pavela, 2012). Huang et al. (1997) found that the EO from nutmeg seeds (*Myristica fragrans* Houtt.) led to reductions in the biomass gain and food consumption of *S. zeamais*.

Thus, the antinutritional effects found in the present study can be used in the attempt to control *S. zeamais* in stored corn, as this pest is highly destructive due to the velocity at which it consumes grains.

3.2.4 Determination of Effects of Essential Oil from *P. umbellata* on Activity of Digestive Enzymes and Acetylcholinesterase

The EO from *P. umbellata* reduced amylase activity in *S. zeamais* at the lowest concentrations compared to the control (Fig. 3A). However, none of the concentrations tested altered trypsin activity (Fig. 3B). The test conducted for acetylcholinesterase (AChE) indicated that the EO from the leaves of *P. umbellata* was capable of significantly increasing its activity in the extract from *Sitophilus zeamais* at all concentrations tested (Fig. 3C).

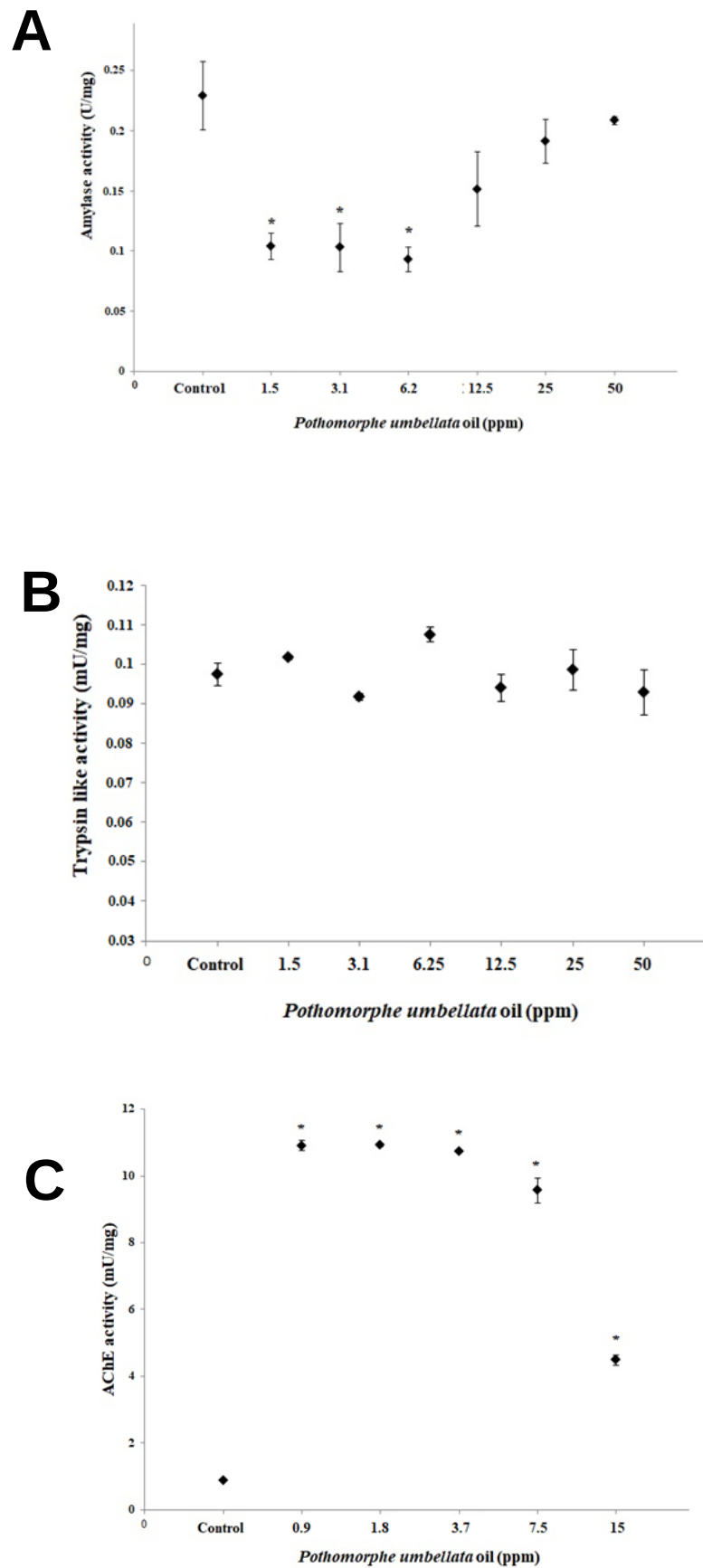


Figure 3 – Effects of essential oil from *P. umbellata* on activity of digestive enzymes (4A – amylase, 4B – trypsin) and acetylcholinesterase (4C).

Starch is one of the main dietary components of stored grain pests. Amylases catalyze the hydrolysis of starch, enabling its storage and use as an energy source (Terra and Ferreira, 2005; Baker, 1991). These enzymes are particularly important to the digestion of stored grain pests, such as *S. zeamais*, which feed on starch-rich grains (Lopes et al., 2010; Baker and Woo, 1992; Cinco-Moroyoqui et al., 2008)

Digestive proteases catalyze the release of peptides and amino acids from dietary protein and the majority are found abundantly in the midgut region of the dietary tract of insects. These digestive proteases and a set of other proteases are also found in the viscera of insects (Christeller et al., 1992; Terra and Ferreira, 1994). Trypsin stands out among the dietary proteases of insects. In the present study, however, no change was found in trypsin activity, likely because the EO from *P. umbellata* does not contain any inhibitor that causes a change in the activity of this enzyme.

Volatile substances in plant-based insecticides have received the attention of the scientific community for grain pest management programs (Isman et al., 2011). Studies have reported that some substances have an inhibitor effect on acetylcholinesterase (AChE). AChE is an enzyme of essential in the physiology of insect and has been used as a sensitive biomarker for the evaluation of the toxicity of synthetic insecticides to insect pests (Kristoff et al., 2010).

In the present study, no inhibitory effect on AChE was found. Indeed, an increase in the activity of this enzyme occurred. This increase can cause the overexcitability of the nervous system, generating neural imbalance. This result contrasts the findings of most studies, as the presence of some insecticidal substances in the OE, especially β -pinene, α -pinene and linalool, altered the digestive and neural physiology of *S. zeamais*, generating an imbalance in enzyme activity and causing mortality. EOs are lipophilic by nature and can be inhaled or ingested. The fast action against insect pests is an indication of a neurotoxic mode of action (Enan, 2001).

5. CONCLUSION

The essential oil from *P. umbellata* exhibited a greater toxic effect to *S. zeamais* in the fumigation assay. Moreover, the EO exhibited an anti-nutritional effect, inhibiting the feeding of the insect, as evidenced by the changes in the growth rate and conversion efficiency of the ingested food. This may be related to the inhibition of amylase activity. The increase in AChE in the organism of the insect causes an imbalance in the nervous system, increasing its neural activity and leading to the death

of the insect. Thus, the essential oil from *P. umbellata* could serve as a viable alternative to synthetic insecticides for the management of *S. zeamais*.

REFERENCES

- Adams, R. P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy.
- Almeida, F.A.C., S.A. Almeida, N.R. Santos, J.P.Gomes, M.E.R. Araújo., 2005. Efeito de extratos alcoólicos de plantas sobre o caruncho do feijão vigna (*Callosobruchus maculatus*). Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande, 9, 585-590. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662005000400023>.
- Amorim, C. Z. ; Flores, C.A, Gomes, B.E; Marques, A.D; Cordeiro, RS., 1988. Screening for antimalarial activity in the genus *Pothomorphe*. J Ethnopharmacol. 24,101 – 106. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(88\)90140-7](https://doi.org/10.1016/0378-8741(88)90140-7).
- Anderson, J.A., Coats, J.R., 2012. Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods. Pestic. Biochem. Phys. 102, 124–128. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.12.002>.
- Angely, J., 1969. - Flora analítica e fitogeográfica de São Paulo. São Paulo, Edições Phytton, p164.
- Araújo, M. J. C., 2015. Potencial Acaricida De Óleos Essenciais De Espécies Do Gênero Piper Sobre O Ácaro Rajado *Tetranychus urticae* Koch (ACARI: TETRANYCHIDAE). Dissertação. Entomologia Agrícola, Universidade Federal de Pernambuco, 84p.
- Araújo, A. M. N., 2014. Toxicidade, efeitos comportamentais e sinergismo de óleos essenciais em *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Entomologia Agrícola.
- Arnason, JT., Durst, T., Philoge`Ne, BJR., 2002. Prospection d'insecticides phytochimiques de plantes tempérées et tropicales communes ou rares. In: Regnault-Roger C, Philoge`ne BJR, Vincent C (eds). Biopesticides d'origine végétale. Edições TEC e DOC, Paris, 37-51.
- Asawalam, E.F., A. Hassanali., 2006. Constituents of the essential oil of *Vernonia amygdalina* as maize weevil protectants. Trop. Subtrop. Agroec. 6, 95-102. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93960207>.
- Baker, J.E., Woo, S.M., 1992. Digestion of starch granules by α -amylases from the rice weevil, *Sitophilus oryzae*: effect of starch type, fat extraction, granule size, mechanical damage, and detergent treatment. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 22, 529–537. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(92\)90029-E](https://doi.org/10.1016/0965-1748(92)90029-E).

- Baker, J.E., 1991. Purification and partial characterization of α -amylase allozymes from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. *Insect Biochemistry*. 21, 303–311. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(91\)90020-F](https://doi.org/10.1016/0020-1790(91)90020-F).
- Bernfeld, P., 1955. Amylases, α and β . *Methods Enzymology*. 1, 149–158. [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(55\)01021-5](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(55)01021-5).
- Bouda, H., L.A. Tapondjou., Fontem, D.A., Gumedzoe, M.Y.D., 2001. Effect of essential oils from leaves of *Ageratum conyzoides*, *Lantana camara* and *Chromolaena odorata* on the mortality of *Sitophilus zeamais* Mots., 1865 (Coleoptera, Curculionidae). *J. Stored Prod. Res.* 37, 103-109. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00011-4](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00011-4).
- Boyd, D. W., Cohen, A. C., Alverson, D. R., 2002. Digestive Enzymes and Stylet Morphology of *Deraeocoris nebulosus* (Hemiptera: Miridae), a Predacious Plant Bug. *Annals of the Entomological Society of America*, 95, 395–401. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2002\)095\[0395:DEASMO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2002)095[0395:DEASMO]2.0.CO;2).
- Brackmann, A., Neuwald, D.A., Ribeiro, N.D., Freitas, S.T., 2002. Conservação de três genótipos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do grupo comercial carioca em armazenamento refrigerado e em atmosfera controlada. *Ciência Rural*, 32, 911-915.
- Brito, J.P., Oliveira, J.E.M., Bortoli, S.A., 2006. Toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 6, 96-103.
- Chagas, A.C. de S., Passos, W. M., Prates, H. T., Leite, R. C., Furlong, J., Fortes, I. C. P., 2002. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 39, n. 5, 247-253. <https://doi.org/10.1590/S1413-95962002000500006>.
- Chaubey, M. K., 2012. Fumigant toxicity of essential oils and purê compounds against *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae), *Biological Agriculture & Horticulture: An International Journal for Sustainable Production Systems*, 28, 111-119, <https://doi.org/10.1080/01448765.2012.681352>.
- Christeller, J.T., Laing, W.A., Markwick, N.P., 1992. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22, 735-746. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(92\)90052-G](https://doi.org/10.1016/0965-1748(92)90052-G).
- Chu, S.S., Liu, Q.R., Liu, Z.L., 2010. Insecticidal activity and chemical composition the essential oil of *Artemisia vestita* from China against *Sitophilus zeamais*. *Biochemical Systematics and Ecology*. Chu, S. S., Liu, Q. R., & Liu, Z. L. (2010). Insecticidal activity and chemical composition of the essential oil of *Artemisia vestita* from China against *Sitophilus zeamais*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38, 489–492. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.04.011>.

- Cinco-Moroyoqui, F.J., Diaz-Malvaez, F.I., Alanis-Villa, A., Barron-Hoyos, J.M., Cardenas-Lopez, J.L., Cortez-Rocha, M.O., Wong-Corral, F.J., 2008. Isolation and partial characterization of three isoamylases of *Rhyzopertha dominica* F. (Coleoptera: Bostrichidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 150, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.02.008>.
- Coats, J.R., Karr, L.L., Drewes, C.D., 1991. Toxicity and neurotoxic effects of monoterpenoids in insects and earthworms. In: Hedin, P.A. (Ed.), *Naturally Occurring Pest Bioregulators*. ACS (American Chemical Society), Washington, DC, 305-316. <https://doi.org/10.1021/bk-1991-0449.ch020>.
- Coitinho, C. B. L. R.; Oliveira, V. J.; Junior, G. C. G. M.; Câmara, G. A. C., 2006. Atividade inseticida de óleos vegetais sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) em milho armazenado. *Revista Caatinga*, Mossoró, 19, 176- 182, abril/junho.
- Coitinho, R. L. B. C., Oliveira, J. V., Gondim Junior, Corrêa E Camara, M. G., Gomes, C. A., 2010. Persistência de óleos essenciais em milho armazenado, submetido à infestação de gorgulho do milho. *Cienc. Rural* [online]. 2010, 40,1492-1496.
- Companhia Nacional De Abastecimento – CONAB., 2020. Acompanhamento. safra brasileira de grãos, v. 5– Safra 2020, n. 5- Segundo levantamento, Brasília, 1-75. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/>(acessado em 13 de dezembro de 2020).
- Cosimi, S.; Rossi, E.; Cioni, P. L.; Canale, A., 2009. Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests, Evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* Stephens and *Tenebrio molitor* L. *Journal of Stored Products Research*, 45, 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2008.10.002>.
- De Souza, M. T., De Souza, M. T., Bernardi, D., de Melo, D. J., Zarbin, P. H. G., Zawadneak, M. A. C., 2021. Insecticidal and oviposition deterrent effects of essential oils of *Baccharis* spp. and histological assessment against *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Sci.* 11, 3944. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83557-7>.
- Dutra, K. A., De Oliveira, J. V., Navarro, D. M. DO A. F., Barbosa, D. R. E S., E Santos, J. P. O., 2016. Control of *Callosobruchus maculatus* (FABR.) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in *Vigna unguiculata* (L.) WALP. with essential oils from four *Citrus* spp. plants. *J. of Stored Products Research*, 68, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2016.04.001>.
- Dyer, L. A., Palmer, A., 2004. *Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology and evolution*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 228.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).

- Enan, E., 2001. Molecular and pharmacological analysis of an octopamine receptor from American cockroach and fruit fly in response to plant essential oils. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 130, 325-37. <https://doi.org/10.1002/arch.20076>.
- Estrela, J. L. V., Fazolin, M., Catani, V., Alécio, M. R., Lima, M. S., 2006. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. *Pesq. agropec.* 41, 217-222. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2006000200005>.
- Fao. 2019. FAOSTATS: CROPS. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acessado em 12 de março, 2021.
- Faroni, L.R. D. A., 1992. Manejo das pragas dos grãos armazenados e sua influência na qualidade do produto final. *Revista Brasileira de Armazenamento*, Viçosa, 17, 36-42.
- Fazolin, M., J.L.V. Estrela, V. Catani, M.R. Alécio, M.S. L., 2007. Atividade inseticida do óleo de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Schum (Bignoneaceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). *Acta Amazonica* 37: 599-604. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672007000400015>.
- Ferreira, L. O. G.; Pauliquevis, C. F.; Contea, C. DE O.; Favero, S., 2018. Atividade de Fagoinibição do Óleo Essencial de *Eucalyptus torelliodora* sobre *Sitophilus zeamais* Motsch (Coleoptera: Curculionidae). *Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde*. 22, 137-141. <https://doi.org/10.17921/1415-6938.2018v22n2p137-141>.
- Freitas, F. Paiva., 2007. Efeito de monoterpenos de óleos essenciais presentes em *Alpinia speciosa*, *Cymbopogon citratus* e *Rosmarinus officinalis* sobre atpases de larvas de *Aedes aegypti*. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - Biociências e Biotecnologia.
- Gibernau, M., Maia, A.C.D, Navarro, D.M.A., 2021. Pollination ecology and floral scent chemistry of *Philodendron fragrantissimum* (Araceae). *Botany Letters*. 1-11. <https://doi.org/10.1080/23818107.2021.1909497>.
- Guzmán-Maldonado, S.H., A. Marin-Jarillo, J.Z. Castellanos, E. Gonzalez De Mejia, Acosta-Gallegos, J.A., 1996. Relationship between physical and chemical characteristics and susceptibility to *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae) and *Acanthoscelides obtectus* (Say) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal of Stored Products research*, 32, 53-58. [https://doi.org/10.1016/0022-474X\(95\)00037-8](https://doi.org/10.1016/0022-474X(95)00037-8).
- Hamdi, S. H., Hedjal-Chebheb, M., Kellouche, A., Khouja, M. L., Boudabous, A., Ben Jemâa, J. M., 2015. Management of three pests' population strains from Tunisia and Algeria using *Eucalyptus* essential oils. *Industrial Crops and Products*, 74, 551–556. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.072>.

- Huang, Y., J.M.W.L. Tan, R.M. Kini, S.H. Ho., 1997. Toxic and antifeedant action of nutmeg oil against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Mots., 1865. J. Stored Prod. Res. 33, 289-298. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(97\)00009-X](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(97)00009-X).
- Isman, M.B., Koul, O., Luczynski, A., Kaminski, J., 1990. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 38, 1406-1411. <https://doi.org/10.1021/jf00096a024>.
- Isman, M.B., Miresmailli, S., Machial, C., 2011. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. Phytochem. Rev. 10,197–204. 1 <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9170-4>.
- Isobe, T., Ohsaki, A., Nagata, K., 2002. Antibacterial constituents against *Helicobacter pylori* of Brazilian medicinal plant, pariparoba. Yakugaku Zasshi,122, 291-294. <https://doi.org/10.1248/yakushi.122.291>.
- Jilani, G.; Saxena, R.C.,1990. Repellent and feeding deterrent effects of tumeric oil, sweetflag oil, neem oil, and a neem-based insecticide against lesser grain borer (Coleoptera: Bostrichidae). Journal of Economic Entomology, 83, 629-634. <https://doi.org/10.1093/jee/83.2.629>.
- Kakade, M.L., Rackis, J.J., Mcghee, J.G., 1969. An evaluation of natural vs synthetic substrates for measuring the anti tryptic activity of soy bean samples. Cereal Chemistry 46, 518-526.
- Kambiré, D. A., Yapi, T. A., Boti, J. B., Tomi, G. G., Pierre, B. A., Tomi, F., 2019. Chemical Composition of Leaf Essential Oil of *Piper umbellatum* and Aerial Part Essential Oil of *Piper guineense* From Côte d'Ivoire. Natural Product Communications. 14. <https://doi.org/10.1177/1934578X19859124>.
- Keita, S.M., Vincent, C., Schmidt, J., Ramaswamy, S., Belanger, A., 2000 Effect of various essential oils on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). Journal Stored Prod Res 36, 355–364. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(99\)00055-7](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(99)00055-7).
- Kellouche. A., Ait-Aider, F., Labdaoui, K., Moula, D., Ouendi, K. Hamadi, N., Ouramdane, A., Frerot, B., Mellouk, M., 2010. Biological activity of ten essential oils against cowpea beetle, *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera: Bruchidae). International Journal of Integrative Biology. 10, 86.
- Kristoff, G., Verrengia Guerrero, N.R., Cochon, A.C., 2010. Inhibition of cholinesterases and carboxylesterases of two invertebrate species, *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*, by the carbamate pesticide carbaryl. Aquat. Toxicol. 96, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.10.001>.

- Kumar, A., Shukla, R., Singh, P., Singh, A.K., Dubey, N.K., 2009. Use of essential oil from *Mentha arvensis* L. to control storage moulds and insects in stored chickpea. *J. Sci. Food Agric.* 89, 2643–2649. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3768>.
- Lee, B.H.; Choi, W.S., Lee, S.E., Park, B.S. 2001. Fumigant toxicity of essential oils and their constituent compounds towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). *Crop. Prot.* 20, 317–320. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00158-7](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00158-7).
- Liang, Jun-yu., Yang, Ying-ying., Na, Yue., Shao, Ya-zhou., He, Chun-yu., Zhang, Ji & Jia, Ling-yun., 2021. Insecticidal and acetylcholine esterase inhibition activity of *Rhododendron thymifolium* essential oil and its main constituent against two stored product insects. *Journal of Environmental Science and Health, Part B.* <https://doi.org/10.1080/03601234.2021.1894888>.
- Lira, C.S., Pontual, E.V., Albuquerque, L.P., Paiva, L.M., Paiva, P.M.G., Oliveira, J.V., Napoleão, T.H., Navarro, D.M.A.F., 2015. Evaluation of the toxicity of essential oil from *Alpinia purpurata* inflorescences to *Sitophilus zeamais* (maize weevil). *Crop Protection.* 71, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.004>.
- Liu, Z.L., Chu, S.S., Jiang, G.H., 2011. Insecticidal activity and composition of essential oil of *Ostericum sieboldii* (Apiaceae) against *Sitophilus zeamais* and *Tribolium castaneum*. *Rec. Nat. Prod.* 5, 74-81.
- Lopes, K. V. G., Silva, L. B., Reis, A. P., Oliveira, M. G. A., Guedes, R. N. C., 2010. Modified α -amylase activity among insecticide-resistant and -susceptible strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Journal of Insect Physiology*, 56, 1050–1057. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.02.020>.
- Lopes, A. P., bagatela, B. S., Rosa, P. C. p., Nanayakkara, D. N. P., Carvalho, J. C. T., maestro, E. L, Bastos, J. K., Perazzo, F.F., 2013. Antioxidant and Cytotoxic Effects of Crude Extract, Fractions and 4-Nerolidylcathecol from Aerial Parts of *Pothomorphe umbellata* L. (Piperaceae). *BioMed Research International*, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2013/206581>.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).
- Martins, G. S. O., 2016. Caracterização Química e Atividade Inseticida de Óleos Essenciais Cítricos Sobre *Dysmicoccus Brevipes* (cockerell, 1893) (hemíptera: Pseudococcidae). Dissertação de mestrado. Centro de ciências agrárias - Programa de Pós-graduação em Produção vegetal. Universidade Federal do Espírito Santo - Alegre. 45 f.
- Mohamed, M.I.E, Abdelgaleil, S.A.M., 2008. Chemical composition and insecticidal potential of the essential oils from Egyptian plants against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *J App Entomol Zool* 43, 599–607. <https://doi.org/10.1303/aez.2008.599>.

- Moreira, M.D., Picanço, M. C., Barbosa, L. C. A., Guedes, R. N. C., De Campos, M. R., Silva, G. A., Martins, J. C., 2007. Plant compounds insecticide activity against coleoptera pests of stored products. *Pesqu. Agropecu. Bras.* 42, 909-915. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2007000700001>.
- Mossi, A. J., astolfi, V., Kubiak, G., Lerin, L., Zanella, C., Toniazzo, G., De Oliveira, D., Treichel, H., devilla, I. A., Casian, R., Restello, R., 2011. Insecticidal and repellency activity of essential oil of *Eucalyptus* sp. against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 273- 277. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4181>.
- Napoleão, T.H., Belmonte, B.R., Pontual, E.V., Albuquerque, L.P., SA, R.A., Paiva, L.M., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., 2013. Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*. 54, 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2013.04.002>.
- Nerio, L.S., Oliveira-Verbel, J., Stashenko, E.E., 2009. Repellent activity of essential from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). *J. Stored Prod. Res.* 45, 212-214. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2009.01.002>.
- Nacional, I. of S. and T., (NIST WebBook), 2014.U. S deparatament of Commerce. <https://doi.org/10.18434/T4D303>.
- Nukenine, E. N., Goudougou, J. W., Adler, C., Reichmuth, C., 2010. Efficacy of diatomaceous earth and botanical powders against the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) on maize. 425, 881–887. Tenth International Working Conference on Stored Product Protection, Julius-Kühn-Archiv. <https://doi.org/10.5073/jka.2010.425.176>.
- Ogendo, J.O., Wambua, L.M., Deng, A. L., Owuoche, J., Bett, P.K., 2011. Toxic, Antifeedant And Repellent Activity Of Aqueous Crude Extracts Of *Tephrosia vogelii* Hook On The Larval Stages Of *Helicoverpa armigera* Hübner. *Biocontrol potential Using Essential Oils*. <https://doi.org/10.18869/modares.jcp.5.3.447>.
- Oyedeji, A. O., Okunowo, W. O., Osuntoki, A. A., Olabode, T. B., Ayo-Folorunso, F. 2020. Insecticidal and biochemical activity of essential oil from *Citrus sinensis* peel and constituents on *Callosobruchus maculatus* and *Sitophilus zeamais*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104643. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104643>.
- 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. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2012.10644030>.
- Perazzo, F.F.; Souza, G.H.B., Lopes, W., Cardoso, LGV., Carvalho, J.C.T., Nanayakkara, D.N.P.; Bastos, J.K., 2005. Antiinflammatory and analgesic properties of water – ethanolic extract from *Pothomorphe umbellata* L.

- (Piperaceae) aerial parts. *J Ethnopharmacol.* 99, 215 – 220. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.02.023>.
- Pimentel, M. A. G. 2010. Behavioral Response and Selection for Phosphine Resistance in *Rhyzopertha dominica* F. (Coleoptera: Bostrichidae). 112 f. Doctorate (Doctor scientiae in Entomology) - Federal University of Viçosa. Minas Gerais.
- Prakash, B., Singh, P., Yadav, S., Singh, S.C., Dubey, N.K., 2013. Safety profile assessment and efficacy of chemically characterized *Cinnamomum glaucescens* essential oil against storage fungi, insect, aflatoxin secretion and as antioxidant. *Food Chem. Toxicol.* 53, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.044>.
- Prates, L. H. F., Faroni, L. R. D., Heleno, F. F., De Queiroz, M. E. L. R., De Sousa, A. H., Silva, M. V. A., 2019. Eugenol diffusion coefficient and its potential to control *Sitophilus zeamais* in rice. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47562-1>.
- Rajendran, S., Sriranjini V., 2008. Plant products as fumigants for stored-product insect control. *J. Stored Prod. Res.* 44, 126-135. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2007.08.003>.
- Rajkumar, V., Gunasekaran, C., Christy, I. K., Dharmaraj, J., Chinnaraj, P., Paul, C. A., 2019. Toxicity, antifeedant and biochemical efficacy of *Mentha piperita* L. essential oil and their major constituents against stored grain pest. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 156, 138-144. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.02.016>.
- Ramos, J. M. O., Santos, C. A., Santana, D. G., Santos, D. A., Alves, P. B., Thomazzi, S. M., 2013. Chemical constituents and potential anti-inflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23, 644–650. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000045>.
- Ribeiro, I. A. T. de A., Da Silva, R., Da Silva, A., pinheiro, P. M., Paiva, P. M. G., Navarro, D. M. do A. F., Da Silva, M. V., Napoleão, T. H., Correia, M. T. S., 2020. Chemical characterization and insecticidal effect against *Sitophilus zeamais* (maize weevil) of essential oil from *Croton rudolphianus* leaves. *Crop Protection*. 129, 105043, <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.105043>.
- Rodrigues, E. R., Nogueira, N. G. P., Zocolo, G. J., Leite, F. S., Januario, A. H., Fusco-Almeida, A. M., Fachin, A. A., De Marchi, M. R. R., Dos Santos, A. G., Pietro, R. C. L. R., 2012. *Pothomorphe umbellata*: Antifungal activity against strains of *Trichophyton rubrum*. *Journal de Mycologie Médicale*, 22, 265–269. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2012.05.005>.
- Sampson, B. J., Tabanca, N., Kirimer, N., Demirci, B., Baser, K. H. C., Khan, I. A., Wedge, D. E., 2005. Insecticidal activity of 23 essential oils and their major compounds against adult *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) (Aphididae: Homoptera). *Pest Management Science*, 61, 1122–1128. <https://doi.org/10.1002/ps.1100>.

- Scott, I.M., Jensen, H. R., Philogène, B. J. R., Arnason, J. T., 2007. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry Reviews*, 7, 65–75. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9058-5>.
- Sithisut, D., Fields, P.G., Chandrapathya, A., 2011. Contact toxicity, feeding reduction and repellency of essential oils from three plants from the ginger family (Zingiberaceae) and their major components against *Sitophilus zeamais* and *Tribolium castaneum*. *J. Stored Prod.* 104, 1445-1454. <https://doi.org/10.1603/EC11050>.
- Tapondjou, A. L., Adler, C., Fontem, D.A., Bouda, H., Reichmuth, C., 2005. Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. *J. Stored Prod. Res.* 41, 91-102. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2004.01.004>.
- Tchoumboungang, F., Jazet, D., P., M., Sameza, M., L., Fombotioh, N., Wouatsa, N., A., V., Amvam, Z., P., H., Menut, C., 2008. Comparative essential oils composition and insecticidal effect of different tissues of *Piper capense* L., *Piper guineense* Schum. et Thonn., *Piper nigrum* L. and *Piper umbellatum* L. grown in Cameroon. *Afr. j. biotechnol.* 8, 424-431. <https://doi.org/10.4314/ajb.v8i3.59831>.
- Terra, W.R., Ferreira C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109B: 1-62. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)90141-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)90141-4).
- Terra, W. R., Ferreira, C., 2005. Biochemistry of digestion. In: GILBERT, L. I., IATROV, K., GILL, S. (Org.). *Comprehensive Molecular Insect Science*, v. 4, p. 171-224.
- Tripathi, A. K., 2018. Pests of stored grains. 311-359. In: Omkar (eds) *Pests and Their Management*. Springer, Singapore.
- Xie, Y.S., Bodnaryk, R.P., Fields, P.G., 1996. A rapid and simple flour-disk bioassay for testing substances active against stored-product insects. *Can. Entomol.* 128, 865-875. <https://doi.org/10.4039/Ent128865-5>.
- Ya-Ali, P., Yarahmadi, F., Mehrnia, M. A., 2020. Efficacies of Two Nano-Formulations of Tasmanian Blue Gum Essential Oil to Control *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Economic Entomology*. 113, 1555–1562. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa069>.

4. ARTIGO 2

BIOATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrciaria floribunda* (Myrtaceae) NO CONTROLE DE *Sitophilus zeamais* MOTS. (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

Wevertton Marllon Anselmo¹, Júlio César Ribeiro De Oliveira Farias De Aguiar¹, Camila Soledade de Lira Pimentel¹, Ana Patrícia Silva de Oliveira², Thiago Henrique Napoleão², Patrícia Maria Guedes Paiva², Patryck Émerson Monteiro dos Santos², Eurico Eduardo Pinto de Lemos³, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro¹

¹Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-540, Recife, Pernambuco, Brasil

²Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

³Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA/UFAL), Maceió, Alagoas, Brasil

RESUMO

Myrciaria floribunda (H.West ex Willd.) O. Berg é conhecida popularmente como Cambuí. Seu óleo essencial (OE) tem ação bactericida e inseticida. O *Sitophilus zeamais* configura-se como uma das importantes pragas de milho armazenado. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade inseticida do OE de *M. floribunda* contra o *S. zeamais*. Foram analisadas a composição química, toxicidade por fumigação, de contato, por ingestão e avaliação do efeito do OE na atividade das enzimas amilase, tripsina e acetilcolinesterase in vitro. A análise da composição do óleo revelou a presença de (E)-Caryophyllene (56,41%); Viridiflorol (4,02%), α – Selinene (3,85%), 1,8 Cineole (3,53%) e α -Humulene (2,26%), como os compostos majoritários. O OE mostrou toxicidade por fumigação, com a CL₅₀ 3,2 μ L/L de ar. O OE alterou a alimentação do inseto reduzindo a taxa de crescimento e a eficiência na conversão de alimento ingerido a partir de 62,5 μ L/g por peso de inseto. No entanto, não houve mortalidade para o teste de contato. Nesse estudo, o OE de *M. floribunda* não alterou a atividade da enzima tripsina, no entanto, foi verificado um aumento da atividade da enzima amilase e da enzima acetilcolinesterase (AChE). Assim sendo, o OE de *M. floribunda* pode servir como alternativa no controle de *S. zeamais*.

Palavras Chave: *Myrciaria floribunda*, *Sitophilus zeamais*, fumigação, amilase, acetilcolinesterase, bioinseticida.

1. INTRODUÇÃO

O milho, *Zea mays* (L.) é uma importante cultura alimentar em países tropicais, especialmente o Brasil, é o cereal mais amplamente cultivado na produção global de

cereais, e sua produção de milho ocupa lugar de destaque .A produção brasileira de grãos teve um alcance de 229,75 milhões de toneladas entre 2020 e 2021, sendo a produção de 104,9 milhões de toneladas do milho (CONAB, 2020).

Os insetos-praga são os principais responsáveis no setor de armazenamento por perdas de grãos e para preveni-las se faz uso de inseticidas fumigantes, que apesar de eficientes, podem provocar efeitos colaterais, como a toxicidade aos aplicadores, presença de resíduos nos grãos e a possibilidade da seleção de populações de pragas resistentes (NWOSU et al., 2015). No entanto, esses produtos têm levado ao seu uso indiscriminado, causando resistência nos insetos-praga e aumentando a quantidade de resíduos nos alimentos (NWOSU, 2018).

Os insetos causam diminuição do valor nutricional, desvalorização do produto, diminuição do grau de higiene, redução de massa, além de promoverem o aquecimento da massa de grãos no local da infestação. Esse quadro contribui para aumento da atividade respiratória da massa de grãos, proporcionando maior consumo de matéria seca e, conseqüentemente, rápida deterioração do produto (FARONI, 1992).

Dentre os insetos-praga do milho destaca-se o *S. zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae). Esse inseto é uma potente praga do setor de grãos armazenados de regiões neotropicais, apresentando elevado potencial de ataque aos grãos, tanto no campo quanto no armazenamento, causando perdas em torno de 10% (FARONI 1992; (SCHÖLLER et al.,1997);SILVEIRA et al., 2006).

A utilização de plantas com ação inseticida tem sido considerada uma alternativa promissora no manejo integrado de pragas, pois muitas espécies de vegetais são ricas em compostos secundários que apresentam essa atividade tanto no campo quanto no armazenamento(ROCHA et at., 2015). Compostos bioativos obtidos de plantas, podem ser utilizados de forma alternativa, principalmente ao fumigante fosfina, substância largamente utilizada no mundo, mas que já não apresenta uma ação satisfatória devido a ocorrência de resistência nos insetos de diversas pragas de grãos armazenados (PIMENTEL et al., 2008).

Os OEs são misturas de compostos voláteis bioativos oriundos de vegetais e, têm sido um dos pontos de destaque dos inseticidas botânicos devido à sua segurança para organismos não visados e resistência de baixo nível (MARRONE, 2019). Sua composição consiste em uma gama de substâncias, dentre elas os terpenóides que

apresentam atividade inseticida de um abundante espectro de pragas de grãos (HUANG et al., 2019)

O gênero *Myrciaria* é o maior gênero exclusivamente neotropical da família das plantas Myrtaceae, com um pouco mais de 140 gêneros e 4.630 espécies (SOBRAL et al., 2013). *M. floribunda* (H.West ex Willd.) O. Berg tem ampla distribuição no Brasil, podendo ser encontrada nos estados do Norte, Nordeste (Alagoas, Bahia e Pernambuco), Centro-Oeste, Sudeste e Sul (FLORA DO BRASIL, 2016). Essa espécie é popularmente conhecida como Cambuí, Cambuim, Cambiuva, Cambuí-amarelo, Cambuí-Vermelho e Murta (LEMOS et al., 2018). O OE das folhas dessa espécie apresenta atividade inseticida para ninfas de *Rhodnius prolixus*, *Oncopeltus fasciatus* e *Dysdercus peruvianus* com efeito tóxico de contato (THIEBOLT et al., 2012; THIEBOLT et al., 2014).

Tem-se como objetivo neste trabalho, avaliar a atividade inseticida do óleo essencial de folhas de *M. floribunda* no controle de *S. zeamais*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal e Extração do Óleo Essencial

Folhas de *Myrciaria floribunda* (West ex Willd.) O. Berg foram coletadas do Banco Ativo de Germoplasma de Cambuizeiro (BAG – Cambuí), localizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA/UFAL), em Rio Largo – Alagoas (latitude 9° 29' 45" S, longitude 35° 49' 54" W) durante os meses de Julho e Setembro de 2019 e levadas ao Laboratório de Química fundamental da Universidade Federal de Pernambuco para extração do óleo essencial e bioatividade.

Para extração do óleo essencial, folhas frescas (1100 g) de *M. floribunda* (Figura 1) foram trituradas e submetidas à técnica de hidrodestilação por 3h. O óleo essencial foi coletado através de um aparelho tipo Clevenger modificado. O óleo foi separado da água, secos com Na₂SO₄ e armazenados em recipientes selados à 4°C de temperatura. O rendimento dos óleos foi calculado com base no peso do material fresco. O acesso da planta foi cadastrado no Sisgen com número A668DC0.

2.2 Análise da Composição Química do Óleo Essencial

A análise dos constituintes voláteis do óleo essencial (quantitativa e qualitativa) foi realizada em CG/EM (Agilent 5975C Series) e GC (Thermo Trace Ultra) segundo

as condições experimentais descritas por Bezerra-Silva et al. (2016) e Da Silva et al. (2015).

A identificação dos compostos foi feita por meio da análise dos espectros de massa de cada pico cromatográfico, comparação com padrões autênticos e cálculo de índices de retenção. Para o cálculo dos índices de retenção linear dos componentes do óleo foi utilizado os tempos de retenção de cada composto e os tempos de retenção de n- alcanos (C9 a C25) analisados sob as mesmas condições.

Os valores calculados foram comparados com os índices de retenção publicados na literatura a partir de comparação de seus espectros de massa e tempos de retenção àqueles de padrões disponíveis em bibliotecas de referência NIST08 e Wiley Registry™ 9th Edition, integradas ao software Agilent MSD Productivity ChemStation (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA).

2.3 Ensaio Inseticida

2.3.1 Insetos

Uma colônia de *S. zeamais* foi criada no Laboratório de Ecologia Química, do Departamento de Química fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, em recipiente (1,5 L de capacidade) coberto com tecido voil e mantido a 28 ± 2 °C, fotoperíodo de 12:12h (L:D), e 70% de umidade relativa. Machos e fêmeas (30 – 60 dias de idade) foram usados no ensaio. Os insetos foram alimentados com grãos de milho não transgênico (150g por recipiente).

2.3.2 Avaliação da Toxicidade por Contato do Óleo essencial

Para avaliar a toxicidade por contato do óleo essencial de *M. floribunda*, foi usado o método descrito por Lira et al. (2015). Inicialmente, soluções de óleo de *M. floribunda* foram preparadas em 1% (v/v) Tween 80. Nesse bioensaio foram utilizadas as concentrações 20, 83,3 e 166,6 µg/g de inseto. Em seguida, uma alíquota de 0,5 µL dessas soluções foi aplicada na superfície dorsal da região torácica dos insetos usando uma micropipeta. Os insetos no grupo controle negativo foram tratados com 0,5 µL de Tween 80 a 1% (v / v). Vinte insetos foram utilizados em cada ensaio e mantidos em recipientes de plástico (4,0 cm de largura e 6,0 cm de comprimento). Os recipientes de plástico foram mantidos por 7 dias no escuro a 28 ± 2 °C. A taxa de mortalidade foi registrada após 7 dias. Os testes foram realizados cinco vezes.

2.3.3 Avaliação da Toxicidade Fumigante do Óleo essencial

O bioensaio de toxicidade fumigante foi realizado de acordo com o método proposto por Chu et al. (2010). O ensaio utilizou recipientes plásticos com formato cilíndrico (diâmetro: 4 cm, altura: 5 cm e volume: 74 ml), cujas tampas foram cobertas com papel filtro. O papel de filtro foi previamente embebido em 20 µL do óleo diluído em etanol, utilizando doses de 2,7; 4; 5,4; 6,7 e 8 µL/L de ar. No tratamento de controle, o papel do filtro foi embebido apenas em etanol. Após 30 segundos, 20 insetos de *S. zeamais* foram colocados em cada recipiente e as tampas foram bem fechadas para formar uma câmara selada. Após 24 horas de exposição, os insetos foram transferidos para recipientes com ar ambiente, e a taxa de mortalidade foi registrada após 7 dias. Cada ensaio teve quatro repetições.

2.3.4 Avaliação da toxicidade por ingestão do óleo essencial

Para este bioensaio, uma dieta artificial foi preparada para os insetos (Lira et al., 2015) usando farinha de trigo autoclavada (2,0g; Dona Benta®, Bunge Alimentos S.A., Benevides, PA, Brasil) em uma solução de óleo de 5 mL (em 1% Tween 80). As concentrações utilizadas neste teste foram 62,5; 125; 250; 500 e 1000 µL/g (µL de óleo puro/g de farinha de trigo). No tratamento controle, a dieta foi preparada com 5 mL de uma solução composta por 1% de Tween 80, etanol e farinha de trigo autoclavada. Posteriormente, cinco alíquotas (200 µL) dos tratamentos de suspensão ou controle, que foram medidos com uma micropipeta equipada com uma ponta descartável cortada na extremidade estreita (2 mm de diâmetro interno), foram adicionadas em placas de Petri com peso conhecido (90 mm x 100 mm) para a formação do disco. As placas contendo os discos de farinha foram deixados na incubadora (37°C) durante 24 horas para secar. Após esse período, o peso da placa foi determinado novamente e a massa dos discos foi calculada. Vinte adultos de *S. zeamais* com peso conhecido foram então transferidos para cada placa. Cada ensaio teve quatro repetições. Após 7 dias (28 ± 2°C no escuro), foram registradas a taxa de mortalidade e os pesos de discos e insetos quebrados. A dieta controle consistia em farinha de trigo suspensa em etanol.

Os índices de deterrência alimentar (IDA) e nutricionais foram determinados usando os resultados de toxicidade obtidos por ensaios de ingestão. O índice de deterrência alimentar (IDA) foi calculado pela fórmula $IDA (\%) = 100 \times (C - T)/C$, de acordo com Isman et al. (1990), onde C e T representam o consumo da dieta nos

grupos controle e tratamento, respectivamente. Com base nesses valores, as dietas incluindo óleo foram classificadas de acordo com Liu et al. (2007) da seguinte forma: nenhuma restrição alimentar ($IDA < 20\%$), fraca ($50\% > IDA \geq 20\%$), moderada ($70\% > IDA \geq 50\%$) ou forte ($IDA \geq 70\%$) impedimento alimentar.

A taxa de consumo relativo foi calculada como $(TCR) = (\text{mg de biomassa ingerida}) / (\text{mg de biomassa inicial de inseto} \times \text{dias})$. A taxa relativa de ganho de biomassa foi calculada como $(TBG) = (\text{mg de biomassa adquirida}) / (\text{mg de biomassa inicial de inseto} \times \text{dia})$. Em seguida, a eficiência da conversão alimentar foi calculada como $(IEC) (\%) = 100 \times (\text{biomassa adquirida}) / (\text{alimento ingerido})$. Todos esses parâmetros nutricionais foram calculados de acordo com Xie et al. (1996).

2.3.5 Preparação dos Extratos do Intestino de Adultos de *S. zeamais*

Extratos intestinais de adultos de *S. zeamais* foram preparados como descrito por Napoleão et al. (2013). Os adultos foram removidos da colônia e imobilizados por resfriamento a 4°C por 10 min. Em seguida, o intestino dos insetos foram dissecadas usando uma agulha, puxando a extremidade do abdome após a remoção do elytra. Os intestinos dissecados foram mantidos em um banho de gelo. Em seguida, 50 intestinos foram homogeneizados com 1 mL de uma solução tampão (acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5 ou Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, ambos contendo cloreto de cálcio 0,02 M) usando um moedor de tecidos. Os homogenatos foram centrifugados (9000g por 15 min a 4°C) e o sobrenadante correspondeu aos extratos intestinais (preparações enzimáticas). A concentração de proteína nos extratos intestinais foi determinada usando o método descrito por Lowry et al. (1951).

2.3.5.1 Determinação dos efeitos do Óleo Essencial na Atividade de Enzimas Digestivas e da atividade da Acetilcolinesterase

O efeito do óleo sobre as atividades das enzimas digestivas dos extratos intestinais de *S. zeamais* foi avaliado incubando os extratos com o óleo a 28°C por 30 min antes da avaliação da atividade enzimática. Os ensaios foram realizados em quintuplicado. A atividade de α -amilase foi determinada de acordo com o método descrito por Bernfeld (1955). O extrato de intestino em tampão acetato (15 μL , 52,5 μg de proteína) foi incubado por 30 minutos com 15 μL do óleo nas concentrações de 0,9; 1,8; 3,7; 7,5; 15 e 30 ppm e tampão acetato como controle. A seguir, as amostras foram incubadas a 50°C por 10 minutos com 400 μL de uma solução de amido solúvel

a 1% (p/v) em acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 contendo CaCl_2 0,02M e NaCl 0,15M. A reação foi interrompida para adição de 500 μL de ácido dinitrosalicílico (DNS). Em seguida, os ensaios foram aquecidos em água fervente a 100 °C por 6 min e imediatamente resfriados em gelo por 15 min. A absorbância a 540 nm foi determinada. A quantidade de açúcares redutores foi determinada utilizando-se uma curva padrão da reação de diferentes concentrações de glicose ($y = 0,7216x + 0,0216$, onde x é a concentração de glicose em μM e y é a absorvância) com DNS. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para gerar 1 μmol de glicose por minuto. O branco da reação foi realizado na ausência de amido.

A atividade de tripsina foi determinada pela incubação (30 min, 37°C) do extrato de intestino em tampão Tris (15 μL , 200 μg de proteína) tratado com o OE nas concentrações de 0,9;1,8;3,7;7,5; 15 e 30 ppm e N-benzoil- DL-arginil-p-nitroanilida (BAPNA) 8 mM (5 μL) em Tris-HCl 0,1 M pH 8,0. Para o controle foi utilizado tampão Tris. A atividade da tripsina foi determinada pela medida de absorbância a 405 nm foi determinada (KAKADE *et al.*, 1969). Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de BAPNA por minuto. Controle da hidrólise do substrato foi efetuado por incubação (60 min, 37°C) de tripsina bovina (5 μg) com BAPNA 8 mM (5 μL).

A atividade de acetilcolinesterase (AChE) foi determinada incubando-se 10 μL do extrato de insetos (72 μg de proteína) nas concentrações 0,9;1,8;3,7;7,5; 15 e 30 ppm com 20 μL de acetiltiocolina 0,052 M e 200 μL de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico 0,25 mM (DTNB) durante 3min a 25°C. Após este período, a liberação de tiocolina foi monitorada por determinação da absorbância a 405nm. Uma unidade de atividade de AChE foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de acetiltiocolina por minuto (ELLMAN *et al.*, 1961).

2.4 Análise estatística

Os dados foram expressos como uma média $\pm$ erros padrão, que foram calculados usando o Software GraphPad Prism versão 8.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) (significância em $p < 0,05$) e testes intervalo múltiplo de Tukey para identificar diferenças significativas na comparação das médias, usando o Software Origin (OriginLab, Northampton, Massachusetts, EUA). A Concentração letal (LC_{50}) e

seus limites de confiança foram determinados por análise Probit, e os dados foram analisados por determinação de valores de qui-quadrado e graus de liberdade usando o StatPlus Pro 6.2.5.0.

3. RESULTADOS

A utilização de inseticidas botânicos, no manejo de pragas de produtos armazenados, vem sendo uma alternativa aos tradicionais inseticidas sintéticos. No presente estudo, foi avaliado o óleo essencial das folhas de *M. floribunda* como agente inseticida contra *S. zeamais*.

3.1 Composição Química do Óleo Essencial de *M. floribunda*

O rendimento de EO obtido pela hidrodestilação das folhas de *M. floribunda* foi obtido 0,43% (p/p) e um total de 5,3026 g foi extraído. A análise por GC-MS revelou 42 compostos voláteis, sendo os sesquiterpenos o grupo principal no óleo essencial das folhas (73,8%). As principais substâncias químicas identificadas no óleo essencial foram: E-Caryophyllene (56,41%); Viridiflorol (4,02%), α – Selinene (3,85%), 1,8 Cineole (3,53%) e α -Humulene (2,26%). Os constituintes e quantidades relativas do óleo essencial estão indicados na Tabela 1.

Tabela 1 – Abundância relativa (%) dos constituintes do OE de *M. floribunda*

Composto a	Índice de Retenção		%	S.D.
	Calculado ^b	Literatura ^c		
α -pineno	932	931	0,80	0,07
β -pineno	9,74	968	1,01	0,08
Myrceno	988	991	0,08	0,01
α -phelandreno	1002	1003	0,35	0,04
α -terpineno	1014	1015	0,03	0,01
p -cymeno	1020	1023	0,02	0,01
Limoneno	1024	1027	1,06	0,09
1,8-cineol	1026	1029	3,53	0,35
γ -terpineno	1054	1058	0,18	0,02
linalol	1095	1100	0,27	0,02
bornil acetato	1284	1287	0,05	0,01
α -cubebeno	1348	1351	0,50	0,04
α -ylangeno	1373	1373	0,43	0,07
α -copaeno	1374	1377	1,37	0,19
sativeno	1390	1391	0,12	0,03
α -gurjuneno	1409	1411	0,77	0,03
(E)-cariofileno	1417	1422	56,41	2,41
β -gurjuneno	1431	1431	1,96	0,28
γ -elemeno	1432	1435	0,54	0,09
Aromadendreno	1439	1441	0,79	0,12
α -humuleno	1452	1455	2,26	0,06
alo-aromadendreno	1458	1463	1,24	0,03
(E)-etil cinamato	1465	1468	0,10	0,01
trans-cadina-1(6),4-dieno	1475	1475	0,51	0,04
γ -muuroleno	1478	1478	0,53	0,02
α -amorfenos	1484	1482	0,11	0,01
β -selineno	1489	1488	1,43	0,22
α -selineno	1498	1497	3,85	0,53
α -muuroleno	1500	1502	1,88	0,15

δ -amorfenos	1511	1509	2,23	0,03
γ -cadineno	1513	1516	1,46	0,02
δ -cadineno	1522	1526	2,09	0,03
α -cadineno	1537	1534	0,32	0,04
α -calacoreno	1545	1545	0,35	0,02
germacreno B	1559	1559	0,43	0,04
Palustrol	1567	1570	0,32	0,05
Globulol	1590	1587	0,73	0,10
viridiflorol	1592	1595	4,02	0,29
ledol	1602	1605	0,67	0,02
α -muurolol	1644	1644	1,76	0,07
β -eudesmol	1649	1653	0,32	0,06
α -cadinol	1652	1658	1,35	0,08
Total de identificados			98,25	

^a Constituintes listados em ordem de eluição em uma coluna DB-5 não- polar.

^b Índice de retenção (RI) calculado pelo tempo de retenção em relação à de uma série de alcanos C9-C30n em uma coluna capilar DB-5 de 30 m. ^c Valores obtidos de Adams (2009).

3.2.2 Avaliação da Toxicidade Fumigante

O ensaio de toxicidade fumigante mostrou que o óleo essencial de *M. floribunda* elevou as taxas de mortalidade de insetos. A análise estatística mostrou que todas as concentrações foram significativamente diferentes em relação ao controle, exceto a concentração de 2.7 $\mu\text{L/L}$ de ar (Figura 1).

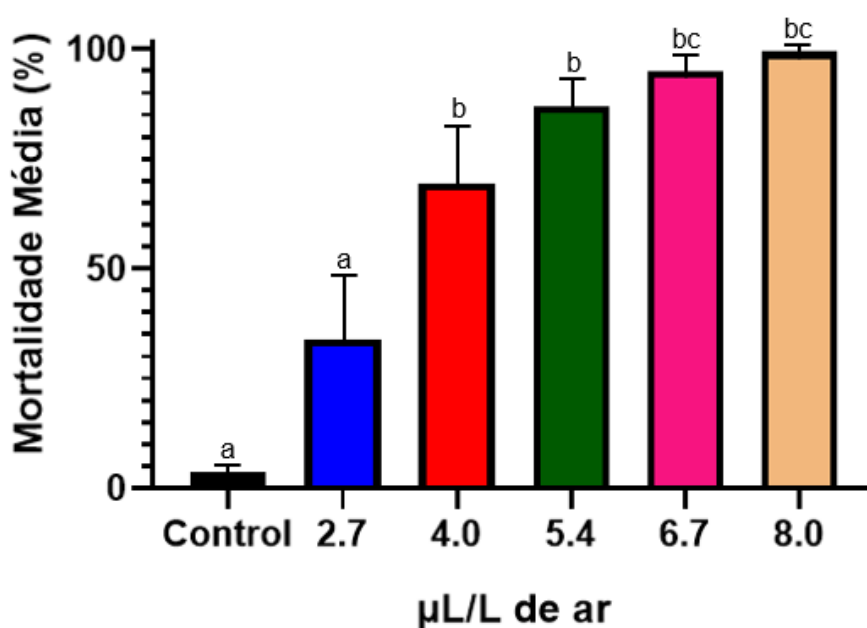
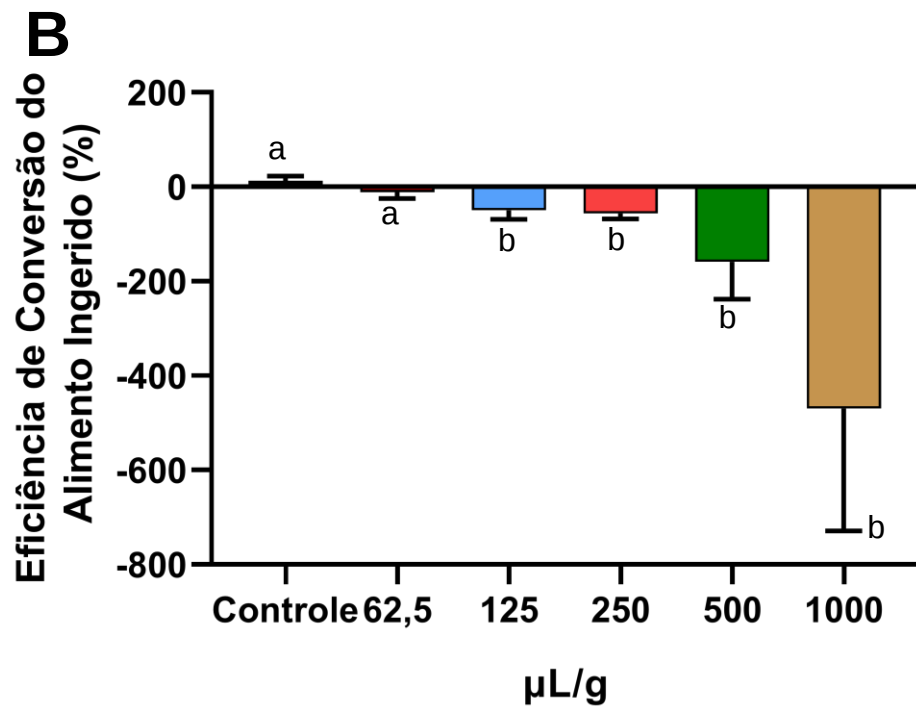
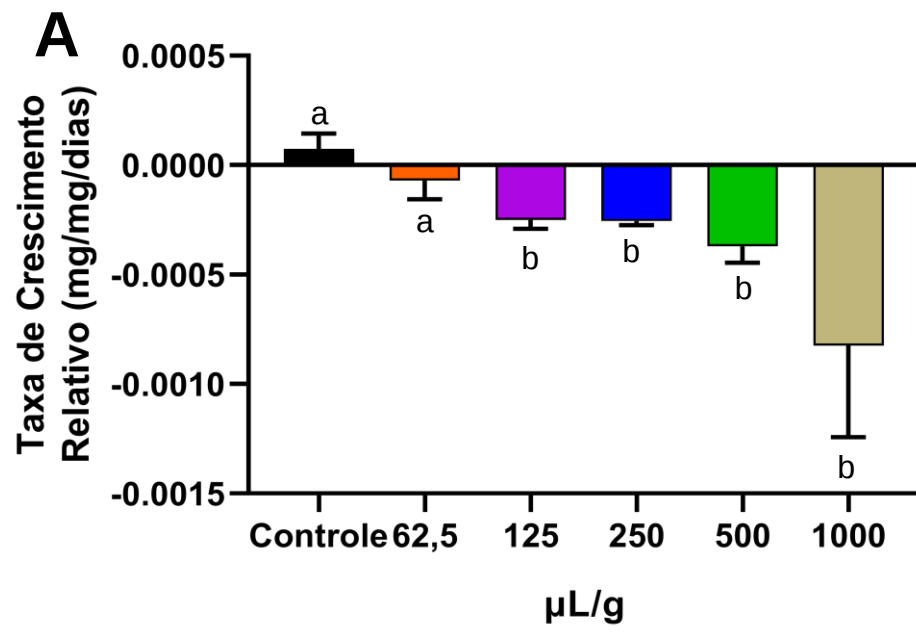


Figura 1 – Toxicidade de *Sitophilus zeamais* exposto ao OE de *M. floribunda* usando o bioensaio de fumigação

3.2.3 Avaliação da Toxicidade por Ingestão

Observou-se que a presença de óleo de *M. floribunda* na dieta interferiu na nutrição dos insetos. O OE levou a uma perda de biomassa (Fig. 2A) em decorrência de uma ineficiência na conversão de alimentos ingeridos (Fig. 2B). As taxas de consumo relativo (Fig. 2C) foram significativamente diferentes do controle nas concentrações de 500 e 1.000 µL/g. De acordo com o teste de toxicidade por ingestão, o OE induziu significativamente ($p > 0,05$) a mortalidade de *S. zeamais* nos tratamentos a partir da concentração 500 µL/g, em comparação com o controle usando etanol (Figura 3). Esses resultados indicam que a morte de insetos está ligada à ingestão de algum(s) componente(s) presente no óleo essencial.



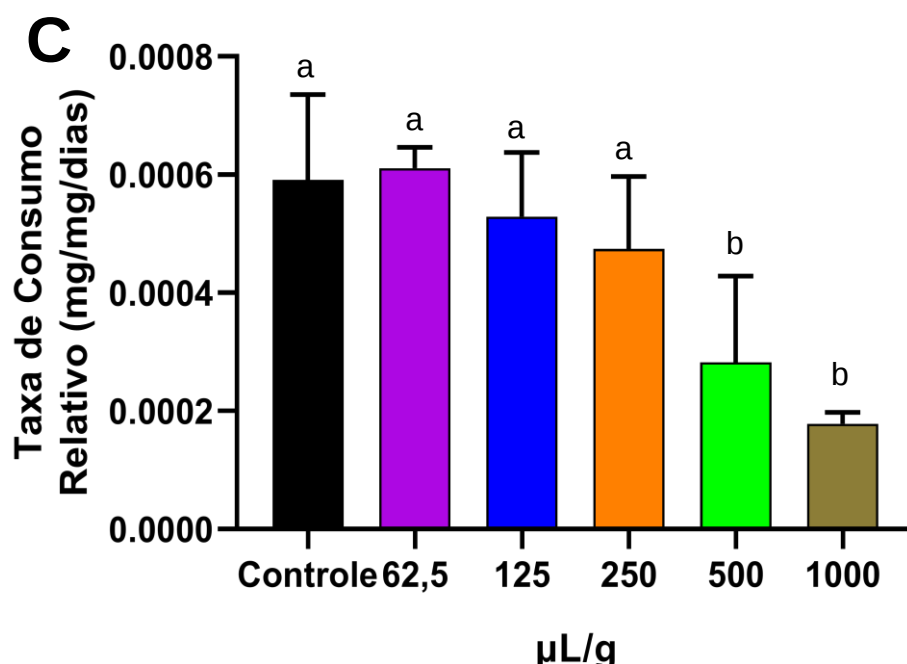


Figura 2 – Indicadores nutricionais de adultos de *S. zeamais* criados em dietas artificiais contendo etanol (controle) ou solução etanólica de óleo essencial de *M. floribunda* (µL de óleo puro/g de farinha de trigo). (A) A taxa relativa de ganho de biomassa indica a biomassa (mg) obtida diariamente por mg de peso corporal inicial. (B) A eficiência na conversão de alimentos ingeridos (%) indica a quantidade de alimentos ingeridos convertidos em biomassa pelos insetos. (C) A taxa de consumo relativo indica a quantidade de alimento consumido (mg) por mg de peso corporal por dia. Cada barra corresponde à média $\pm$ DP de três repetições.

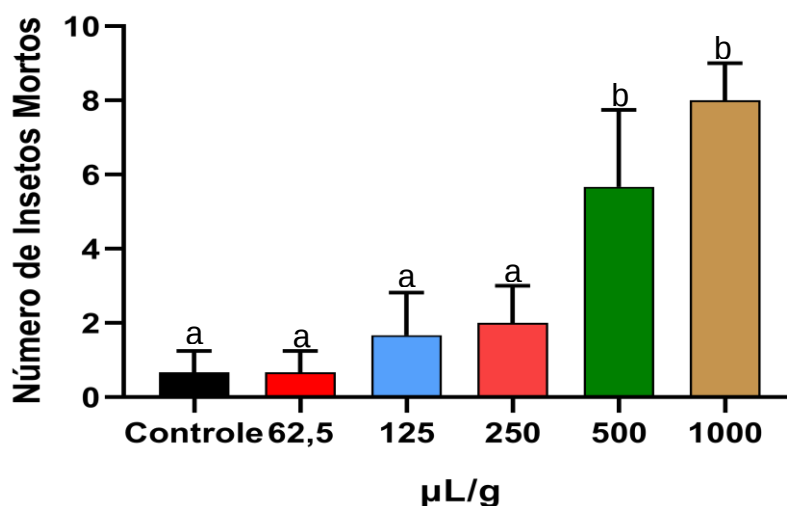
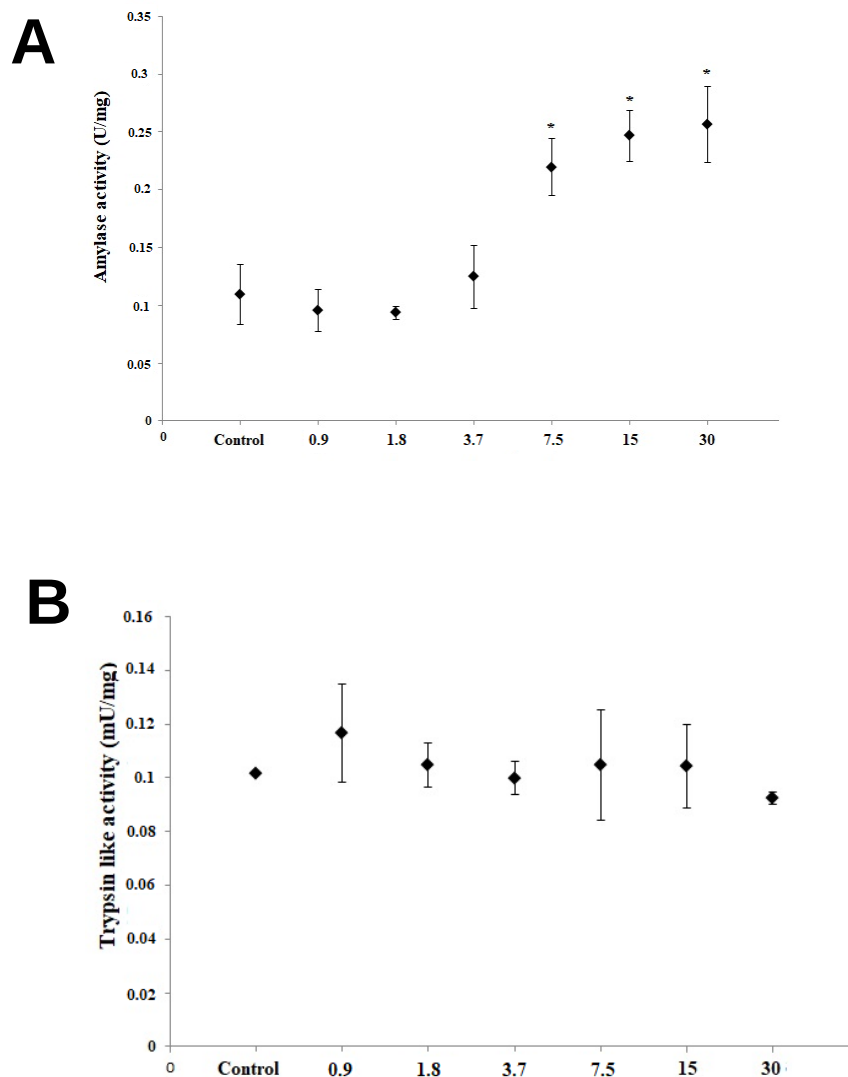


Figura 3 – Mortalidade de *S. zeamais* de adultos de *S. zeamais* criados em dietas artificiais contendo etanol (controle) ou solução etanólica de óleo essencial de *P. umbellata* (µL de óleo puro/g de farinha de trigo). Cada barra corresponde à média $\pm$ DP de três repetições.

3.2.4 Determinação dos Efeitos do OE de *M. floribunda* na Atividade de Enzimas Digestivas e Acetilcolinesterase

Em relação à atividade das enzimas digestivas, o OE de *M. floribunda* modulou a atividade das enzimas intestinais dos insetos. O OE aumentou a atividade de amilase do extrato de intestino de *S. zeamais* nas maiores concentrações (Fig. 4A). Quanto à enzima tripsina, nenhuma concentração testada alterou sua atividade (Fig. 4B). O teste realizado para acetilcolinesterase (AChE) indicou que o OE das folhas foi capaz de aumentar a atividade da acetilcolinesterase do extrato de intestino de adultos de *S. zeamais* em todas as concentrações testadas (Fig. 4C).



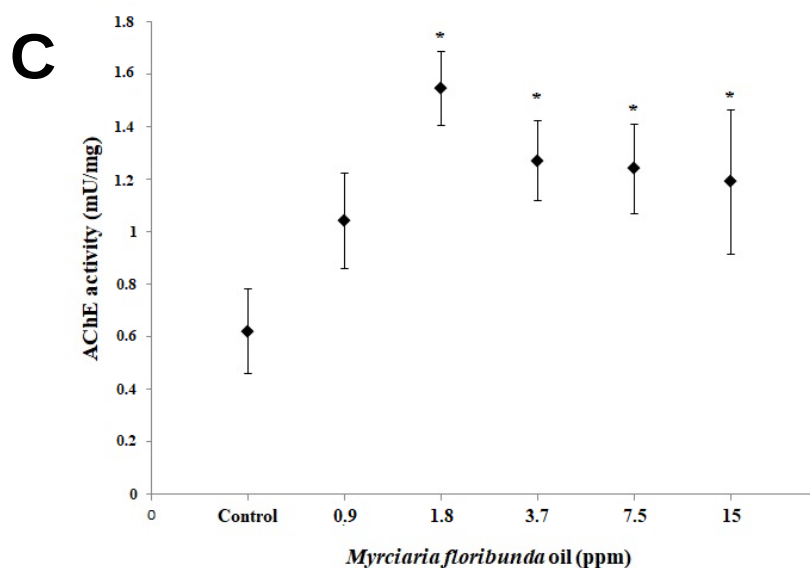


Figura 4 – Efeitos do OE de *M. floribunda* na Atividade de Enzimas Digestivas (4A – amilase, 4B – Tripsina) e Acetilcolinesterase (4C).

4. DISCUSSÃO

Em nosso trabalho, o (E)-Caryophyllene foi o componente majoritário do OE de *M. floribunda*. No entanto, no trabalho de Ramos et al. (2010) o (E) – nerolidol foi o componente mais abundante (32,4%) no OE obtido das folhas de *M. floribunda* e 1,8-cineol correspondeu a 5,8% do óleo, este valor foi próximo do encontrado no nosso trabalho. Já Tietbohl et al. (2012) obtiveram 38,4% de 1,8-cineol da composição total do OE obtido das folhas de *M. floribunda*, sendo então o composto majoritário no óleo. É importante ressaltar que o 1,8-cineol é o componente majoritário na maioria dos trabalhos com o gênero *Myrciaria*. Entretanto, em muitos outros trabalhos de plantas do gênero *Myrciaria*, é possível observar a presença de (E)-Caryophyllene como um dos majoritários. No trabalho de Limberger et al. (2004) com *M. ricardiana* e *M. hatschbachii*, os autores mostraram que o β -caryophyllene foi o componente majoritário na composição do óleo com porcentagens de 20,6% e 23,3%, respectivamente. Cerqueira et al. (2009) verificaram no OE das folhas de *M. salzmannii* que a porcentagem de β -caryophyllene tinha variações de 10,3 a 13,2%. Pereira-Junior (2018) mostrou que o (E)-Caryophyllene foi o componente majoritário do OE das folhas das seguintes espécies: *M. fenestrata* (20,57%), *M. amapensis* (73,12%), *M. caudata* (14,83%) e *M. sylvatica* (45,88%).

Ao analisar a ação do OE por ingestão dos insetos, observou-se que os insetos apresentaram menor ganho de peso, ou seja, um crescimento negativo. Esse crescimento pode indicar uma dificuldade em adultos de *S. zeamais* em incorporar os nutrientes, podendo ter metabolizado suas próprias reservas, levando a uma perda de biomassa por conta da eficiência negativa na conversão de alimento.

Quando ingerido, o OE das folhas de *M. floribunda* causou uma maior mortalidade em *S. zeamays* nas maiores concentrações. Esses resultados indicam um potencial do OE de *M. floribunda* no controle de *S. zeamais*, sugerindo que as propriedades antinutricionais e as taxas de mortalidade observadas neste estudo estão possivelmente relacionadas aos efeitos pós-ingestão causados pelos compostos do óleo.

Trabalhos com OEs de *Alpinia purpurata* (Lira et al., 2015) e *Croton rudolphianus* (RIBEIRO, et al., 2020) foram avaliados para toxicidade por ingestão em *S. zeamays* e revelaram uma alteração da taxa de ganho de biomassa e na eficiência na conversão dos alimentos ingeridos, entretanto, sem promover diferença significativa na mortalidade dos insetos em 7 dias. Dessa forma, os efeitos antinutricionais encontrados neste estudo podem ser úteis nas tentativas de controle de *S. zeamays*, uma praga muito destrutiva, devido à velocidade com que consome os grãos.

O OE de *M. floribunda* mostrou efeito estimulador da atividade da α -amilase nas maiores concentrações. Esse efeito pode ser, em parte, consequência da interferência da ação do OE na atividade dessa enzima, resultando em inanição. Atoui et al., (2005) utilizando OE de folhas de *Pelargonium graveolens*, no entanto, verificaram que a atividade da α -amilase teve sua atividade inibida. Nesse contexto, Rahali et al. (2017) e Ustun et al. (2012) demonstraram que alguns monoterpenos exibem atividades inibitórias da α -amilase. Estes resultados do nosso trabalho, indicam que o aumento da atividade da α -amilase pode ser relacionado à presença de alguns compostos no óleo essencial (SHOBANA et al., 2009). No presente estudo, não foi obtido mudança no efeito do OE *M. floribunda* na atividade da tripsina. Além disso, não há relato publicado sobre o efeito do OE de *M. floribunda* na atividade de α -amilase em *S. zeamays*.

No presente estudo, foi verificado um aumento da atividade da enzima AChE. Esse resultado contrapõe-se a maioria dos trabalhos, visto que a maioria dos estudos verifica uma inibição da atividade dessa enzima. Nesse sentido, o OE pode

ter causado um efeito nerotóxico em decorrência do aumento da atividade da AChE, gerando assim mortalidade. Esse aumento da atividade da enzima AChE pode estar relacionada a alguns compostos do OE. Nesse contexto, evidências recentes sugerem que compostos como 1,8 cineol, β -pineno, β -caryophyllene e eugenol podem modular a atividade nervosa (Dohi et.al, 2009; CHAUBEY, 2016; RAHALI et.al., 2017) A maioria dos inseticidas ligam-se às proteínas receptoras dos insetos e interrompem a neurotransmissão normal levando a paralisia e morte (LEE et al.,2001; CHAUBEY, 2016).

5. CONCLUSÃO

Este estudo revela que o EO de *M. floribunda* apresentara atividade inseticida contra *S. zeamays*. Nesse sentido, o OE de *M. floribunda* tem potencial para ser usado no controle de *S. zeamays*, por ser tóxico para insetos adultos via fumigação, por exercer efeitos antinutricionais quando ingerido, e por alterar a atividade das enzimas α -amilase e AChE. O efeito inseticida provavelmente pode ser atribuído à atividade de alguns compostos presentes no OE. Assim sendo, o OE de *M. floribunda* têm potencial para ser desenvolvido em pesticidas botânicos para gerenciar pragas de grãos.

6. REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. Identification of essential oils by gas chromatography/mass spectroscopy. Carol Stream: Allured Pub. Co., USA., 469 p., 2009.
- ATOUI, A.K. et. al. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. Food Chemistry V.89 p.27-36, 2005.
- BERNFELD, P., 1955. Amylases, α and β . Methods Enzymology. 1, 149–158.
- BEZERRA-SILVA, P. C., DUTRA, KAMILA. A., SANTOS, GEANNE. K. N., SILVA, RAYANE. C. SILVA., IULEK, JORGE., MILET-PINHEIRO, PAULO; NAVARRO, DANIELA MARIA DO AMARAL FERRAZ. 2016. Evaluation of the Activity of the Essential Oil from an Ornamental Flower against *Aedes aegypti*: Electrophysiology, Molecular Dynamics and Behavioral Assays. PLOS ONE, 11(2).
- CERQUEIRA, M.D.; MARQUES, E.J.; MARTINS, D.; ROQUE, N.F.; CRUZ, F.G. 2009. Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg (Myrtaceae) (Seasonal variation of the chemical composition of the essential oil of *Myrcia salzmannii* Berg (Myrtaceae)). Quím. Nova, 32, 1544–1548.
- CHAUBEY, M.K., 2016. Insecticidal activities of *Cinnamomum tamala* (Lauraceae) essential oil against *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae). Int. J. Entomol. Res. 04, 91–98.
- CHU, S.S., LIU, Q.R., LIU, Z.L., 2010. Insecticidal activity and chemical composition the essential oil of *Artemisia vestita* from China against *Sitophilus zeamais*. Biochemical Systematics and Ecology. 38, 489-492.
- CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). 2020. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 5– Safra 2020, n. 5- Segundo levantamento, Brasília, p. 1-75.
- DA SILVA, RAYANE CRISTINE SANTOS; PINHEIRO, PAULO MILET; DA SILVA, PATRÍCIA CRISTINA BEZERRA; DA SILVA, ALEXANDRE GOMES; DA SILVA, MARCIA VANUSA; FERRAZ, DANIELA MARIA DO AMARAL; DA SILVA, NICÁCIO HENRIQUE. 2015. (E)-Caryophyllene and α -Humulene: *Aedes aegypti* Oviposition Deterrents Elucidated by Gas Chromatography-Electrophysiological Assay of *Commiphora leptophloeos* Leaf Oil. PLOS ONE, 10(12).
- DOHI, S., TERASAKI, M., & MAKINO, M. 2009. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity and Chemical Composition of Commercial Essential Oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(10), 4313–4318.
- ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology., v. 7, p. 88-95, 1961.

FARONI, L.R.D'A. 1992. Manejo das pragas dos grãos armazenados e sua influência na qualidade do produto final. Revista Brasileira de Armazenamento, Viçosa, v.17, n.1, p. 36-42.

FLORA DO BRASIL. 2016. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 04 setembro de 2020.

Huang, H.-T., Lin, C.-C., Kuo, T.-C., Chen, S.-J., & Huang, R.-N. 2019. Phytochemical composition and larvicidal activity of essential oils from herbal plants. Planta, 250(1), 59–68.

ISMAN, M.B., KOUL, O., LUCZYNSKI, A., KAMINSKI, J., 1990. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 38, 1406-1411.

KAKADE, M.L., SIMONS, N., LIENER, I.E. An evaluation of natural vs synthetic substrates for measuring the antitryptic of soybean samples. Cereal Chemistry, Saint Paul, v.46, n.4, p.518-526, 1969.

LEE, BH; CHOI WS, LEE SE, PARK BS. 2001. Fumigant toxicity of essential oils and their constituent compounds towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). Crop. Prot. 20:317–320.

LEMO, EURICO EDUARDO PINTO, REZENDE, LEILA DE PAULA, RICHARDSON ARAÚJO, ROCHA, ALVES, RICARDO ELESBÃO. MYRCIARIA FLORIBUNDA. CORADIN, LIDIO; CAMILLO, JULCÉIA; PAREYN, FRANS GERMAIN CORNEEL (Ed.). Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Nordeste. Brasília, DF: MMA, 2018. (Série Biodiversidade;51).205216. Disponível:<[HTTP://www.mma.gov.br/publicacoes/biodiversidade/category/142-serie-biodiversidade.html](http://www.mma.gov.br/publicacoes/biodiversidade/category/142-serie-biodiversidade.html)>, Acesso em: 03 de outubro de 2019.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J. M. 2004. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. Química Nova, 27(6), 916–919.

LIRA, C.S., PONTUAL, E.V., ALBUQUERQUE, L.P., PAIVA, L.M., PAIVA, P.M.G., OLIVEIRA, J.V., NAPOLEÃO, T.H., NAVARRO, D.M.A.F., 2015. Evaluation of the toxicity of essential oil from *Alpinia purpurata* inflorescences to *Sitophilus zeamais* (maize weevil). Crop Protection. 71, 95–100.

LIU, Z.L., GOH, S.H., HO, S.H., 2007. Screening of Chinese medicinal herbs for bioactivity against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). Journal of Stored Products Research. 43, 290-296.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265–275.

MARRONE, P.G. Pesticidal natural products – status and future potential. *Pest Management Science*. 2019.

Napoleão et al. (2013).

NAPOLEÃO, T.H., BELMONTE, B.R., PONTUAL, E.V., ALBUQUERQUE, L.P., SA, R.A., PAIVA, L.M., COELHO, L.C.B.B., PAIVA, P.M.G., 2013. Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*. 54, 26 e 33.

NWOSU, Luke Chinaru; ADEDIRE, Chris Olukayode; OGUNWOLU, Emmanuel Oludele. Screening for new sources of resistance to *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) infestation in stored maize genotypes. *Journal of crop Protection, Tarbiat Modares University*, v. 4, n. 3, p. 277–290, 2015.

NWOSU, L. C. (2018). Maize and the maize weevil: advances and innovations in postharvest control of the pest. *Food Quality and Safety*, 2(3), 145–152.

PEREIRA JÚNIOR, R. C. Caracterização química e avaliação dos potenciais antimicrobiano, inseticida e citotóxico de óleos essenciais obtidos de *Myrcia* spp. (myrtaceae) ocorrentes em ecossistema de terra firme (Amazônia). 2018. 209 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018.

RAHALI, N., MEHDI, S., YOUNSI, F., BOUSSAID, M., MESSAOUD, C. 2017. Antioxidant, α -amylase, and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Hertia cheirifolia* essential oils: Influence of plant organs and seasonal variation. *International Journal of Food Properties*, 1–15.

RAMOS, MÔNICA FREIMAN DE S., MONTEIRO, SÉRGIO DA S., SILVA, VAGNER P., NAKAMURA, MARCOS J., SIANI, ANTONIO C. 2010. Essential Oils From Myrtaceae Species of the Brazilian Southeastern Maritime Forest (Restinga), *Journal of Essential Oil Research*, 22:2,109-113.

RIBEIRO, I. A. T. DE A., DA SILVA, R., DA SILVA, A., PINHEIRO, P. M., PAIVA, P. M. G., NAVARRO, D. M. DO A. F., DA SILVA, M. V., NAPOLEÃO, T. H., CORREIA, M. T. S., 2020. Chemical characterization and insecticidal effect against *Sitophilus zeamais* (maize weevil) of essential oil from *Croton rudolphianus* leaves. *Crop Protection*. 129.

SCHÖLLER, M., S. PROZELL, A.G. AL-KIRSHI & C. REICHMUTH. 1997. Towards biological control as a major component of integrated pest management in stored product protection. *J. Stored Prod. Res.* 33:81-97.

SHOBANA, S., SREERAMA, Y. N., & MALLESHI, N. G. 2009. Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of α -glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chemistry*, 115(4), 1268–1273.

SILVEIRA, R. D.; FARONI, L. R. D. A.; PIMENTAL, M. A. G.; ZOCOLO, G. J. Influência da temperatura do grão de milho, no momento da pulverização, e do período de armazenamento, na mortalidade de *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum*, pela mistura bifenthrin e pirimifós-metil. *Revista Brasileira de Armazenamento*, v.31, p.120-124, 2006.

SOBRAL, M., PROENÇA, C., SOUZA, M., MAZINE, F., LUCAS, E. 2013. Myrtaceae. In Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar>. Acesso em: 10 de dezembro de 2019.

TIETBOHL, L.A.C., LIMA, B.G., FERNANDES, C.P., SANTOS, M. G., SILVA, F.E.B., Denardin, BACHINSKI, E.L.G., R., ALVES, G.G., SILVA-FILHO, ROCHA, M.V., L. 2012. Comparative study and anticholinesterasic evaluation of essential oils from leaves, stems and flowers of *Myrciaria floribunda* (H.West ex Willd.) O. Berg. *Latin American Journal of Pharmacy*, 31, 637–641.

TIETBOHL, L.A.C., BARBOSA, T., FERNANDES, C.P., SANTOS, M.G., MACHADO, F.P., SANTOS, K.T., MELLO C.B., ARAÚJO, H.P., GONZALEZ, M.S., FEDER, D., ROCHA, L. Laboratory evaluation of the effects of essential oil of *Myrciaria floribunda* leaves on the development of *Dysdercus peruvianus* and *Oncopeltus fasciatus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(3), 316-321, 2014.

USTUN, O., F.S. SENOL, M. KURKCUOGLU, I.E. ORHAN, M. KARTAL, K.H.C. 2012. Baser. Investigation on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant activities of extracts and essential oils of Turkish *Pinus* species and Pycnogenol. *Ind. Crops Prod.*, 38, pp. 115-123.

XIE, Y.S., BODNARYK, R.P., FIELDS, P.G., 1996. A rapid and simple flour-disk bioassay for testing substances active against stored-product insects. *The Canadian entomologist*. 128,865e875.

5. PATENTE

Relatório descritivo da patente de invenção para “**FORMULAÇÃO FUMIGANTE EM MICROEMULSÃO PARA CONTROLE DE *Sitophilus zeamais* USANDO *Myrciaria floribunda* E *Pothomorphe umbellata***”

Campo da Invenção

[001] O presente invento consiste em método de obtenção e caracterização de uma formulação, utilizando os óleos essenciais das partes aéreas (folhas) de *Myrciaria floribunda* Myrtaceae (Cambui) e *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) (Pariparoba), para controle de adultos de *Sitophilus zeamais*, tendo como componentes majoritários (E)-Caryophyllene (26,81%); Viridiflorol (6,64%) e α – Selinene (3,58%) para *Myrciaria floribunda* e β – Pineno (27,33%), α – Pineno (14,55%) e Linalol (12,03%) para *Pothomorphe umbellata*.

[002] A referida invenção é voltada para preparação de formulação fumigante, especificamente para reduzir e/ou eliminar gorgulho de milho armazenado do gênero *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae), causador de danos definitivos e irrecuperáveis sofridos pelo milho armazenado, visto que nos últimos anos tais insetos vêm se tornando uma das principais pragas primárias de diversas culturas, por exemplo, o milho (*Zea mays* L.).

Problemas que a Invenção se Propõem a Resolver

[003] Em condições de climas tropicais, os insetos assumem inata importância como pragas dos grãos armazenados, pelo fato dos grãos constituir-se em ambiente ideal para seu desenvolvimento. Os insetos diminuem o valor nutricional, desvalorizam o produto, diminuem do grau de higiene, reduzem a massa de grãos, e promovem o aquecimento da massa de grãos no local da infestação.

[004] Tal situação pode contribuir para aumento da atividade respiratória da massa de grãos, proporcionando maior consumo de matéria seca e, conseqüentemente, rápida deterioração do produto. Quando os níveis populacionais dos insetos são altos, uma série de fatores interage contribuindo para o comprometimento da qualidade dos produtos que, muitas vezes, se tornam impróprios para o consumo.

[005] Os insetos-praga de produtos armazenados, conforme o hábito alimentar, podem ser classificados como pragas primárias ou secundárias. As primárias são capazes de atacar os grãos inteiros e sadios, já as secundárias se alimentam dos grãos danificados mecanicamente. São exemplos de pragas primárias de cereais, *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae) e *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae).

[006] O gorgulho-do-milho, popularmente conhecido o *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera:Curculionidae) configura uma das pragas mais importantes quanto ao armazenamento de grãos nas regiões tropicais. Esse inseto é conhecido como grande causador de danos sofridos pelos grãos armazenados em especial o milho, de forma definitiva e irrecuperável, uma vez que o processo de alimentação desse inseto nos grãos armazenados causa uma considerável perda de peso, cerca de 10% de perdas existentes, redução de nutrientes e do poder germinativo em sementes. Essa problemática torna-se mais importante para os agricultores de subsistência, para os quais os grãos fazem parte de sua alimentação básica e as condições de armazenamento são precárias.

[007] O controle dessas pragas é feito, comumente, com inseticidas químicos fumigantes e protetores que, apesar de eficientes, podem provocar alguns efeitos colaterais, como a toxicidade aos aplicadores, presença de resíduos nos grãos e a possibilidade da seleção de populações de insetos resistentes. A integração de métodos não químicos, no manejo de pragas de produtos armazenados, vem sendo uma alternativa para reduzirem o uso dos inseticidas nas unidades armazenadoras de grãos. Isto é importante uma vez que métodos alternativos, como o uso de compostos secundários de plantas, podem amenizar problemas de resíduos nos alimentos e a resistência das pragas pelo uso excessivo desses produtos.

[008] Muitas espécies de vegetais são ricas em compostos secundários, os quais estão envolvidos em diversos processos de interação planta-praga, além de apresentarem atividade inseticida contra o ataque de pragas no campo e no armazenamento. Esses compostos provocam mortalidade, repelência, deterrência na oviposição e alimentação, redução do crescimento, dentre outros aspectos não apresentados pelos inseticidas convencionais, que geralmente são mais tóxicos e provocam apenas mortalidade dos insetos.

[010] Nos últimos anos, os pesquisadores têm voltado a atenção para a utilização de métodos, como a utilização de substâncias de origem vegetal, em muitos

países tropicais e subtropicais como uma tática alternativa e promissora no controle de coleópteros de cereais e de milho armazenados, principalmente por pequenos e médios produtores.

[011] A flora brasileira, rica e diversificada, oferece opções para a descoberta de novas plantas com atividade inseticida, o que pode significar alternativas de controle de pragas ao produtor e, conseqüentemente, auxilia significativamente para o manejo e/ou controle de pragas de grãos armazenados, sem poluir o ambiente e oferecendo alimentos saudáveis aos consumidores. O aproveitamento da bioatividade de compostos secundários obtidos de plantas com propriedades fumigantes tem sido incrementado, visando o controle de pragas primárias e secundárias de grãos armazenados (KETOH et al. Journal of Stored Products Research, 41, 363-371, 2005; BRITO et al. Revista de Biologia e Ciências da Terra, 6, 96-103, 2006).

[012] As substâncias originadas de vegetais, geralmente, são de fácil aquisição, baixo custo e oferecem segurança para os aplicadores e para o meio ambiente, podendo ser utilizadas na forma de pós, extratos e óleos essenciais. Os óleos essenciais são conhecidos há muitos anos por diferentes propriedades, tais como: antisséptico, desinfetante, antifúngico, antibacteriano e inseticida. Conseqüentemente, os óleos essenciais têm sido utilizados como produtos naturais para várias utilizações, incluindo o uso na agricultura sustentável.

[013] Infere-se, portanto, que o presente invento pode ser inserido no contexto biotecnológico e tem como objetivo principal, controlar o desenvolvimento e crescimento de *Sitophilus zeamais* que destroem produtos armazenados de interesse alimentício amplamente explorado pela agricultura, especialmente o milho. Os bioprodutos desenvolvidos à base de óleos essenciais despertam o interesse comercial para uso como defensivo agrícola. Especificamente, estão diretamente associados ao uso de fitocomponentes específicos que favoreçam o manejo sustentável de grãos infestados por *Sitophilus zeamais*, principalmente entre agricultores de subsistência. Assim, visando contribuir com a produção alternativa de alimentos de forma orgânica e agroecológica, o presente invento possibilita fortalecer o setor dos bionegócios, em função da viabilidade comercial em larga escala.

Fundamentos da Invenção

[014] Existem no Brasil algumas famílias na qual são explorados os óleos essenciais, destacam-se a Piperaceae, Myrtaceae, Lauraceae, Verbenaceae,

Lamiaceae, Rutaceae e Poaceae (COITINHO et al. Ciência e Agrotecnologia, 35, 172-178, 2011). O gênero *Myrcia* é o maior gênero exclusivamente neotropical da família das plantas Myrtaceae com um pouco mais de 140 gêneros e 4.630 espécies (SOBRAL et al. Lista de Espécies da Flora do Brasil, 2013). A goiaba, o cravo e o eucalipto estão entre os membros significativos dessa família e são conhecidos por seus óleos essenciais utilizados medicinalmente e por outros fins comerciais. A *Myrciaria floribunda* (H.West ex Willd.) O. Berg pertence à família Myrtaceae, tem ampla distribuição no Brasil e é comumente conhecido como “Camboim”.

[015] Foram encontrados monoterpenos e sesquiterpenos como principais componentes do óleo essencial de folhas de *M. Floribunda*, sendo o 1,8-cineol, o δ -Cadinene e (E) -cariofileno como principais constituintes. O óleo essencial também exibiu atividade da acetilcolinesterase, um mecanismo bem conhecido de ação inseticida (LÓPES & PASCUAL-VILLALOBOS. Industrial Crops and Products, 31(2), 284-288, 2010; BARBOSA et al. Industrial Crops & Products, 151, 112372, 2020). Além do *Sitophilus zeamais*, o óleo das folhas de *M. floribunda* também possui atividade inseticida contra os hemípteros fitófagos *Oncopeltus fasciatus* e *Dysdercus peruvianus* (TIETBOHL et al. Revista Brasileira de Farmacognosia, 24(3), 316-321, 2014).

[016] Em relação à *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., o gênero *Pothomorphe* inclui plantas de porte arbustivo ou herbáceo constituído de poucas espécies, não ultrapassando duas dezenas (YUNKER. Hohnia 3, 29-284, 1973). As espécies *Pothomorphe umbellata* e *Pothomorphe peltata*, ambas conhecidas pelos nomes vulgares de pariparoba e de caapeba, são encontradas no Brasil e empregadas no tratamento de diversas enfermidades, por suas atividades gástricas (COIMBRA, R. Notas de Fitoterapia, 2, 292-293, 1958), antiépilética, diabética e tratamento de doenças hepáticas (FELZENSZWALB et al. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 20, 403-405, 1987). Além disso, foi verificada a atividade antimalárica de *Pothomorphe umbellata* (AMORIM et al. Journal of Ethnopharmacology. 24,101 – 106, 1988).

[017] Quanto à fitoquímica, em *Pothomorphe umbellata* foram encontrados como principais constituintes químicos em extratos metanólico: ácidos fixos, esteróides, saponinas, taninos, xantonas, flavononas, flavonóis e flavonas (SPONCHIADO JÚNIOR et al. Revista Fitos, 3,1, 31-37, 2007). Já o óleo essencial desta espécie foi detectado o fenilpropanóide denominado dilapiol (1-alil-2,5dimetoxi-

3,4-metilenodioxibenzeno), α -pineno, β -pineno, α -humuleno e (E)-nerolidol (MORAES et al. Anais de Farmácia e Química de São Paulo, 24,1-2, 1-9, 1984; MARTINS, A.P. et al. Phytochemistry. 49, 2019-2023, 1998).

[018] Há várias publicações voltadas a formulações inseticidas, tais como: **AU20042012680** que descreve uma formulação de anetol (componente principal) do óleo essencial de *Thymbra spicata* (menta) contra adultos de *Sitophilus oryzae*. A patente de número **CN101946811** que se refere à inseticida microencapsulado derivado de óleo essencial de anis, óleo essencial de absinto, óleo essencial de canela e óleo essencial de cravo-da-índia contra algumas pragas de grãos armazenados. Além disso, a patente **KR1020040063288** verificou a atividade inseticida de óleo essencial de eucalipto contra *Sitophilus oryzae*, gorgulho do feijão (*Callosobruchus chinensis*). Ademais, a patente **CN107950606** descreve um repelente microencapsulado contra *Sitophilus zeamais* à base de óleo essencial de *Folium artemisiae argyi* (absinto). Há também a patente de número **CN105494460**, cuja aplicação do óleo essencial de *Melaleuca ahemifolia* no controle de *Sitophilus zeamais*.

[019] Embora existam várias patentes publicadas a base de óleos essenciais com atividade inseticida, não foi observada o uso de produtos com efeito inseticida à base de *Myrciaria floribunda* e nem à base de *Pothomorphe umbellata* contra pragas de grãos armazenados. Vale destacar que é o primeiro ensaio utilizando óleo essencial de *Myrciaria floribundi* contra *Sitophilus zeamais* em milho sob condições controladas. A referida invenção confere-se como um produto inovador, o qual poderá ser utilizado junto a outros métodos para o controle de pragas de grãos armazenados, em especial o *Sitophilus zeamais*.

[020] Dessa forma, tendo em vista a necessidade de encontrar novas formas de controle de pragas em situações de armazenamento de grãos, que cause menos impactos ambientais, desenvolveu-se a formulação, que se mostrou eficiente contra o *Sitophilus zeamais*.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 apresenta a tabela com valores da CL₅₀ do teste de toxicidade por fumigação da formulação contra adultos de *S. zeamais*.

A Figura 2 apresenta a toxicidade de *S. zeamais* exposto a formulação usando o bioensaio de fumigação.

A Figura 3 apresenta o diagrama de etapas.

A Figura 4 apresenta a extração do óleo essencial, diferenciando-o da parte aquosa (Hidrolato).

A Figura 5 apresenta o disco de papel filtro com a formulação para ser colocada na tampa da câmara selada para teste de toxicidade fumigante.

A Figura 6 apresenta a câmara selada com os insetos.

Descrição da Invenção

[021] De acordo com a presente invenção, é proporcionado um fumigante para o controle de adultos de *Sitophilus zeamais*. Mais particularmente, uma formulação à base de óleo essencial de *Myrciaria floribunda* e *Pothomorphe umbellata*.

Exemplo 1 – Extração dos Óleos Essenciais:

[022] Para extração dos óleos essenciais foi utilizado partes aéreas (folhas) de *Myrciaria floribunda* e *Pothomorphe umbellata*, utilizando um extrator de Clevenger modificado, acoplado a um balão de fundo redondo de 5L e como fonte de calor, uma manta aquecedora da marca QUIMIC®, modelo Q321A28.

[023] Depois da coleta, o material vegetal passou por uma série de processos que envolve a separação mecânica das folhas (desfolhagem) atacadas por pragas ou microrganismos, com posterior lavagem e trituração em moinho de facas (Figura 3). Para o processo de extração, cada óleo essencial foi extraído separadamente pelo processo de hidrodestilação. Folhas frescas das plantas foram trituradas, sendo adicionado ao balão de hidrodestilação com água na proporção de 1:5 (m/v). Cada óleo essencial foi obtido separadamente através da sua condensação juntamente com o vapor de água (Figura 4) por um período máximo de 3 horas, coletando-se o óleo em seguida e tratando-o com sulfato de sódio anidro para remoção da água remanescente. Cada óleo foi armazenado em frascos separados de âmbar mantidos sob refrigeração de -24°C até serem submetidos à análise química e/ou teste de atividade biológica.

Exemplo 2 – Identificação dos constituintes químicos dos Óleos Essenciais:

[024] Para caracterizar e identificar os constituintes dos óleos essenciais de *Myrciaria floribunda* e *Pothomorphe umbellata*, foi preparada uma solução de cada óleo usando hexano bidestilado como solvente, sendo retirado 1µL dessa solução para injeção e análise em um cromatógrafo gasoso (GC) acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadrupolo Agilent 5975C Series GC-MS (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), equipado com coluna apolar DB-5

(Agilent J&W, 60 m × 0.25 mm diâmetro interno; espessura do filme 0.25 µm). As amostras foram analisadas sob as seguintes condições: temperatura inicial do GC de 60°C mantida por 3 min, depois aumentando de 2,5 °C min⁻¹ até a temperatura final de 240°C, que foi mantida por 10 minutos. O hélio foi utilizado como gás de arraste a fluxo constante de pressão 100 kPa. A interface do espectrômetro de massa foi definida em 200 °C e os espectros de massa registrados em 70 eV (em modo EI), além disso, foram obtidos espectros de massa com velocidade de 0,5 scan por segundo, com faixa de varredura de m/z de 35 a 550. A identificação dos compostos foi feita por meio da análise dos espectros de massa de cada pico cromatográfico, comparação com padrões autênticos e cálculo de índices de retenção. Para o cálculo dos índices de retenção linear dos componentes do óleo foi utilizado os tempos de retenção de cada composto e os tempos de retenção de n- alcanos (C9 a C25) analisados sob as mesmas condições. Os valores calculados foram comparados com os índices de retenção publicados na literatura a partir de comparação de seus espectros de massa e tempos de retenção àqueles de padrões disponíveis em bibliotecas de referência.

Exemplo 3 – Obtenção da Formulação:

[025] Para o preparo da formulação, foi elaborado uma solução estoque de concentração 120 ppm o que equivale a 32,4 µL/L de ar, usando 0,3 mg de cada óleo essencial solubilizado em 5 ml de etanol, promovendo a obtenção de uma microemulsão que foi estabilizada com tween 80. A referida formulação fumigante foi testada usando as concentrações de 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 5 ppm e 8 ppm, o que equivale a 0,27 µL/L; 0,54 µL/L; 0,81 µL/L; 1,3 µL/L e 2,1 µL/L de ar, respectivamente, utilizando como solvente o etanol e estabilizante tween 80. A formulação inseticida pode ser aplicada diretamente sobre os grãos, uma vez que a mesma não utiliza água, como também pode ser utilizada durante o armazenamento, com pulverizadores, pois os componentes ativos contidos na formulação são voláteis. Ademais, tal formulação poderá ser utilizada nos pós colheita como forma de prevenção aos insetos-praga.

Exemplo 4 – Atividade Fumigante:

[026] Para a realização do bioensaio fumigante, um disco de papel filtro com 4 cm de diâmetro foi colocado no lado interno da tampa de um recipiente plástico com formato cilíndrico (diâmetro: 4,2 cm, altura: 5,3 cm e volume: 74 ml) (Figura 5). Em cada papel filtro foi colocado 20 µL da formulação. Após a evaporação do solvente, foram adicionados 20 insetos, em seguida a tampa foi colocada firmemente no

recipiente, para formar uma câmara selada (Figura 6). Foram feitos testes com controles contendo somente os solventes da microemulsão. Os ensaios e o controle foram realizados em quadruplicata, e a mortalidade avaliada após sete dias.

[027] Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) (significância em $p < 0,05$) e teste de Tukey para identificar diferenças significativas na comparação das médias, usando o Software Origin (OriginLab, Northampton, Massachusetts, EUA). A Concentração letal (LC50) e seus limites de confiança foram determinados por análise Probit, e os dados foram analisados por determinação de valores de qui-quadrado e graus de liberdade usando o Software StatPlus Pro 6.2.5.0.

Exemplo 5 – Resultados

[028] A análise da composição química do óleo essencial de *Myrciaria floribunda* mostrou que os componentes majoritários são: E-Caryophyllene (26,81%); Viridiflorol (6,64%) e α – Selinene (3,58%).

[029] A análise e quantificação da composição química do óleo essencial de *Pothomorphe umbellata* identificou que seus constituintes principais são: β – Pineno (27,33%), α – Pineno (14,55%) e Linalol (12,03%).

[030] A avaliação da atividade fumigante mostrou que a referida formulação elevou a taxa de mortalidade dos insetos de forma dose dependente. A análise estatística mostrou que os dados de controle e tratamentos nas diferentes concentrações foram significativamente diferentes (Figura 2). Ajustando-se ao modelo de Probit ($p = 0,92$) a concentração letal média de 50% após 7 dias de exposição foi estimada em $0,648 \mu\text{L.L}^{-1}$ de ar (Figura 1).

[031] Dessa forma, a formulação a base dos óleos essenciais de *Myrciaria floribunda* e *Pothomorphe umbellata* é um meio prático, eficiente e seguro aplicado sob a forma líquida, no controle de insetos-praga de grãos armazenados análogos ao *Sitophilus zeamais*, contribuindo assim, para a diminuição de problemas originados por insetos-praga de produtos armazenados em regiões tropicais, servindo principalmente ao pequeno produtor e dos armazenadores, mudando assim o pensamento de que as pragas de grão armazenados devem ser combatidas apenas com produtos químicos.

REIVINDICAÇÕES

1. FORMULAÇÃO FUMIGANTE DE UMA MICROEMULSÃO PARA CONTROLE DE *Sitophilus zeamais* USANDO *Myrciaria floribunda* E *Pothomorphe umbellata*” **caracterizada** por ser formada por solução a partir de óleo essencial de *Myrciaria floribunda* e óleo essencial de *Pothomorphe umbellata* extraídos pela técnica de hidrodestilação isolados das partes aéreas (folhas) das plantas em condições especiais.

2. FORMULAÇÃO FUMIGANTE DE UMA MICROEMULSÃO PARA CONTROLE DE *Sitophilus zeamais* USANDO *Myrciaria floribunda* E *Pothomorphe umbellata*” de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada**, por ter componentes majoritários (E)-Cariofileno (26,81%); Viridiflorol (6,64%) e α – Selineno (3,58%) e β – Pineno (27,33%), α – Pineno (14,55%) e Linalol (12,03%), respectivamente.

3. FORMULAÇÃO FUMIGANTE DE UMA MICROEMULSÃO PARA CONTROLE DE *Sitophilus zeamais* USANDO *Myrciaria floribunda* E *Pothomorphe umbellata*” de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** por ser uma formulação fumigante compreendendo concentrações de 0,0001%, a 99,9% a partir do óleo essencial de *Myrciaria floribunda* e do óleo essencial de *Pothomorphe umbellata* utilizando como solvente o etanol ou outro solvente apolar, como acetona ou acetato de etila e estabilizante tween 80.

4. PROCESSO de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado** pelos óleos essenciais serem obtidos por meio da hidrodestilação das folhas de *Myrciaria floribunda* e *Pothomorphe umbellata*.

5. PROCESSO de acordo com as reivindicações 3 e 4, **caracterizado** por utilizarem concentrações de 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 5 ppm e 8 ppm a partir do óleo essencial de *Myrciaria floribunda* e do óleo essencial de *Pothomorphe umbellata*.

DESENHOS

Tempo (dias)	CL ₅₀ ± EP (IC 95%) ML.L ⁻¹ de ar	GL	X ²	p
7	0,648 ± 0,066	3	0,48	0,9231

CL: concentração letal; GL: graus de liberdade; IC: intervalo de confiança; P: probabilidade; EP: Erro Padrão; X²: Qui-quadrado.

FIGURA 1

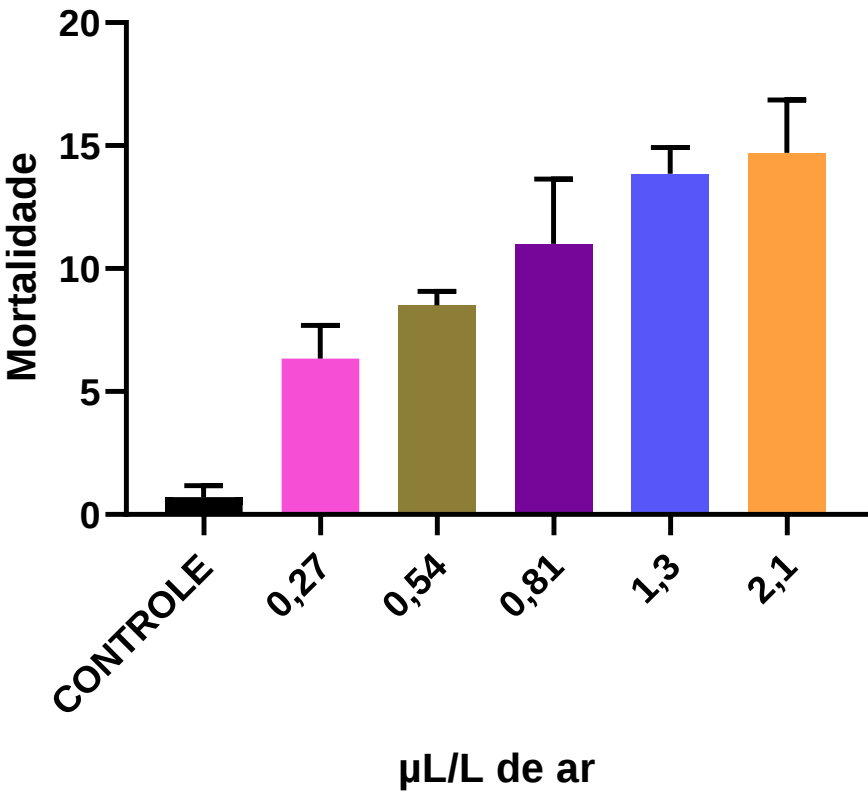


FIGURA 2

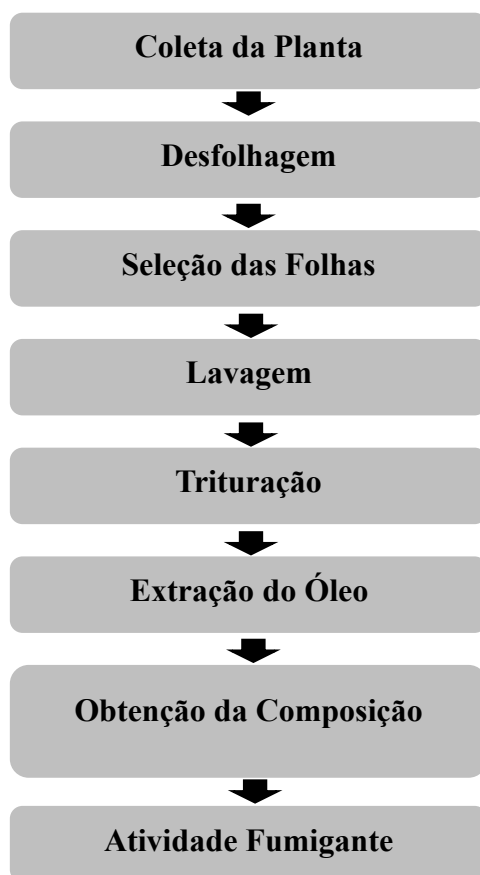
**FIGURA 3****FIGURA 4**



FIGURA 5



FIGURA 6

RESUMO

FORMULAÇÃO FUMIGANTE EM MICROEMULSÃO PARA CONTROLE DE *Sitophilus zeamais* USANDO *Myrciaria floribunda* E *Pothomorphe umbellata*

A presente patente de invenção refere-se a uma formulação fumigante inseticida a partir do processo de obtenção do óleo essencial de *Myrciaria floribunda* e do óleo essencial de *Pothomorphe umbellata* no controle de adultos de *Sitophilus zeamais* em grãos de milho, tendo como constituintes majoritários: (E)-Caryophyllene (26,81%) e Viridiflorol (6,64%) para *Myrciaria floribunda* e β – Pineno (27,33%) e α – Pineno (14,55%) para *Pothomorphe umbellata*. No bioensaio fumigante foi utilizada uma solução estoque da emulsão (tween 80) de 120 ppm que posteriormente foi diluída até as concentrações desejadas. Na atividade fumigante foi utilizado um disco de papel filtro com 4 cm de diâmetro colocado no lado interno da tampa de um recipiente plástico com formato cilíndrico. Em seguida foi colocado em cada recipiente 20 insetos e avaliados depois de 7 dias. Os resultados obtidos mostraram que a formulação ocasionou redução no número dos adultos de *sitophilus zeamays*. Estes compostos da referida formulação apresentam relevância no setor agroindustrial, sendo a formulação podendo ser aplicada sob os grãos durante a colheita e/ou armazenamento, sob a forma líquida. Por ser de fácil aplicação e segurança, a invenção pode prevenir e/ou reduzir o desenvolvimento dos insetos em milho, através da ação fumigante de acordo com a necessidade do produtor.

6. CONCLUSÕES

- Os bioensaios de toxicidade com os óleos essenciais revelaram que os óleos essenciais de *P. umbellata* e *M. floriunda* podem ser usados contra *S. zeamais*;
- Os testes de ingestão alteraram a fisiologia dos insetos interferindo negativamente na taxa de crescimento relativo e na eficiência de conversão de alimento;
- Os óleos essenciais alteraram a atividade da enzima amilase;
- Os óleos essenciais foram capazes de aumentar consideravelmente a atividade da enzima acetilcolinesterase;
- A Microemulsão formada pelos óleos de *P. umbellata* e *M. floriunda* (em proporções iguais) sob a forma líquida, foi eficiente no controle via fumigação do *Sitophilus zeamais*.

7. REFERÊNCIAS

ACHARYA, V., YOUNG, B. R. 2008. A Review of the Potential of Bio-Ethanol in New Zealand. *Bulletin of Science, Technology & Society*, 28(2), 143–148.

ALMEIDA, F.A.C., S.A. ALMEIDA, N.R. SANTOS, J.P.GOMES, M.E.R. Araújo. 2005. Efeito de extratos alcoólicos de plantas sobre o caruncho do feijão vigna (*Callosobruchus maculatus*). *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v.9, p.585-590.

ALMEIDA, S.A., F.A.C. ALMEIDA, N.R. SANTOS, S.S.A. MEDEIROS, H.S. ALVES. 2006. Controle do caruncho *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) utilizando extratos de *Piper nigrum* L. (Piperaceae) pelo método de vapor. *Ciência e Agrotecnologia*, v.30, p.793-797.

AMORIM, C. Z. ; FLORES, C.A, GOMES, B.E; MARQUES, A.D; CORDEIRO, RS., 1988. Screening for antimalarial activity in the genus *Pothomorphe*. *J Ethnopharmacol*. 24:101 – 106.

ANGELY, J. - Flora analítica e fitogeográfica de São Paulo São Paulo, Edições Phytton, 1969. 164p.

ARAUJO, E.C., S. MEDEIROS FILHO, F.V. VIEIRA, A.M.E. BEZERRA. 2001. Qualidade fisiológica de sementes de feijão caupi tratadas com pó de nim. *Revista Ciência Agronômica*, v.32, n.1/2, p.60-68.

ASHRAF, N.S., SUTTON, J.R., YANG, Y., RANXHI, B., LIBOHOVA, K., SHAW, E.D., BARGET, A.J., TODI, S.V., PAULSON, H.L., COSTA, M.D.C. 2020. Druggable genome screen identifies new regulators of the abundance and toxicity of ATXN3, the Spinocerebellar Ataxia type 3 disease protein. *Neurobiol. Disease* 137.

BACCI, L. et al. 2015. Toxicity, behavior impairment, and repellence of essential oils from pepperosmarin and patchouli to termites. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 156, n. 1, p. 66–76, jul.

BAGATELA , B. S., LOPES, A. P., FONSECA, F. L. A., ANDREO, M. A., NANAYAKKARA, D. N. P., BASTOS, J. K., PERAZZO, F. F. 2013. Evaluation of antimicrobial and antimalarial activities of crude extract, fractions and 4-nerolidylcathecol from the aerial parts of *Piperumbellata* L. (Piperaceae), *Natural Product Research*, 27:23, 2202-2209.

BOUDA, H., L.A. TAPONDJOU., FONTEM, D.A., GUMEDZOE, M.Y.D., 2001. Effect of essential oils from leaves of *Ageratum conyzoides*, *Lantana camara* and

Chromolaena odorata on the mortality of *Sitophilus zeamais* Mots., 1865 (Coleoptera, Curculionidae). J. Stored Prod. Res. 37: 103-109.

BRACKMANN, A., D.A. NEUWALD, N.D. RIBEIRO, S.T. FREITAS. 2002. Conservação de três genótipos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do grupo comercial carioca em armazenamento refrigerado e em atmosfera controlada. Ciência Rural, v.32, p.911-915.

CAMAROTI, J. R. S. L.; ALMEIDA, W. A.; BELMONTE, B. R.; OLIVEIRA, A. P. S.; LIMA, T. A.; FERREIRA, M. R. A.; PAIVA, P. M. G.; SOARES, L. A.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO T. H. *Sitophilus zeamais* adults have survival and nutrition affected by *Schinus terebinthifolius* leaf extract and its lectin (SteLL). Industrial Crops & Products, v. 116. p. 81–89. 2018.

CAMPOS, R. N. DE S. et al. Acaricidal properties of vetiver essential oil from *Chrysopogon zizanioides* (Poaceae) against the tick species *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Veterinary Parasitology, v. 212, n. 3-4, p. 324– 330, 2015.

CHOWAŃSKI, S., ADAMSKI, Z., MARCINIAK, P., ROSIŃSKI, G., BÜYÜKGÜZEL, E., BÜYÜKGÜZEL, K., FALABELLA, P., SCRANO, L., VENTRELLA, E., LELARIO, F., BUFO, S. 2016. A Review of Bioinsecticidal Activity of Solanaceae Alkaloids. Toxins, 8(3), 60.

COITINHO, R. L. B. C. de. et al. Toxicity by fumigation, contact and ingestion of essential oils in *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1885 (Coleoptera: Curculionidae). Ciência e Agrotecnologia, v. 35, n. 1, p. 172 178, 2011.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). 2020. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 5– Safra 2020, n. 5- Segundo levantamento, Brasília, p. 1-75.

CONTE, Osmar; OLIVEIRA, Fernando. T. de; HARGER, Nelson; CORRÊA FERREIRA, Beatriz, S. Resultados do manejo integrado de pragas da soja na safra 2013/14 no Paraná Londrina: Embrapa Soja, 2014. 56 p. (Embrapa Soja. Documentos, 356).

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

DEQUECH, STB, RIBEIRO, LP, SAUSEN, CD, EGEWARTH, R, KRUSE, ND. Fitotoxicidade causada por inseticidas botânicos em feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado em estufa plástica. Revista da FZVA, v.15, p. 71-80. 2008.

EMBRAPA. 2010. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cultivo do Milho. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo. Versão Eletrônica – 6º edição. Setembro/2010. (Sistema de Produção, 2).

ESTRELA, J. L. V., FAZOLIN, M., CATANI, V., ALÉCIO, M. R., LIMA, M. S. DE., Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.41, n.2, p.217-222. 2006.

FAO. 2020. FAOSTATS: CROPS. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acessado em 12 de março, 2021.

FLORA DO BRASIL. 2016. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 04 setembro de 2020.

GALLO, Domingos; NAKANO, Octávio; SILVEIRA NETO, Sinval; *et al.* Entomologia agrícola. [S.l: s.n.], 2002.

GARCÍA-LARA S, D J BERGVINSON. 2007. Integral program to reduce postharvest losses in maize. Agric. Téc. Méx. 33:181-189.

HAZRATI, H.; SAHARKHIZ, M. J.; MOEIN, M.; KHOSHGHALB, H. Phytotoxic effects of several essential oils on two weed species and Tomato. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 13, n. December 2017, p. 204–212, 2018.

HEINZMANN, B. M.; SPITZER, V.; SIMÕES, C. M. O. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed: p.23-28,

ISOBE, T., OHSAKI, A., NAGATA, K., 2002. Antibacterial constituents against *Helicobacter pylori* of Brazilian medicinal plant, *pariparoba*. Yakugaku Zasshi, 122(4), 291-294. <https://doi.org/10.1248/yakushi.122.291>.

KAIMOTO, T.; HATAKEYAMA, Y.; TAKAHASHI, K.; IMAGAWA, T.; TOMINAGA, M.; OHTA, T. Involvement of transient receptor potential A1 channel in algescic and analgesic actions of the organic compound limonene. European Journal of Pain, v.20, n.7, p.1155-1165, 2016.

KHALID, M. H., AKHTAR, M. N., MOHAMAD, A. S., PERIMAL, E. K., AKIRA, A., ISRAF, D. A., LAJIS, N., SULAIMAN, M. R. 2011. Antinociceptive effect of the essential oil of *Zingiber zerumbet* in mice: Possible mechanisms. Journal of Ethnopharmacology, 137(1), 345–351.

KHAWAR, J., MAHAJAN, G., SARDANA, V., & CHAUHAN, B. S. 2015. Allelopathy for weed control in agricultural systems. Crop Protection, 72, 57–65.

KLING, J. EDMÉADES, G. 1997. Morphology and growth of maize: IITA research guide, No. 9. Ibadan, Nigeria: IITA, p. 36.

KOUL, O., S. WALIA, AND G.S. DHALIWAL. 2008. Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopesticides International* 4:63-84.

KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, MG, v. 36, n. 1, p. 225-242, fev. 2014.

LANGSI, J.D.; NUKENINE, E.N.; OUMAROU, K.M.; MOKTAR, H.; FOKUNANG, C.N.; MBATA, G.N. Evaluation of the Insecticidal Activities of α -Pinene and 3-Carene on *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Insects*, 2020, 11, 540.

LEE, B.-H., LEE, S.-E., ANNIS, P. C., PRATT, S. J., PARK, B.-S., & TUMAALII, F. 2002. Fumigant Toxicity of Essential Oils and Monoterpenes Against the Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* Herbst. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 5(2), 237–240.

LEMO, EURICO EDUARDO PINTO, REZENDE, LEILA DE PAULA, RYCHARDSON ARAÚJO, ROCHA, ALVES, RICARDO ELESBÃO. MYRCIARIA FLORIBUNDA. CORADIN, LIDIO; CAMILLO, JULCÉIA; PAREYN, FRANS GERMAIN CORNEEL (Ed.). Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Nordeste. Brasília, DF: MMA, 2018. (Série Biodiversidade;51).205216.Disponível:<[HTTP://www.mma.gov.br/publicacoes/biodiversidade/category/142-serie-biodiversidade.html](http://www.mma.gov.br/publicacoes/biodiversidade/category/142-serie-biodiversidade.html)>,Acesso em: 03 de outubro de 2019.

LIMA, J.K.A.; ALBUQUERQUE, E.L.D.; SANTOS, A.C.C.; OLIVEIRA, A.P.; ARAUJO, A.P.A.; BLANK, A.F.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; ALVES, P.B.; SANTOS, D.A.; BACCI, L. Biototoxicity of some plant essential oils against the termite *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). **Industrial Crops and Products**. v. 47, p. 246-251, 2013.

LIU, Z.L., GOH, S.H., HO, S.H., 2007. Screening of Chinese medicinal herbs for bioactivity against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research*. 43, 290-296

LOECK, A.E. Pragas de produtos armazenados. Pelotas: EGUFPEL, p. 113, 2002.

LOPEZ, Antonio; BICERRA, Enrique; DIAZ, Edgar. Perfil ecológico de cuatro rodales de Camu Camu árbol *Myrciaria floribunda* (H. West. ex Willd) O. Berg. en Ucayali. *Ecol. apl.*, Lima , v. 5, n. 1-2, p. 45-52, dic. 2006 .

LOPES, A. P., BAGATELA, B. S., ROSA, P. C. P., NANAYAKKARA, D. N. P., CARVALHO, J. C. T., MAISTRO, E. L, BASTOS, J. K., PERAZZO, F.F., 2013. Antioxidant and Cytotoxic Effects of Crude Extract, Fractions and 4-Nerolidylcathecol

from Aerial Parts of *Pothomorphe umbellata* L. (Piperaceae). *BioMed Research International*, 1–5.

LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. 2002. *Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa, Plantarum.

LORINI, I., L.H. MIIKE & V.M. SCUSSEL. 2002. *Armazenagem de grãos*. Campinas: IBG. 1000p.

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

LORINI, I., KRZYZANOWSKI, F. C., FRANÇA-NETO, J. DE B., HENNING, A. A. Principais Pragas e Métodos de Controle em Sementes durante o Armazenamento – Série Sementes. Circular Técnica, Londrina – PR. 2010.

LOURENÇO, A.R.L.; BARBOSA, M.R.V. Myrtaceae em restingas no limite norte de distribuição da Mata Atlântica, Brasil. *Rodriguésia*, 63(2), 373-393, 2012.

LU, X., WENG, H., LI, C., HE, J., ZHANG, X., & MA, Z. 2020. Efficacy of essential oil from *Mosla chinensis* Maxim. cv. Jiangxiangru and its three main components against insect pests. *Industrial Crops and Products*, 147.

LUCENA, D. C. et al. Biological activity of *Piper aduncum* extracts on *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Erebidiae) and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 1869-1879, aug. 2017.

MAHDAVIKIA, F., SAHARKHIZ, M. J. (2015). Phytotoxic activity of essential oil and water extract of peppermint (*Mentha x piperita* L. CV. Mitcham). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 146–153.

MAJID ASIFA, BURENHULT NICLAS, STENSMYR MARCUS, DE VALK JOSJE AND HANSSON BILL S. 2018. Olfactory language and abstraction across cultures *Phil. Trans. R. Soc.* B373

MAKATE, N. 2010. The susceptibility of different maize varieties to post-harvest infestation by *Sitophilus zeamais* (MOTSCH) (Coleoptera: Cuculionidae). *Scientific Research and Essay*. 5. 030-034.

MARTINS, G. S. O., 2016. Caracterização Química e Atividade Inseticida de Óleos Essenciais Cítricos Sobre *Dysmicoccus Brevipes* (Cockerell, 1893) (hemiptera: Pseudococcidae). Dissertação de mestrado. Centro de ciências agrárias - Programa

de Pós-graduação em Produção vegetal. Universidade Federal do Espírito Santo - Alegre. 45 f.

MASSOLA JÚNIOR, N.S. Avaliação de danos causados pelo enfezamento vermelho e enfezamento pálido na cultura do milho. 1998. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

MENDONÇA, J. FARIAS. Óleos Essenciais De Piperáceas Como Alternativas Para O Controle De Pragas. 2019. 69P. Dissertação (Mestrado em Ciência Floresta) - Universidade Federal do Acre, Rio Branco. 2019.

MILLEZI, A. F. et al. Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 15, n. 3, p. 373 379, jan. 2013.

MIRESMAILLI, S.; ISMAN, M.B. Botanical insecticides inspired by plant–herbivore chemical interactions. **Trends in Plant Science - Cell Press**, Maryland Heights, v.19, n.1, p.29-35. 2014.

MORRIS, J. G. Unique nutrient requirements of cats appear to be diet-induced evolutionary adaptations. Recent Advances in Animal.Nutrition, v.13, p.187–194, 2001.

MOSTAFA, A. A.; AL-ASKAR, A. A.; ALMAARY, K. S.; DAWOUD, T. M.; SHOLKAMY, E. N.; BAKRI, M. M. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. Saudi jornal of biological sciences, v. 25, 2, 361-366, 2018.

NAVARRETE, A. et al. Improvement of essential oil steam distillation by microwave pretreatment. Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 50, n. 8, p. 4667 4671, mar. 2011.

NWOSU, L. C., NWOSU, U. I. 2012. Assessment of maize cob powder for the control of weevils in stored maize grain in Nigeria. Journal of Entomological Research, 36 : 21–24

ODEYEMI, O. O., MASIKA, P., AFOLAYAN, A. J. 2008. Insecticidal activities of essential oil from the leaves of *Mentha longifolia* L. subsp. *capensis* against *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae). African Entomology, 16(2), 220–225.

OLIVEIRA, E.; WAQUIL, J.M.; FERNANDES, F.T.; PAIVA, E.; RESENDE, R.O.; KITAJIMA, E.W. “Enfezamento pálido” e “enfezamento vermelho” na cultura do milho no Brasil Central. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 23, p. 45-47, 1998.

OLIVEIRA, L.M. Composição química e atividade antioxidante de frutos liofilizados de *Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd) O. Berg. Rio de Janeiro, 2015. 64f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

OLIVEIRA, C. M. De; SABATO, E. De O. Estratégias de Manejo de *Dalbulus maidis*, para controle de enfezamentos e virose na cultura do milho. In: PAES, M.C.D.; PINHO, R.G.Von; MOREIRA, S.G. (Eds.). Soluções integradas para os sistemas de produção de milho e sorgo no Brasil. Sete Lagoas, MG, p.749-780, 2018.

OOTANI, M. A. et al. Use of essential oils in agriculture. *Journal of Biotechnolog and Biodiversity*, v. 4, n. 2, p. 162 174, mai. 2013.

OYEDEJI, A. O., OKUNOWO, W. O., OSUNTOKI, A. A., OLABODE, T. B., AYO-FOLORUNSO, F. 2020. Insecticidal and biochemical activity of essential oil from *Citrus sinensis* peel and constituents on *Callosobrunchus maculatus* and *Sitophilus zeamais*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104643.

PAULIQUEVIS, C. F.; CONTE, C. O.; FAVERO, S. Atividade insetistática do óleo essencial de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. Sobre *Rhyzopertha dominica* (Fabricius, 1792) (Coleoptera: Bostrichidae). *Revista Brasileira de Agroecologia*, v.8, p.39-45, 2013.

PAULIQUEVIS, C. F.; FAVERO, S. Atividade insetistática de óleo essencial de *Pothomorphe umbellata* sobre *Sitophilus zeamais*. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 19 (12), 2015.

PASA, M. C. Saber local e medicina popular: a etnobotânica em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Ciências Humanas*, Belém, v. 6, n. 1, p. 179-196, 2011

PERAZZO, F.F.; SOUZA, G.H.B., LOPES, W., CARDOSO, LGV., CARVALHO, J.C.T., NANAYAKKARA, D.N.P.; BASTOS, J.K., 2005. Antiinflammatory and analgesic properties of water – ethanolic extract from *Pothomorphe umbellata* L. (Piperaceae) aerial parts. *J Ethnopharmacol*. 99:215 – 220.

PEREIRA, R. J. E CARDOSO, M. G. J. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. *J. Biotec. Biodivers*. v. 3, N.4: pp. 146-152, Nov. 2012

Pereira, N. Da V. PASA, M.C. 2019. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DA ESPÉCIE *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. *Biodiversidade* - v.19, n.1, 2020 - pág. 125

PIMENTEL, F. A. Influência da secagem sobre o rendimento e composição química dos compostos voláteis das raízes de *Piper piscatorum* Trel. & Yunck. (Piperaceae). *Química Nova*, v .35, n. 4, p. 715 718, jan. 2012.

PRATES, H.T.; SANTOS, J.P. dos. Óleos essenciais no controle de pragas de grãos armazenados. In: LORINI, I.; MIIKE, L.H.; SCUSSEL, V.M. (Org.). Armazenagem de grãos. Campinas: IBG, 2002. p.443-461.

PRATES, L. H. F., FARONI, L. R. D., HELENO, F. F., DE QUEIROZ, M. E. L. R., DE SOUSA, A. H., SILVA, M. V. A., 2019. Eugenol diffusion coefficient and its potential to control *Sitophilus zeamais* in rice. *Scientific Reports*, 9(1).

PRIYADARSHI, V. HOTA, D, KARNA, A. 2018. Effect of Growth Regulators and Micronutrients Spray on Chemical Parameters of Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) cv. Calcuttia. *International Journal of Economic Plants* 2018, 5(3):99-103.

RAMOS, MÔNICA FREIMAN DE S., MONTEIRO, SÉRGIO DA S., SILVA, VAGNER P., NAKAMURA, MARCOS J., SIANI, ANTONIO C. 2010. Essential Oils From Myrtaceae Species of the Brazilian Southeastern Maritime Forest (Restinga), *Journal of Essential Oil Research*, 22:2,109-113.

RAMOS, J. M. O., SANTOS, C. A., SANTANA, D. G., SANTOS, D. A., ALVES, P. B., THOMAZZI, S. M., 2013. Chemical constituents and potential anti-inflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(4), 644–650.

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

RAWANI, A. GHOSH, A. CHANDRA, G. 2014. Mosquito larvicidal potential of four common medicinal plants of India. *The Indian Journal of Medical Research* 140(1):102-108.

REES, D.P. 1996. Coleoptera. *Integrated Management of Insects in Stored Products*(Bh. Subramanyam & D.W. Hagstrum), pp. 1–40. Marcel Dekker, New York, NY.

RIBEIRO, I. A. T. DE A., DA SILVA, R., DA SILVA, A., PINHEIRO, P. M., PAIVA, P. M. G., NAVARRO, D. M. DO A. F., DA SILVA, M. V., NAPOLEÃO, T. H., CORREIA, M. T. S., 2020. Chemical characterization and insecticidal effect against *Sitophilus zeamais* (maize weevil) of essential oil from *Croton rudolphianus* leaves. *Crop Protection*. 129.

RODRIGUES, E. R., NOGUEIRA, N. G. P., ZOCCOLO, G. J., LEITE, F. S., JANUARIO, A. H., FUSCO-ALMEIDA, A. M., FACHIN, A. A, DE MARCHI, M. R. R., DOS SANTOS, A. G., PIETRO, R. C. L. R., 2012 . *Pothomorphe umbellata* : Antifungal activity against strains of *Trichophyton rubrum*. *Journal de Mycologie Médicale*, 22(3), 265–269.

ROEL, A.R., 2001. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. *Revista Internacional de Desenvolvimento Local*, v.1, p.43-50.

SADGROVE, N., JONES, G. 2015. A Contemporary Introduction to Essential Oils: Chemistry, Bioactivity and Prospects for Australian Agriculture. *Agriculture*, 5(1), 48–102.

SANTOS, J. P.; FONTES, R. A. ARMAZENAMENTO E CONTROLE DE INSETOS NO MILHO ESTOCADO NA PROPRIEDADE AGRÍCOLA. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 14, n, 165, p. 40-45, 1990.

SENTHIL-NATHAN, S. 2014) A Review of Biopesticides and Their Mode of Action Against Insect Pests. *Environmental Sustainability*, 49–63.

SILVA-AGUAYO, G., P. GONZÁLEZ-GÓMEZ, R. HEPP-GALLO& P. CASALS-BUSTOS. 2004. Control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky con polvos inertes. *Agrociencia*, v.38, n.5, p.529-536.

SILVEIRA, J. C. et al. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. *Enciclopédia Biosfera*, v. 8, n. 15, p. 2038 2052, dez. 2012.

SIMÕES, C. M. O. Farmacognosia: da planta ao medicamento. UFRGS; Florianópolis: Ed.09. UFSC, 2017.

SINGAB, N., A., & YOUSSEF, F. S. 2014.Medicinal Plants with Potential Antidiabetic Activity and their Assessment. *Medicinal & Aromatic Plants*, 03(01).

SOBRAL, M., PROENÇA, C., SOUZA, M., MAZINE, F., LUCAS, E. 2013. Myrtaceae. In *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.Disponível em:<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar>. Acesso em: 10 de dezembro de 2019.

SOUZA, G. M.; BARBOSA, A. M. Fatores de estresse no milho são diversos e exigem monitoramento constante. *Visão Agrícola* n° 13. Versão eletrônica, p. 30-34, jul/dez, 2015.

SOUZA, M.C.; MORIM, M. P. Subtribos Eugeniinae O. Berg e Myrtinae O. Berg (Myrtaceae) na Restinga da Marambaia, RJ, Brasil. *Acta Botânica Brasileira*, 22(3), 652-683, 2008.

SPONCHIADO JR, E.C.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, J.O.; FRANÇA, S.C. *Pothomorphe umbellata*. *Revista Fitos*, v.3, n.1, p.31-37, 2007.

SULEIMAN, R., WILLIAMS, D., NISSEN, A., BERN, C. J., ROSENTRATER, K. A. 2015. Is flint corn naturally resistant to *Sitophilus zeamais* infestation? *Journal of Stored Products Research*, 60, 19–24.

TAPONDJOU, A. L., ADLER, C., FONTEM, D.A., BOUDA, H., REICHMUTH, C., 2005. Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. *J. Stored Prod. Res.* 41, 91-102.

TIETBOHL, L.A.C., LIMA, B.G., FERNANDES, C.P., SANTOS, M. G., SILVA, F.E.B., Denardin, BACHINSKI, E.L.G., R., ALVES, G.G., SILVA-FILHO, ROCHA, M.V., L. 2012. Comparative study and anticholinesterasic evaluation of essential oils from leaves, stems and flowers of *Myrciaria floribunda* (H.West ex Willd.) O. Berg. *Latin American Journal of Pharmacy*, 31, 637–641.

TIETBOHL, L.A.C., BARBOSA, T., FERNANDES, C.P., SANTOS, M.G., MACHADO, F.P., SANTOS, K.T., MELLO C.B., ARAÚJO, H.P., GONZALEZ, M.S., FEDER, D., ROCHA, L. Laboratory evaluation of the effects of essential oil of *Myrciaria floribunda* leaves on the development of *Dysdercus peruvianus* and *Oncopeltus fasciatus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(3), 316-321, 2014.

TOFFANELLI, C.M. Efeito do fitoplasma do enfezamento vermelho do milho e da população de vetores infectivos sobre sintomas e componentes de produção. 2001. 69 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

TONGJURA, J. D. C., AMUGA, G. A. MAFUYAI, H. B. Laboratory assessment of the susceptibility of some varieties of infested with *Sitophilus zeamais* Motsch (Coleoptera: Culcleonidea). *Science World Journal*. 5,2.

VÁSQUEZ, S. P. F.; MENDONÇA, M. S. de; NODA, S. do N. Ethnobotany of medicinal plants in riverine communities of the Municipality of Manacapuru, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, v. 44, n. 4, p. 457-472, 2014.

WEI, L.; HUA, R.; LI, M.; HUANG, Y.; LI, S.; HE, Y.; SHEN, Z. Chemical Composition and biological activity of star anise *Illicium verum* extracts against maize weevil, *Sitophilus zeamais* adults. *Journal of Insect Science*, v. 14, p. 1-13, jun. 2014.

WEINZIERL, R., AND HENN, T. 1994. Botanical insecticides and insecticidal soaps. In: Leslie, A. R. (ed.) *Handbook of Integrated Pest Management for Turf and Ornamentals*. Lewis Publisher, Boca Raton, Florida, U.S.A. pp. 542–555.

WEINZIERL, R.A. 2000. Botanical insecticides, soaps, and oils. In: Rechcigl JE, Rechcigl NA (eds) *Biological and biotechnological control of insect pests*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp 101–121.

YOUNG, J. Z. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n.18, p. 5207-5213, 2003.