

**UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA REGIONAL DE CHAPECÓ**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais**

**Geisa Percio do Prado**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADE DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Cunila angustifolia* BENTH (LAMIACEAE)  
SOBRE *Alphitobius diaperinus* (PANZER, 1797)  
(COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)**

**Chapecó-SC, 2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA REGIONAL DE CHAPECÓ**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADE DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Cunila angustifolia* BENTH (LAMIACEAE)  
SOBRE *Alphitobius diaperinus* (PANZER, 1797)  
(COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)**

**Geisa Percio do Prado**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Comunitária Regional de Chapecó, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Neusa Fernandes de Moura

Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Roberto Mello Garcia

**Chapecó-SC, julho, 2007**

## FICHA CATALOGRÁFICA

- 
- 661.8063      Prado, Geisa Percio do  
                  Caracterização química e bioatividade do óleo essencial  
                  de *Cunila angustifolia* Benth (Lamiaceae) sobre *Alphitobius*  
                  *diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) /  
                  Geisa Percio do Prado. — Chapecó, 2007.
- 60 p.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Comunitária Regional  
de Chapecó, 2007.  
Orientadora: Neusa Fernandes de Moura.
1. Essências e óleos essenciais. 2. *Alphitobius diaperinus* –  
Controle. I. Título
-



**UNOCHAPECÓ**

**UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA REGIONAL DE CHAPECÓ**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADE DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Cunila angustifolia* BENTH (LAMIACEAE)  
SOBRE *Alphitobius diaperinus* (PANZER, 1797)  
(COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)**

**Geisa Percio do Prado**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do grau de

**Mestre em Ciências Ambientais**  
sendo aprovado em sua forma final.

---

Neusa Fernandes de Moura, Doutora  
Orientadora

**BANCA EXAMINADORA**

---

Flávio Roberto Mello Garcia, Doutor  
Co-Orientador

---

Claudete Justina Valduga, Doutora

Chapecó, 13 de julho de 2007

## **DEDICATÓRIA**

A todas as pessoas que possam ser beneficiadas com esta pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

Deus, acima de tudo.

Aos meus pais Luiz Percio e Sonia Maria Carbonera Percio, por terem me dado a benção da vida e o bom exemplo.

Ao meu esposo Joney do Prado, por respeitar minhas escolhas e pelo constante incentivo nos momentos de dificuldades e estudo.

À orientadora prof<sup>a</sup>. Neusa Fernandes de Moura, pelos ensinamentos no decorrer do curso, pela orientação prestada na realização desta pesquisa, incentivando, ajudando e cobrando sempre.

Ao prof. Flávio Roberto Mello Garcia, pela co-orientação, incentivo e ensinamentos.

Ao prof. Luiz Henrique Rangrab, pelo auxílio prestado no Aviário de Pesquisa do Instituto Regional para o Desenvolvimento Sustentável – São Carlos, SC.

Ao demais professores do curso, pois dissertação é muito mais que ela mesma.

Ao casal de técnicos Geraldo Appelt e Nelci Scheid Appelt que ajudaram muito na realização do experimento em campo.

A todas as pessoas que ajudaram cuidar dos meus amados filhos, especialmente meus pais, irmãos, sogra e vizinhos.

Aos bolsistas que muito ajudaram, especialmente Lisonéia Smanionotto, Melodi Schimidt e Jackson Edinei Ritt, e muitos outros que ajudaram muito.

À coordenação do Mestrado em Ciências Ambientais que esteve sempre à disposição.

A UNOCHAPECÓ que financiou parte desta pesquisa.

À SADIA/SA que financiou os frangos e demais elementos necessários para a realização do experimento em campo.

*"Cada um que passa em nossa vida,  
passa sozinho, pois cada pessoa é única  
e nenhuma substitui outra.  
Cada um que passa em nossa vida,  
passa sozinho, mas não vai só  
nem nos deixa sós.  
Leva um pouco de nós mesmos,  
deixa um pouco de si mesmo.  
Há os que levam muito,  
mas há os que não levam nada.  
Essa é a maior responsabilidade de nossa vida,  
e a prova de que duas almas  
não se encontram ao acaso. "*

*(Antoine de Saint-Exupéry)*

## RESUMO

PERCIO – DO PRADO, Geisa. Caracterização química e bioatividade do óleo essencial de *Cunila angustifolia* Benth (Lamiaceae) sobre *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae). Dissertação (Mestrado). Universidade Comunitária Regional de Chapecó, 2007 60 p.

A espécie *Cunila angustifolia* foi coletada em Chapecó-SC, Brasil. O óleo essencial foi obtido por arraste a vapor em Clevenger modificado. A análise química dos compostos, realizada por CG/EM e utilizando índice de Kovats, permitiu identificar vinte e dois compostos, representando mais de 95% dos compostos presentes na planta. A análise química foi realizada em diferentes épocas do ano, sendo que em todas o composto majoritário foi a pulegona (inverno – 56,5%, primavera – 74,34%, verão – 64,1% e outono – 56,0%). O óleo essencial da *C. angustifolia* apresentou atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella flexnerii*, *Enterobacter* sp., *Proteus mirabilis* e *Salmonella* sp., sendo que a *S. flexnerii* foi a bactéria mais sensível ao óleo. Esta atividade demonstrada pelo óleo contribuiu na diminuição da proliferação de bactérias patogênicas no aviário. A bioatividade do óleo foi testada frente ao *Alphitobius diaperinus* em laboratório e em campo. O resultado em laboratório apresentou eficiência de 100%, tanto para larvas quanto para adultos, quando o óleo foi utilizado nas concentrações de 5% e 10%. No ensaio em campo a eficiência do óleo diminuiu para 86,26% na concentração de 5% com duas aplicações e 46,26% e 49,94% nas concentrações de 5% e 10% com apenas uma aplicação, para larvas. Para adultos a eficiência foi de 77,73% na concentração de 5% aplicado duas vezes e 70,64% na concentração de 5% com apenas uma aplicação. A bioatividade inseticida do óleo essencial de *C. angustifolia* frente ao *A. diaperinus* é caracterizado pela presença de monoterpenos oxigenados, principalmente pulegona.

Palavras-chave: cascudinho de aviário, óleos essenciais, *Cunila angustifolia*.

## ABSTRACT

PERCIO – DO PRADO, Geisa. Chemical characterization and bioactivity of the essential oil *Cunila angustifolia* Benth (Lamiaceae) upon *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae). Dissertation (Master). Universidade Comunitária Regional de Chapecó, 2007 60 p.

*Cunila angustifolia* was collected in Chapecó – SC, Brazil. The essential oil was submitted to water distillation, using a modified Clevenger-type apparatus. The chemical analysis of compounds were analyzed by GC/MS, using Kovats retentions indexes, twenty two compounds were identified, representing more than 95% of the compounds in the specie. The chemical analysis was obtained in different periods of the year, and in all of them, the main compound was the pulegone (winter – 56.5%, spring – 74.34%, summer – 64.1% and autumn 56.0%). The essential oil of *C. angustifolia* showed antimicrobial activity to *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella flexnerii*, *Enterobacter sp.*, *Salmonella sp.* and *Proteus mirabilis*, and the *S. flexnerii* was the more sensitive to the oil. This activity showed by the oil, contributes in the decrease of the proliferation of the pathogenic bacteria inside the poultry houses. The bioactivity of the oil was tested against *Alphitobius diaperinus* in laboratory and in field. The result in laboratory showed 100% efficiency, for larvae and for adult, in oil concentrations of 5% and 10%. During the application in field, the oil efficiency decreased to 86.26% in the concentration 5% with two applications, and to 46.26% and 49.94% in concentrations of 5% and 10% one application, these data are from larvae. The results of the application with adult are 77.73% in oil concentration 5%, that was used twice and, 70.64% in oil concentration 5% with only one application. The insecticidal bioactivity of essential oil of *C. angustifolia* against *A. diaperinus* is characterized by the presence of oxygenate monoterpenes, mainly pulegone.

Keywords: lesser mealworm, essential oil, *C. angustifolia*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química da nicotina .....	4
Figura 2- Estrutura química da rotenona .....	5
Figura 3- Estrutura química básica dos piretróides .....	5
Figura 4- Estrutura química da azadirachtina.....	6
Figura 5- Aparelho de destilação.....	9
Figura 6- Estrutura de terpenóides e fenilpropanóide .....	10
Figura 7- Estrutura de monoterpenos acíclicos e ciclohexanóides.....	11
Figura 8- Estrutura sesquiterpenos .....	11
Figura 9- Biossíntese de terpenos .....	12
Figura 10- Estrutura química do $\alpha$ e $\beta$ -pineno .....	13
Figura 11- Estrutura química do precoceno I e II.....	14
Figura 12- Estrutura química do timol e carvacrol.....	14
Figura 13- Estrutura química do citronelal, 1,8 cineol e L-mentol .....	16
Figura 14- Estrutura química do eugenol e aldeído cinâmico .....	16
Figura 15- Estrutura química do cimol.....	16
Figura 16- Ramo de <i>Cunila angustifolia</i> .....	19
Figura 17- Estrutura química do sabineno, $\gamma$ -terpineno e limoneno .....	19
Figura 18- <i>Alphitobius diaperinus</i> , larva de último instar e adulto .....	21
Figura 19- Estrutura química da cipermetrina.....	22
Figura 20- Armadilha “Tupe Trap” utilizada para a captura dos cascudinhos.....	27
Figura 21- Aplicação do óleo de <i>Cunila angustifolia</i> no aviário .....	28
Figura 22- Perfil cromatográfico do óleo da <i>C. angustifolia</i> , coletada no outono .....	32
Figura 23- Perfil cromatográfico do óleo da <i>C. angustifolia</i> , coletada no inverno .....	33
Figura 24- Perfil cromatográfico do óleo da <i>C. angustifolia</i> , coletada na primavera .....	34
Figura 25- Perfil cromatográfico do óleo da <i>C. angustifolia</i> , coletada no verão .....	35
Figura 26- Espectro de massa da pulegona .....	36
Figura 27- Espectro de massa da isomentona .....	37
Figura 28- Espectro de massa do neomentol .....	38
Figura 29- Espectro de massa do mentol .....	39
Figura 30- Número de adultos vivos de <i>A. diaperinus</i> em teste realizado em laboratório .....	43
Figura 31- Metabolismo da pulegona .....	44

Figura 32- Número de larvas vivas de <i>A. diaperinus</i> em teste realizado em laboratório .....	45
Figura 33- Número de larvas vivas de <i>A. diaperinus</i> em teste realizado em campo .....	48
Figura 34- Número de larvas mortas de <i>A. diaperinus</i> em teste realizado em campo .....	49
Figura 35- Número de adultos vivos de <i>A. diaperinus</i> em teste realizado em campo .....	50
Figura 36- Número de adultos mortos de <i>A. diaperinus</i> em teste realizado em campo .....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Identificação e origem de bactérias gram-positivas e gram-negativas utilizadas nos testes antimicrobianos .....	30
Tabela 2- Composição química do óleo essencial de <i>C. angustifolia</i> .....	41
Tabela 3- Bioautografia do óleo volátil de <i>C. angustifolia</i> .....	42
Tabela 4- Valores médios de indivíduos vivos. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo Teste de Duncan.....	46
Tabela 5- Valores médios de indivíduos vivos seguido pelo erro padrão. Nível de significância de 5% pelo Teste de Turkey.....	47
Tabela 6- Eficiência do óleo da <i>C. angustifolia</i> frente ao <i>A. diaperinus</i> em teste realizado em campo .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ISO – International Standart Organization  
UFMS – Universidade Federal de Santa Maria  
AMV – Ácido mevalônico  
IPP – Isopentilpirofosfato  
GPP – Geranilpirofosfato  
DL<sub>50</sub> – Dose letal com 50% de morte  
Ppm – Partes por milhão  
CG – Cromatografia gasosa  
TTC – Cloreto de Trifenil Tetrazólico  
IK – Índice de Kovats  
IR – Índice de Retenção  
EM – Espectrometria de massa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
2.1 Plantas inseticidas .....	4
2.2 Óleos voláteis.....	8
2.3 Óleos essenciais inseticidas .....	13
2.4 <i>Cunila angustifolia</i> (vassourinha).....	17
2.5 <i>Alphitobius diaperinus</i> (cascudinho de aviário) .....	19
2.6 Controle de <i>Alphitobius diaperinus</i> .....	22
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
3.1 Extração dos óleos .....	24
3.2 Análise química do óleo essencial .....	24
3.3 Aplicação dos óleos nos <i>A. diaperinus</i> , em laboratório.....	26
3.4 Aplicação dos óleos nos <i>A. diaperinus</i> , em campo.....	27
3.5 Atividade antimicrobiana do óleo da <i>Cunila angustifolia</i> .....	30
<b>4 RESULTADOS</b> .....	31
4.1 Composição química do óleo da <i>Cunila angustifolia</i> .....	31
4.2 Atividade antimicrobiana.....	42
4.3 Ação inseticida do óleo de <i>C. angustifolia</i> contra <i>A. diaperinus</i> , em laboratório .....	43
4.4 Ação inseticida do óleo de <i>C. angustifolia</i> contra <i>A. diaperinus</i> , em campo .....	47
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	53
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	54

## 1 INTRODUÇÃO

A avicultura de corte representa um importante segmento agroindustrial, no Brasil, sendo uma das atividades mais dinâmicas e avançadas tecnologicamente, e está concentrada principalmente na Região Sul do país. Esta atividade teve avanço no seu desenvolvimento e modernização especialmente nos últimos 30 anos, alcançando níveis elevados de produtividade. Em 1970, eram necessários 70 dias para o crescimento e engorda de um frango de corte que consumia cerca de 2,0 kg de ração para 1,0 kg de ganho de peso, sendo que 80% desse peso vivo poderia ser considerado comestível. Atualmente um frango de corte fica pronto para o abate com 2,40 kg de peso vivo, aos 42 dias com conversão alimentar de 1,80 kg de ração/kg de ganho de peso (GIROTTI, MIELE, 2004).

A carne de frango representa 42,64% do total da produção de carnes no Brasil (FAO, 2005), visando atender à demanda o setor de avicultura potencializa a produção, realizando curtos intervalos entre os lotes (de 5 a 10 dias) e trocas de cama com intervalos variáveis, podendo ser a cada seis ou sete lotes. Esse manejo, com grandes intervalos, acarreta problemas com relação ao aumento de insetos no interior dos aviários, pois o conteúdo de matéria orgânica favorece a proliferação de coleópteros.

Dentre os problemas associados a essa atividade destaca-se o cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae), sendo o responsável pela queda na conversão alimentar das aves, pois estas digerem os insetos no lugar da ração balanceada (ALVES *et al.*, 2004), além de veicular agentes patogênicos, tais como fungos (*Aspergillus* sp.), bactérias (*Escherichia* sp., *Salmonella* sp., *Bacillus* spp., *Streptococcus* sp.), viroses, oocistos de coccídeos (*Eimeria* sp.) e cisticercose de tênias (*Choanotaenia* sp. e *Raillietina* sp.) (GOMES, 2000).

A química dos produtos naturais está intimamente relacionada à biodiversidade, principalmente vegetal. Neste contexto, o Brasil, que apresenta duas das mais diversas formações vegetais do planeta, Floresta Amazônica e Floresta Atlântica, apresenta um valioso arsenal químico a ser estudado. Dentre as famílias vegetais conhecidas e utilizadas popularmente e, portanto, com elevado potencial químico, encontra-se a família Lamiaceae com aproximadamente 264 gêneros descritos (USDA, 2007). Dentre eles o gênero *Cunila*, conhecido por apresentar óleos voláteis.

Os óleos voláteis possuem uma variada série de ações biológicas (DEY, HARBONE, 1997), sendo esta uma das justificativas para se aprofundar os estudos em óleos no combate de pragas. Compostos orgânicos bioativos produzidos por vegetais incluem repelentes, inibidores de crescimento, esterilizantes e toxinas, que formam uma vasta defesa química contra insetos e microrganismos invasores e apresentam-se como uma estratégia viável para a redução das populações de insetos (CAVALCANTE *et al.*, 2006).

Os óleos essenciais compreendem mais de 60 componentes individuais. Componentes principais podem constituir até 85 % do óleo, visto que outros componentes estão presentes somente como traço (SENATORE, 1996). Seus constituintes variam de hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres entre outros. Os compostos terpênicos constituem a maioria dos óleos essenciais. Os monoterpenos mais comuns encontrados nos óleos voláteis são: linalol, geraniol, tujona, cânfora, limoneno e outros. Já entre os sesquiterpenos mais comuns encontram-se o farnesol, nerolidol, bisaboleno e outros (SIMÕES *et al.*, 2003).

A escolha pela espécie *Cunila angustifolia* deu-se através de estudos preliminares que demonstraram a eficiência da planta contra o *A. diaperinus* e à atividade antimicrobiana seletiva detectada para a *Salmonella enteritidis*, em laboratório, pelo Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais da UNOCHAPECÓ.

Este estudo apresenta-se como uma alternativa viável de controle natural contra o *A. diaperinus* (cascudinho de aviário) numa tentativa de resolver este problema ambiental.

### OBJETIVO GERAL

Verificar a eficiência do óleo volátil da vassourinha (*Cunila angustifolia*) no controle do cascudinho de aviário (*Alphitobius diaperinus*) em laboratório e em campo.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficiência do óleo sobre *A. diaperinus*.
- Identificar o princípio ativo do óleo bem como sua composição química.
- Avaliar a atividade antibacteriana do óleo volátil da *C. angustifolia*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Plantas inseticidas

Atualmente, os inseticidas naturais têm sido cada vez mais requisitados, apresentando inúmeras vantagens quando comparados ao emprego de inseticidas sintéticos, como por exemplo, são obtidos de recursos renováveis e são rapidamente degradados, não deixando resíduos em alimentos e no meio ambiente. O desenvolvimento destes compostos requer tempo e também um estudo sistematizado que preencha requisitos, tais como seletividade contra inimigos naturais, baixa toxicidade em mamíferos, biodegradabilidade e ausência de fitotoxicidade, além dos requisitos econômicos para que sua produção em alta escala seja viável (VIEIRA *et al.*, 2001).

O uso do fumo (*Nicotiana tabacum* L.), da família Solanaceae, é bastante conhecido como inseticida, sendo os alcalóides nicotina, nornicotina e anabasina os principais princípios ativos extraídos de suas folhas (Figura 1) (GALLO *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2004). *Lonchocarpus e Tephrosia* apresentam larga atividade inseticida, porém, sofrem inatividade via degradação fotoquímica em condições de campo. Os principais análogos sintéticos são a eliptona, a deguelina e a munduserona. Os rotenóides (Figura 2) podem atuar tanto por ingestão, devido ao seu potencial fago-inibidor quanto por contato (VIEIRA *et al.*, 2004).

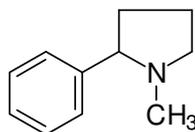


Figura 1 – Estrutura química da nicotina

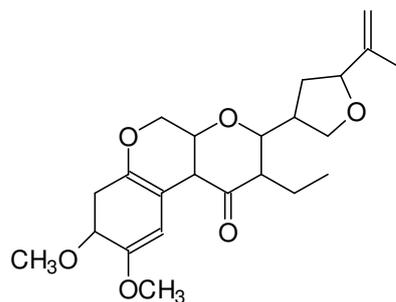


Figura 2 - Estrutura química da rotenona

Um dos grupos de substâncias conhecidas e ainda utilizado como inseticidas é o dos piretróides (Figura 3), originalmente extraídos de flores de crisântemos (Asteraceae). A grande vantagem de sua utilização é a sua baixa toxicidade aos mamíferos e alta toxicidade aos insetos. Dentre os principais análogos dos piretróides estão os sintéticos ciclopropânicos deltametrina, fenvalerato e esfevalerato (GODFREY, 1994).

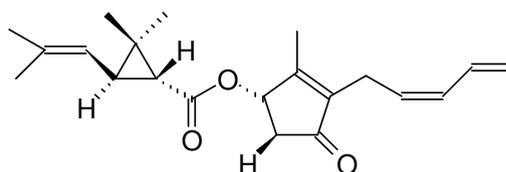


Figura 3 – Estrutura química básica dos piretróides

Dentre os terpenóides que apresentam atividade inseticida, encontram-se os tetranortriterpenos conhecidos como limonóides e são os maiores representantes desta classe de compostos inseticidas. Podem ser encontrados nas famílias Meliaceae, Rutaceae e Cneoraceae (VIEIRA *et al.*, 2001; 2004).

Dentro da família Meliaceae, destaca-se a *Azadirachta indica* A., conhecida por “nim”, que é considerada uma das mais importantes devido a sua atividade sistêmica, eficiência em baixas concentrações e baixa toxicidade aos mamíferos (GALLO et al., 2002). O principal composto extraído dos frutos desta planta é a azadiractina (Figura 4), um limonóide que atua interferindo no funcionamento de glândulas endócrinas que controlam a metamorfose em insetos e também apresenta propriedade fago-inibidora (VIEIRA et al., 2001).

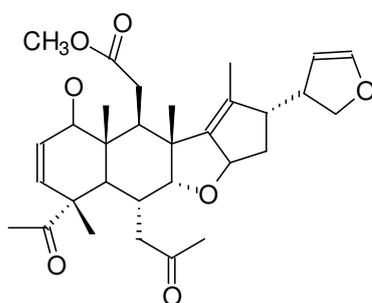


Figura 4. Estrutura química da azadiractina

Gonçalves et al. (2001), utilizando o extrato de *A. indica* na concentração de 2,5 % e 5 %, respectivamente, constataram a mortalidade de 97,5 % e 100 % de fêmeas do ácaro-verde da mandioca *Mononychellus tanajoa*.

No Brasil, a planta conhecida como cinamomo (*Melia azedarach* L.) ou Santa Bárbara, também em Meliaceae, é bastante estudada. Brunherotto & Vendramim (2001) verificaram a eficiência de extratos aquosos de cinamomo e observaram redução da sobrevivência larval da traça do tomateiro *Tuta absoluta*, quando estas foram alimentadas com folhas de tomateiro tratadas com extratos aquosos de várias partes deste vegetal. Os autores observaram que o extrato das folhas apresentou maior bioatividade.

Outras meliáceas promissoras, no controle de diversas espécies de insetos, são as do gênero *Trichilia*, sendo o limonóide triquilina seu principal composto (MORAIS et al., 1981). Thomazini et al., (2000) testaram extratos aquosos de ramos e folhas de *Trichilia pallida* S. sobre a traça-do-tomateiro *Tuta absoluta*, e constataram que os extratos de folhas e de ramos prejudicam o desenvolvimento do inseto, afetando, principalmente, a fase larval.

As rocaglamidas fazem parte de uma classe de substâncias com potente atividade inseticida, as quais podem ser encontradas em espécies do gênero *Aglai* (Meliaceae). Muitos outros análogos derivados da rocaglamida já foram isolados e apresentam atividade inseticida (NUGROHO *et al.*, 1997).

As furanocumarinas são encontradas em plantas das famílias Rutaceae e Apiaceae, podendo agir de várias formas como inseticidas. São representantes desta classe o isopsoraleno (furanocumarina angular) e o psoraleno (furanocumarina linear) (VIEIRA *et al.*, 2004).

## 2.2 Óleos voláteis

A ISO (International Standard Organization) define óleos voláteis como os produtos obtidos de partes de planta através da destilação por arraste com vapor d'água. São líquidos oleosos aromáticos obtidos de materiais das plantas tais como flores, sementes, folhas, galhos, entre outros (VAN DE BRAAK e LEITJEN, 1999). De um modo geral, são misturas de substâncias voláteis lipofílicas, geralmente odoríferas, líquidas, solúveis em solventes orgânicos, e também, denominadas de óleos essenciais, nome este derivado do componente chamado *Quinta essentia* descoberto por Paracelsus Von Hohenheim no século XVI (GUENTHER, 1948).

Os óleos essenciais são líquidos voláteis, refringentes e de odor característico. Formam-se num grande número de plantas como subprodutos do metabolismo secundário. Os vegetais são mais ricos em essências quando o tempo é estável, quente, soalheiro, sendo as melhores condições para a colheita. Estes óleos acumulam-se em certos tecidos no seio das células ou de reservatórios de essência, sob a epiderme dos pêlos, das glândulas ou nos espaços intracelulares. O controle microscópico da qualidade dos óleos essenciais revela-nos que essas células estão dispostas em formações características (MIGUEL, 1999).

Embora tais óleos fossem usados para perfume, propriedades de sabor e conservantes desde a Antigüidade, apenas o óleo turpentina foi mencionado pela história de gregos e romanos (GUENTHER, 1948).

Os óleos essenciais têm seu maior uso na União Européia, nos alimentos (como flavorizantes), perfumes (fragrâncias) e formulações farmacêuticas. Os componentes individuais dos óleos são usados também como alimento, extraídos do material da planta ou manufaturado sintético (OOSTERHAVEN et al., 1995). As propriedades antibacterianas dos óleos essenciais e seus componentes são explorados em diversos produtos como aferidores dentais do canal da raiz (MANABE et al., 1987) e anti-sépticos.

Compostos orgânicos bioativos produzidos por vegetais incluem repelentes, deterrentes alimentares e de oviposição, inibidores de crescimento, esterilizantes e toxinas, que formam uma vasta defesa química contra insetos e microrganismos invasores (CAVALCANTE et al., 2006). Atualmente são conhecidos aproximadamente cem mil compostos naturais ecoquimicamente ativos (LARCHER, 2000).

A destilação por vapor é o método usado geralmente para produção industrial de óleo

essencial. Porém a extração por meio de CO<sub>2</sub> supercrítico produz um perfil organoléptico mais natural (MOYLER, 1998). A diferença organoléptica do perfil indica uma diferença na composição dos óleos obtidos pela extração com o solvente ao contrário da destilação, e isto também pode influenciar as propriedades farmacológicas, entre elas antimicrobianas. Isto foi confirmado pelo fato de estes óleos extraídos da planta por hexano exibem maior atividade antimicrobiana do que os óleos extraídos por arraste de vapor (PACKIYASOTHY e KYLE, 2002).

Na extração por arraste de vapor d'água o óleo volátil é arrastado pela água por possuir tensão de vapor menor. Em pequena escala, emprega-se o aparelho Clevenger com modificações (Figura 5). O óleo obtido é separado da água através do aparelho rotaevaporador e seco com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. O método é preferencialmente usado para extrair óleo de plantas frescas (SIMÕES et al., 2003).

Os óleos essenciais podem compreender mais de 60 componentes individuais, sendo que os componentes principais podem constituir até 85% do óleo, visto que outros componentes estão presentes somente como traço (SENATORE, 1996).

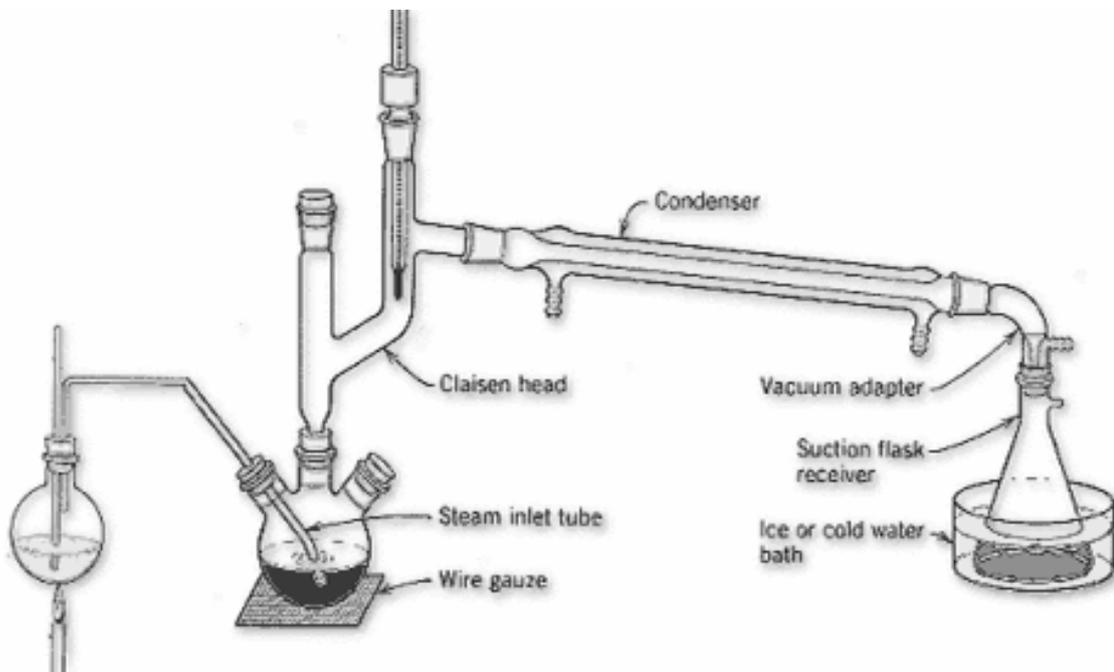


Figura 5 – Aparelho de destilação

Os constituintes dos óleos essenciais variam de hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, entre outros. Os compostos terpênicos constituem a maioria dos óleos essenciais. Os monoterpenos mais comuns encontrados nos óleos voláteis são: linalol, geraniol, tujona, cânfora, limoneno e outros. Já entre os sesquiterpenos mais comuns encontramos o farnesol, nerolidol, bisaboleno e outros (SIMÕES et al., 2000).

Os componentes químicos dos óleos voláteis podem ser divididos em duas classes, com base na sua biossíntese (Figura 6) encontram-se os derivados dos terpenóides, formados pela via do ácido mevalônico-acetato e derivados do fenilpropanóide, compostos aromáticos formados pela via do ácido chiquímico (STRAPAZZON, 2004).

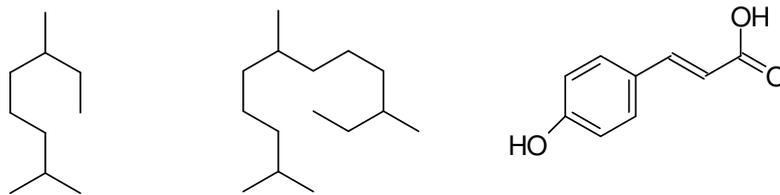


Figura 6 – Estrutura de terpenóides e fenilpropanóide

Os terpenos possuem uma estrutura comum, suas fórmulas representam a união de duas, três, quatro, seis, oito ou mais unidades do isopreno (2-metil-1, 3-butanodieno ou metilbutanodieno). Os terpenóides são formados por várias ciclizações, rearranjos e perdas ou adição de átomos de carbono. Classificados como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos, sendo os dois primeiros encontrados principalmente em óleos essenciais (DEY; HARBORNE, 1997).

Os monoterpenos fazem parte da classe mais simples dos terpenóides, sendo constituídos por 10 átomos de carbono, ou seja, duas unidades de isopreno. São componentes da maioria dos óleos essenciais. O maior interesse nestes compostos é o seu uso como perfumes e flavorizantes em alimentos, porém apresentam efeitos inseticida e farmacológico (DEY; HARBORNE, 1997).

Os monoterpenos são classificados em acíclicos, ciclopentanóides, ciclohexanóides (Figura 7) e irregulares.

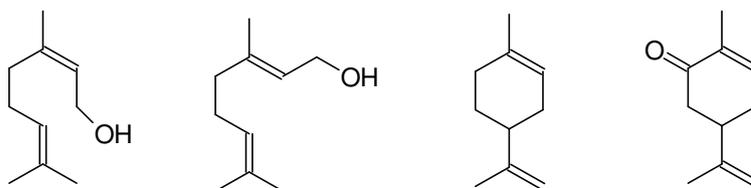


Figura 7 – Estrutura de monoterpenos acíclicos e ciclohexanóides

Os sesquiterpenos (Figura 8) são bastante encontrados em plantas, fungos e algas. Mais de 100 sesquiterpenos são conhecidos e identificados. Eles aparecem principalmente com monoterpenos em óleos essenciais. Sua estrutura compreende 15 átomos de carbono, relacionando-se com o constituinte fundamental do qual podem considerar-se derivados: o *trans-cis*-farnesol ou o *trans-trans*-farnesol (COSTA, 1994). A maioria dos sesquiterpenos apresenta propriedades biológicas como inseticida e antibiótica (DEY; HARBONE, 1997).

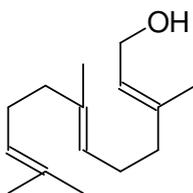


Figura 8 – Estrutura química do sesquiterpeno

A rota biossintética dos isoprenóides (Figura 9) foi determinada a partir de estudos dos esteróis em animais. A chave para esta rota foi determinada pelo ácido mevalônico (AMV), que apresenta 6 átomos de carbono. O ácido mevalônico é catalisado pela hidroximetilglutaril-CoA redutase, proveniente do metabolismo da glicose, mais precisamente pela

condensação aldólica da acetil-CoA com acetoacetil-CoA (DEY; HARBONE, 1997).

Seguindo a rota biossintética, o AMV é convertido em isopentilpirofosfato (IPP), adquirindo um mol de ATP. O IPP converte-se no seu isômero dimetil-alil-pirofosfato(DMAPP), que por sua vez, através de reação de condensação forma o geranyl-pirofosfato (GPP), que novamente condensa-se com outra molécula de IPP formando o farnesil pirofosfato (FPP). Estas condensações de IPP com pirofosfatos alílicos produzem novos prenil-pirofosfatos, ou seja, resultando em sesquiterpenos e diterpenos (DEY; HARBONE, 1997; SIMÕES et al., 2003).

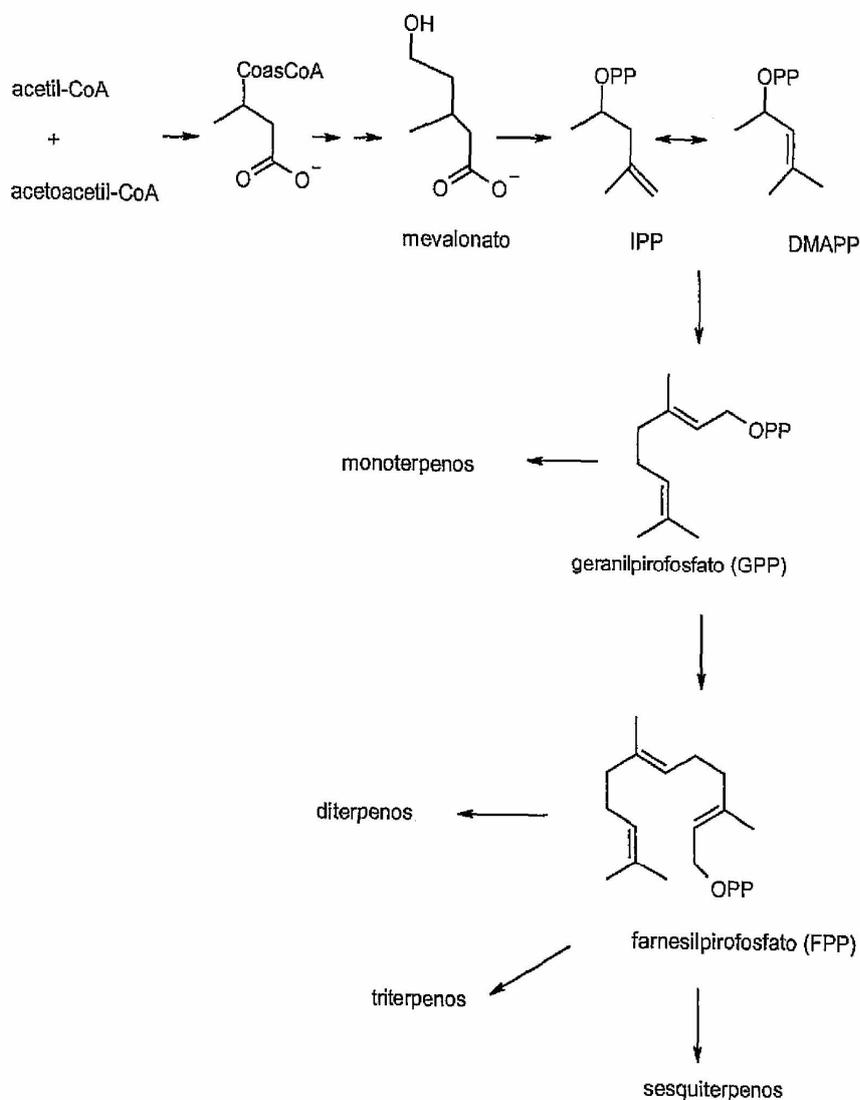


Figura 9 – Biossíntese de terpenos (Fonte: HARBONE, 1993)

### 2.3 Óleos essenciais inseticidas

Em muitas plantas são encontradas substâncias com potencial atividade inseticida ou repelente, estas substâncias são geralmente voláteis e podem ser detectadas pelas antenas ou tarsos de insetos. Entre essas, estão os monoterpenos (citronelal, linalol, mentol,  $\alpha$  e  $\beta$ -pinenos, mentona, carvona e limoneno), os sesquiterpenos (farnesol, nerolidol), os fenilpropanóides (safrol, eugenol) e muitos outros compostos (PANIZZI e PARA, 1991; SIMÕES e SPTIZER, 2004).

Os monoterpenos  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno (Figura 10) estão presentes no óleo volátil extraído da resina de pinheiro *Pinus sylvestris* L., armazenado pela larva da vespa *Neodiprion* (Hymenoptera). Quando a lagarta é atacada por um predador, estas substâncias são liberadas, causando repelência e fazendo com que ele desista do ataque (HARBONE, 1993).

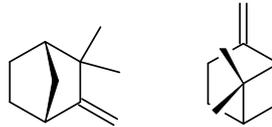


Figura 10 - Estrutura química do  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno

O óleo essencial das folhas de louro, *Laurus nobilis* L., foi testado contra baratas *Periplaneta americana*, por Machado *et al.* (1995). Estes autores observaram que este óleo essencial foi repelente, porém não tóxico. Oliveira e Vendramim (1999) realizaram um estudo com pós e óleo essencial de folhas de louro (*L. nobilis*), canela (*Cinnamomum zeylanicum* N.) e óleo de sementes de nim (*Azadirachta indica*), testados em adultos de *Zabrotes subfasciatus* em sementes de feijão. Constataram que o maior índice de repelência foi para os óleos essenciais das folhas de canela, com 96,2%, na dose de 5,0 mL/kg e das folhas de louro, com 74,6%, na dose de 2,5 mL/kg. Seus respectivos pós foram menos eficientes que os óleos essenciais.

Bowers et al. (1976), estudando a composição química e a atividade inseticida do óleo essencial de mentrasto (*Ageratum conyzoides*), observaram que este era o responsável pela metamorfose prematura dos insetos. Concluíram que as substâncias precoceno I e precoceno II (Figura 11) da classe cromenos foram responsáveis por esta atividade. Bouda et al. (2001), utilizando o mesmo óleo essencial em *Sitophilu zeamais* Motsh., observaram que este apresentou potencial atividade inseticida, causando mortalidade em 24 horas, com a dose letal ( $DL_{50}$ ) igual a 0,9 %.

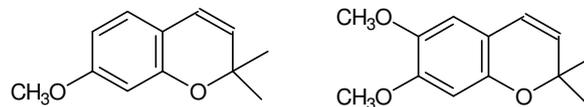


Figura 11 - Estrutura química do precoceno I e II

Nesta mesma época, Isman et al. (2001) testaram óleos essenciais de vinte plantas para a largata-do-tabaco, *Spodoptera litura*. Observaram que os óleos de *Satureia hortensis*, *Thymus serpyllum* e *Origanum creticum* causaram mais de 90 % da mortalidade larval e atribuíram esta atividade à presença dos monoterpênóides fenólicos, timol e carvacrol (Figura 10), constituintes majoritários do óleo de *S. hortensis*, *T. serpyllum*.

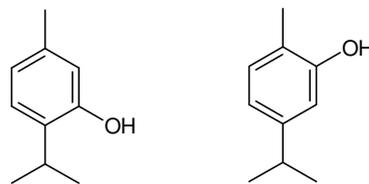


Figura 12 - Estrutura química do timol e carvacrol

O citronelal (Figura 13) pode ser encontrado em várias plantas como capim-citronela (*Cymbopogon nardus* R.) e em espécies de eucalipto, principalmente em *Eucalyptus citriodora* H. Pesquisas de Penteadó (1999) recomendam o óleo de eucalipto no controle de pragas de produtos armazenados, como *Tribolium castaneum* (Herbs) e *S. zeamais*. Segundo estes autores, o citronelal e o 1,8-cineol (Figura 13) são responsáveis por esta atividade biológica.

Pesquisas realizadas por Agarwal *et al.* (2001) comprovaram a atividade inseticida do L-mentol (Figura 13) contra *T. castaneum* com  $DL_{50}$  igual a 108,4 ppm.

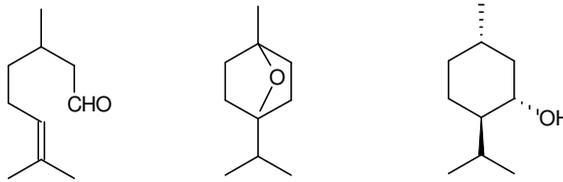


Figura 13 - Estrutura química do citronelal, 1,8 cineol e L-mentol

Huang *et al.* (2002) testaram o eugenol, o isoeugenol e o metileugenol sintéticos contra o *S. zeamais* e *T. castaneum*. Constataram que a dose letal foi similar para todos os compostos na dose ( $DL_{50}$ ) de 30 ppm para o *S. zeamais*. O potencial dos componentes comparados por  $DL_{50}$  foi isoeugenol > eugenol > metileugenol para o *T. castaneum*.

O óleo essencial de cravo da Índia (*Eugenia caryophyllus* T.) tem como principal constituinte o eugenol. O aldeído cinâmico e o eugenol (Figura 14), quando isolados das folhas de *Cinnamomum osmophloeum*, mostraram repelência contra cupins (*Coptotermes formosanus*). Trabalhos de Simas *et al.* (2004) demonstraram que plantas ricas em fenilpropanóides, como o eugenol, o aldeído cinâmico e o safrol, contribuem para o controle de larvas do mosquito da dengue *Aedes aegypti* L.

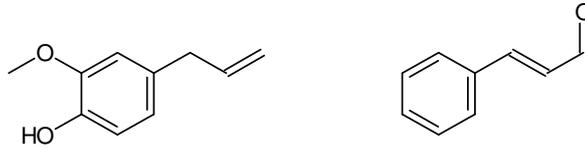


Figura 14. Estrutura química do eugenol e aldeído cinâmico

No óleo essencial extraído das folhas do *Eucalyptus saligna* S. e *Cupressus sempervirens* L., Tapondjou et al. (2005) isolaram os constituintes majoritários 4-terpineol, o cimol e o pineno. Consideraram o cimol (Figura 15) o principal constituinte responsável pela toxicidade e repelência para o *S. zeamais* e *T. confusum*. O óleo de *Eucalyptus* foi mais tóxico que o óleo de *Cupressus*, para ambas as espécies na  $DL_{50}$  igual a 0,36 ml/cm<sup>2</sup>, para *S. zeamais* e 0,48 ml/cm<sup>2</sup> para *T. confusum*.

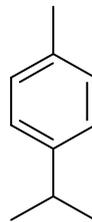


Figura 15. Estrutura química do cimol

Com a finalidade de testar a atividade inseticida de dois monoterpenos halogenados (mertenseno e violaceno) isolados da alga vermelha *Plocamium cartilagineum* contra a traça-do-tomate *T. absoluta* do pulgão-verde *Schizaphis graminum*, Argandoña et al. (2000) observaram que houve uma grande toxicidade do violaceno para os pulgões, causando 92 % de mortalidade em 48 horas nas concentrações de 100 e 250 ppm.

## 2.4 *Cunila angustifolia* (vassourinha)

A família Lamiaceae compreende cerca de 2800 espécies distribuídas em todo o mundo, sendo o maior centro de dispersão a região do Mediterrâneo . Muitas das espécies introduzidas no Brasil são plantas medicinais e fontes de óleos essenciais (JOLY, 1976; BARROSO, 1986).

*C. angustifolia* encontra-se classificada taxonomicamente na subfamília Nepetoideae, tribo Menthae, que conta com cerca de 69 gêneros descritos (USDA, 2007).

O gênero *Cunila* (Lamiaceae) compreende aproximadamente 22 espécies com distribuição no México, Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai, sendo encontradas 12 espécies registradas para o Brasil (BORDIGNON *et al.*, 2003).

É geralmente aceito que os óleos essenciais, secretados pelas glândulas capilares, ao cobrirem as folhas protegem a planta contra herbívoros e patógenos, enquanto o óleo secretado pelas glândulas capilares nas flores servem para atrair agentes polinizadores, no caso da família Lamiaceae, principalmente as abelhas (HILL, 1965).

Dentre as espécies mais estudadas pode ser citada a *Cunila spicata* conhecida popularmente como poejo, utilizada pela medicina popular para combater febre, gripe, bronquite, entre outros. Seus principais constituintes químicos são o linalol e cineol (MANN, 1995). Outras espécies também são conhecidas como poejo a *Cunila fasciculata* e a *Cunila microcephala* que apresentam como principais constituintes a mentofurana e o limoneno (BORDIGNON *et al.*, 1997). Pode-se citar também as espécies *Cunila galioides* e *Cunila menthoides* conhecidas popularmente como menta e que apresentam seus principais constituintes as isomentonas, mentona e pulegona (ECHEVERRIGARAY *et al.*, 2003).

A *C. angustifolia* (Benth) (Figura 16) apresenta-se como um arbusto folioso com aproximadamente 1,5 m de altura. Suas folhas são pecioladas a subsésseis com lâmina foliar de 6-60 mm de comprimento e 1-15 mm de largura, elípticas-lanceoladas, obtusas, margens levemente dentadas desde a metade até  $\frac{3}{4}$  da folha. Pecíolos de 1-10 mm. Inflorescência paucifloras axilares (4-6 flores) em pedúnculos de 1 mm de comprimento, brácteas de 0,5 mm. Possui corola branca, bilabiada; os estames são inseridos na metade do tubo, com filamento curto. O estigma é bifido recurvado; fruto com 4 clusas pequenas, 2 são freqüentemente ovóides, de cor parda amarelada (XIFREDA; MALLO, 2001).



Figura 16 – Ramo de *Cunila angustifolia*

*Cunila angustifolia* pertence ao gênero *Cunila* sect. *Incisae* Epling (1937), caracterizada pelas inflorescências cimosas paucifloras brevemente pedunculadas. Esta característica permite diferenciá-la de outras espécies do mesmo gênero (XIFREDA; MALLO, 2001).

Conhecida por vassourinha, erva da tosse e parente do poejo a *C. angustifolia* apresenta como principais metabólitos secundários (Figura 17) o sabineno,  $\gamma$ -terpineno e limoneno (ECHEVERRIGARAY *et al.*, 2003). Segundo Bordignon *et al.* (1999), foi determinado como constituintes majoritários o sabineno e óxido de *trans*-piperitona.

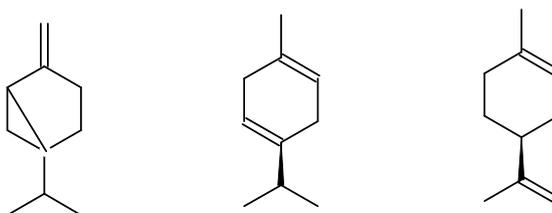


Figura 17 – Estrutura química do sabineno,  $\gamma$ -terpineno e limoneno

## 2.5 *Alphitobius diaperinus* (cascudinho de aviário)

*A. diaperinus* é considerado um problema mundial para a avicultura, esta espécie possui uma grande capacidade de proliferação e é berço de vários agentes patogênicos, além de trazer prejuízos à vedação dos aviários, mas principalmente por interferir diretamente no desenvolvimento das aves (PAIVA, 2000). É um inseto cosmopolita, conhecido primeiro como praga secundária de grãos, comumente encontrado, em altas densidades, nos aviários. Tanto larvas como adultos são encontrados na cama de aviários, alimentando-se do adubo, ração e de aves mortas e moribundas. É responsabilizado como importante vetor da leucose aviária. No interior de espécimes de *A. diaperinus* foram encontradas colônias de bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de fungos e ovos de helmintos. Esses insetos têm sido responsáveis por grandes prejuízos econômicos na avicultura, uma vez que as aves do quarto ao vigésimo dia de vida comumente ciscam a cama para se alimentarem desses insetos. Isto é importante, uma vez que é nesse período que há melhor conversão alimentar. Dessa forma, comem pouca ração, alteram significativamente a conversão, apresentam diarreia, e desuniformizam o lote (MATIAS, 1992). A atividade de procura do besouro na cama, torna a ave mais suscetível à irritação do trato respiratório, devido à poeira (BERNARDI, 2000).

Os insetos podem infestar os aviários através da cama levada para a lavoura, da ração excedente recolhida ou, ainda, através do caminhão que transporta as camas usadas e maravalhas. Alguns desses adultos também voam em direção ao aviário atraídos pela luz (MATIAS, 1999).

A expansão da avicultura industrial em sistemas de confinamento nas últimas três décadas, propiciou a este inseto um habitat ideal para seu desenvolvimento, tornando-o um problema mundial. Em criações intensivas de aves de produção, estes besouros podem se tornar um sério problema, proliferando-se em grandes quantidades na cama, onde larvas e adultos se criam na ração derramada e no esterco (GOMES, 2000).

Ainda segundo Gomes (2000), a transmissão de agentes patogênicos ocorre quando os frangos ingerem larvas e adultos infectados: durante os primeiros dez dias de vida os frangos de corte podem consumir cerca de 450 larvas/ave/dia mesmo que tenham alimento à sua disposição.

Matias (1999) relata que vários são os prejuízos causados pelo cascudinho. Têm-se observado que as aves infectadas por ele apresentam o fígado friável, fato este atribuído às toxinas da quinona - uma substância produzida para afastar os predadores, liberada por

glândulas ao lado da boca. Muitas dessas aves, ao ingerirem a carapaça rígida dos insetos adultos, podem ter hemorragia em função dos danos provocados na moela.

A ordem Coleoptera, com cerca de 370.000 espécies descritas, constitui o maior grupo conhecido de insetos, o que corresponde, aproximadamente, a 40 % da Classe Insecta e a 30 % do Reino Animalia (LAWRENCE, BRITTON, 1991). Ocupam grande quantidade de nichos ecológicos, talvez por serem os primeiros insetos holometabólicos a evoluírem (CHERNAKI e ALMEIDA, 2001a).

*A. diaperinus* (Figura 18) pertence a família Tenebrionidae, com cerca de 2.900 espécies que ocorrem na região tropical da América e é uma das poucas espécies que são problema para os avicultores. Além disso, pode-se citar o *A. piceus* e *Tribolium* sp. (PAIVA 2000). É originário do leste da África onde está associado a ninhos de aves e morcegos (GOMES, 2000).



Figura 18 - *Alphitobius diaperinus*, larva de último instar e adulto

*A. diaperinus* são pequenos insetos (entre 6,0 a 6,8 mm) que se desenvolvem passando pelas fases de ovo, larva (aproximadamente oito instares), pupa e adulto (CHERNAKI; ALMEIDA, 2001a).

O ciclo de vida depende da temperatura. Conforme esta aumenta, ele fica mais curto. As condições ideais para seu bom desenvolvimento são temperatura de 32 °C e 12% de umidade. A 21 °C o ciclo do ovo a ovo leva 70 dias. À temperatura constante de 28 °C uma fêmea pode produzir acima de dois mil ovos a cada 42 dias, aproximadamente (STEELMAN, 1996).

Os adultos vivem apenas um ano. Durante seu tempo de vida, as fêmeas chegam a ter 12 posturas, pondo num total de 200 a 400 mil ovos em cada uma. As larvas fazem orifícios no piso para formarem as pupas, da mesma forma que as fêmeas adultas o fazem para porem ovos. Quando a cama é retirada, larvas de diferentes estágios se escondem nesses orifícios e na base dos pilares, ao passo que os adultos o fazem nas muretas, telhas, madeirame e na base dos pilares.

Quando é colocada uma cama nova, estas larvas e adultos retornam. Com isso, já no primeiro lote, é registrado um alto nível de infestação, que vai aumentando a cada lote.

Ao se retirar o lote, observa-se que adultos e larvas estão localizados nos pontos onde estavam os comedouros tubulares. As larvas dão preferência às bases dos pilares enquanto que os adultos às muretas (STEELMAN, 1996).

## 2.6 Controle de *Alphitobius diaperinus*

O controle do *A. diaperinus* é dificultado pelos hábitos críticos desses insetos, além disso, a maioria está baseada na utilização de inseticidas químicos de curto período residual, cuja utilização é limitada pela presença constante das aves nos aviários, e ainda que eficientes podem causar a intoxicação dos animais (ALVES, *et al.*, 2004).

A utilização de piretróides para o controle do cascudinho é o método mais utilizado nos dias de hoje, uma vez que o controle manual torna-se inviável devido o grande número de insetos encontrados. Os produtos mais utilizados são derivados da cipermetrina (Figura 19) que é um piretróide moderno, derivado dos primeiros piretróides, porém melhor elaborado quimicamente, tendo maior eficiência que os antigos.

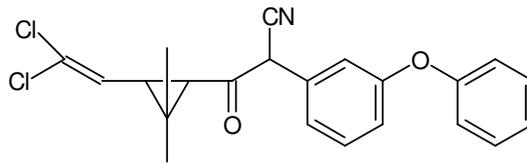


Figura 19 – Estrutura química da cipermetrina

Spinosa *et al.* (1996) citam propriedades lipofílicas da cipermetrina. A cutícula que reveste os insetos é rica em lipídios o que facilita a penetração da cipermetrina. Uma vez absorvida, é levada através da hemolinfa para as células nervosas atingindo o sistema nervoso central. Os insetos apresentam falta de coordenação e dificuldade de movimentos associados com hipersecreção, tremores, convulsão, queda e morte.

Não fosse a toxicidade em aves e mamíferos, o problema com os cascudinhos estaria resolvido. O uso indiscriminado, a dificuldade da aplicação com EPIs adequados, além do tempo necessário de espera para a colocação de novas aves nos aviários (SPINOSA *et al.*, 1996), faz com que novas alternativas de controle sejam necessárias.

Por enquanto, a integração de métodos que utiliza medidas de controle cultural através de técnicas de monitoramento da população de pragas e de conhecimento de comportamento das espécies aliados aos demais controles, são as alternativas utilizadas.

O controle mecânico envolve os detalhes da construção dos galpões, manejo dos resíduos e práticas sanitárias. No controle químico o conhecimento dos efeitos e quantidades utilizadas dos produtos químicos aplicados evita gastos desnecessários ao produtor, bem como a explosão da densidade populacional do inseto (ALVES *et al.*, 2004).

A prática de limpeza freqüente dos galpões reduz as populações desses coleópteros, no entanto há risco potencial para dispersão e reinfestação dos galpões. Com as variadas técnicas de manejo e os riscos que este inseto oferece na transmissão de patógenos, as principais medidas de controle de *A. diaperinus* utilizam aplicação de produtos químicos nas instalações (RODRIGUEIRO e PRADO, 2004).

O controle realizado através de entomopatógenos apresenta segurança em relação às aves, uma vez que os microrganismos entomopatogênicos têm se mostrado inócuos aos animais homeotérmicos (CRAWFORD *et al.*, 1998). Os estudos publicados no Brasil restringem-se a testes *in vitro* de seleção de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, onde mostram a suscetibilidade do inseto em relação aos entomopatógenos e a variabilidade na virulência dos isolados (ALVES *et al.*, 2004).

Ainda são necessários muitos estudos que visem conhecer a compatibilidade entre o controle habitual (inseticidas) e os fungos entomopatogênicos (ALVES *et al.*, 2005).

Por outro lado, os óleos voláteis possuem uma série de ações biológicas como antimicótica, antimicrobiana, ação analgésica, antiinflamatória, antiespasmódica, larvicida, hipnótica e sedativa (DEY; HARBONE, 1997). Além dos usos mais antigos como laxantes, xaropes, conservas, perfumes, condimentos (ANTUNES JUNIOR, 2002).

Desta forma, justifica-se aprofundar os estudos em óleos voláteis no combate de pragas.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Extração dos óleos

As folhas da espécie *C. angustifolia* foram coletadas em todas as estações do ano (outono, inverno, primavera e verão), no período matutino, uma vez que a exposição solar pode provocar uma perda quantitativa importante do óleo existente no vegetal (SIMÕES *et al.*, 2003). A espécie foi identificada pela Prof. Thais Scotti do Canto-Dorow, e a excisata depositada no Herbário da UFSM (SMDB 9925).

No laboratório de Química Analítica da UNOCHAPECÓ, as folhas “in natura”, da planta foram submetidas à extração através de arraste de vapor por quatro horas utilizando um aparelho de “Clevenger” modificado, tendo um rendimento de 1,2% de óleo. No processo de extração o óleo essencial foi arrastado pelo vapor da água devido a sua volatilidade, em seguida é condensado e recolhido. A separação do óleo da água foi realizada utilizando-se éter etílico, secando-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e evaporando-se o solvente em rotaevaporador. O óleo foi armazenado em frascos de cor âmbar, de vidro, com tampa de silicone em geladeira.

### 3.2 Análise química do óleo essencial

O óleo obtido foi submetido à análise por Cromatografia Gasosa modelo Varian 3800, equipado com coluna capilar fundida (25m x 0,25mm, 0,25  $\mu\text{m}$  film thickness) recheada com SE-54. As condições para análise em CG foram: He (1 mL/min); temperatura do injetor 200 °C; temperatura FID 280 °C; temperatura da coluna 50 - 250 °C a 4 °C/min. As análises em CG/EM foram realizadas utilizando o modelo HP 5973-6890 GC-MSD operando em modo EI a 70 eV, equipado com coluna capilar HP-5 (30m x 0,25mm, 0,25  $\mu\text{m}$  film thickness). A temperatura da coluna e do injetor foram as mesmas utilizadas para CG. A identificação dos compostos foi realizada com base comparativa de tempos de retenção, índice de Kovat's, conforme a Equação 1 e espectro de massa da NBS (MASSADA, 1976; ADAMS, 1995). Os resultados quantitativos foram calculados através da integração das áreas dos picos da CG sem o uso de fatores de correção.

$$IK = 100 - n + 100 \Delta n \frac{t_{ri} - t_{rn}}{t_{rm} - t_{rn}} \quad \text{Equação 1}$$

onde:

IK = índice de Kovats

n = número de carbonos do alcano que elui antes da amostra

$\Delta n$  = número de carbonos do alcano que elui depois de i menos o número de carbonos do alcano que elui antes da amostra

$t_{ri}$  = tempo de retenção da amostra

$t_{rn}$  = tempo de retenção do alcano que elui antes da amostra

$t_{rm}$  = tempo de retenção do alcano que elui depois da amostra

### 3.3 Aplicação dos óleos nos *A. diaperinus*, em laboratório

As espécimes de *A. diaperinus* foram coletados em aviários localizados no município de Chapecó. A identificação e separação dos indivíduos adultos e larvas de último instar foi feita de acordo com Chernaki e Almeida (2001a).

O experimento foi realizado durante o mês de novembro de 2005 no laboratório de Entomologia da UNOCHAPECÓ, sob temperatura de  $25\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  e umidade relativa do ar de  $70\% \pm 10\%$ , com fotoperíodo de 12 horas.

Para o ensaio foram utilizadas placas de Petry com 10 cm de diâmetro e 2 cm de altura. O interior das placas foi forrado com papel filtro, onde foi adicionada uma alíquota do óleo em concentrações de 1 %, 5 % e 10 % diluídas em água, como testemunha foi utilizado água destilada. Foram utilizados insetos adultos e larvas de último instar que foram acondicionados em número de dez insetos para cada placa (unidade experimental). Foram feitas contagens diárias do número de indivíduos vivos, no período de trinta dias. Para cada tratamento foram realizadas quatro repetições em delineamento totalmente casualizado.

A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA e as médias foram agrupadas pelo teste de Duncan a 5%, os valores obtidos foram transformados em raiz quadrada de  $x + 0,5$  e foi aplicada a fórmula de Abbott (1925) para a obtenção da porcentagem de eficiência.

### 3.4 Aplicação dos óleos nos *A. diaperinus*, em campo

O experimento em campo foi realizado em um aviário teste, dividido em 12 box<sup>1</sup> de condições semelhantes. As aves foram patrocinadas por uma empresa da região, bem como a ração, a vacina contra Gumboro e esporádicas visitas de técnico especializado.

O óleo foi aplicado em diferentes concentrações, sendo o Teste 1 (5%- uma única aplicação), Teste 2 (5% - duas aplicações), Teste 3 (10% - uma única aplicação) e Teste 4 (testemunha). O Teste 2 foi realizado com duas aplicações, uma logo após a colocação da cama do aviário e outra após 15 dias.

Os testes foram realizados com três repetições, ou seja, cada tratamento foi aplicado em três boxes. Em cada box foram colocadas cinco armadilhas, sendo estas colocadas uma embaixo do comedouro, uma embaixo do bebedouro, uma no centro, uma na entrada do box e outra em frente à janela.

Para a captura dos cascudinhos foi utilizada armadilha conhecida como “Tupe Trap” (Figura 20) descrita por Safrit e Axtell (1984).



Figura 20 – Armadilha “Tupe Trap” utilizada para a captura dos cascudinhos

---

<sup>1</sup> O box caracteriza-se pela divisão do aviário em partes menores (mini-aviários), visando a padronização das condições para a realização da pesquisa, além de diminuir os gastos.

O experimento foi realizado no Aviário Teste do Instituto Regional para o Desenvolvimento Sustentável – São Carlos no período de 30 de novembro de 2005 a 22 de janeiro de 2006.

Foram aplicados 100 mL de óleo nas diferentes concentrações em cada box. A aplicação foi feita com aplicador manual (Figura 21) após a colocação da cama de aviário e um dia antes da colocação das aves. O Teste 2 teve sua segunda aplicação realizada aos 15 dias após a colocação das aves e foi realizada sem a remoção das mesmas.

Foram feitas contagens semanais da população de insetos adultos (vivos e mortos) e larvas (vivas e mortas) para a realização da análise estatística.



Figura 21 – Aplicação do óleo de *Cunila angustifolia* no aviário

O delineamento realizado foi de blocos casualizados. Foi utilizado Statistica 6.0 e as médias foram agrupadas pelo teste de Tukey a 5 %, os valores obtidos foram transformados em raiz quadrada de  $x + 0,5$  e foi aplicada a fórmula de Abbott (1925) para a obtenção da porcentagem de eficiência.

Durante todo o experimento foi controlada a temperatura do aviário, uma vez que em temperaturas inferiores a 16,5 °C a quantidade de insetos é menor (CHERNAKI; ALMEIDA, 2001b).

Foram feitas anotações semanais quanto ao peso das aves e ração consumida. Também foram computados dados de mortalidade.

### 3.5 Atividade antimicrobiana do óleo da *Cunila angustifolia*

Um total de nove cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas foram utilizadas para a realização do teste microbiológico (Tabela 1). Todos os procedimentos de isolamento, coleta e identificação por metodologia padrão foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da UNOCHAPECÓ.

Tabela 1 – Identificação e origem de bactérias gram-positivas e gram-negativas utilizadas nos testes antimicrobianos

<b>Espécie Gram-positiva</b>	<b>Origem</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC12228
<i>Enterococcus faecalis</i>	ISOLADO
<i>Micrococcus</i> sp.	ISOLADO
<b>Espécie Gram-negativa</b>	<b>Origem</b>
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC29245
<i>Enterobacter</i> sp.	ISOLADO
<i>Shigella flexneri</i>	ISOLADO
<i>Salmonella</i> sp.	ISOLADO

O método de bioautografia direta foi a técnica utilizada para screening da atividade antimicrobiana de *C. angustifolia*, sendo o inóculo padronizado com tubo de 0,5 na escala de MacFarland.

A amostra de óleo foi solubilizada em clorofórmio, e colocada em placas cromatográficas em massas diferentes (1,3 µg, 3,2 µg, 6,4 µg, 12,8 µg, 32 µg, 64 µg). Essas placas foram então transferidas para as placas de Petry, onde foram inoculados os microorganismos em solução salina juntamente com o meio de cultura (Agar Miller Hinton). As placas foram então transferidas para a estufa, onde foram incubadas durante 48 horas a 37 °C. Após transcorrido esse tempo foram realizadas as respectivas leituras, usando-se para isto a solução reveladora - TTC (Cloreto de Trifenil Tetrazólico), analisando-se onde o óleo foi efetivo inibindo o crescimento microbiano (MAC FADIN, 2000). Para controle positivo foi usado cloranfenicol.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Composição química do óleo de *Cunila angustifolia*

Um dos métodos utilizados para identificar um componente de um óleo essencial, em CG, é a determinação do seu índice de retenção de Kowats (KI). Este índice é determinado através da injeção de uma mistura de n-alcanos com tempo de retenção e ordem de ebulição conhecidos juntamente com o óleo que terá seu índice calculado.

Neste trabalho a composição química do óleo essencial da *C. angustifolia* foi determinada pelo cálculo do índice de Kowats de cada componente e a comparação com os espectros de massa destes com os padrões de igual índice de retenção encontrados na literatura (ADAMS, 1995).

O perfil cromatográfico da *C. angustifolia* (Figura 22) coletada no outono, revela que o pico com maior área apresenta tempo de retenção a 14,75 min. Este mesmo pico foi observado no perfil cromatográfico do inverno (Figura 23), primavera (Figura 24) e verão (Figura 25).

Analisando o perfil cromatográfico do inverno e outono observa-se semelhança entre os mesmos, o que significa pouca variação dos seus constituintes.

Já o perfil cromatográfico do óleo essencial da *C. angustifolia* coletado na primavera e verão apresentam-se similares, diferindo do perfil cromatográfico do inverno e outono, com relação aos picos com tempo de retenção entre 11 e 12 min. Sendo que o pico de 11,72 min apresenta concentração maior na primavera e verão.

A análise do espectro de massa referente a este pico (Figura 26), aliado ao índice de retenção (IR), permitiu identificar o composto majoritário como sendo a pulegona.

Estes picos, entre 11 e 12 min, após análise do espectro de massa e índice de Kovats são referentes aos monoterpenos isomentona (Figura 27), neomentol (Figura 28) e mentol (Figura 29).

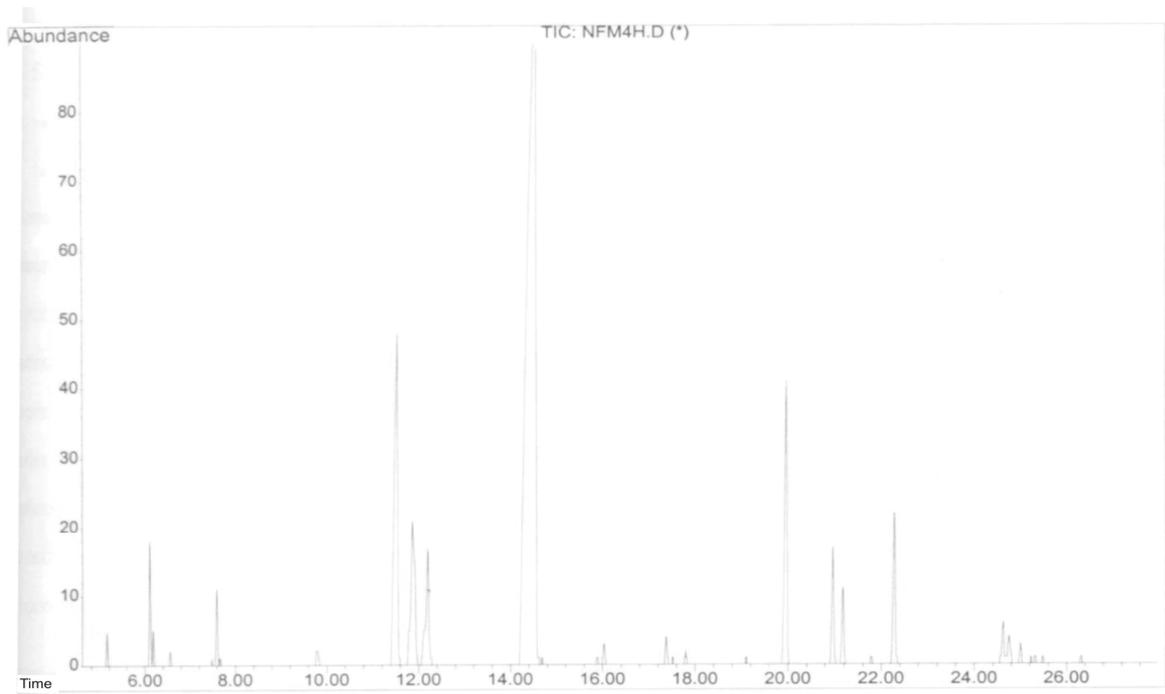


Figura 22 – Perfil cromatográfico do óleo da *C. angustifolia*, coletada no outono

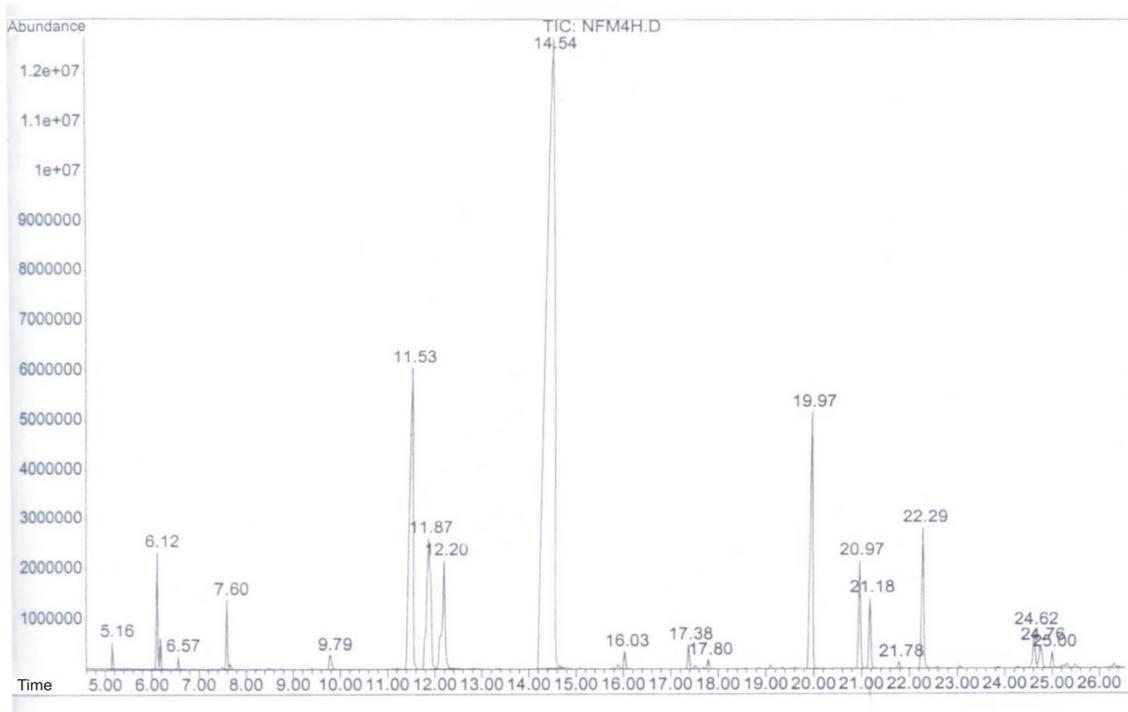


Figura 23 – Perfil cromatográfico do óleo da *C. angustifolia*, coletada no inverno

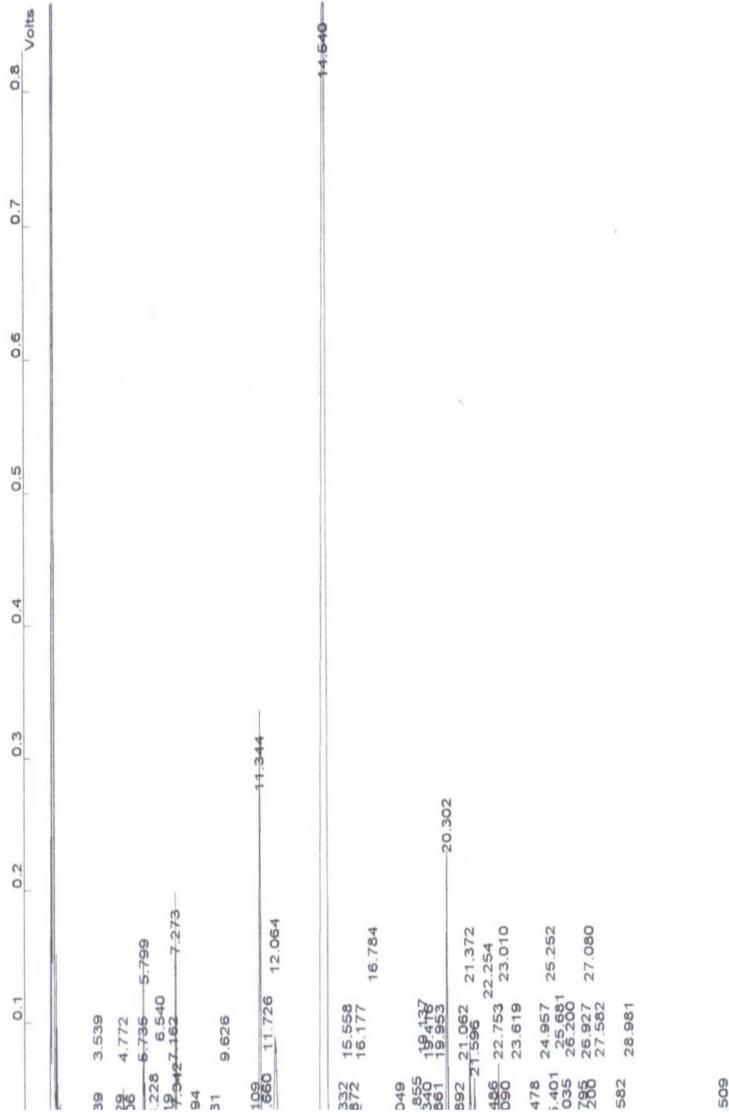


Figura 24 – Perfil cromatográfico do óleo da *C. angustifolia*, coletada na primavera

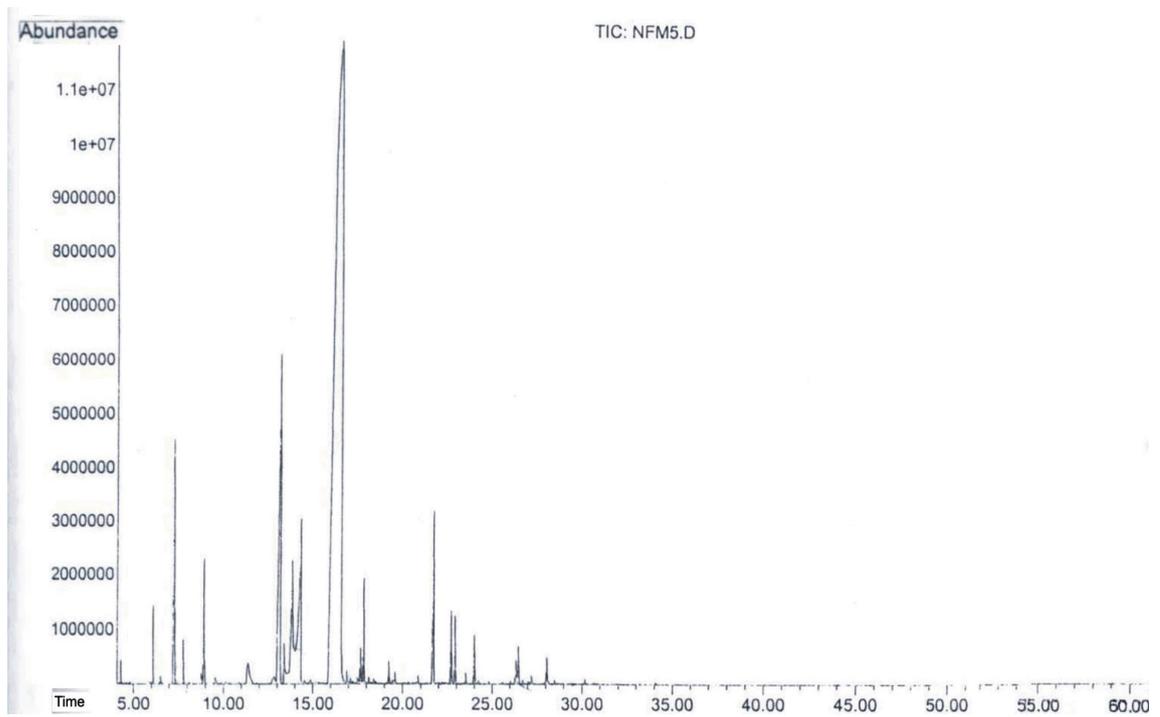


Figura 25 – Perfil cromatográfico do óleo da *C. angustifolia*, coletada no verão

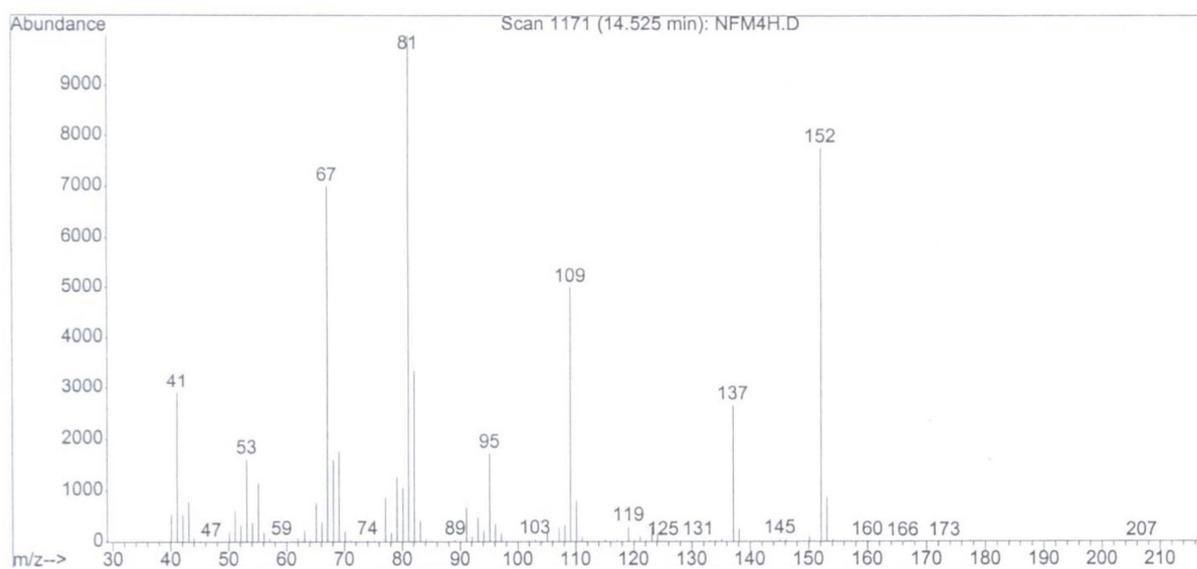
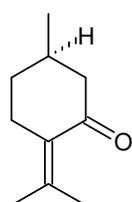


Figura 26 – Espectro de massa da pulegona

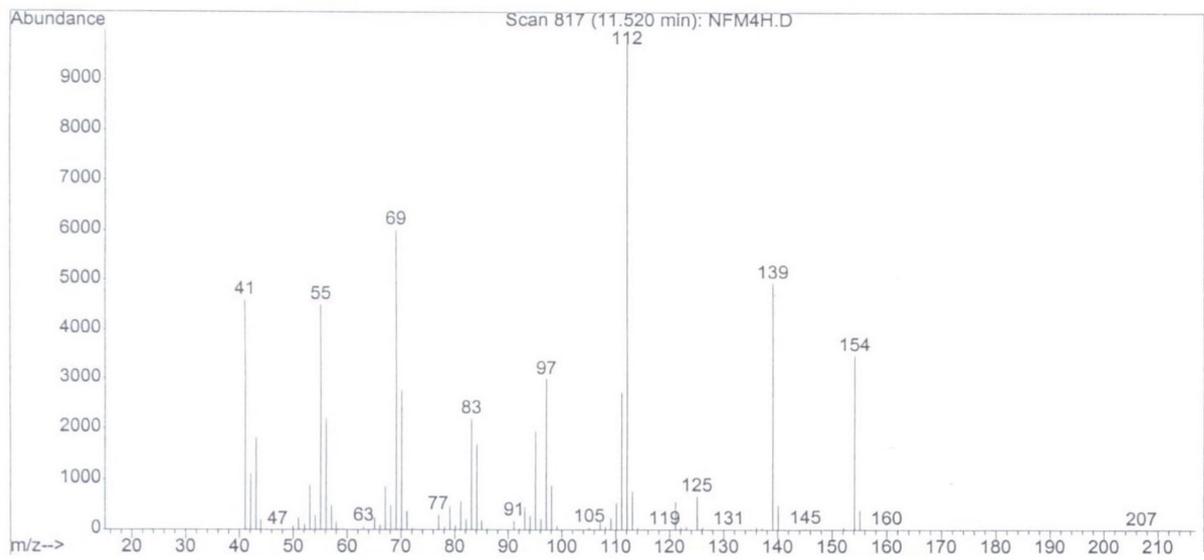
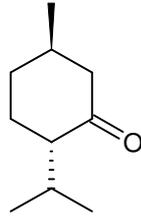


Figura 27 – Espectro de massa da isomentona

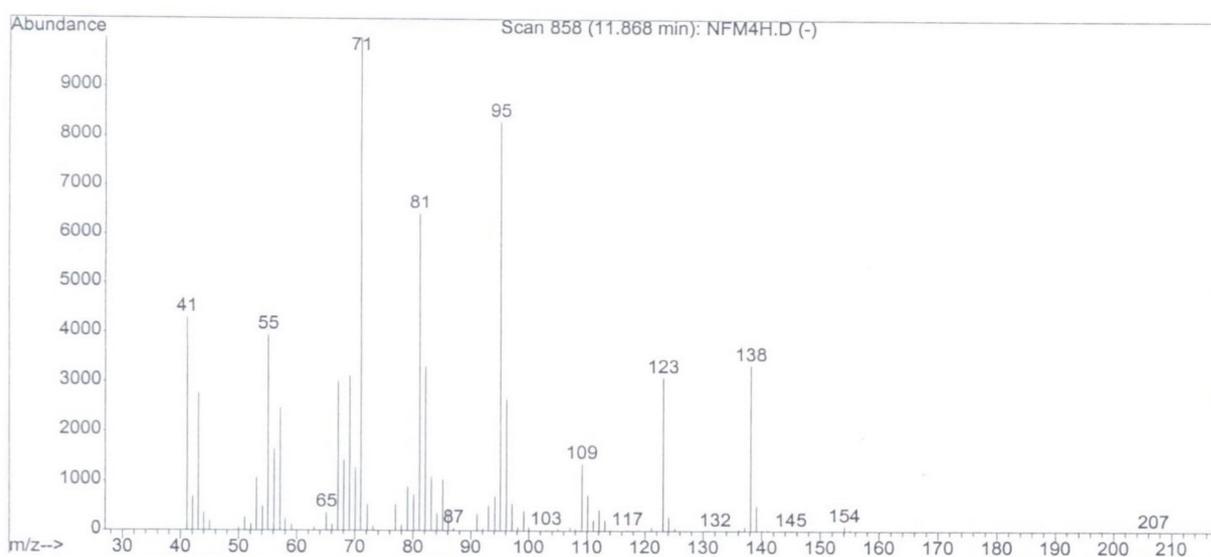
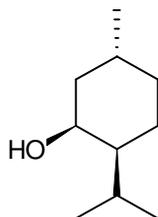


Figura 28 – Espectro de massa do neomentol

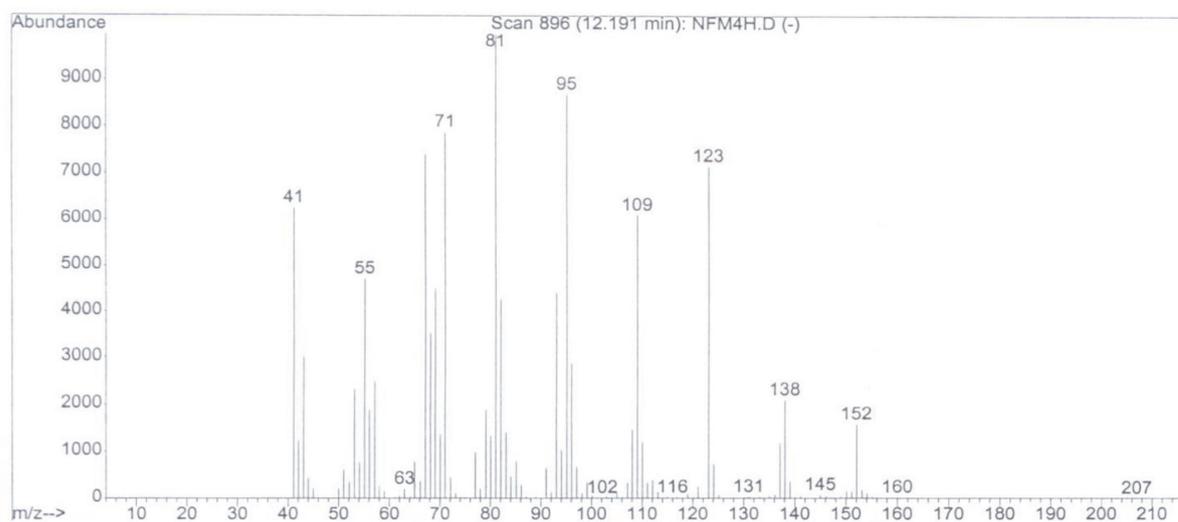
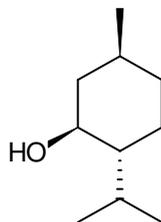


Figura 29 – Espectro de massa do mentol

A análise detalhada de todos os compostos presentes no óleo essencial da *C. angustifolia* em diferentes épocas do ano, encontra-se na Tabela 2. Foram identificados vinte e dois compostos (22), representando cerca de 95,41% a 98,01% do total presente na planta.

Os compostos oxigenados foram encontrados em maior quantidade (inverno- 77,04%, primavera- 84,19%, verão- 82,22% e outono- 76,27%). Através da análise sazonal verificou-se que os períodos com menor temperatura apresentaram aumento na concentração de compostos não-oxigenados (inverno- 18,77%, primavera- 13,82%, verão- 13,30% e outono- 19,14%).

Observando a Tabela 2, verifica-se que independente da época de coleta, o monoterpene pulegona apresenta-se como composto majoritário, apenas variando a concentração. A estação da primavera apresenta a maior concentração deste monoterpene (inverno – 56,50%, primavera – 72,34%, verão – 64,10% e outono – 56,0%). A pulegona é monoterpene encontrado principalmente no gênero *Mentha* (LORENZO *et al.*, 2002 e AGRELO DE NASIFFF, 2002), e em algumas espécies a alta concentração de pulegona, pode apresentar efeito abortivo e hepatotóxico (AGRELO DE NASIFFF, 2002).

Os terpenos isomentona e neo-mentol em relação ao período da primavera apresentaram suas menores concentrações, contribuindo para o aumento da concentração da pulegona. O período do outono e inverno demonstraram aumento significativo na concentração do  $\beta$ -cariofileno e biciclogermacreno, aumentando desta forma a concentração dos sesquiterpenos.

A análise da variação sazonal do óleo essencial da *C. angustifolia* permite melhor aproveitamento da espécie, de acordo com os fins biológicos e/ou aromáticos necessários, no nosso caso, ação tóxica frente ao *A. diaperinus*.

Considerando os resultados publicados sobre o óleo essencial de *C. angustifolia*, Bordignon *et al.* (1999) verificaram dois diferentes quimiotipos desta espécie, tendo como compostos majoritários o sabineno (41,4%) e o óxido-de-*trans*-piperitona (42,4%). Estes resultados foram completamente diferentes do nosso estudo, onde observamos a pulegona como composto majoritário em todas as épocas de coleta. Nosso trabalho apresenta semelhança ao já descrito por Moreira e Krambeck (1976), que determinou, também a pulegona como composto majoritário, porém com concentração inferior a 50%.

Estes resultados demonstram que há uma relação significativa entre a composição química e a origem geográfica da espécie *C. angustifolia*.

Tabela 2 : Composição química do óleo essencial de *C. angustifolia*

Compostos	I.K	Inverno	Primavera	Verão	Outono
$\alpha$ -tujeno	991	0,01	0,01	0,02	0,01
$\alpha$ -pineno	939	0,34	0,40	0,54	0,38
sabineno	976	1,71	1,60	2,67	1,88
$\beta$ -pineno	980	0,41	0,51	0,46	0,41
mirceno	990	0,07	0,25	0,34	0,17
orto-cimeno	1020	0,04	0,03	0,02	0,02
limoneno	1031	1,09	2,56	1,19	1,19
isomentona	1163	11,20	7,45	9,10	11,00
neo-mentol	1165	5,73	0,91	3,80	5,62
mentol	1173	3,58	3,47	5,20	3,63
pulegona	1241	56,50	72,34	64,10	56,0
acetato-bornil	1275	0,03	0,02	0,02	0,02
$\delta$ -elemeno	1339	0,47	0,52	0,19	0,50
$\alpha$ -copaeno	1370	0,20	0,11	0,21	0,20
$\beta$ -elemeno	1391	0,09	0,03	0,09	0,09
$\alpha$ -gurjuneno	1410	0,04	0,03	0,02	0,04
$\beta$ -cariofileno	1419	6,90	4,38	2,36	6,62
$\alpha$ -humuleno	1454	2,29	1,25	0,78	2,25
Allo-aromandreno	1462	1,50	0,80	0,72	1,61
germacreno D	1480	0,14	0,30	0,12	0,14
biciclogermacreno	1497	3,32	1,0	0,54	3,80
$\delta$ -cadineno	1520	0,05	0,04	0,03	0,03

I.K : Índice de Kovat's determinado em coluna SE-54.

## 4.2 Atividade antimicrobiana

O óleo volátil da *C. angustifolia* foi testado frente a nove cepas de bactérias, e apresentou atividade contra seis delas (Tabela 3), sendo que a maior atividade foi frente a bactérias Gram-negativas. Acredita-se que esta ação mais efetiva deve-se ao fato de que as Gram-negativas apresentam uma camada de peptídeoglicano de menor espessura.

Tabela 3. Biauotografia do óleo volátil de *C. angustifolia*

<b>Bactéria Gram-positiva</b>	<b>Massa do óleo volátil de <i>C. angustifolia</i></b>
<i>Micrococcus</i> sp.	negativo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	32 µg
<i>Enterococcus faecalis</i>	64µg
<b>Bactéria Gram-negativa</b>	<b>Massa do óleo volátil de <i>C. angustifolia</i></b>
<i>Escherichia coli</i>	negativo
<i>Shigella flexnerii</i>	3,2µg
<i>Enterobacter</i> sp.	32µg
<i>Proteus mirabilis</i>	32µg
<i>Salmonella</i> sp.	32µg

A bactéria *Shigella flexnerii* foi a mais sensível frente ao óleo essencial da *C. angustifolia*. Esta bactéria é responsável pela shigelose, que causa diarreia hemorrágica, infecção e ulcerações intestinais (BURT, 2004).

O óleo apresentou atividade frente a *S. aureus*, bactéria responsável por pneumonia em frangos. A mesma concentração (32µg) do óleo essencial da *C. angustifolia* foi efetiva contra *Salmonella* sp. Esta bactéria apresenta maior importância na avicultura devido ao risco de contaminação alimentar em seres humanos (CHERNAKI-LEFFER *et. al.* 2002).

Segundo Despins *et al.* (1987), *A. diaperinus* é um importante vetor da leucose aviária. Em trabalho descrito por Chernaki-Leffer *et. al.* (2002), foram encontradas bactérias como *Proteus mirabilis* e *Proteus vulgares*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp, *Citrobacter* e *L. pneumoniae*, nos insetos (cascudinho) e na cama de aviário. Como o óleo volátil apresentou efeito *in vitro* sobre algumas destas espécies, acredita-se que o uso do óleo de *C. angustifolia*, além de apresentar ação inseticida, pode diminuir a proliferação de bactérias patogênicas no aviário, contribuindo assim para a saúde do frango.

### 4.3 Ação inseticida do óleo de *C. angustifolia* contra *A. diaperinus*, em laboratório

O ensaio laboratorial contra o *A. diaperinus* foi realizado simultaneamente entre adultos e larvas no período de 25 de outubro a 25 de novembro. Os dados analisados são dos primeiros cinco dias, no restante do período foram observadas as testemunhas para garantir que as condições do experimento eram ideais.

Em adultos os testes utilizando as concentrações de 10 % e 5 % foram efetivos nas primeiras 24 horas (Figura 30), sendo que com 10 % após 30 minutos já não havia nenhum indivíduo vivo e com 5 % após uma hora todos já haviam morrido. Isto representa uma alta toxicidade do óleo da *C. angustifolia* frente ao *A. diaperinus*.

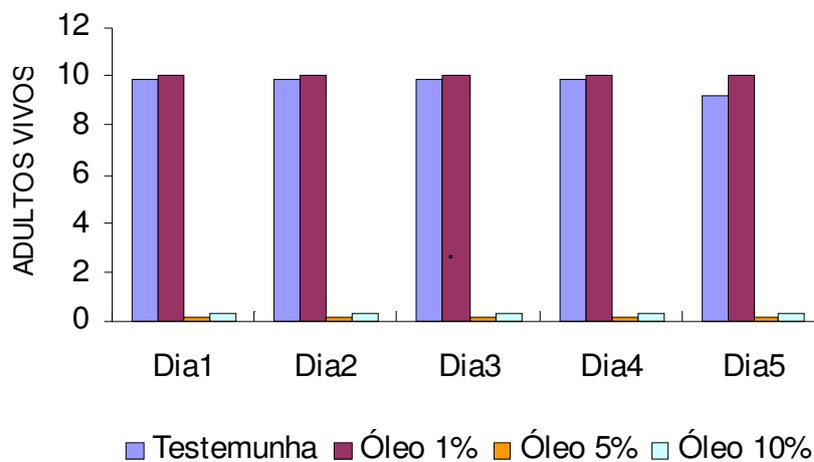


Figura 30 – Número de adultos vivos de *A. diaperinus* em teste realizado em laboratório

Esta alta toxicidade, acredita-se ser decorrente dos terpenos presentes no óleo essencial, principalmente a pulegona. Sabe-se que a pulegona, apresenta ação hepatotóxica (AGRELO DE NASSIFF *et al.*, 2004; SIMAS *et al.*, 2003), e em alguns estudos *in vivo* com ratos, este terpeno demonstrou toxicidade no fígado e bile, o que ocorre em humanos também. O metabolismo da pulegona (Figura 31) pode levar à formação de mentofuranos, que apresentam alta toxicidade (SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 2002).

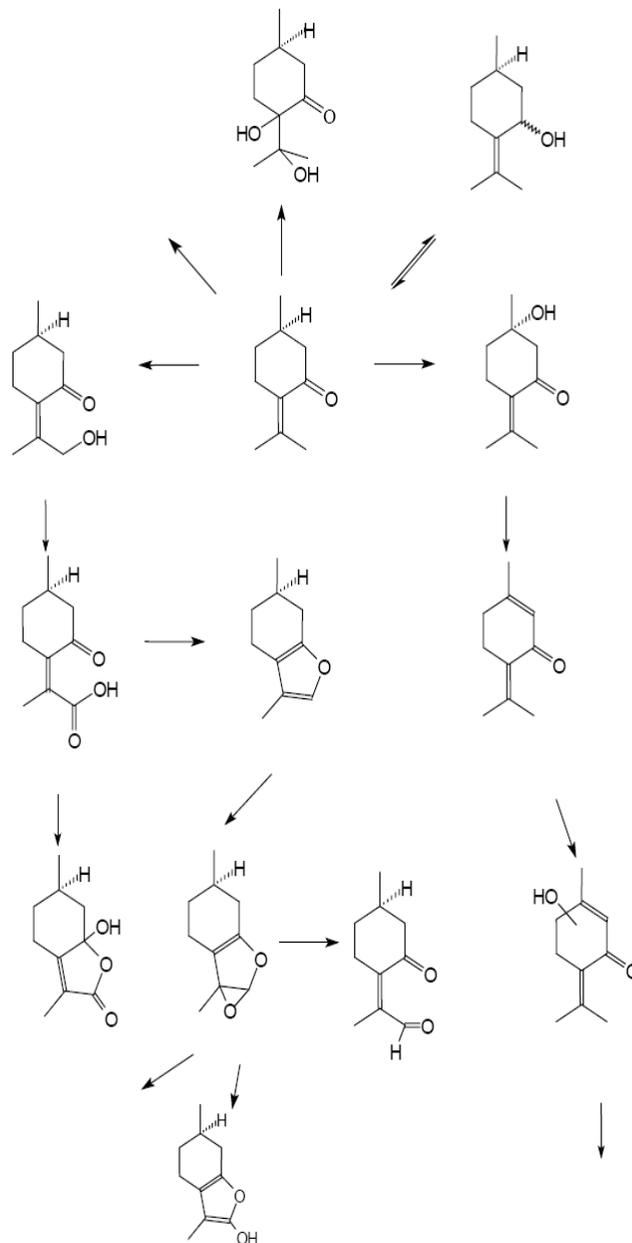


Figura 31 – Metabolismo da pulegona

Como foi observado no período de uma hora, os testes de 5 % e 10 % de concentração de óleo essencial apresentaram eficiência de 100 % em adultos sem diferença significativa.

Em estudo realizado com o monoterpene pulegona observou-se que frente ao *Tyrophagus putrescentiae* o monoterpene apresentou toxicidade DL90 de 14 µg/L (SÁNCHEZ-RAMOS, 2000) e 50 µg/mL, DL100 sobre *Sitophilus oryzae*, *Tribolium castaneum*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Musca domestica* e *Blattella germanica* (LEE, et al., 2002). Resultado semelhante foi encontrado para o α-pineno e canfeno (monoterpenos não oxigenados) frente a *Rhyzophagos dispar*, *Formica rupa* e *Tenebrio molito* (VIEGAS, 2003).

Como neste trabalho o óleo apresenta maior concentração de monoterpenos não oxigenados, acredita-se que esta ação tóxica é devida à concentração dos terpenos oxigenados.

Porém, o teste com a concentração de 1% igualou-se estatisticamente com a testemunha.

Já para as larvas de último instar obteve-se 83 %, 98 % e 100 % de eficiência para as concentrações de 1 %, 5 % e 10 %, respectivamente.

De acordo com a Figura 32, observa-se que todas as concentrações utilizadas apresentaram atividade no controle das larvas de *A. diaperinus*.

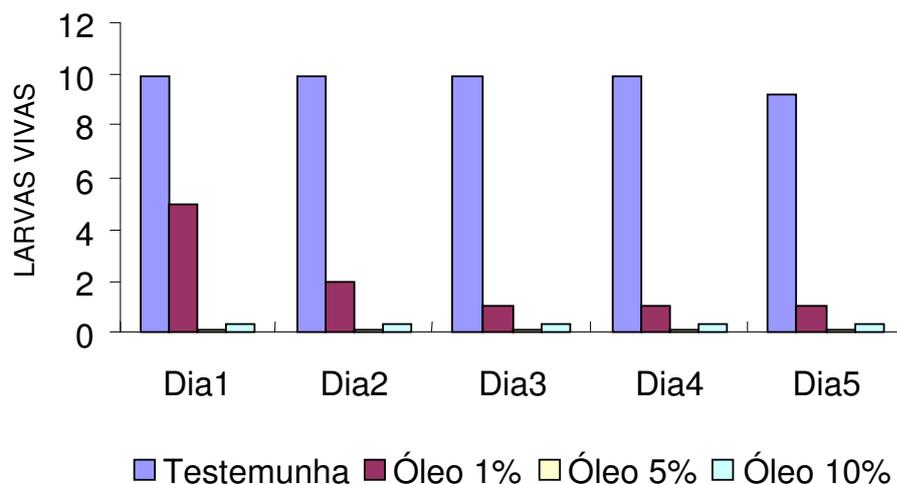


Figura 32 – Número de larvas vivas de *A. diaperinus* em teste realizado em laboratório

A Tabela 4 apresenta os valores médios de indivíduos vivos, de acordo com o Teste de Duncan, ao nível de significância de 5 e 1 %. As concentrações mais eficientes tanto para larvas, quanto para adultos foram 5 e 10 %.

A partir destes resultados optou-se em aplicar em campo a concentração de 10 % com apenas uma aplicação e a concentração de 5 % com uma e duas aplicações.

Tabela 4. Valores médios de indivíduos vivos. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5 % pelo Teste de Duncan

Tratamentos	Médias	
	Larvas	Adultos
Testemunha	3,26 <sup>a</sup>	3,29 <sup>b</sup>
Óleo 1%	1,63 <sup>b</sup>	3,31 <sup>a</sup>
Óleo 5%	1,09 <sup>c</sup>	1,00 <sup>c</sup>
Óleo 10%	1,00 <sup>c</sup>	1,00 <sup>c</sup>

#### 4.4 Ação inseticida do óleo de *C. angustifolia* contra *A. diaperinus*, em campo

O experimento foi realizado no período 30 de novembro de 2005 a 22 de janeiro de 2006. Período de temperatura média de 26,8°C (controle realizado dentro do aviário).

Após a análise em laboratório, o trabalho a campo, reproduz os problemas causados com a presença do cascudinho no aviário, e o real efeito do óleo essencial da *C. angustifolia* no combate do mesmo, com todas as variáveis possíveis.

Neste caso foram observadas a maioria das condições que pudessem garantir uma melhor reprodutibilidade das condições normais na criação de frangos. Por se tratar de pesquisa a campo, as variáveis são conduzidas a valores desejados, porém não são manipuladas como em testes laboratoriais. Isto fica claro ao observar os coeficientes de variação, que no teste a campo foram muito mais elevados.

A Tabela 5 apresenta as médias encontradas e o erro padrão no final do experimento (50 dias) para cada tratamento.

Tabela 5. Valores médios de indivíduos vivos seguido pelo erro padrão. Nível de significância de 5 % pelo Teste de Tukey, para letras diferentes

Tratamentos	Médias	
	Larvas	Adultos
Testemunha	1937,33 <sup>c</sup> ± 549,49	97,66 <sup>c</sup> ± 52,72
Óleo 5 %	896,00 <sup>b</sup> ± 121,17	39,66 <sup>b</sup> ± 14,81
Óleo 5 % aplicado 2 vezes	354,00 <sup>a</sup> ± 108,00	10,66 <sup>a</sup> ± 4,80
Óleo 10 %	564,33 <sup>d</sup> ± 140,96	162,00 <sup>c</sup> ± 82,20

Mesmo com estas diferenças foi possível observar o efeito do óleo essencial da *C. angustifolia* sobre o *A. diaperinus* e seu potencial como inseticida natural.

A primeira análise realizada foi referente as larvas vivas nas cinco armadilhas colocadas em cada box (cada teste teve 3 repetições). Observa-se na Figura 33 que no início do experimento não houve diferença significativa entre os testes e a testemunha, porém no final de 50 dias, observa-se diferença significativa entre os testes e a testemunha, sendo o Teste 2 (concentração de 5 % aplicado 2 vezes) o de maior eficiência.

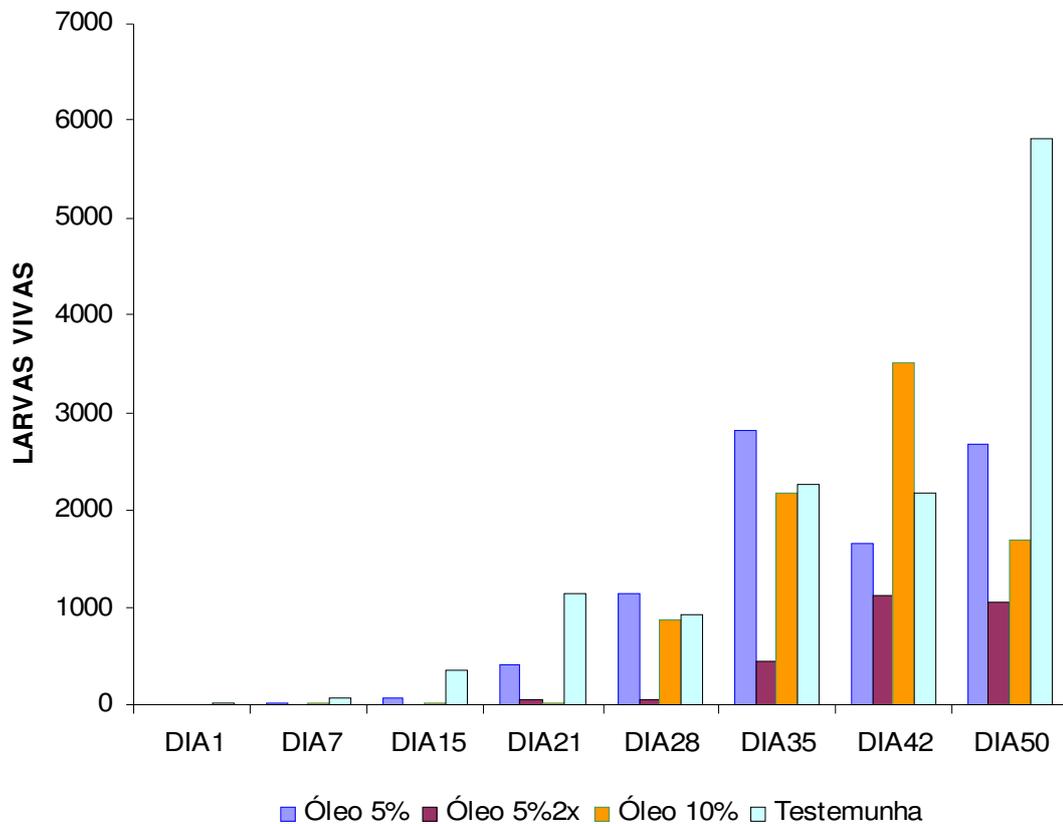


Figura 33 – Número de larvas vivas de *A. diaperinus* em teste realizado em campo, avaliado durante o período de 50 dias

Ao longo do período, observa-se que ocorre flutuação do número de larvas vivas o que pode demonstrar a locomoção dos indivíduos dentro do box, o consumo destes insetos pelas aves e a presença de larvas mortas, conforme mostra a Figura 34.

Observa-se que o Teste 2 (concentração de 5 % aplicado 2 vezes) contribuiu para a diminuição de larvas vivas (Figura 34), conseqüentemente aumentou o número de larvas mortas. Nos demais testes o número de larvas mortas foi semelhante e variou relativamente em comparação ao número de larvas vivas.

Outro dado importante é observar que a partir do 15º dia o Teste 2 aumentou o número de larvas mortas, isso ocorreu devido a segunda aplicação do óleo na cama do aviário.

Neste experimento mesmo que no 50º dia estatisticamente não houve diferença estatística entre os testes e a testemunha, a diferença significativa entre o 15º e o 28º dia (Testemunha e Teste 2) garantiram a diminuição do *A. diaperinus*.

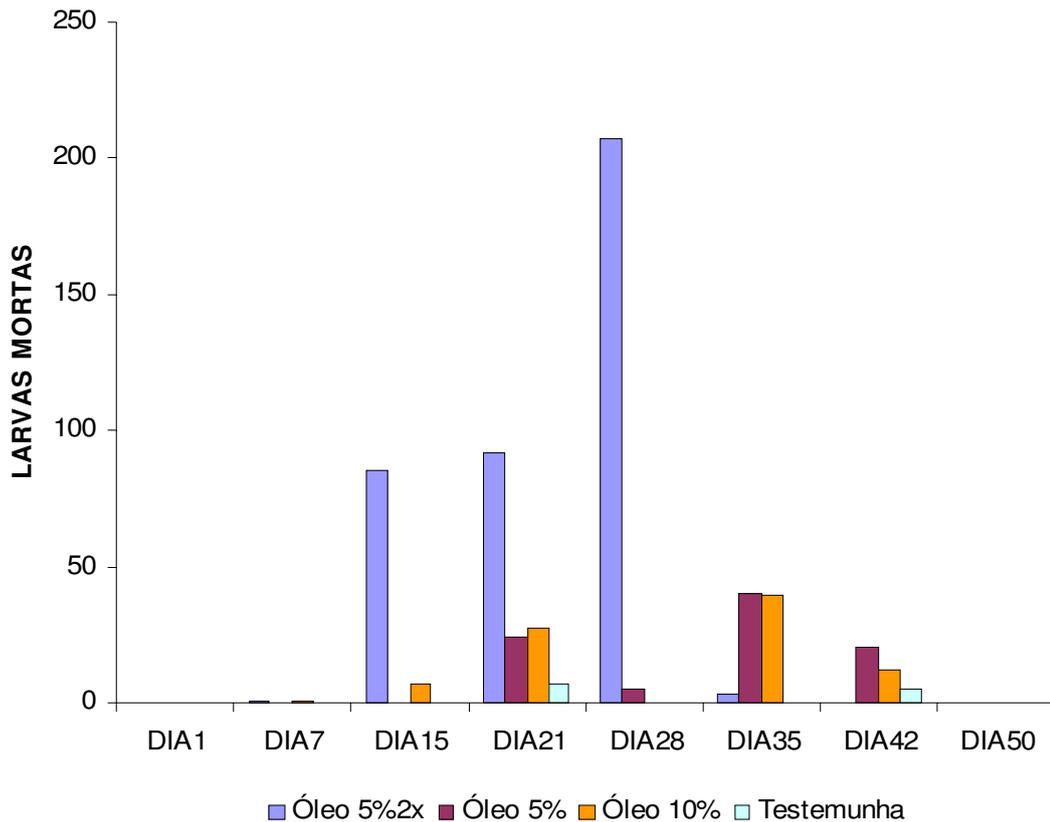


Figura 34 – Número de larvas mortas de *A. diaperinus* em teste realizado em campo

Analisando o número de indivíduos adultos vivos (Figura 35) observa-se que o Teste 2 (concentração de 5% aplicado duas vezes) também foi o mais eficiente, porém, diferente das larvas, igualando-se estatisticamente com o Teste 1 (concentração de 5% com apenas uma aplicação). Em indivíduos adultos o Teste 3 (concentração de 10%) não apresentou eficiência igualando-se estatisticamente com a Testemunha.

O que se observa é que o óleo com menor concentração tem ação mais efetiva contra o indivíduo adulto do que o com maior concentração.

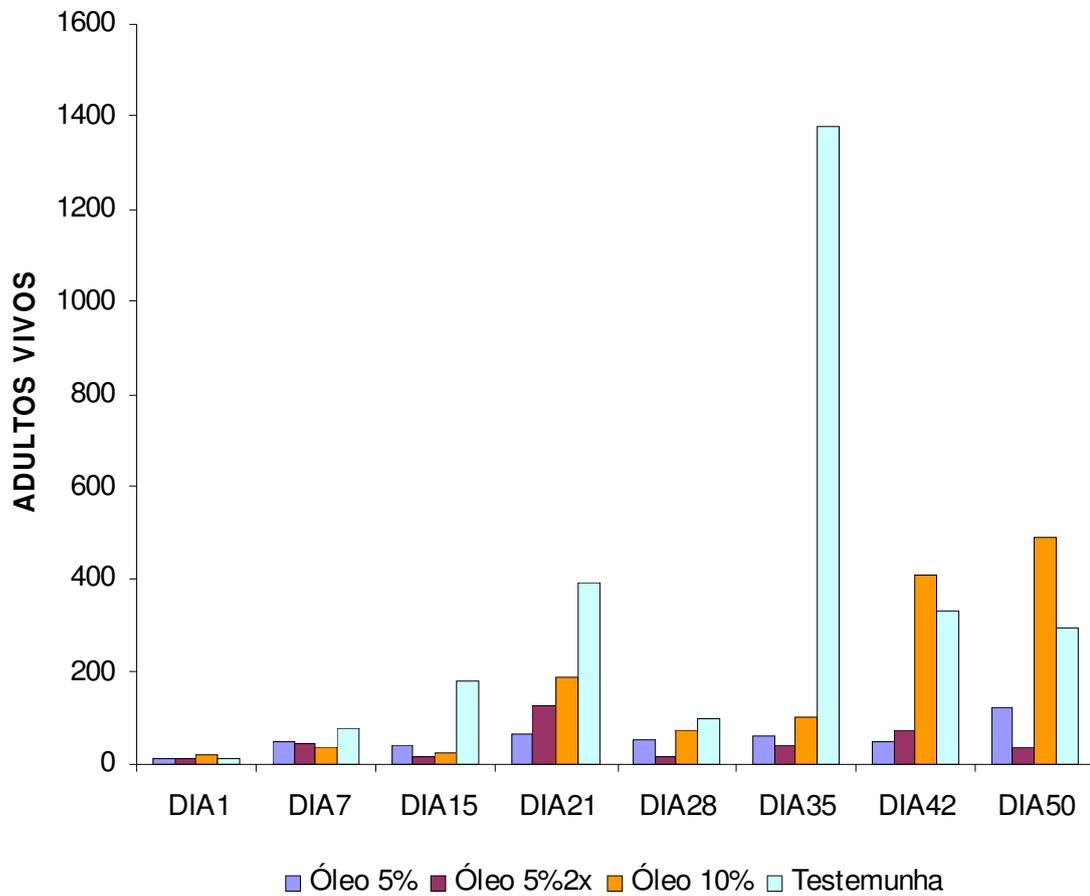


Figura 35 – Número de adultos vivos de *A. diaperinus* em teste realizado em campo

A variação do número de indivíduos vivos presentes em cada dia de contagem explica-se pela flutuação da dinâmica populacional. Além de servirem de comida aos frangos e migrarem de um box para outro.

Aplicar o óleo duas vezes aumentou o tempo de duração do produto na cama do aviário, o que garantiu que o número de indivíduos permanecesse baixo durante os 50 dias da avaliação (período em que os frangos foram armazenados e recolhidos para abate). Porém a aplicação com 5 % de óleo apenas uma vez também garantiu estabilidade.

A segunda aplicação ocorreu com a presença dos frangos no aviário. Estes não apresentaram nenhuma alteração em decorrência disto. Deste modo, aplicar o produto mais que uma vez garante que sua ação seja mais prolongada.

Ao comparar o número de indivíduos adultos mortos, observa-se que no período em

que o óleo foi aplicado pela segunda vez ocorreu aumento de adultos mortos (Figura 36), como já foi observado com relação às larvas, porém não observa-se uma eficiência significativa no final dos 50 dias.

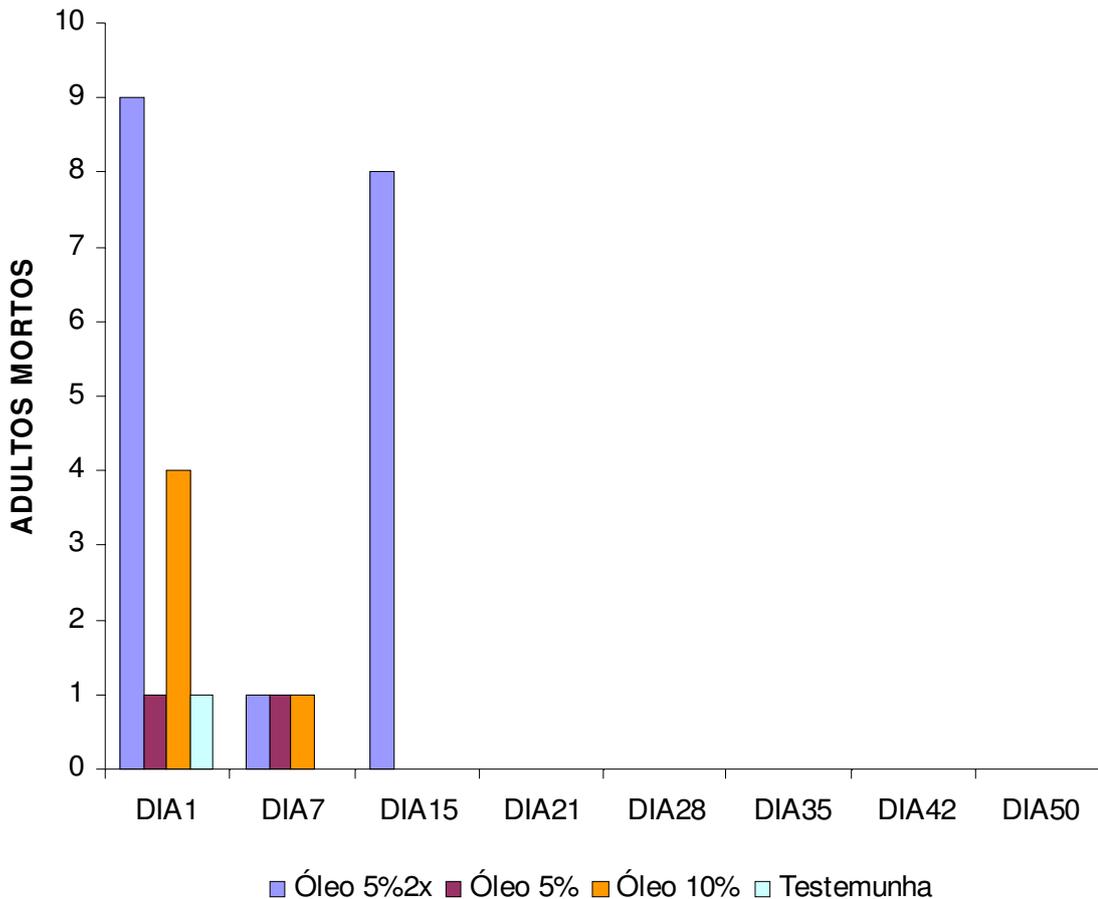


Figura 36 – Número de adultos mortos de *A. diaperinus* em teste realizado em campo

A eficiência só é observada quando é realizada a análise de indivíduos vivos. Porém, o aumento de indivíduos mortos contribui na análise final, pois quando há mais mortos, conseqüentemente há mais vivos.

Analisando o trabalho de forma global, ou seja, o resultado no 50º dia, observa-se que o óleo da *C. angustifolia* apresentou um resultado positivo, pois diminuiu a quantidade de *A. diaperinus* na cama do aviário, impedindo o desenvolvimento de larvas e matando os indivíduos presentes.

A eficiência do óleo da *C. angustifolia* frente aos indivíduos adultos (Tabela 6) foi de

77,73 % na concentração de 5 % aplicado duas vezes e 70,64 % na concentração de 5 % com apenas uma aplicação, com igualdade estatística e coeficiente de variação de 42,66 %. Apesar do coeficiente de variação ser relativamente alto, é aceitável em experimentos à campo, onde trabalha-se com indivíduos vivos que se reproduzem e locomovem-se. O tratamento na concentração de 10 % obteve insignificância estatística sendo eficiente apenas 27,94 %. Isto comprova que concentrações mais elevadas do óleo da *C. angustifolia* perdem o efeito inseticida esperado.

Para as larvas de último instar obteve-se eficiência de 86,26% para a concentração de 5 % com duas aplicações. Para as concentrações de óleo 5 % com uma aplicação e 10 % obteve-se eficiência de 46,26 % e 49,94 % respectivamente, em igualdade estatística. O coeficiente de variação obtido foi de 39,19 % (Tabela 6).

Tabela 6 - Eficiência do óleo da *C. angustifolia* frente ao *A. diaperinus* em teste realizado em campo.

Tratamentos	% de eficiência	
	Larvas	Adultos
Óleo 5%	46,26	70,64
Óleo 5% com 2 aplicações	86,26	77,73
Óleo 10%	49,94	27,94
Coefficiente de variação	39,19	42,66

A eficiência encontrada para os óleos frente ao *A. diaperinus*, pode ser pela toxicidade apresentada pela pulegona (composto majoritário), com concentração de 72,3% no óleo de *C. angustifolia*.

A pulegona está dentro da classe dos terpenos, que são compostos de importância ecológica como defensivos de plantas. Dos compostos presentes no óleo essencial da *C. angustifolia*, mentol, pulegona, isomentol e neomentol, todos apresentam a mesma rota biossintética (HARBONE, 1993) e são utilizados na indústria alimentícia como flavorizantes (SPEIJERS, 2006).

Aparentemente sua ação inseticida seria decorrente da inibição da acetilcolinesterase nos insetos, o que já foi observado para a 1,2-epóxi-pulegona, tida como principal agente inseticida de *Lippia stoechadoifolia* (Verbenaceae) (GODFREY, 1994).

## 5 CONCLUSÕES

O estudo do óleo volátil da *Cunila angustifolia* no controle de *Alphitobius diaperinus*, apresentou resultados satisfatórios contribuindo para o uso de produtos naturais com potencial inseticida.

Em relação à composição química do óleo o monoterpeno pulegona apresenta-se como composto majoritário, independente da estação de coleta. Isto garante a toxicidade esperada da planta.

Foi possível detectar atividade antimicrobiana frente a seis dos nove microrganismos estudados: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella flexnerii*, *Enterobacter* sp., *Proteus mirabilis* e *Salmonella* sp. Esta atividade garante a diminuição de microrganismos patogênicos veiculados pelo *A. diaperinus*.

Em ensaio laboratorial o óleo da *C. angustifolia* apresentou eficiência de 100 % contra indivíduos adultos e larvas de *A. diaperinus*.

Em campo o óleo essencial de *C. angustifolia* apresentou eficiência significativa de 77,73 % e 70,64% para adultos, nos testes com concentração de 5 % aplicado duas vezes e concentração de 5 % aplicado uma vez, respectivamente.

Observou-se que o teste em campo não reproduz os testes laboratoriais, o que demonstra que mais estudos serão necessários, tais como: outras formas de aplicação do óleo, teste de reuso da cama de aviário e mecanismo de fixação do óleo.

## 6 REFERÊNCIAS

- ABOTT, W.S. A method for computing the effectiveness of an insecticide. **J. Econ. Entomol.** v. 18, p. 265-167. 1925.
- ADAMS, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA.** 1995.
- AGARWAL, M.; WALIA, S.; DRINGRA, S.; KHAMBAY, B. P. S. Insect growth inhibition, antifeedant and antifungal activity of compounds isolated/derived from *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) rhizomes. **Pest Management Science**, Sussex, v. 57, n. 3, p. 289-300, mar. 2001
- AGRELO DE NASSIFF, A. E.; RICCIARDI, G. A. L.; TORRES, A. M.; RICCIARDI, A. I. A. Aceite esencial de *Mentha pulegiom* L. Comunicaciones científicas y tecnológicas, 2002. Disponível <[www.google.com](http://www.google.com)> Acesso em: 02/03/2007.
- ALVES, L. F. A., ROHDE, C., ALVES, V. S. Patogenicidade de *Steinernema glaseri* e *S. Carpocapsae* (Nematoda: Rhabdita) contra o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**. v. 34 n. 1. Londrina Jan/Fev, 2005.
- ALVES, L. F. A.; ALVES, V. S.; BRESSAN, D. F.; NEVES, P. M. O. J.; ALVES, S.B. Ocorrência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em adultos de cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) Coleoptera: Tenebrionidae) em aviários comerciais em Cascavel, PR. **Neotropical Entomology**. nov-dez 2004.
- ANTUNES JÚNIOR, D. **Farmácia de manipulação: noções básicas.** 1ª ed. São Paulo: Tcnopress, 140p. 2002.
- ARGANDOÑA, V.; DEL POZO, T.; SAN-MARTÍN, A.; ROVIROSA, J. Insecticidal activity of *Plocamium cartilagineum* monoterpenes. **Boletim de la Sociedad Chilena de Química**, Concepción, v. 45, n. 3, 2000.
- BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil.** Viçosa:Universidade Federal de Viçosa, v. 3, p. 98-118. 1986.
- BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. **Common fragrance and flavor materials: prepatation, properties and uses.** Wiley-VCH, Weinheim, p.293. 2001.
- BERNARDI, P. L. Programa para controle do cascudinho. **Simpósio Brasileiro de Avicultura.** Chapecó: N. Print, p. 149-151. 2000.
- BORDIGNON, S. A. de L., MONTANHA, J. A., SCHENKEL, E. P. Flavones and flavonones from South American *Cunila* species (Lamiaceae). **Biochemical systematics and**

**ecology**. v. 31, pg. 785-788. 2003.

BORDIGNON, S.A.L., SCHENKEL, E.P., SPITZER, V. The essential oil composition of *Cunila microcephala* and *Cunila fasciculata*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7 p.1283-1286, 1997.

BORDIGNON, S.A.L., SCHENKEL, E.P., SPITZER, V. The essential oil composition of *Cunila menthoides* Benth (Lamiaceae). **J. Essent. Oil. Res.**, v. 10, p.317-320, 1998.

BORDIGNON, S.A.L., SCHENKEL, E.P., SPITZER, V. The essential oil composition of *Cunila angustifolia* (Lamiaceae). **J. Essent. Oil. Res.**, v. 11, p.145-148, 1999.

BOUDA, H.; TAPONDJOU, A. L.; FONTEM, D. A.; GUMEDZOE, M. Y. D. Effect of essential oils from leaves of *Ageratum conyzoides*, *Lantana camara* and *Chromolaena odorata* on the mortality of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 103-109, Apr. 2001.

BOWERS, W. S.; OHTA, T.; CLEERE, J. S.; MARSELLA, P. A. Discovery on insect anti-juvenile hormones in plants. **Science**, Washington, v. 193, n. 4253, p. 542-547, 1976.

BRUNHEROTTO, R.; VENDRAMIM, J. D. Bioatividade de extratos aquosos de *Melia azedarach* L. sobre o desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em tomateiro, **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 455-459, July/Sept. 2001.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **Review**. 2004.

CAVALCANTE, G. M., MOREIRA, A. F. C., VASCONCELOS, S. D. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília: v. 41, n1, p. 9-14. jan, 2006.

CHERNAKI, A. M., ALMEIDA, L. M. de. Morfologia dos estágios imaturos e do adulto de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera, Tenebrionidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 18. n. 2, p. 351-363, 2001a.

CHERNAKI, A. M., ALMEIDA, L. M. de. Exigências térmicas, período de desenvolvimento e sobrevivência de imaturos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera, Tenebrionidae). **Neotropical entomology**: Londrin, v. 30 n. 3, set: 2001b.

CHERNAKI-LEFFER, A.M., S.M. BIESDORF, L.M. ALMEIDA, E.V.B. LEFFER e F. VIGNE.. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no Oeste do Estado do Paraná, Brasil. **Revta bras. Ciência Avícola**. n. 4. p. 243-247. 2002.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2 ed. Lisboa: Fundação Calauste Gulbenkian,. 135p. 1994.

- CRAWFORD, P. J., BROOKS, W. M., ARENDS, J. J. Efficacy of field-isolated strains of *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) as microbial control agents of the lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal Econ. Entomology**. v. 9, p. 1295-1301. 1998.
- DESPINS, J. L.; TERNER JUNIOR, C.; RUSZLER, P. L. Constructions profiles of high rise caged layer houses in association with insulation damage caused by the lesser mealworm, *A. diaperinus* (Panzer) in Virginia. **Poultry Science**. v.66. p. 243-250. 1987.
- DEY, P.M.; HARBONE, J. B. **Plant biochemistry**. London: Academic Press, 529p. 1997.
- ECHEVERRIGARAY, S. FRACARO, F., SANTOS, A. C. A. dos., PAROUL, N., WASUM, R., SERAFINI, L. A. Essential oil composition of south Brazilian populations of *Cunila galioides* and its relation with the geographic distribution. **Biochemical systematics and ecology**. v. 31. p. 467-475. 2003.
- EPLING, C. **Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis**. Beiheft II 85, p. 97, 1937.
- FAO - Food and Agriculture Organization of United Nations. FAOSTAT Database Collections. Disponível na internet. URL: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 26/jun/2005.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E. et al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. v. 10, 920 p.
- GIROTTI, A. F., MIELE, M. **Estudos da Embrapa** - Situação atual e tendências para a avicultura de corte nos próximos anos. Redação AI (Edição 1129/2004)
- GODFREY, C. R. A. **Agrochemical from natural products**. Marcel Dekker, Inc., New York, 1994.
- GOMES, J. P. C. Controle de *Alphitobius diaperinus* em aviários. **Simpósio Brasileiro de Avicultura**. Chapecó: N. Print, p. 141-147. 2000.
- GONÇALVES, M. E. C.; OLIVEIRA, J. V.; BARROS, R.; TORRES, J. B. Efeito de extratos vegetais sobre estágios imaturos e fêmeas adultas de *Mononychellus tanajoa* (Bondar) (Acari:Tetranychidae). **Neotropical Entomology, Londrina**, v. 30, n. 2, p. 305-309, apr./jun 2001.
- GUENTHER, E. **The essential oils**. D. Van Nostrand, New York, 1948.
- HARBONE, J. B. **Ecological biochemistry**. 4. ed. London: Academic, Press 1993.
- HILL, A. F. Botânica econômica: **plantas úteis y productos vegetales**. Barcelona: Omega., p. 26-523. 1965.

HUANG, Y.; HO, S. H.; LEE, H. C.; YAP, Y. L. Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 403-412, 2002.

ISMAN, M. B.; WAN, A. J.; PASSREITER, C. M. Insecticidal activity of essential oils to the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*, **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 72, n. 1, p. 65-68, jan. 2001.

JOLY, A. B. Botânica: **introdução à taxonomia vegetal**. 3.ed. São Paulo:Nacional, v. 4, p. 571-586. 1976.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 550p. 2000

LAWRENCE, J. F.; E. B. BRITTON. Coleoptera (beetles). In C.S.I.R.O. (ed.), **Insects of Australia**. 2. ed. v. 2, p.543-683. Carlton: Melbourn University Press. 1991.

LEE, S.; PETERSON, C. J.; COATS, R. R. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. **Journal of Stored Products Research**. v. 39. p. 77-85. 2003.

LORENZO, D.; PAZ, D.; DELLACASSA, E.; DAVIES, P.; ROSER, V.; CAÑIGUERAL, S. Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Dez, v. 45. n. 4. p. 519-524. 2002.

MAC FADIN, J. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. 3ed. USA, Lippincott Williams & Wilkins, 912p. 2000.

MACHADO, V. L. L.; PALMA, M. S.; OLIVEIRA, M. da C. Ação Repelente de óleos essenciais da folha de louro (*Laurus nobilis* L.) em ninfas e adultos de *Periplaneta americana* (L.) (Blattaria: Blatitidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Piracicaba, v. 24, n. 1, p. 13-20, abr. 1995.

MANABE, A; NAKAYAMA, S.; SAKAMOTO, K. Effects of essential oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and dipalitoyl phosphatidylcholine-liposomes. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 44, p. 77-84. 1987.

MANNS, D. Linalool and cineole type glucosides from *Cunila spicata*. **Phytochemistry**. v. 39, n. 5. p. 1115 – 1118. 1995.

MASSADA, Y. **Analysis of Essential Oil by Gas Chromatography and Spectrometry**. John Wiley& Sons: New York, 1976.

MATIAS, R. S. Cascudinho. **Zeneca**: informativo. Jun, 2 p. 1999.

MATIAS, R. S. Controle de *Alphitobius diaperinus* em piso e cama de aviários. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília. Jan, v. 27. p. 205-207. 1992.

MIGUEL, M. S. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe, p. 98. 1999.

MORAIS, A. A. de; REZENDE, C. M. A. da M.; VON BÜLOW; MOURÃO, J. C.; NAKATANI, M.; JAMES, J. C.; NAKANISHI, K. Isolation and structure of trichilins, antifeedants against the southern army worm. **Journal of American Chemistry Society**, Washington, v. 103, n. 5, p. 1228-1230, 1981.

MOREIRA, E.A., KRAMBECK, R. Análise cromatográfica de óleo essencial das folhas de *Cunila angustifolia* Benth. Labiatae. **Tribuna Farmacêutica**, v. 44, p. 50-59, 1976.

MOYLER, D. A. CO<sub>2</sub> extraction and other new technologies: an update on commercial adoption. **International Federation of Essential Oils and Aroma Trades-21<sup>st</sup> International Conference on Essential Oils and Aroma's**. IFEAT, London, p. 33-39. 1998.

NUGROHO, B. W.; EDRADA, R. A.; GUSSREGEN, B.; WRAY, V.; PROKSCH, P. Inseticidal rocaglamide derivatives from *Aglaia duppereana*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 44, n. 8, p. 1455-1461, apr. 1997.

OLIVEIRA, J. V.; VENDRAMIM, J. D. Repelência de óleos essenciais e pós vegetais sobre adultos de *Zabrotes subfasciatus* (Boh) (Coleoptera: Bruchidae) em sementes de feijoeiro. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 28, n. 3, p. 549-556, dez. 1999.

OOSTERHAVEN, K.; POOLMAN, B.; SMID, E. J. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. **Industrial Crops and Products**. v. 4,. p. 23-31. 1995.

PACKIYASOTHY, E. V.; KYLE, S. Antimicrobial properties of some herb essential oils. **Food Australia**. v. 54, p. 384-387. 2002.

PAIVA, D. P. Cascudinho: Biologia. **Simpósio Brasileiro de Avicultura**. Chapecó: N. Print, p. 133-139. 2000.

PANIZZI, A. R., PARRA, J. R. P. **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, 359p. 1991.

PENTEADO, S. R. **Defensivos alternativos e naturais: para uma agricultura saudável**. Campinas, SP, 95 p. 1999.

RODRIGUEIRO, T. S. C. ; PRADO, A. P. Suscetibilidade de adultos de população de *A. diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) a diferentes concentrações do inseticida ciflutrina. Disponível em <[www.google.com.br](http://www.google.com.br)> Acesso em 28/05/2007.

SAFRIT, R. D. AXTELL, R. C. Evaluations of sampling methods for darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) in the litter of turkey and broiler houses. **Poultry Science**. v. 63 n.12 p. 2368-2375. 1984.

SÁNCHEZ-RAMOS, I.; CASTAÑERA, P. Acaracidal activity of natural monoterpenes on *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank), a mite of stored food. **Journal os Stored Products Research**. v. 37. p. 93-101. jan. 2000.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD. Opinion of the scientific committee on food on pulegone and menthofuran. Belgium, 2002.

SENATORE, F. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a Thyme (*Thymus pulegioides* L.) Growing Wild in Campania (Southern Italy). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 44, p. 1327 -1332. 1996.

SIMAS, N. K.; LIMA, E. da C.; CONCEIÇÃO, S. da R.; KUSTER, R. M.; OLIVEIRA FILHO, A. M. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 46-49, jan./fev. 2004.

SIMÕES, C. M. O. et al. Plantas medicinais populares no Rio Grande do Sul. 3ª ed. Porto Alegre: UFRGS, 2000.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre: Universidade, 1102p. 2003.

SIMÕES, C. M.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. da UFSC, 2004.

SPEIJERS, G. J. A. Who food additives series 46: pulegone and related substances. Section on public health, centre for substances and risk assessment, national institute of public health and the environment, bilthoven, netherlands. Disponível em 07/12/2006.

SPINOSA, H. S. ; GORNIK, S. L. ; BERNARDI, M. M. . **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 585 p. 1996.

STEELMAN, D. Beetles threaten profit by damaging house insulation, carrying diseases and reducing growth, fees efficiency. **Poultry Digest**. p.22-23. 1996.

STRAPAZZON, J. de O. Composição química e análise antimicrobiana do óleo volátil de *Annona squamosa*L. (Ariticum) Monografia de graduação (2004).

TAPONDJOU, A. L.; ADLER, C.; FONTEMC, D. A.; BOUDA, H.; REICHMUTH, C. Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* Val. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 91-102, 2005.

THOMAZINI, A. P. B. W.; VENDRAMIM, J. D.; LOPES, M. T. R. Extratos aquosos de *Trichilia pallida* e a traça-do-tomateiro. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 1, p. 13-17,

jan./mar. 2000.

USDA, ARS, Programa Nacional dos Recursos Genetic. Rede de informação dos recursos de Germplasm - Recursos nacionais laboratório de Germplasm, Beltsville, Maryland. Disponível em: <[www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/family.pl?2099](http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/family.pl?2099)> Acesso em: 26/05/2007.

VAN DE BRAAK, S. A.A.J.; LEIJTEN, G. C. J. J. Essential oils and oleoresins: a survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. **CBI, Centre for the promotion of imports from developing countries**. Rotterdam, p. 116. 1999.

VIEGAS JR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química nova**. v. 26, n. 3, p. 390-400. 2003.

VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; ANDREI, C. C. Plantas inseticidas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. da UFRGS, 1102 p. 2004.

VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; BIAVATTI, M. W. Inseticidas de origem vegetal. In: FERREIRA, J. T. B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. **Produtos naturais no controle de insetos**. São Carlos: Ed. da UFSCar, 2001. 176 p. (Série de Textos da Escola de Verão em Química, v. 3).

XIFREDA, C. C.; MALLO, A. C. Citas nuevas o críticas para la flora argentina III: *Cunila angustifolia* (Lamiaceae: Mentheae). *Darwiniana*. v.39. n. 1-2. p.175-178. 2001.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)