

CROP PROTECTION

Toxicidade do Óleo de *Piper aduncum* L. a Adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae)¹MURILO FAZOLIN², JOELMA L.V. ESTRELA³, VALDOMIRO CATANI², MARILENE S. DE LIMA^{2,4} E MARCIO R. ALÉCIO^{2,4}¹Trabalho financiado pelo CNPq²Embrapa Acre, C. postal 321, 69908-970, Rio Branco, AC, murilo@cpafac.embrapa.br³Bolsista CNPq- DCR, joelma@cpafac.embrapa.br; ⁴Bolsista CNPq/PIBIC*Neotropical Entomology* 34(3):485-489 (2005)Toxicity of *Piper aduncum* Oil to Adults of *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae)

ABSTRACT - Essential oils extracted from *Piper aduncum* L. (Piperaceae) are mainly comprised of phenylpropanoid dillapiol, a group of substances widely known by their insecticide and synergistic properties. The abundance of *P. aduncum* in the state of Acre, and the need to control the bean leaf beetle, *Cerotoma tingomarianus* Bechyné motivated this study, which examined the toxic effects of *P. aduncum* oil on these beetles. Mortality rate, survival and foliar consumption were used to evaluate the effects of topical (LD₅₀ and LT₅₀) and contact (filter-paper) (LC₅₀) applications of different oil concentrations. The toxicity of *P. aduncum* oil to *C. tingomarianus* was high with: LC₅₀ of 0.06 ml/cm² and LD₅₀ of 0.002 ml/mg of the insect. For contact (filter-paper) applications, the mortality rate was nearly 100% at oil concentrations of 1%, whereas for topical applications, the mortality rate changed from 5% to 30%. Oil concentrations of 2.5% and 5% significantly reduced the foliar consumption by the beetles. Oil concentrations above 5% greatly reduced the LT₅₀. Contact application (filter-paper) of *P. aduncum* oils have, therefore, insecticide effects on *C. tingomarianus*, when applied at 0,04 % concentration. In case of topical application, these oils can cause physiological problems, when used at concentrations higher than 2.5%.

KEY WORDS: Dillapiol, essential oil, botanical insecticide

RESUMO - No óleo essencial de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) predomina o fenilpropanóide dilapiol, com reconhecida ação inseticida e sinérgica. A abundância dessa piperácea no Acre e a necessidade do controle de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné estimularam a realização desta pesquisa com o objetivo de avaliar a toxicidade do óleo essencial de *P. aduncum* sobre adultos da praga. Avaliou-se o efeito da aplicação de contato tópica (DL₅₀ e TL₅₀) e da ação por contato com superfície contaminada (papel-filtro) (CL₅₀) de diferentes concentrações do óleo, por meio da mortalidade e consumo foliar do inseto. Verificou-se que a toxicidade do óleo de *P. aduncum* para *C. tingomarianus* foi alta, considerando-se a CL₅₀ = 0,06 ml de óleo/cm² e DL₅₀ = 0,002 ml de óleo/mg de inseto. A mortalidade dos insetos alcançou praticamente 100% nas concentrações de 1% do óleo na avaliação por contato (papel-filtro) e de 5% a 30% nas concentrações aplicadas topicamente. Houve redução significativa do consumo foliar dos insetos nas concentrações de 2,5% e 5%, além da redução do TL₅₀ em função do aumento das concentrações. O óleo de *P. aduncum* apresenta efeito inseticida para *C. tingomarianus* na concentração de 0,04% por contato (papel-filtro), provocando ainda distúrbios fisiológicos pela ação da aplicação tópica em concentrações superiores a 2,5%.

PALAVRAS-CHAVE: Dilapiol, óleo essencial, inseticida botânico

Os produtos de origem botânica são fontes potenciais de recursos para a produção de novos inseticidas (Hedin 1982, Isman 1995, Park *et al.* 2002). Os óleos essenciais e seus constituintes têm-se mostrado potencialmente ativos

como inseticidas botânicos (Singh & Upadhyay 1993).

No gênero *Piper*, os constituintes químicos mais comuns são as amidas, destacando-se as isobutilamidas, piperidina e pirrolidina (Sengupta & Ray 1987). Outro grupo de

compostos potencialmente ativos e não menos importantes, que estão presentes em proporções consideráveis, são os fenilpropanóides, incluindo-se entre eles: monolignólides como o apiol, miristicina, eugenol, safrol, dímeros de fenilpropanóides e dilapiol (Bernard *et al.* 1995). Bernard *et al.* (1995) compararam o extrato alcóolico de folhas de dezesseis espécies de *Piper* apontando *P. aduncum* como a de maior atividade inseticida, com 92% de eficiência no controle de larvas de segundo instar de *Aedes atropalpus* L., à concentração de 1 ppm. O dilapiol aparece como constituinte principal no óleo essencial de *P. aduncum* variando de 58% a 88,4% (Smith & Kassim 1979, Gottlieb *et al.* 1981).

No zoneamento e caracterização de habitats naturais de pimenta longa no Acre, realizado por Pimentel *et al.* (1998a), verificou-se que *P. aduncum* está presente em todos os municípios do estado com maior concentração nos vales dos rios Purus e Juruá. A maioria dos habitats naturais surge em pastagens degradadas e abandonadas observando-se populações em áreas de capoeira aberta com idade média de nove anos.

Nos últimos anos, têm se buscado alternativas para o desenvolvimento do manejo integrado da *Cerotoma tingomarianus* Bechné que, segundo Fazolin & Gomes (1993), é a praga de maior importância para a cultura do feijoeiro no Acre devido ao desfolhamento severo que causa às plantas. Para a cv. Pérola, mais cultivada pelos produtores acreanos, Fazolin & Estrela (2003) observaram decréscimos de produtividade próximo a 34,4% quando ocorria 66% de desfolhamento na fase de florescimento das plantas de feijoeiro. O nível populacional de *C. tingomarianus* que causa esse nível de desfolhamento, equivalente ao nível de dano econômico, é observado com frequência nas condições do Acre (Fazolin & Estrela 2004).

A abundância da *P. aduncum* na região, aliada à importância econômica deste crisomelídeo, demandou o desenvolvimento deste trabalho, cujo objetivo foi avaliar a toxicidade do óleo essencial de *P. aduncum*, rico em dilapiol, a adultos de *C. tingomarianus*.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos em laboratório no período de outubro de 2002 a março de 2003. As plantas de *P. aduncum* utilizadas foram coletadas no banco de germoplasma da Embrapa Acre e os adultos de *C. tingomarianus* foram capturados, com rede entomológica, em áreas cultivadas com feijão comum cv. Peróla.

Obtenção e Composição do Óleo Essencial. Plantas adultas de *P. aduncum* foram cortadas a 0,4 m do solo, separando-se as folhas e os ramos secundários para processamento. A massa vegetal foi submetida à secagem por seis dias em secador solar desenvolvido por Pimentel *et al.* (1998_b) até atingir de 20% a 30% de umidade, sendo revolvida duas vezes ao dia para facilitar a aeração. O material foi submetido à extração por arraste forçado de vapor de água, utilizando-se o sistema de caldeira aquecida por gás, acoplada a um extrator, seguindo-se a metodologia de Simões & Spitzer (1999). Após a condensação, a mistura do óleo essencial foi recebida em coletores comunicantes de decantação para a

separação do óleo. O rendimento do óleo foi de 1,8%. A análise por cromatografia do óleo essencial foi realizada em cromatógrafo a gás HP5890 equipado com coluna capilar de sílica fundida (DB-5,30 m x 20 mm), tendo hélio como gás de arraste e programação de temperatura de 80°C a 140°C (4°C/min.) e de 140°C a 240°C (20°C/min.). Obteve-se assim um óleo composto por 73,97% de dilapiol; 3,92% de safrol e 2,84% de sarisan como componentes majoritários.

Exposição em Superfície Contaminada (Papel Filtro).

Foram realizados bioensaios preliminares com concentrações que provocassem baixa (próximo a 0) e alta (próximo a 100%) mortalidade dos indivíduos expostos. Para tanto foram preparadas soluções-estoque a partir de 100 ml do óleo, diluídas com acetona na proporção de 1:10 até obter a concentração de 10⁻⁶%.

O tempo de exposição do inseto ao óleo de *P. aduncum* foi determinado pela sobrevivência de 20 indivíduos, distribuídos em quatro placas de Petri e expostos a 0,5 ml de acetona, quantidade suficiente para cobrir uniformemente o disco de papel de filtro de 9 cm de diâmetro. Foram avaliados tempos de exposição de 24h e 48h, sendo adotado o tempo de 48h como o mais adequado para a montagem dos bioensaios definitivos. Testes de sobrevivência, comparando-se números diferentes de adultos de *C. tingomarianus* por placa de Petri de 9 cm de diâmetro apontaram cinco indivíduos/ placa com ideal para o desenvolvimento dos bioensaios.

Impregnaram-se papéis-filtro com 0,5 ml do óleo veiculado em acetona, nas concentrações estabelecidas. Após a evaporação do solvente, de cada concentração, os papéis-filtro foram colocados nas placas de Petri, que em seguida receberam cinco adultos de *C. tingomarianus*, sem alimentação, constituindo uma parcela experimental. As placas de Petri foram mantidas em câmara climatizada a temperatura de 25 ± 1°C, umidade relativa de 57 ± 8,4% e fotofase de 12h. O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro repetições.

Para avaliação dos bioensaios definitivos foram estabelecidas as seguintes concentrações: 1; 10⁻¹; 10⁻²; 10⁻³; 10⁻⁴; 10⁻⁵ e 10⁻⁶%, além de um controle com apenas solvente (acetona). Os bioensaios permitiram definir as curvas de concentração-mortalidade e determinar a concentração com probabilidade de causar 50% de mortalidade (CL₅₀), de acordo com a metodologia descrita por Finney (1971).

Os valores de mortalidade dos tratamentos foram corrigidos pela mortalidade da testemunha utilizando-se a fórmula de Abbott (1925). Cada bioensaio foi repetido três vezes e os valores corrigidos de mortalidade foram submetidos à análise de Probit, utilizando-se o programa de análises estatísticas SAS (SAS Institute 1989)

Exposição por Aplicação Tópica. Adultos de *C. tingomarianus* foram anestesiados por exposição à temperatura de -16°C durante cinco minutos, sendo as aplicações realizadas por meio de microseringa com capacidade de 10 ml, depositando-se as concentrações a serem avaliadas na face ventral do pronoto. Foram realizados testes preliminares que determinaram cinco dias como tempo de exposição ideal dos insetos ao produto, 1 ml como volume

a ser aplicado e cinco insetos por placa de Petri de 9 cm de diâmetro, com quatro repetições por tratamento.

O procedimento experimental foi o mesmo adotado para avaliação do efeito por contato em superfície contaminada, sendo que o intervalo de concentrações determinado foi de 1% a 30%, sendo avaliado nos bioensaios definitivos. Dentro desse intervalo foram estabelecidas as concentrações: 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 20 e 30%, além de um controle com apenas solvente (acetona). Como alimento aos insetos confinados foram fornecidas folhas de feijoeiro cv. Pérola, previamente lavadas em hipoclorito de sódio a 1%, com a finalidade de eliminar além da poeira, microorganismos indesejáveis. Além da mortalidade diária dos insetos, e Tempo Letal Médio (TL₅₀) das diferentes concentrações do óleo de *P. aduncum*, foi avaliado o consumo médio diário de folhas dos insetos sobreviventes, por meio da medição da área foliar remanescente, utilizando-se o integrador de área foliar ADC AM-200. As parcelas experimentais, número de repetições, delineamento estatístico e procedimentos para análise visando o cálculo da DL₅₀ e TL₅₀ seguiram a metodologia descrita para avaliação do efeito por contato em superfície contaminada.

Resultados e Discussão

Os valores obtidos no cálculo das concentrações-mortalidade (Tabela 1) para o efeito de contato (papel-filtro) (CL₅₀ = 0,003 ml de óleo/ cm²) e dose-mortalidade para o efeito contato por aplicação tópica (DL₅₀ = 0,002 ml de óleo/ mg de inseto) sugerem que o óleo de *P. aduncum* foi tóxico para *C. tingomarianus*. A concentração equivalente à CL₅₀ foi de 0,04% e para DL₅₀ de 4,1%, apontando o efeito por contato (papel-filtro) como mais eficaz que o efeito de contato por aplicação tópica. Por outro lado, o valor da inclinação da curva de concentração-mortalidade para o efeito da aplicação tópica foi maior que o valor calculado para o efeito de contato (papel-filtro) (Tabela 1), evidenciando que adultos de *C. tingomarianus* responderam de forma mais homogênea ao óleo de *P. aduncum* quando recebem a aplicação do óleo diretamente no corpo. Valores altos de inclinação da curva indicam que pequenas variações na dose do óleo promovem grandes variações na mortalidade, resultando em resposta homogênea da população (Atkins *et al.* 1973).

Os insetos sobreviventes, após a aplicação tópica, diminuíram gradativamente a média do consumo foliar diário a medida em que maiores concentrações do óleo de *P. aduncum* foram aplicadas (Fig. 1). Observaram-se, nas concentrações de 2,5% e 5%, valores diários de consumo foliar menores que 1,23 cm², abaixo dos determinados por

Fazolin & Estrela (2004) para esse crisomelídeo em plantas de feijoeiro cv Pérola. Esses resultados sugerem a ocorrência de distúrbios fisiológicos devido a toxicidade do óleo de *P. aduncum*, à semelhança dos resultados obtidos por Bernard *et al.* (1995). Estes autores, ao adicionarem o extrato de *P. aduncum* a 0,4% na dieta alimentar de lagartas de segundo instar de *Ostrinia nubilalis* Hübner, observaram significativa redução da atividade e do desenvolvimento do inseto. Nas concentrações de 7,5% e 10,0% houve paralisação completa do consumo foliar.

A associação de ligninas ao grupo metilenedioxifenil é uma característica das piperáceas, que se apresentam em grande número nas plantas e são consideradas importantes inibidores de monooxigenases dependentes de citocromo P450, e são utilizadas como sinergistas de inseticidas naturais (Murkerjee *et al.* 1979 & Bernard *et al.* 1990). Muitos componentes potencialmente tóxicos contidos no alimento dos insetos são gradualmente eliminados por essa enzima detoxificativa antes de se acumularem a níveis letais.

O aumento da mortalidade em função do aumento das concentrações a partir de 5%, aplicadas topicamente nos adultos da *C. tingomarianus*, pode ter reduzido sua capacidade de detoxificação nas maiores concentrações. Entretanto, especificamente na concentração de 2,5%, a partir do segundo dia de avaliação, os insetos apresentaram mortalidade de 40%, permanecendo os remanescentes vivos até o final do

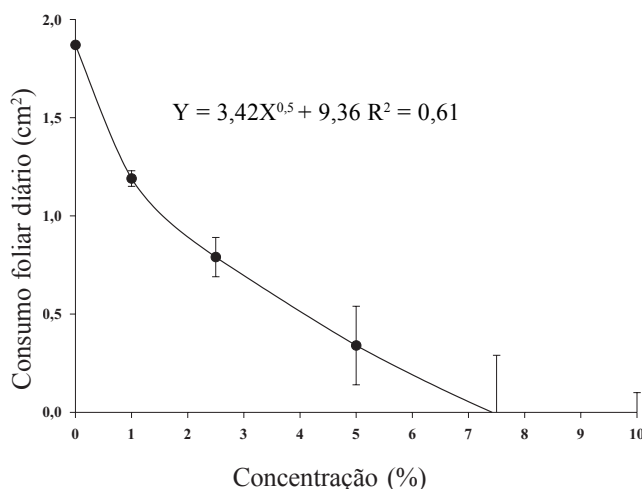


Figura 1. Consumo foliar diário médio de adultos de *C. tingomarianus* submetidos à aplicação tópica de diferentes concentrações do óleo de *P. aduncum*.

Tabela 1. Toxicidade de adultos de *C. tingomarianus* ao óleo de *P. aduncum* (n = 480)

Intoxicação por contato	Inclinação ± EPM	CL ₅₀ (IC 95%) µl de óleo/cm ²	DL ₅₀ (IC 95%) µl de óleo/mg	χ ²	Prob.
Superfície contaminada	0,45 ± 0,05	0,003 (0,002 – 0,003)	-	15,5	1,00
Aplicação tópica	0,65 ± 0,05	-	0,002 (0,001- 0,002)	5,64	0,34

CL₅₀ e DL₅₀ = Concentração e dose letal, respectivamente; IC 95% = Intervalo de confiança a 95% de probabilidade

Tabela 2. Tempo Letal (TL₅₀) (dias) de diferentes concentrações do óleo de *P. aduncum* aplicadas topicamente em adultos de *C. tingomarianus*. (n = 60)

Concentrações (%)	Inclinação ± EPM	TL ₅₀ (IC 95%)	χ ²	Prob.
2,5	0,5153 ± 0,1118	3,87 (2,57 – 14,59)	6,4	0,99
5,0	0,5053 ± 0,1365	1,41 (1,05 – 1,72)	14,6	0,85
7,5	0,6024 ± 0,1037	0,91 (0,48 – 1,18)	10,2	0,92
10,0	0,6476 ± 0,1418	0,97 (0,42 – 1,37)	16,5	0,56

TL₅₀ = Tempo letal; IC 95% = Intervalo de confiança a 95% de probabilidade

experimento, sugerindo ser esta uma concentração limite para a sobrevivência, onde adultos de *C. tingomarianus* continuaram a se alimentar, embora de forma reduzida (Fig. 1), mas o suficiente para permitir a sobrevivência dos indivíduos. Nessa concentração, pode ter havido a recuperação parcial da capacidade de defesa bioquímica do inseto, retomando a produção de monooxigenase dependente de citocromo P450, inicialmente inibida pela ação das ligninas associadas ao grupo metilenedioxifenil, expressando-se a tolerância da população remanescente tanto aos compostos tóxicos presentes no óleo de *P. aduncum* como àqueles presentes no alimento.

Outra hipótese para explicar esse comportamento baseia-se nos relatos de Bernard *et al.* (1989) que ressaltam a diferenciação da intoxicação por ligninas, predominantemente crônica, daquela causada por inseticidas neurotóxicos, predominantemente aguda, o que poderia ocasionar a menor mortalidade na concentração de 2,5%, dentro do período experimental de cinco dias. Bernard *et al.* (1995) afirmaram que *P. aduncum* possui grande quantidade de lignina, incluindo-se o dilapiol.

A relação dos valores dos Tempos Letais Médios (TL₅₀) obtidos em função das concentrações aplicadas por via tópica foi linear, com coeficiente angular positivo (Tabela 2), demonstrando que acréscimos nos valores da mortalidade causada pelo óleo de *P. aduncum*, para cada concentração, foram crescentes durante os cinco dias de avaliação. Esses valores foram de 3,87; 1,41; 0,91 e 0,97 dias para as concentrações de 2,5%; 5%; 7,5% e 10%, respectivamente (Tabela 2).

O efeito inseticida do dilapiol pode estar relacionado à ação conjunta dessa lignina e dos outros compostos bioativos minoritários na composição do óleo como sarisan (Bizzo *et al.* 2001) e principalmente safrol (Huang *et al.* 1999), uma vez que eles apresentam em sua estrutura o grupo metilenedioxifenil (Fig. 2).

O óleo rico em dilapiol, proveniente de plantas de *P. aduncum*, apresentou toxicidade para adultos de *C.*

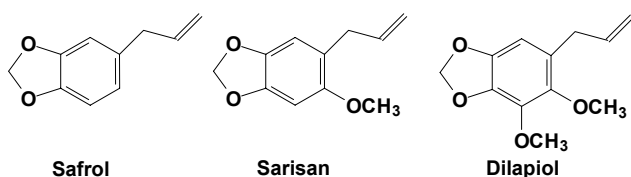


Figura 2. Arilpropanóides majoritários do óleo essencial de *P. aduncum*, destacando a presença do grupo metilenedioxifenil.

tingomarianus em concentrações a partir de 0,04% por ação de contato em superfície contaminada e a partir de 4,1% por aplicação tópica. Insetos submetidos às concentrações acima de 2,5% por aplicação tópica apresentaram distúrbios fisiológicos.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio técnico de Valdemir de Souza e Silva, Ronaldo Queiroz de Oliveira, Charles Rodrigues da Costa, Rubens Mamedio Bastos, John Lennon Mesquita Catão e Pedro Pereira da Silva.

Literatura Citada

- Abbott, W.S. 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Atkins, E.L., E. Gerywood & R.L. Macdonald. 1973.** Toxicity of pesticides and other agricultural chemicals to honey bees. Laboratory studies. Davis, University of California, 36p.
- Bernard, C.B., H.G. Krishnamurty, D. Chauret, T. Durst, B.J.R. Philogene, P. Sanchés-Vindas, C. Hasbaun, L. Poveda, L.S. Roman, & J.T. Arnason. 1995.** Insecticidal defenses of piperaceae from the neotropics. *J. Chem. Ecol.* 21: 801-814.
- Bernard, C.B., J.T. Arnason H.G., B.J.R. Philogene, J. Lam & T. Waddel. 1989.** Effects of lignans and other secondary metabolites of the Asteraceae on the PMSO activity of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Phytochemistry* 28: 1373-1378.
- Bernard, C.B., J.T. Arnason H.G., B.J.R. Philogene, J. Lam & T. Waddel. 1990.** In-vivo effect of mixtures of allelochemicals on the life cycle of the european corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Entomol. Exp. Appl.* 57: 17-22.
- Bizzo, H.R., D. Lopes, R.V. Abdala, F.A. Pimentel, J.A. de Souza, M.V.G. Pereira, L. Bergter & E.F. Guimarães. 2001.** Sarisan from leaves of *Piper hispidinervum* C. DC (Long pepper). *Flavour Frag. J.* 16: 113-115.
- Fazolin, M. & J.L.V. Estrela. 2003.** Comportamento da cv.

- Pérola (*Phaseolus vulgaris* L.) submetida a diferentes níveis de desfolha artificial. Ciênc. Agrotec. 27: 978-984.
- Fazolin, M. & J.L.V. Estrela. 2004.** Determinação do nível de dano econômico de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae) em *Phaseolus vulgaris* L. cv. Pérola. Neotrop. Entomol. 33: 1-7.
- Fazolin, M. & T.C. Gomes. 1993.** Dinâmica populacional de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné em Caupi e Puerária em Rio Branco, Acre. An. Soc. Entomol. Brasil 22: 491-495.
- Finney, D.J. 1971.** Probit analysis. London, Cambridge University, 33p.
- Gottlieb, O.R.M, M. Koketsu, M.T. Magalhães, J.G.S. Maia, P.H. Mendes, A.I. Rocha, M.L. Silva & V. C. Wilberg. 1981.** Óleos essenciais da Amazônia VII. Acta Amazon. 11: 143-148.
- Hedin, P.A. 1982.** New concepts and trends in pesticide chemistry. J. Agr. Food Chem. 30: 201-215.
- Huang, Y., S.H. Ho & M. Kini. 1999.** Bioactivities of safrole and isosafrole on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). J. Econ. Entomol. 92: 676-683.
- Isman, M.B. 1995.** Leads and prospects for the development of new botanical insecticides. Rev. Pest. Toxicol. 3: 1-2.
- Mukerjee, S.K., V.S. Saxena & S.S. Tomar. 1979.** New methylenedioxyphenyl synergists for pyrethrins. J. Agric. Food Chem. 27: 1209-1211.
- Park, B.S., S.E. Lee, W.S. Choi, C.Y. Jeong, C. Song & K.Y. Cho. 2002.** Insecticidal and acaricidal activity of pipernonaline and piperocetadecalidine derived from dried fruits of *Piper longum* L. Crop Prot. 21: 249-251.
- Pimentel, F.A., J.B.M. Pereira & M.N. de Oliveira. 1998a.** Zoneamento e caracterização de habitats naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) no Acre. Rio Branco, Embrapa - CPAF/AC, 17p. (Embrapa-CPAF/AC. Boletim de Pesquisa, 20).
- Pimentel, F.A., W.G. Cabral, M.R. da Silva & P.S.N. Pinheiro. 1998b.** Processo de secagem de biomassa de pimenta longa (*Piper hispidinervum*). Rio Branco, Embrapa - CPAF/AC, 2p. (Embrapa-CPAF/AC. Comunicado Técnico, 98).
- SAS Institute. 1989.** SAS User's Guide: Statistics. Version 6.12. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Sengupta, S. & A.B. Ray. 1987.** The chemistry of *Piper* species: A review. Fitoterapia 58: 147-166.
- Simões, C.M.O. & V. Spitzer. 1999.** Óleos voláteis. In C.M.O. Simões, Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre/ Florianópolis, UFRS/ UFSC, 416p.
- Singh, G. & R.K. Upadhyay. 1993.** Essential oil: A potent source of natural pesticides. J. Sci. Ind. Res. 52: 676-683.
- Smith, R.M. & H. Kassim. 1979.** The essential oil of *Piper aduncum* from Fiji. N. Z. J. Sci. 22: 127-128.

Received 01/VII/04. Accepted 184/II/05.
