



UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOQUÍMICA

DISSERTAÇÃO

Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. e *Cymbopogon nardus* (L) Rendle, sobre o ciclo reprodutivo, enzimas de resistência e a composição lipídica do *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Bruchidae.), inseto-praga do feijão *Vigna unguiculata* (L) Walp.

Marcela de Souza Alves

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

DISSERTAÇÃO

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Cymbopogon citratus* (DC) STAPF. E *Cymbopogon nardus* (L.)
RENDLE, SOBRE O CICLO REPRODUTIVO, ENZIMAS DE RESISTÊNCIA E
A COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DO *Callosobruchus maculatus* (FABRICIUS, 1775)
(COLEOPTERA: BRUCHIDAE.), INSETO-PRAGA DO FEIJÃO *Vigna
unguiculata* (L.) WALP.**

Sob a orientação do Professor

Emerson Guedes Pontes

e Co-orientação do Professor

Marco Andre Alves de Souza

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Química, no
Curso de Pós-Graduação em
Química, Área de Concentração
Bioquímica.

Seropédica, RJ
Agosto, 2015

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais em especial à minha mãe, a qual devo o meu caráter e a construção do meu ser humanizado.

“...Por isso, eu supliquei e a inteligência me foi dada. Invoquei, e o espírito da sabedoria veio até mim. Eu a preferi aos cetros e tronos e, em comparação com ela, considerei a riqueza como um nada. Não a compararei com a pedra mais preciosa, porque todo o ouro, ao lado dela, é como um punhado de areia. E junto dela, a prata vale o mesmo que um punhado de barro... Aqueles que a adquirem, atraem a amizade de Deus, porque são recomendados pelo dom da instrução dela.”

Bíblia Sagrada. Sb. 7; 7-9, 13.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me concedeu o dom da vida e permitiu que chegasse até aqui.

À toda minha família e amigos que compreenderam minha ausência em muitos momentos.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade.

Ao professor Marco Andre Alves Souza pela orientação e por ser meu “Bernadinho científico”.

Ao professor Emerson Guedes Pontes pela orientação e apoio.

À professora Cristiane Martins Cardoso pela colaboração.

A todos os meus amigos de laboratório. Não quero citar nomes porque são muitos e isso seria imperdoável, pois todos foram importantes.

À direção, colegas e alunos do Colégio Estadual Professor José Antônio Maia Vinagre pelo acolhimento, apoio e compreensão. Não poderia estar mais feliz.

Aos amigos do CEDERJ que mesmo com a distância jamais nos separamos, o apoio de vocês é muito importante.

Aos amigos do alojamento F1 da UFRRJ pela amizade e apoio.

Ao programa de pós-graduação em Química da UFRRJ.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

À todos que colaboraram para elaboração do trabalho e àqueles que contribuíram para que meu espírito permanecesse no trabalho.

RESUMO

ALVES, Marcela de Souza Alves. **Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. e *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, sobre o ciclo reprodutivo, enzimas de resistência e a composição lipídica do *Callosobruchus maculatus* Fabricius, 1775 (Coleoptera: Bruchidae.), inseto-praga do feijão *Vigna unguiculata* (L.) Walp.** 2015. 108p. Dissertação (Mestrado em Química, Bioquímica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Atualmente, existe o interesse em alternativas naturais para o controle de insetos pragas de grãos armazenados, entre elas pode-se citar a utilização dos óleos essenciais. Deste modo, o objetivo deste trabalho consistiu em estudar o efeito dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *C. nardus* sobre o ciclo reprodutivo do *Callosobruchus maculatus* e alguns aspectos relacionados ao metabolismo de xenobióticos e lipídios. Sendo assim, os óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus* foram extraídos por hidrodestilação e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Depois, os efeitos fumigantes dos óleos essenciais foram testados em diferentes concentrações (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 $\mu\text{L cm}^{-3}$) sobre *C. maculatus* e, em seguida, alguns aspectos do ciclo reprodutivo avaliados, como a concentração letal para metade da população (CL50), oviposição e emergência de novos adultos. Os efeitos fumigantes dos óleos essenciais também foram testados para se avaliar a proteína bruta, atividade total de algumas enzimas (acetilcolinesterase, glutatona S-transferase, carboxiesterase, alfa e beta-esterases) e frações lipídicas (com fêmeas virgens e copuladas separadamente), na concentração 0,4 e 0,1 μL e no tempo de 12 e 6 horas, respectivamente, para *C. citratus* e *C. nardus*. Os resultados obtidos após a análise química dos óleos essenciais mostraram os majoritários neral (36,6%) e geranial (50,5%), para *C. citratus* e citronelal (50,3%) e nerol (10,8%) para *C. nardus*. O efeito fumigante dos óleos essenciais promoveram uma mortalidade acentuada no teste com *C. nardus* (CL50 = 0,12 $\mu\text{L cm}^{-3}$); ambos os óleos essenciais diminuíram a oviposição e a emergência de novos adultos. As análises de proteína nos extratos brutos, mostraram que os óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus* promoveram aumento no conteúdo protéico das fêmeas e redução nos machos. As enzimas de resistência das fêmeas de *C. maculatus* sob efeito do óleo essencial de *C. citratus*, apresentaram aumento de atividade da alfa-esterase e carboxiesterase e diminuição da beta-esterase, acetilcolinesterase e glutatona S-transferase; nos machos foram observadas diminuição das atividades acetilcolinesterase e carboxiesterase e aumento da alfa-esterase e glutatona S-transferase; as fêmeas de *C. maculatus* sob efeito do óleo essencial de *C. nardus* promoveram diminuição da atividade das enzimas acetilcolinesterase, carboxiesterase, alfa e beta-esterases; nos machos foram observadas a diminuição da atividade da alfa-esterase e aumento da carboxiesterase. Quanto as frações lipídicas, houve redução no conteúdo de triacilgliceróis nas fêmeas copuladas sob efeito fumegante do óleo essencial de *C. citratus*.

Palavras-chave: Feijão-caupi, caruncho, voláteis, capim-limão, capim-citronela.

ABSTRACT

ALVES, Marcela de Souza Alves. **Chemical composition and biological activity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. & *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle essential oils on reproductive cycle, resistance enzymes and lipid composition of *Callosobruchus maculatus* Fabricius, 1775 (Coleoptera: Bruchidae), insect pests of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp.** 2015. 108p. Dissertação (Mestrado em Química, Bioquímica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Nowadays, there is an interest in natural alternatives for insect control pests of stored grain, including use of essential oils. Thus, the objective of this work was to study the *Cymbopogon nardus* and *C. citratus* essential oils effect on reproductive cycle of *Callosobruchus maculatus* and some aspects regarding to xenobiotic and lipids metabolism. Thus, *Cymbopogon citratus* and *C. nardus* essential oils were extracted by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. Then, essential oils fumigants effects were tested at different concentrations (0.1; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 and $1\mu\text{L cm}^{-3}$) on *C. maculatus* and then evaluated some aspects of reproductive cycle, such as, lethal concentration to kill half of population members (LC50), oviposition and emergency of new adults. Essential oils fumigant effects were also tested to evaluated crude protein, total activity of some enzymes (acetylcholinesterase, glutathione S-transferase, carboxylesterase, alpha and beta-esterases) and lipid fractions (with virgin and copulated females separately), at concentration, 0.4 and 0.1 μL , and periods, 12 and 6 hours, for *C. citratus* and *C. nardus*, respectively. Results obtained after essential oils chemical analysis showed main compounds, neral (36.6%), geranial (50.5%) to *C. citratus*, citronellal (50.3%) and nerol (10.8%) for *C. nardus*. Essential oils fumigant effects promoted increased mortality in *C. nardus* assay (LC50 = 0.12 $\mu\text{L cm}^{-3}$); both essential oils decreased oviposition and emergence of new adults. Crude extracts protein analysis showed that *C. citratus* and *C. nardus* essential oils promoted increase in females protein content and decrease in males. *C. maculatus* females resistance enzymes under *C. citratus* essential oil influence, showed increase activity for alfa-esterase, carboxylesterase and decrease for beta-esterase, acetylcholinesterase and glutathione S-transferase; in males were observed decrease in activity for acetylcholinesterase, carboxylesterase and increase for alfa-esterase and glutathione S-transferase; *C. maculatus* females under *C. nardus* essential oil influence promoted decrease in activity enzyme for acetylcholinesterase, carboxylesterase, alpha and beta-esterase; in males were observed decrease in activity for alpha-esterase and increase for carboxylesterase. In lipid fractions there was decrease in triacylglycerols content for females copulated under fumigant effect of *C. citratus* essential oil.

Keywords: Cowpea, cowpea-weevil, volatile, lemongrass, citronella grass

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|----------------|--|
| FAO | Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura |
| AGROFIT | Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários |
| MAPA | Ministério da Agricultura e Pecuária |
| AChE | Acetilcolinesterase |
| A-Est | Alfa-esterase |
| B-Est | Beta-Esterase |
| GST | Glutathione-S-transferase |
| CbE | Carboxiesterase/carboxilesterase |
| OP | Organofosforados |
| CB | Carbamatos |
| DDT | Dicloro-difenil-tricloroetano |
| DTNB | Ácido 5,5' ditionitrobenzeno |
| GSH | Glutathione reduzida |
| CDNB | 1- cloro-2,4 dinitrobenzeno |
| AG | Ácido graxo |
| TG | Triacilglicerol |
| CHO | Colesterol |
| CHOE | Colesterol éster |
| FVC | Fêmea virgem controle |
| FVT | Fêmea virgem tratada |
| FCC | Fêmea copulada controle |
| FCT | Fêmea copulada tratada |
| MC | Macho controle |
| MT | Macho tratado |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. Feijão-caupi ou fradinho (<i>V. unguiculata</i>) no campo (A). Detalhe da vagem aberta expondo os grãos (B) e o grão separado (C)..... | 15 |
| FIGURA 2. Caruncho <i>Callosobruchus maculatus</i> . vista dorsal do macho (A), fêmea (B) e lateral de uma fêmea (C)..... | 19 |
| FIGURA 3. ciclo reprodutivo de <i>C. maculatus</i> . ovos depositados sobre a superfície do grão (A). Larva recém emergida penetrando no grão (B). Larva no interior do grão (C). Diferentes estágios larvais (D). Detalhe da pulpa de segundo estágio (E) Formação da janela para saída do inseto adulto (F) detalhe da cavidade de pulpação após emergência do novo adulto (G). Cópula dos insetos adultos..... | 20 |
| FIGURA 4. Estrutura química do DDT..... | 21 |
| FIGURA 5. Estrutura química dos inseticida paration (A) e malation (B). | 22 |
| FIGURA 6. Estrutura da fosfina (PH ₃)..... | 22 |
| FIGURA 7. Estrutura química da rotenona (A), piretrina (B) e azadiractina (C). | 25 |
| FIGURA 8. Alguns compostos voláteis de plantas aromáticas..... | 26 |
| FIGURA 9. Secção transversal de lâmina foliar de <i>C. citratus</i> | 27 |
| FIGURA 10. Plantas de capim-limão (<i>Cymbopogon citratus</i>) no campo..... | 29 |
| FIGURA 11. Cultivo de capim-citronela..... | 31 |
| FIGURA 12. Mecanismo geral de resistência metabólica aos xenobióticos, envolvendo três fases. | 32 |
| FIGURA 13. Atividade geral das enzimas de detoxificação de fase I esterases (A) e acetilcolinesterase (B) e de fase II glutationa S-transferase (C)..... | 34 |
| FIGURA 14. Mobilização de lipídios do corpo gorduroso para a ovogênese..... | 36 |
| FIGURA 15. Aparelho reprodutor de uma fêmea de <i>C. maculatus</i> | 37 |
| FIGURA 16. SIstema de hidrodestilação. | 38 |
| FIGURA 17. Efeito fumigante do óleo essencial de <i>C. citratus</i> (0,4 µl cm ⁻³) por 12 horas, sobre machos e fêmeas de <i>C. maculatus</i> | 50 |
| FIGURA 18. Conteúdo de ácidos gráxos e triacilglicerol em fêmeas copuladas e virgens de <i>C. maculatus</i> sob efeito fumigante do óleo essencial de <i>C. citratus</i> (0,4 µl cm ³), por 12 horas. | 51 |
| FIGURA 19. Proteína total (mg ml ⁻¹) obtido de fêmeas e machos de <i>C. maculatus</i> sob o efeito ou não do óleo essencial de <i>C. citratus</i> e <i>C. nardus</i> | 52 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 20. Atividade de acetilcolinesterase ($\text{mU} \cdot \text{min}^{-1}$) obtido de fêmeas e machos de <i>C. maculatus</i> sob o efeito ou não do óleo essencial de <i>C. citratus</i> e <i>C. nardus</i> | 53 |
| FIGURA 21. Atividade da alfa-esterase ($\mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$) obtido de fêmeas e machos de <i>C. maculatus</i> sob o efeito ou não do óleo essencial de <i>C. citratus</i> e <i>C. nardus</i> | 54 |
| FIGURA 22. Atividade da beta-esterase ($\mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$) obtido de fêmeas e machos de <i>C. maculatus</i> sob o efeito ou não do óleo essencial de <i>C. citratus</i> e <i>C. nardus</i> | 56 |
| FIGURA 23. Atividade de carboxiesterase ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) obtido de fêmeas e machos de <i>C. maculatus</i> sob o efeito ou não do óleo essencial de <i>C. citratus</i> e <i>C. nardus</i> | 57 |
| FIGURA 24. Atividade da glutathiona s-transferase ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) obtido de fêmeas e machos) de <i>C. maculatus</i> sob o efeito ou não do óleo essencial de <i>C. citratus</i> e <i>C. nardus</i> | 58 |

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Análise química (CG-EM) do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. .. 44

TABELA 2. Análise química (CG-EM) do óleo essencial de *Cymbopogon nardus*..... 45

TABELA 3. Mortalidade (%) e $CL_{50\%}$ de *Callosobruchus maculatus* após 48 horas sob o efeito fumigante dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *C. nardus*. 47

TABELA 4. Postura de ovos de *Callosobruchus maculatus* após 48 horas sob o efeito fumigante dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *C. nardus*. 48

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS | 7 |
| LISTA DE FIGURAS | 8 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 14 |
| 2.1 Os Insetos-Praga na Agricultura..... | 14 |
| 2.1.1 <i>Impacto econômico e sobre a produção de alimentos</i> | 14 |
| 2.1.2 <i>Impactos sobre o ambiente e a saúde humana</i> | 16 |
| 2.2 O Inseto-Praga Caruncho do Feijão-Caupi (<i>Callosobruchus maculatus</i>) | 18 |
| 2.2.1 <i>Origem, distribuição e hábito alimentar</i> | 19 |
| 2.2.2 <i>Ciclo de Vida</i> | 19 |
| 2.3 Controle do Caruncho do Feijão-Caupi | 21 |
| 2.3.1 <i>Histórico do controle tradicional químico</i> | 21 |
| 2.3.2 <i>Manejo integrado de pragas (MIP)</i> | 23 |
| 2.3.3 <i>Controle Alternativo</i> | 24 |
| 2.4 Óleos Essenciais | 25 |
| 2.4.1 <i>Produção de compostos voláteis</i> | 25 |
| 2.4.2 <i>Óleos essenciais no controle de insetos-pragas</i> | 27 |
| 2.5 Plantas Aromáticas | 29 |
| 2.5.1 <i>Capim-limão (Cymbopogon citratus)</i> | 29 |
| 2.5.2 <i>Capim-citronela (Cymbopogon nardus)</i> | 30 |
| 2.6 Resistência Metabólica dos Insetos aos Xenobióticos | 31 |
| 2.7 Enzimas de Resistência | 32 |
| 2.8 Metabolismo de Lipídios | 35 |
| 3 METODOLOGIA..... | 37 |
| 3.1 Materiais | 37 |
| 3.1.1. <i>Obtenção e manutenção dos insetos</i> | 37 |
| 3.1.2 <i>Coleta das plantas</i> | 37 |
| 3.2 Extração, Análise Química e Identificação dos Compostos Voláteis | 37 |
| 3.2.1 <i>Extração do óleo essencial por hidrodestilação</i> | 37 |
| 3.2.2 <i>Análise química dos óleos essenciais por CG-DIC e CG-EM</i> | 38 |
| 3.2.3 <i>Identificação dos voláteis nos óleos essenciais</i> | 39 |

| | |
|---|----|
| 3.3 Atividade Biológica dos Óleos Essenciais H <i>Callosobruchus maculatus</i> | 39 |
| 3.3.1 Concentrações crescentes dos óleos essenciais de <i>C. citratus</i> e <i>C. nardus</i> | 39 |
| 3.3.2 Efeito do óleo essencial de <i>C. citratus</i> H fêmeas virgens e copuladas | 40 |
| 3.3.3 Alguns aspectos metabólicos de <i>C. maculatus</i> sob efeito dos óleos essenciais | 40 |
| 3.3.3.1 Conteúdo protéico no extrato bruto de <i>C. maculatus</i> sob efeito dos óleos essenciais de <i>C. citratus</i> e <i>C. nardus</i> | 40 |
| 3.3.3.2 Determinação das atividades total de algumas enzimas no extrato bruto de <i>C. maculatus</i> sob efeito dos óleos essenciais de <i>C. citratus</i> e <i>C. nardus</i> | 41 |
| 3.3.3.3 Determinação do conteúdo lipídico de fêmeas de <i>C. maculatus</i> sob efeito dos óleos essenciais de <i>C. citratus</i> | 43 |
| 3.8 Análise Estatística..... | 44 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 44 |
| 4.1 Perfil Químico dos Óleos Essenciais | 44 |
| 4.1.1 Óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> | 44 |
| 4.1.2 Óleo essencial de <i>Cymbopogon nardus</i> | 45 |
| 4.2 Atividade Biológica dos Óleos Essenciais H <i>Callosobruchus maculatus</i> | 46 |
| 4.2.1 Concentrações crescentes dos óleos essenciais de <i>C. citratus</i> e <i>C. nardus</i> | 46 |
| 4.2.2 Efeito do óleo essencial de <i>C. citratus</i> H fêmeas virgens e copuladas | 49 |
| 4.2.3 Efeito dos óleos essenciais sobre aspectos do metabolismo de <i>C. maculatus</i> | 50 |
| 4.2.3.1 Conteúdo lipídico em cromatografia de camada fina | 50 |
| 4.2.3.2 Conteúdo protéico | 51 |
| 4.2.3.3 Atividade da acetilcolinesterase | 53 |
| 4.2.3.4 Atividade da alfa-esterase | 54 |
| 4.2.3.5 Atividade da beta-esterase | 55 |
| 4.2.3.6 Atividade da carboxiesterase ou carboxilesterase | 56 |
| 4.2.3.7 Atividade da glutational S-transferase | 57 |
| 5 CONCLUSÃO..... | 59 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 60 |
| 7 ANEXO | 78 |

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o feijão é um dos grãos de maior consumo por ser fonte de proteínas, sendo necessária a importação do produto para cobrir sua alta demanda (Lamri-Senhadji, 2013). As perdas econômicas decorrentes da infestação de *C. maculatus* podem chegar a 90%, por isso faz-se necessário a utilização de defensivos agrícolas (Pascual-Villalobos & Ballesta-Acosta, 2003). Os gastos com defensivos agrícolas no Brasil são exorbitantes, chegando a milhões de dólares em 2011 (Bettioli, 2011b).

O *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) é um inseto-praga de grãos armazenados e principalmente do feijão *Vigna unguiculata*. A infestação de *C. maculatus* pode ocasionar proliferação de fungos e grandes perdas como o poder germinativo da semente e do seu valor protéico, resultando na desvalorização econômica do produto.

Comumente insetos que possuem altas taxas de multiplicação como as pragas de grãos armazenados desenvolvem mecanismos de resistência ao princípio ativo dos agrotóxicos. Com isso, o agricultor muitas vezes aumenta a dose de defensivo aplicado nas culturas, como tentativa de controlar a praga.

Por isso, o uso extensivo de defensivos agrícolas (agrotóxicos) é de grande preocupação, pois muitos desses compostos, como a fosfina utilizada no controle de pragas de grãos armazenados como o *Callosobruchus maculatus*, possuem difícil degradação no ambiente. Também, não se pode deixar de mencionar os danos causados à saúde, seja ao aplicador do produto, pelo contato direto ou às pessoas das comunidades adjacentes, através do contato indireto, pela água ou alimento contaminado.

Contudo com a prática do Manejo Integrado de Pragas surge um novo olhar, de uma produção agrícola sustentável, onde o objetivo principal não é a erradicação da praga, mas mantê-la abaixo do nível de dano econômico, mantendo-se assim o equilíbrio ecológico (Pinto-Zevallos & Zarbin, 2013).

E com o surgimento de novas discussões, surgiu o interesse por moléculas biodegradáveis a fim de preservar os recursos hídricos e evitar o processo de bioacumulação, ou seja, a formulação de biopesticidas, que requerem a utilização de compostos de origem natural como os óleos essenciais que são substâncias voláteis produzidas pelo metabolismo secundário das plantas.

Neste contexto, o objetivo dessa dissertação envolveu o estudo do efeito fumegante dos óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus* sobre o ciclo reprodutivo e aspectos do metabolismo de *C. maculatus*.

Deste modo, realizou-se a extração de óleo essencial das plantas aromáticas, capim-limão (*Cymbopogon citratus* L.) e capim-citronela (*C. nardus* L.) e análise da composição química dos óleos essenciais por cromatografia em fase gasosa, CG-DIC e CG-EM. Esses óleos essenciais foram testados por fumigação em diferentes concentrações e avaliou-se o impacto sobre a concentração letal (CL50), oviposição e emergência de novos adultos. Foram avaliados também a proteína bruta, atividade total de algumas enzimas de resistência e o conteúdo de triacilglicerol.

De modo geral, os resultados obtidos mostraram o potencial que os óleos essenciais testados possuem para o controle biológico do inseto praga do feijão-caupi, por terem afetado aspectos importantes relacionados ao metabolismo e fisiologia do inseto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Os Insetos-Praga na Agricultura

2.1.1 Impacto econômico e sobre a produção de alimentos

O feijão é uma leguminosa de grande importância alimentar por ser fonte de proteína vegetal, que combinado com o arroz constitui a dieta básica do brasileiro, sendo o Brasil o maior consumidor dessa leguminosa (Lamri-Senhadji, 2013).

A produção de feijão em grãos segundo levantamento do IBGE em junho deste ano foi de 3.268.503 toneladas representando uma diminuição de 1,2% em relação ao ano anterior (IBGE, 2015).

Apesar do constante aumento da produção em torno de 30%, e da redução do consumo *per capita*, o Brasil ainda possui uma ampla demanda insatisfeita, que é abastecida com importações (MAPA, 2015). Em valores essas importações líquidas têm ultrapassado a margem dos US\$ 20 milhões anuais (EMBRAPA, 2015).

Entre as diferentes espécies de feijão pode-se citar a *Vigna unguiculata* (Figura 1) que é uma cultura global de grande importância nas regiões tropicais e subtropicais.

No Brasil a *V. unguiculata* é conhecida como feijão macassa, feijão macassar, feijão-de-corda, feijão-de-moita (Nordeste), feijão-de-praia (Norte), feijão catador, feijão gurutuba, feijão fradinho (Sudeste) e feijão miúdo (Sul) (Marfrig, 2013).

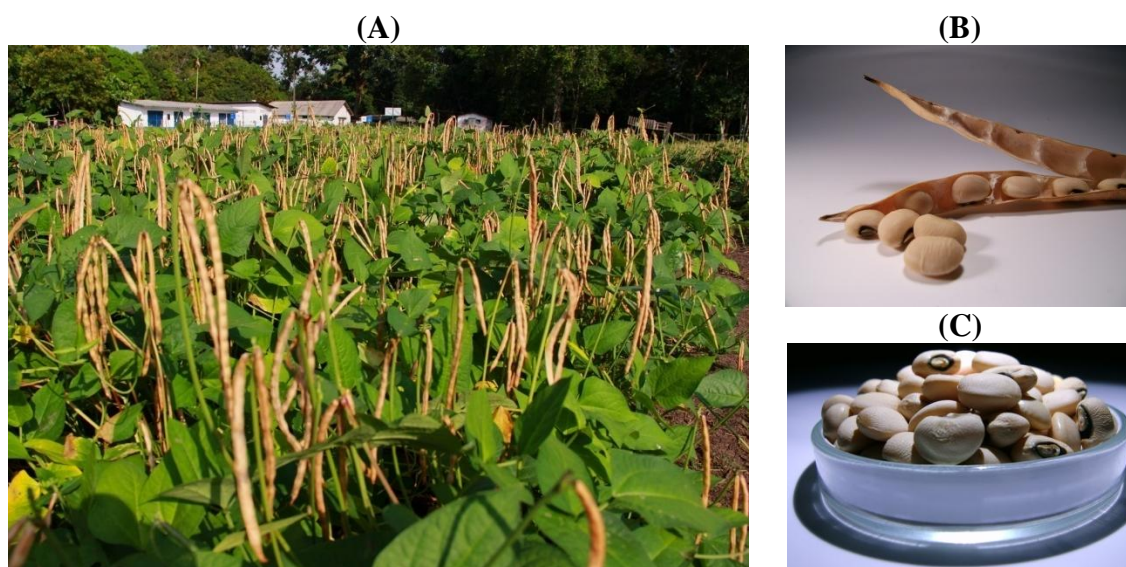


Figura 1. Feijão-caupi ou fradinho (*V. unguiculata*) no campo (A). Detalhe da vagem aberta expondo os grãos (B) e o grão separado (C). Fonte: Banco de imagens da EMBRAPA, disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/905001/caupi>>.

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) estima-se que a população mundial deverá dobrar até 2050 e a produção de alimentos deve aumentar em pelo menos 60% (FAO, 2014).

Os ganhos com a agroindústria no Brasil no período de 2003-2009 foram de US\$ 3,5 bilhões. Em 2010, houve aumento de 4 milhões de hectares em área de cultivo agrícola e neste mesmo ano, o Brasil foi o segundo maior produtor de culturas biotecnológicas no mundo (James, 2011).

Neste contexto, as principais alternativas para se elevar a produção agrícola envolvem: aumento da produtividade acompanhado por avanço tecnológico e biotecnológico, melhoria do ambiente e melhoramento genético das espécie (Vermeulen *et al.* 2012).

Deve-se ressaltar a relação inseto-planta e as consequências dessa relação sobre a produção agrícola, deste modo, a utilização de um controle de pragas faz-se necessário para reduzir os impactos negativos sobre a produção.

O aumento das safras de grãos, necessidade de estocagem, beneficiamento e transporte estimularam o aumento na população de pragas, pois uma quantidade considerável da produção de grãos e sementes de feijão caupi é perdida durante o armazenamento por ação do inseto-praga *C. maculatus*, principalmente nas regiões tropicais da África e da América Central e do Sul onde essa variedade de feijão é muito consumida (Ouali-N' *et al.* 2014).

Os danos provocados pelos bruquídeos são decorrentes da penetração e alimentação das larvas no interior dos grãos, provocando perda de peso, redução do valor nutritivo e do grau de higiene do produto, além de redução ou perda do poder germinativo das sementes (Azevedo & Moura, 2013). Os prejuízos econômicos da ação de *C. maculatus* sobre o feijão caupi envolvem perdas de 60 a 70% do peso em grãos armazenados, podendo evoluir em seis meses para 90% (Gallo *et al.* 2002; Pascual-Villalobos & Ballesta-Acosta, 2003).

2.1.2 Impactos sobre o ambiente e a saúde humana

Em 1962 surgiram as primeiras discussões acerca do uso desordenado de defensivos agrícolas com a publicação do livro “Primavera Silenciosa” em que Rachel Carson propunha que o DDT poderia ser a principal causa dos desequilíbrios ecológicos nos EUA (Krebs *et al.* 1999).

Anteriormente, estima-se que cada pessoa nos EUA em 1950, tenha ingerido através dos alimentos 0,28 mg de DDT por dia (Campbell *et al.* 1965 *apud* D'Amato *et al.* 2002). Esse processo chamado de biomagnificação ou bioacumulação constitui no aumento da concentração de uma substância à medida que percorre a cadeia alimentar se acumulando no nível trófico mais elevado (Johnson & Kennedy 1973).

O processo de biomagnificação ocorre em diversos organismos como microorganismos, vegetais e mamíferos. No Brasil a biomagnificação de metil-mercúrio e DDT na Amazônia segundo dados coletados por autores é preocupante (Torres *et al.* 2009).

Esses autores (Torres *et al.* 2009) encontraram resíduos no solo e em toda população ribeirinha do Rio Negro principalmente no leite materno, além de peixes e duas espécies de cetáceos o boto (*Inia geoffrensis*) e o golfinho-vermelho (*Sotalia fluviatilis*).

Em 2009, devido a sua alta permanência no ambiente e contaminação, foi decretada a lei 11.936/9 que proibiu qualquer forma de comercialização do pesticida (ANVISA, 2009).

Porém, outros pesticidas regularmente comercializados como a fosfina utilizada no controle de *C. maculatus*, são prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana. Em 1988, a fosfina foi classificada pela Organização Mundial da Saúde como extremamente tóxica para os seres humanos (World Health Organization, 1988).

A exposição oral em seres humanos é caracterizada por efeitos gastrointestinais, mais precisamente sobre os rins, fígado além de alterações no sistema cardiovascular, sistema nervoso central e respiratório (Sudakin, 2005).

Um caso ocorrido no Canadá em 2010 confirma tal afirmação em que o gás fosfina inalado por crianças teria levado-as à óbito por insuficiência respiratória e alterações gastrointestinais (Lemoine *et al.* 2011). Outro caso de intoxicação por fosfina de repercussão na mídia foi a intoxicação de tripulantes de um navio que carregava ervilhas em 2008 na França. Parte da tripulação começou a se queixar de dores abdominais, vômito e tonturas (Loddé *et al.* 2015).

Infelizmente o uso indiscriminado de inseticidas é uma realidade no Brasil, que provoca impactos ambientais e danos à saúde do homem, principalmente no trabalhador rural que está exposto mais intensamente a estes produtos (Florão *et al.* 2004; Oliveira *et al.* 2001), além de afetar indiretamente os membros das comunidades adjacentes, através da contaminação do ambiente, da exportação de alimentos contaminados e consumo da água contaminada (Belluta *et al.* 2014).

Podem ser encontrados resíduos de pesticidas nos alimentos e o Brasil possui dois programas de monitoramento o Programa de Análise de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (PARA), coordenado pela ANVISA e o Programa de Controle Nacional de Resíduos Contaminantes (PNCRC), coordenado pelo MAPA (Jardim & Caldas, 2012).

No entanto, o Brasil ainda não possui um regimento de segurança alimentar e nutricional assegurando a qualidade do alimento que chega à mesa do consumidor (Magalhães, 2014). Assim, como consequência do consumo de alimentos contaminados tem surgido problemas de saúde nas pessoas afetadas (Caldas & Jardim, 2011).

De acordo com dados da literatura as consequências da intoxicação por agrotóxicos podem ser: diminuição das defesas imunológicas, anemia, impotência

sexual masculina, cefaléia, insônia, alteração de humor e doenças neurológicas como o mal de Parkinson (Biazon & Baccon, 2014; Schmidt, 2009; Barth & Biazon, 2010). Segundo o Ministério da Saúde do Brasil os casos de intoxicação com agrotóxicos subiu de 3 para 8 mil entre 2006 e 2011 (Ministério da Saúde, 2012).

Cabe resaltar que, além da contaminação do solo e dos recursos hídricos, pode ocorrer a adsorção dos constituintes do solo (matéria orgânica, conteúdo argiloso e outros minerais) e dos micro-organismos que são responsáveis por decompor a matéria orgânica (Gama *et al.* 2013). Um exemplo de contaminação de recursos hídricos por uso extensivo de agrotóxicos na cultura de tomate diz respeito ao Município de Paty do Alferes, interior do Estado do Rio de Janeiro (Veiga *et al.* 2006).

Outra problemática é a utilização de defensivos não registrados no sistema AGROFIT. Em estudos realizados por autores no semi-árido cearense foi verificado que alguns defensivos utilizados na região não possuíam registro para uso e classificação do princípio ativo; dentre os quais 60-70% são utilizados na cultura de feijão e milho (Gama *et al.* 2013), base da alimentação regional.

O Brasil necessita de avaliações de risco ambientais sobre o uso de agrotóxicos, pois mesmo possuindo uma legislação que controla o uso, ainda faltam medidas seguras para os recursos hídricos, solo e a saúde populacional (Belluta *et al.* 2014).

Devido a estes fatores os compostos naturais de origem vegetal surgem como fontes de novas moléculas com atividade inseticida, tornando-se uma alternativa promissora ao controle de pragas de armazenamento (Souto *et al.* 2012, Regnault-Roger *et al.* 2012), em face de um menor impacto ambiental, econômico e em contraposição ao uso tradicional de agrotóxicos (Regnault-Roger *et al.* 2011, Dubey 2011, El-Wakeil 2013).

Portanto, para atingir o objetivo de uma agricultura sustentável, o grande desafio da produção agrícola será integrar os processos biológicos e ecológicos diminuindo o uso de substâncias que causam danos ao ambiente e à saúde dos agricultores e consumidores.

2.2 O Inseto-Praga Caruncho do Feijão-Caupi (*Callosobruchus maculatus*)

2.2.1 Origem, distribuição e hábito alimentar

O *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) é um inseto da família Bruchidae, conhecido como caruncho do feijão, e é considerado uma das mais importantes pragas do feijão *Vigna unguiculata* armazenado no Norte e Nordeste brasileiros (Castro *et al.* 2013; Marfrig 2013).

O *C. maculatus* (Figura 2) é descrito como originário da África e atualmente se encontra na maioria das regiões tropicais e subtropicais do mundo; os adultos são de coloração escura, com cabeça, tórax e abdome pretos, apresentando élitros estriados, pubescência no tórax; nos élitros distinguem-se três manchas mais escuras, de tamanhos diferentes (Haines 1989; Mohapatra *et al.* 2014) O inseto adulto apresenta dimorfismo sexual (Brito & Bortoli, 2006).

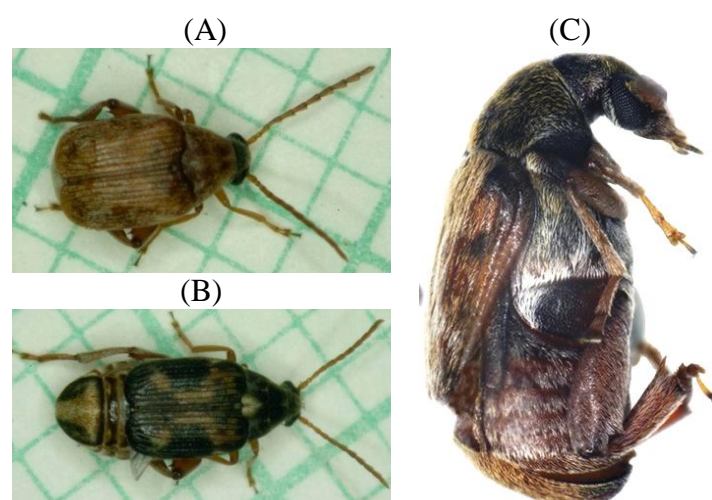


Figura 2. Caruncho *Callosobruchus maculatus*, praga do feijão-caupi. Vista dorsal do macho (A), da fêmea (B) e lateral de uma fêmea (C). Adaptado de Beck and Blumer (2014) e Li *et al.* (2014).

2.2.2 Ciclo de Vida

A duração do ciclo de vida de *C. maculatus* (Figura 3) pode variar conforme as condições ambientais e o material infestado, sendo que o tempo médio de ovo a adulto está em torno de 27 dias (Carvalho *et al.* 2011).

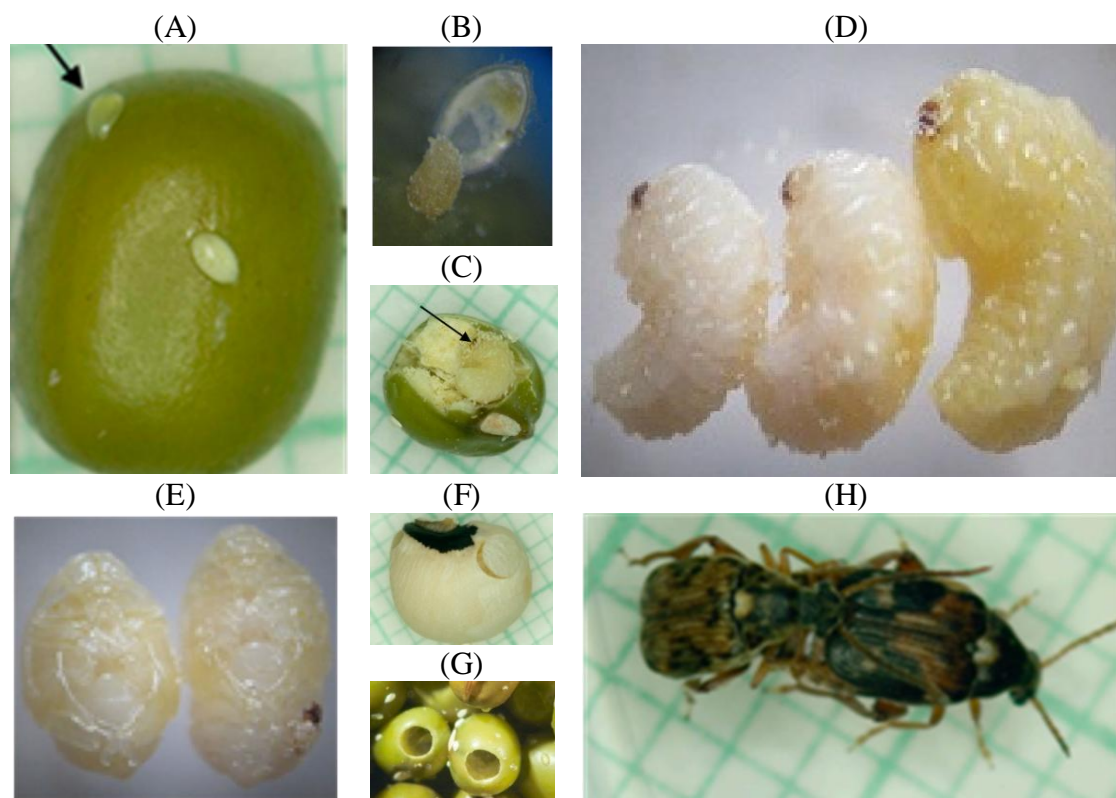


Figura 3. Ciclo reprodutivo de *C. maculatus*. Ovos depositados sobre a superfície do grão (A). Larva recém emergida penetrando no grão (B). Larva no interior do grão (C). Diferentes estágios larvais (D). Detalhe da pulpa de segundo estágio (E) Formação da janela para saída do inseto adulto (F) e detalhe da cavidade de pulpação após emergência do novo adulto (G). Cópula dos insetos adultos, dando início a uma nova geração. Adaptado de Beck and Blumer (2014) e Devi and Devi (2014).

Para efetuar a postura, a fêmea expele um líquido claro e de aspecto pegajoso, sendo o ovo colocado nesse meio, que endurece rapidamente e em seguida as larvas penetram e se desenvolvem no interior dos mesmos (Credland 1992; Regmi *et al.* 2012).

As larvas são do tipo curculioniforme, com coloração branco-leitosa, dotadas de mandíbulas desenvolvidas, capazes de romper os grãos (Gallo *et al.* 2002). As pupas são maiores que os adultos, da mesma coloração das larvas, medindo de 2,5 a 3,5 mm de comprimento e 1,5 a 2,0 mm de largura e próximo à emergência se tornam escuras (Credland *et al.* 1986; De Sá *et al.* 2014).

As fêmeas ovipositam em média setenta ovos, que apresentam aspecto assimétrico. A média de duração da fase larval é de quatorze dias e a pupal, de seis dias.

Os adultos apresentam-se na proporção de uma fêmea para um macho e têm sete a nove dias de longevidade medindo de 1,8 a 2,5 mm. (Mitchell 1975; Gallo *et al.* 2002).

2.3 Controle do Caruncho do Feijão-Caupi

2.3.1 Histórico do controle tradicional químico

O registros históricos datam a utilização de pesticidas 2.500 a.C. pelos Sumérios, que esfregavam enxofre no corpo para espantar pragas. Posteriormente em 1.500 a. C. os egípcios no documento Ebers, descrevem mais de 800 receitas como pesticidas e venenos (Taylor & Holley, 2007).

Nos tempos modernos, a indústria química de pesticidas obteve ascensão na 2º Guerra Mundial com a criação do DDT (diclorofeniltricloroetano) (Figura 4). O objetivo era erradicar o tifo doença transmitida pelo piolho para os soldados. Após a 2º Guerra Mundial o DDT foi encaminhado para uso na agricultura em todo o mundo, sendo comercializado pela primeira vez em 1943 nos Estados Unidos (Delaplane, 2000).

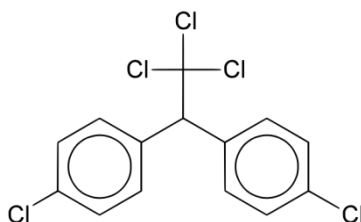


Figura 4. Estrutura química do DDT.

Os primeiros organofosforados produzidos pela indústria química na década de 40 foram o Paration e o Malation (Figura 5) que foram muito utilizados na Alemanha e onde logo apareceram os primeiros efeitos colaterais decorrentes da utilização desses compostos (Casarett, 2008).

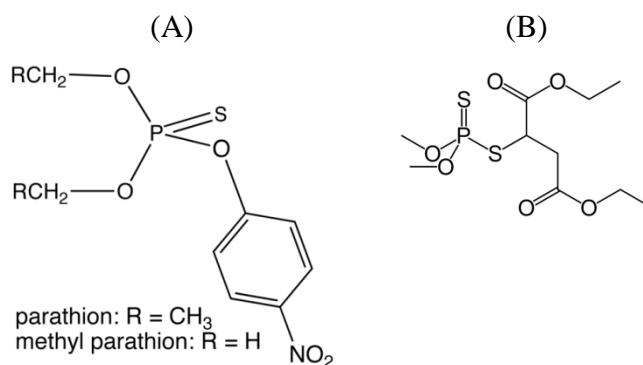


Figura 5. Estrutura química dos inseticida paration (A) e malation (B).

Acredita-se que em 1999, 40% do mercado mundial de pesticidas era representado por organofosforados, menos tóxicos ao ambiente em relação aos organoclorados (Santos *et al.* 2007). Dentro do cenário mundial, o Brasil é um dos maiores consumidores de defensivos agrícolas, em 2011 os gastos foram de US \$ 8,3 bilhões (Bettioli, 2011b).

O método tradicional para diminuir o dano econômico provocado pelo caruncho, *C. maculatus* sobre o feijão-fradinho envolve o uso de inseticidas fumigantes. O processo de fumigação consiste na liberação de gás do princípio ativo do inseticida.

No Brasil o gás utilizado para controle de pragas de grãos armazenados é a fosfina (fosfeto de magnésio) (Figura 6) encontrada na forma de pastilha indicada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil, através do sistema AGROFIT e classificada como extremamente tóxico e perigoso ao meio ambiente (AGROFIT-MAPA 2014).

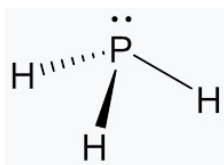


Figura 6. Estrutura da fosfina (PH₃).

As pastilhas fumegantes liberam o gás PH₃ que contém de 0,2 a 1 g do princípio ativo fosfina que em contato com o ambiente reage liberando o gás que possui efeito biocida eliminando as pragas (Lorini, 2011). No entanto, o produto armazenado deve

ser vedado (expurgo) para que apenas a praga entre em contato com o gás (Lorini, 2012).

De acordo com o autor (Lorini, 2011) o tempo mínimo e a concentração de exposição das pragas à fosfina devem ser de 120 horas à uma concentração de 400 ppm. No entanto, alguns problemas podem surgir do tratamento de sementes com fosfina como inibição da germinação e resíduos do composto nas sementes (FAO, 2015).

Em contrapartida, compostos de origem natural derivados de plantas podem ser mais eficientes em relação aos defensivos tradicionais, além de serem biodegradáveis. Dados da literatura relataram que os extratos alcoólicos das plantas *Callopogonium caeruleum* e *Piper nigrum* aplicados no feijão *Vigna* através de fumigação, promoveram maior eficiência no controle de *C. maculatus* em relação à fosfina (Cruz *et al.* 2012).

Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores com o 1,8-cineol (eucaliptol) em pastilha sobre *C. maculatus* em relação ao defensivo agrícola sintético fosfina (Marzanghi *et al.* 2013). Esses resultados demonstram que compostos extraídos de plantas são uma alternativa promissora no controle de *C. maculatus*.

2.3.2 Manejo integrado de pragas (MIP)

A aplicação de produtos químicos de forma desordenada para o controle de praga, promovem inúmeros problemas como: resistência aos inseticidas, aparecimento de pragas consideradas secundárias, o reaparecimento de pragas, efeitos maléficos sobre os predadores naturais e insetos polinizadores além dos efeitos tóxicos dos produtos ao homem (Gallo *et al.* 2002).

Devido a toda problemática causada pelo uso desordenado de defensivos agrícolas, no período de 1960-1970 surgiram as primeiras discussões sobre o desenvolvimento sustentável da agricultura no qual, coincidiu com a implementação do MIP, exigindo o desenvolvimento das técnicas de criação de acolhimento (natural ou alternativo) para utilização de programas de Controle Biológico (Parra, 2014).

No entanto, de acordo com a literatura a prática de MIP é mais antiga. Em registros datados a.C. relatam que os chineses usavam formigas predadoras para proteger pomares de citros de lagartas e besouros (Taylor & Holley 2007).

O objetivo principal do MIP não é erradicar a praga mas mantê-la abaixo do nível de dano econômico através de práticas que envolvem a utilização de ferormônios, plantas geneticamente modificadas, controle biológico e controle químico onde o único alvo seja a praga de interesse (Pinto-Zevallos & Zarbin, 2013).

Deste modo, para a implementação de um programa de MIP algumas considerações são imprescindíveis como reconhecimento das pragas mais importantes (pragas-chaves), avaliação dos inimigos naturais, estudos de fatores climáticos que afetam a dinâmica populacional da praga e seus inimigos naturais, determinação dos níveis de dano econômico e de controle, avaliação populacional (Amostragem), avaliação dos métodos mais adequados para incorporar um programa de manejo (Chandler *et al.* 2011).

A aceitação do MIP pelos agricultores no Brasil foi satisfatória, e um programa desenvolvido e executado na década de 70, para o controle da lagarta *Anticarsia gemmatilis* (praga da soja) alcançou grande êxito (Panizzi, 2013). No entanto, para que um programa de MIP obtenha sucesso é preciso investir em instrução e capacitação dos agricultores e demais trabalhadores do campo (Pretty, 2008).

O MIP possibilitou que novas tecnologias fossem implantadas na produção agrícola e com ele o interesse em moléculas que alterassem o comportamento dos insetos como os feromônios utilizados em armadilhas, os óleos essenciais ou os seus compostos voláteis, produzidos pelas plantas são utilizados como repelentes ou inibidores de oviposição (Cook *et al.* 2007).

2.3.3 Controle Alternativo

A utilização de produtos químicos de origem natural para o controle de pragas tem sido apoiada por políticas públicas de incentivo (Pretty, 2008). Há um grande interesse nos métodos de controle de insetos que exploram essas substâncias naturais que desempenham funções de interação entre os seres vivos, como os feromônios, ou que provoquem alterações comportamentais e/ou fisiológicas, como tem sido observado, no caso dos compostos voláteis que compõem os óleos essenciais (Cook *et al.* 2007).

Contudo, para que essa inovação tecnológica possa ser explorada comercialmente, algumas limitações devem ser superadas quanto aos aspectos burocráticos, captação de recursos para investimento, interesse e adesão do agricultor, entre outros (Chandler *et al.* 2011). Muitas são as etapas envolvidas com a regularização de defensivos agrícolas no Brasil até que possam ser registrados pelas agências e órgãos federais como MAPA, ANVISA e IBAMA, tornando o caminho longo e custoso (Goulart *et al.* 2015).

No entanto, o Brasil ainda está em busca de uma legislação específica para o registro de biopesticidas (Bettiol, 2011). O entrave para o aumento da comercialização de biopesticidas no Brasil é devido aos trâmites legais do governo, uma das regularizações mais complexas do mundo. Existem inseticidas botânicos registrados a base de rotenona, piretrina e azadiractina (Figura 7) (Isman 2006; Isman 2015).

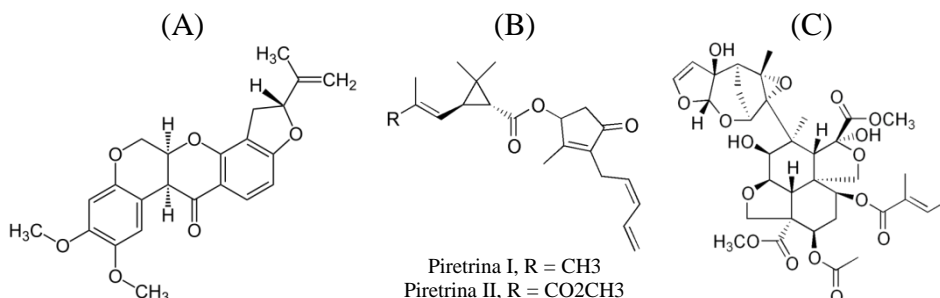


Figura 7. Estrutura química da rotenona (A), piretrina (B) e azadiractina (C).

A comercialização de inseticidas à base de azadiractina, um composto natural isolado da planta nim (*Azadirachta indica*), vem crescendo, assim como, o número de artigos publicados entre os anos de 2007 e 2012 sobre bioinseticidas, principalmente, na Índia, China e Brasil (Isman & Grieneisen 2014).

Em 2009 o mercado de biopesticidas movimentou cerca de 25 milhões de dólares (Tripathi *et al.* 2009). O alto custo da regularização de defensivos químicos tradicionais, a toxicidade dos mesmos ao ambiente e aos organismos não-alvo, contribuem para os investimentos em inovações tecnológicas envolvendo produtos naturais e o controle de pragas.

Deste modo, para a concretização do desenvolvimento agrícola sustentável os setores econômico, social e ambiental devem estar envolvidos em inovação tecnológica, ou seja, em novas moléculas que possam proporcionar eficiência agrônômica, novos mecanismos de ação, manejo da resistência de pragas, maior seletividade e menor impacto ambiental.

2.4 Óleos Essenciais

2.4.1 Produção de compostos voláteis

Segundo a ISO 9235, o óleo essencial é um produto obtido a partir da matéria-prima natural de origem vegetal, extraído por destilação com vapor d'água, por meio de

processos mecânicos a partir do epicarpo de frutas cítricas e por destilação a seco, após separação da fase aquosa, se houver (ISO-9235, 2013). Do ponto de vista puramente químico, é uma mistura complexa (Figura 8) formada por ésteres, alcoóis, aldeídos, terpenos, fenilpropanoides e outras substâncias voláteis (Dewick, 2002a; Dewick 2002b).

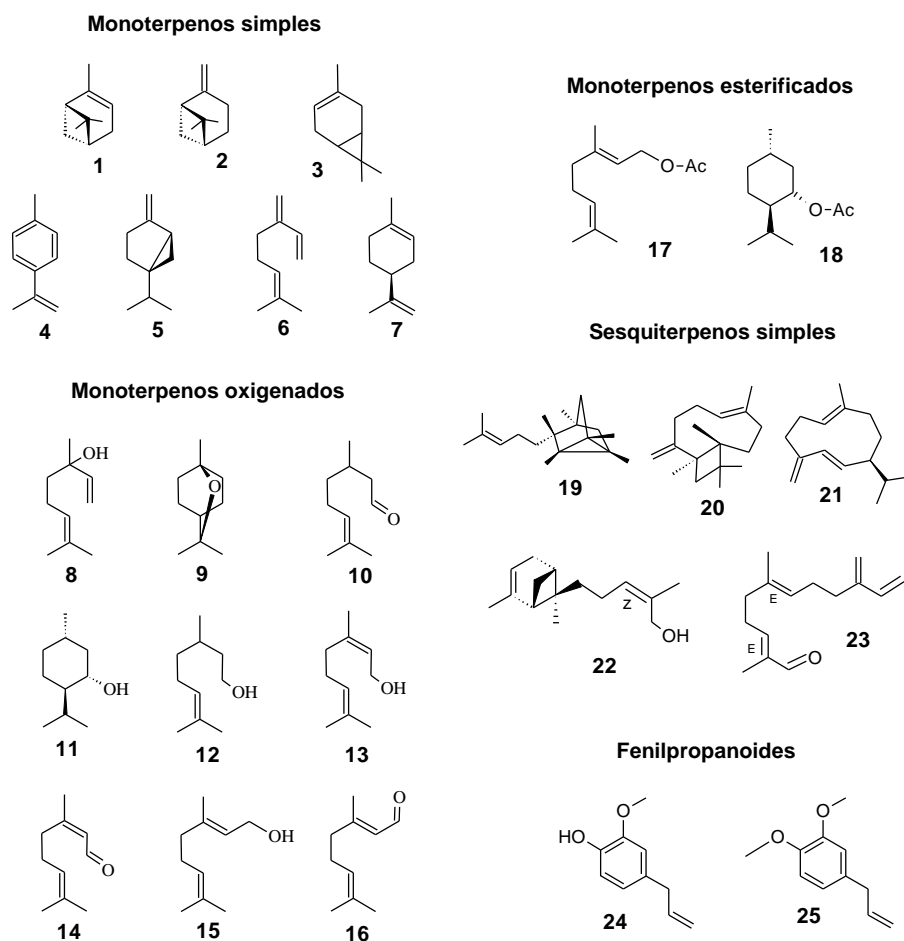


Figura 8. Alguns compostos voláteis de plantas aromáticas. α -pineno (1), β -pineno (2), δ -3-careno (3), *p*-cimeno (4), (-)-sabineno (5), mirceno (6), (-)-limoneno (7), linalol (8), eucaliptol (9), citronelal (10), mentol (11), citronelol (12), nerol (13), neral (14), geraniol (15), geranial (16) Acetato de citronelol (17), Acetato de mentol (18), α -santaleno (19), β -cariofileno (20), germacreno D (21), (Z)- α -trans-bergamotol (22), β -sinensal (23), eugenol (24) e metil eugenol (25).

Os voláteis são encontrados em diferentes órgãos, em tecidos que apresentam estruturas celulares especializadas, os quais são responsáveis pela síntese, estocagem e liberação das substâncias voláteis (Svoboda *et al.* 2000). Os compostos voláteis no gênero *Cymbopogon* são encontrados principalmente em células parenquimáticas do

lado adaxial das folhas (Martins *et al.* 2004; Ogie-Odia *et al.* 2010).. Estas células são responsáveis pela síntese e a estocagem destes voláteis, que para serem liberados na atmosfera dependem de uma ação física que leve ao rompimento das estruturas celulares (Figura 9).

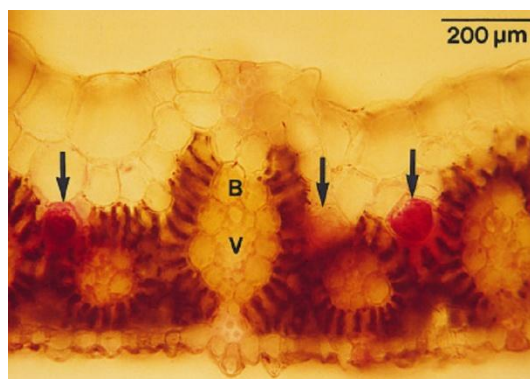


Figura 9. Secção transversal de lâmina foliar de *C. citratus*. Setas: células parenquimáticas diferenciadas coradas com reagente de Schiff, indicando a presença de substâncias lipofílicas, principalmente aldeídos (Lewinsohn, 1998)

As principais vias envolvidas são: via chiquimato/ aragonato que ocorre nos plastídeos seguido por etapas no retículo endoplasmático que levará a síntese de diferentes fenilpropanóides (Gang 2005; Gang *et al.* 2001; Dixon & Paiva 1995; Winkel-shirley 1999; Wagner & Hrazdina 1984); e as vias mevalônica e independente da mevalônica (MEP), que ocorrem respectivamente no citosol e plastídeos, e culminam com a síntese de unidades isoprênicas, que são intermediários na síntese de terpenóides (Paul M. Dewick 2002b; Cheng *et al.* 2007; Lichtenthaler *et al.* 1997; Lichtenthaler 1999).

O perfil químico dos óleos essenciais pode ser modulado diversos fatores como a localização na planta (folha, flor, fruto, caule), variações ambientais (composição do solo, temperatura, doenças, ataques de insetos, poluição), geográficas (altitude), tempo de colheita, genótipo e armazenamento (Figueiredo *et al.* 2008).

2.4.2 Óleos essenciais no controle de insetos-pragas

Os óleos essenciais estão associados a algumas funções ecológicas importantes para o estabelecimento dos vegetais em seu ecossistema, exercendo papel de defesa contra microorganismos e predadores, assim como na atração de insetos e outros

agentes benéficos (Ootani *et al.* 2013; Rattan 2010) talvez por isso muitos compostos naturais apresentam efeito repelente ou inseticida.

Trabalhos acadêmicos têm demonstrado a ação dos óleos essenciais sobre o ciclo de vida de diferentes insetos-praga de grãos armazenados (Regmi *et al.* 2012; Ileke *et al.* 2013; Marangoni *et al.* 2013; Ebadollahi *et al.* 2013) sendo que o mecanismo de ação dos óleos essenciais sobre os insetos pode estar envolvido com a espermatogênese e histoquímica dos ovários (Cruz *et al.* 2012; De Sá *et al.* 2014) ou por meio de alvos bioquímicos (Tang *et al.* 2014; Shang *et al.* 2012; López *et al.* 2010).

Artigos científicos tem demonstrado a ação dos óleos essenciais de *Myristica fragrans*, *Melaleuca alternifolia*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Thymus vulgaris* sobre o inseto praga *C. maculatus* (Ahmed, 2010; Alibabaie & Safaralizadeh, 2015). Também foram avaliados a tolerância dos insetos *Sitophilus oryzae* (Coleoptera, Curculionidae), *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera, Bostrichidae) e *Cryptolestes pusillus* (Coleoptera, Cucujidae) para oito monoterpenos isolados, sendo que o linalol foi o composto que promoveu a menor tolerância, além de maior atividade de esterases (López *et al.* 2010).

Segundo relatos científicos, as exposições aos monoterpenos causam perturbações metabólicas aos insetos, levando-os à morte e isso se deve ao efeito sinérgico dos compostos majoritários, como citronelal, citronelol e geraniol que são apontados como compostos bioativos (Ootani *et al.* 2013). Também foi relatado que os monoterpenos causam injúrias na mitocôndria e no complexo de golgi, prejudicando a respiração e diminuindo a permeabilidade das células (Tripathi *et al.* 2009).

Atualmente, tem se utilizado uma técnica chamada de “Push-Pull”, no qual os óleos essenciais e/ou seus componentes provocam estímulos de repelência e atração, promovendo alterações comportamentais no inseto-praga, os atraindo para armadilhas, onde serão coletados e/ou eliminados (Khan *et al.* 2014).

As substâncias geraniol, citral e α -pineno utilizadas em armadilhas no sistema "push-pull" mostraram efeito de repelência frente ao gorgulho praga das palmeiras *Rhynchophorus ferrugineus* (Guarino *et al.* 2014). O mesmo foi verificado no controle de *Aedes Aegypti* em experimentos com óleo essencial da *Nepeta cataria* (Obermayr *et al.* 2015).

A utilização de óleos essenciais no controle de *C. maculatus* têm sido apontada como uma técnica barata e eficaz, porém devido a volatilidade dos compostos químicos

as formulações devem considerar a liberação de seus componentes ativos no ambiente de interesse para o efetivo controle da praga (Tripathi et al. 2009; Lago *et al.* 2011).

2.5 Plantas Aromáticas

2.5.1 Capim-limão (*Cymbopogon citratus*)

O *Cymbopogon citratus* (Poaceae) (Figura 10) é uma espécie originária da Índia, porém cultivada por todo o mundo principalmente em regiões tropicais. No Brasil é conhecido popularmente como capim-limão, capim-santo e capim-cidreira. Suas folhas são basais, planas, estreitas, longas (50 e 100 cm), com margens ásperas, cortantes e coloração verde. É uma planta perene e sua produção destaca-se nos estados Sul e Sudeste brasileiro, sendo utilizada na medicina popular brasileira na forma de chá como calmante e para tratamento de distúrbios gastrointestinais. O óleo essencial das folhas é amplamente utilizado nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, de cosméticos e perfumaria, bem como para obtenção do citral, componente majoritário que lhe confere forte odor de limão (Martinazzo *et al.* 2007; Carlini *et al.* 1986; Castro & Ramos, 2003; GOMES *et al.* 2007).



Figura 10. Plantas de Capim-limão (*Cymbopogon citratus*) no campo. Fonte: http://extension.illinois.edu/herbs_sp/lemon-grass.cfm

De modo geral, o óleo essencial de *C. citratus* possui 11-12% de mirceno, 28-33% de neral e 40-43% de geranial (Bossou *et al.* 2013; Owolabi *et al.* 2009), podendo apresentar na sua composição entorno de 12% de geraniol (Olivero-Verbel *et al.* 2010).

O óleo essencial de capim-limão possui propriedades inseticidas, antifúngicas e farmacológicas (Cunha *et al.* 2012), tornando-se um produto de interesse para a indústria, por exemplo, a farmacêutica, na busca por diferentes medicamentos, entre eles para o tratamento de *Candida albicans* (Aldawsari *et al.* 2015); na indústria de defensivos agrícolas aplicado ao controle de insetos-pragas (Hernandez-Lambraño *et al.* 2015), entre outros exemplo.

São vários os trabalhos mostrando o potencial dos óleos essenciais para o controle de insetos, dentre os quais se podem citar os estudos contra as pragas de grãos armazenados *Oryzaephilus surinamensis* e *Sitophilus zeamais* (Hernandez-Lambraño *et al.* (2015), *Callosobruchus maculatus* (Rubasinghege *et al.* 2006; Ketoh *et al.* 2005; Ketoh *et al.* 2002; Raja *et al.* 2001), contra larvas dos mosquito *Aedes aegypti* (Vera *et al.* 2014), e carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* (Santos & Vogel, 2012).

2.5.2 Capim-citronela (*Cymbopogon nardus*)

O *Cymbopogon nardus* (Poaceae) (Figura 11), também originário da Ásia tropical e amplamente cultivado nas regiões tropicais do mundo, é vulgarmente conhecido no Brasil como capim-citronela, citronela, citronela-do-ceilão e cidró-do-paraguai. É uma planta perene, com 80 a 120 cm de altura, folhas planas, inteiras, estreitas, longas (50 a 100 cm) e aroma semelhante ao do eucalipto citriodora (Castro & Ramos 2003). A composição química do óleo essencial contém entre 30-40% de geraniol, 22-36% de citronelal, 15-20% de nerol, 10-12% de citronelol, 4-5 % de acetato de geraniol, 3-5% de elemol e 1-3% de acetato de citronelol (Setiawati *et al.* 2011; Hamzah *et al.* 2014).



Figura 11. Cultivo de capim-citronela (*Cymbopogon nardus*). Fonte: Perini, 2008.

O óleo essencial extraído das folhas de *C. nardus* possui propriedades de repelência (Shasany *et al.* 2000) pelo qual é explorado economicamente, além de apresentarem ação fungicida (Soares *et al.* 2014) e bactericida (Wei & Wee, 2013). Existe também o interesse da utilização do óleo essencial para o controle de insetos de interesse agrícola (Nyamador *et al.* 2010; Hedjal-chehheb *et al.* 2013).

O óleo essencial de *C. nardus* apresentou toxicidade contra os insetos-praga de grãos *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus zeamais*, *Palorus subdepressus*, *Cryptolestes sp* (Dombia *et al.* 2014), contra o carrapato-estrela *Amblyomma cajennense* (Clemente *et al.* 2010), repelência para o carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* (Agnolin *et al.* 2010) e a lagarta *Helicoverpa armigera* (Setiawati *et al.* 2011).

2.6 Resistência Metabólica dos Insetos aos Xenobióticos

Apesar de muitos agrotóxicos eficientes estarem disponíveis aos agricultores, existe a necessidade constante de buscar-se novas moléculas, pois, os insetos produzem muitas gerações e rápida sucessão, que leva ao desenvolvimento de resistência ao princípio ativo dos agrotóxicos, (Ricardo, 2011; Sosa-gómez, 2014). A resistência a inseticidas é um problema real e antigo e que está em expansão, pois desde a década de 1940 o número de casos e agrotóxicos envolvidos com a resistência vem aumentando, incluindo a fosfina (Sparks & Nauen, 2014).

Os mecanismos de resistência aos produtos químicos envolvem: redução na penetração do inseticida, aumento na atividade de enzimas de resistência a xenobióticos e alteração genéticas que promovem modificações estruturais em proteínas e enzimas relacionadas ao sistema nervoso (Hemingway & Ranson, 2000; Russell *et al.* 2011).

A resistência metabólica está freqüentemente associada ao aumento da expressão dos genes, seguido pela ampliação na síntese das enzimas de resistência, que são capazes de metabolizar os inseticidas, por hidrólise e adição de grupamentos polares, processos que promovem eliminação de xenobióticos de modo eficiente (Casarett 2008; Reddy *et al.* 2012).

De modo geral, a transformação e eliminação de xenobióticos envolvem três fases (Figura 12). A fase I consiste na atividade de enzimas, dentre elas as esterases, as monooxigenases dependentes do complexo citocromo P450, que envolvem reações de hidrólise, redução e oxidação; a fase II que consiste na atividade de enzimas que promovem conjugação de co-substratos a seus substratos, como a glutathione S-transferase, que através de conjugação com glutathione aumenta a solubilidade dos xenobióticos (Berenbaum & Johnson, 2015); a fase III envolve a eliminação ou excreção dos xenobióticos modificados nas fases I e II para fora das células, com o auxílio de proteínas transportadoras do tipo ABC (Xu *et al.* 2013).

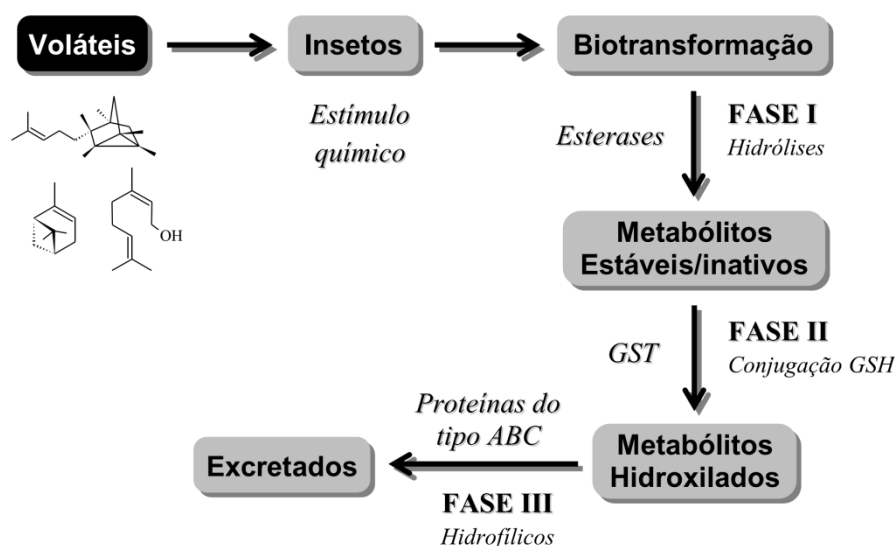


Figura 12. Mecanismo geral de resistência metabólica aos xenobióticos, envolvendo três fases.

2.7 Enzimas de Resistência

O aumento na atividade das esterases tem sido reportado como o principal mecanismo de resistência aos inseticidas organofosforados, em uma grande variedade de insetos (Casarett, 2008; Alvarez *et al.* 2013; Das & Dutta, 2014). Esta atividade é

resultante de uma superprodução de esterases não específicas, as quais metabolizam a molécula do inseticida antes que a mesma alcance seu alvo (Casarett 2008; Kamel 2007).

As esterases são uma grande família de enzimas que hidrolizam o xenobiótico, englobando os grupos α e β -esterases. As enzimas do grupo das α -esterases são classificadas por serem capazes de hidrolizar organofosforados ou carbamatos, enquanto que as enzimas pertencentes do grupo das β -esterases como a acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e carboxilesterase ou carboxiesterase (CbE, EC 3.1.1.1) são caracterizadas por serem inibidas por organofosforados ou carbamatos, (Montella *et al.* 2012; Punta *et al.* 2011). As enzimas de detoxificação de fase I alfa e beta-esterase (α -Est e β -Est), acetilcolinesterase, carboxilesterase ou carboxiesterase e de fase II glutationa-S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) podem ser encontradas no retículo endoplasmático ou no citoplasma da célula (Ross *et al.* 2010).

Os resíduos de aminoácidos presentes no sítio de ligação de esterases de insetos são: Ser, Cis ou Asp (resíduos nucleófilos) e Glu ou Asp (resíduos ácidos). Essa tríade de aminoácidos no sítio de ligação da enzima é essencial para a atividade catalítica (Jackson *et al.* 2013). Em insetos, essas enzimas diferem quanto ao resíduo nucleófilo que são Ser e Cis para α -Est e β -Est, respectivamente (Montella *et al.* 2012).

As esterases são enzimas denominadas “promíscuas” por catalisarem reações com diferentes substratos contendo funções éster, tioéster e amida-éster (Figura 13), possibilitando a célula metabolizar um amplo espectro de substratos, apesar de apresentarem alta estereoespecificidade (Aranda *et al.* 2014).

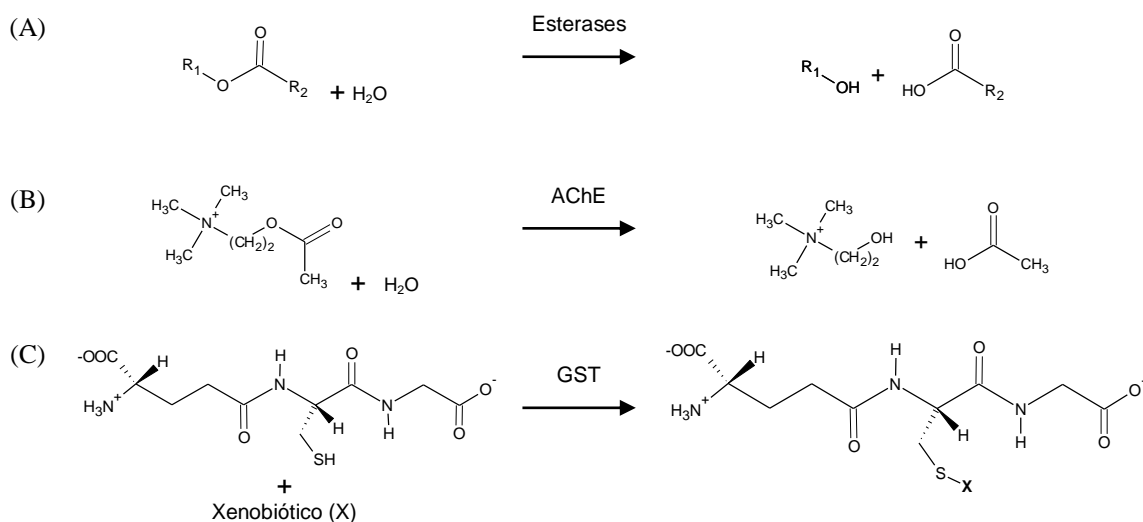


Figura 13. Atividade geral de enzimas de detoxicação de fase I esterases (A), acetilcolinesterase (B) e de fase II glutationa S-transferase (C).

As esterases dos insetos estão relacionadas a inúmeros processos como a degradação de moléculas voláteis, reprodução e digestão (Montella *et al.* 2012), assim como, alterações comportamentais, redução do teor de lipídios neutros e do tempo de vida do inseto (Birner-Gruenberger *et al.* 2012).

De acordo com a literatura, as carboxilesterases podem estar relacionadas ao metabolismo de lipídios devido ao fato de seu sítio ativo possuir afinidade com ésteres metílicos de ácidos graxos, sendo facilmente hidrolisados por essas enzimas. Este mecanismo pode estar relacionado com a presença de uma α -hélice anfipática no terminal N com a presença de aminoácidos carregados positivamente (Jackson *et al.* 2013)

Os resíduos de aminoácidos no sítio de ligação da AChE de insetos são His, Glu e Ser, responsáveis pela reação de hidrólise da acetilcolina levando a formação de um complexo acetil-AChE e posterior liberação de colina (Soreq & Seidman, 2001; Dou *et al.* 2013).

A AChE é essencial para os insetos e animais superiores, pois, está envolvida com os estímulos nervosos na transmissão colinérgica (López & Pascual-Villalobos 2010; Rajashekar *et al.* 2014). Sua inibição provoca acúmulo de acetilcolina na sinapse, causando um estado de estimulação permanente, com eventual morte do inseto (Rattan 2010; Mwila *et al.* 2013).

A GST é uma enzima de fase II que está localizada no citoplasma da célula e possuem atividade na membrana mitocondrial, são responsáveis pela conjugação da glutationa (GSH) com xenobióticos (figura 13), promovendo uma maior solubilidade em água e facilitando a eliminação através das enzimas de fase III (Casarett 2008; Enayati *et al.* 2005).

A GST de insetos é composta por dois sítios catalíticos: o sítio H, com um domínio C-terminal de caráter hidrofóbico para ligação com o xenobiótico e o sítio G, na porção N-terminal, para a ligação com GSH. No sítio G há formação de um ânion tiolato na GSH, o qual reage com o xenobiótico no sítio H (Hemingway *et al.* 2004; Oakley *et al.* 2001).

Diferentes trabalhos têm relatado o aumento da atividade total das enzimas esterases e GSTs em piolho-do-algodão (Shang *et al.* 2012), ácaro-rajado (Moghadam *et*

al. 2012), mosquito *Aedes aegypti* (Maestre *et al.* 2010), taturana vermelha (Muthusamy *et al.* 2013) e o mosquito do gênero *Anopheles* (Nkya *et al.* 2013) sob o efeito de xenobióticos (DDT, organofosforados e piretróides), agindo como uma fonte secundária de resistência (Bogamuwa *et al.* 2002; Gamil *et al.* 2011; Moreira *et al.* 2012; Wright *et al.* 2000).

Na literatura existem relatos de produtos naturais, óleos essenciais e monoterpenos promovendo a inibição da enzima AChE contra diversos insetos (Kumrungsee *et al.* 2014; Ebadollahi *et al.* 2013; Jeon *et al.* 2013; Muthusamy *et al.* 2013; Tang *et al.* 2014; Maestre *et al.* 2010; Enayati *et al.* 2005).

2.8 Metabolismo de Lipídios

Os insetos utilizam os lipídios de reserva com a finalidade de suprir as necessidades energéticas que atividades como vôo, acasalamento, ovogênese, assim como, o desenvolvimento corpóreo, demandam. Os lipídios são liberados por indução hormonal (hormônio adipocinético, AKH), no corpo gorduroso principalmente na forma de triacilgliceróis (Athenstaedt & Daum, 2006).

A mobilização da reserva lipídica (Figura 12) é desencadeada pela estimulação do AKH, que modula as concentrações de AMPc e Ca^{2+} , os quais desencadeiam processos que levam a ativação das lipases, degradação parcial dos triacilgliceróis (TG) em ácidos graxos (AG) e diacilgliceróis (DAG), que em seguida, são oxidados (AG) e transportados (DAG) por lipoproteínas através da hemolinfa até os demais tecidos (Gilbert & Chino 1974; Arrese *et al.* 2001). (Figura 14).

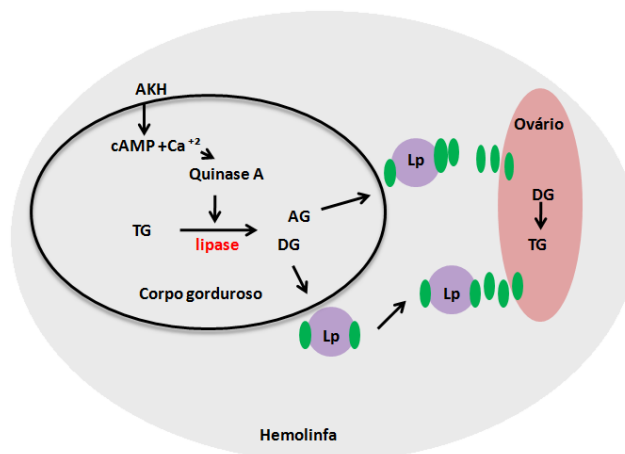


Figura 14. Mobilização de lipídios do corpo gorduroso para a ovogênese. AG= ácido graxo, DAG = diacilglicerol, Lp = lipoforinas. Modificado de Atella *et al.* 2012; Arrese *et al.* 2001.

Após a incorporação de DG pelos ovários ocorre a síntese de TG, a principal reserva energética dos ovos que será utilizada para o desenvolvimento do embrião. O mecanismo de síntese de TG nos oócitos ainda não foi elucidado, porém sabe-se que a síntese de novo em insetos é limitada (Ziegler & Vanantwerpen, 2006).

As fêmeas de *Callosobruchus* possuem um par de ovários compostos por seis ovariolos com grande número de oócitos, os quais são amadurecidos com o aporte de lipídios e proteínas (Figura 15). Os ovários são divididos em quatro regiões (filamento terminal, germário, vitelário e oviduto) e se comunicam com a espermateca, através do oviduto. No filamento terminal encontram-se as células somáticas, no germário as células em constante diferenciação celular e no vitelário os ovos em diferentes estágios de maturação (Mohamed *et al.* 2015; Ziegler & Vanantwerpen, 2006). Segundo relatos científicos anormalidades podem comprometer a estrutura dos ovários (Sreelatha & Geetha, 2010).

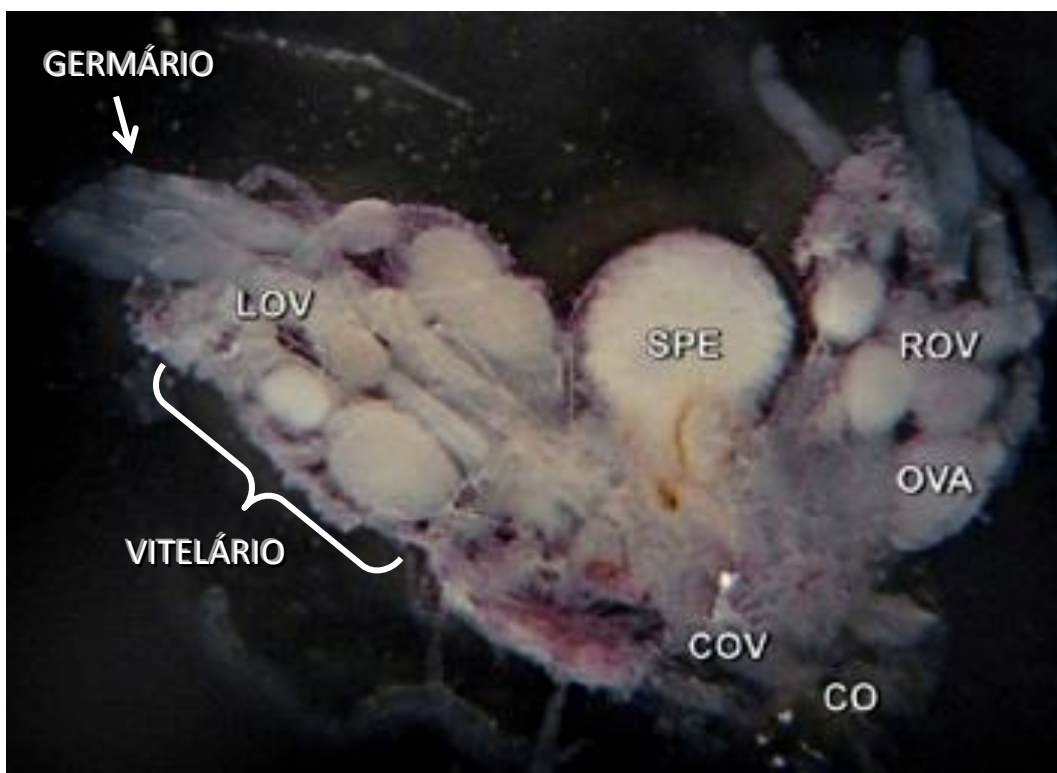


Figura 15. Aparelho reprodutor de uma fêmea de *C. maculatus*. Ovário direito (ROV), ovário esquerdo (LOV), ovariolo (OVA), espermateca (SPE), oviduto (COV) e gonoforo (CO). Adaptado de Mohamed *et al.* 2015.

Portanto, com o intuito de se buscar alternativas ao uso de agrotóxicos, os objetivos do presente trabalho foram avaliar os efeitos dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *C. nardus* sobre o ciclo reprodutivo, enzimas do metabolismo de biotransformação e o conteúdo de lipídios de reserva em *Callosobruchus maculatus*.

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais

3.1.1. Obtenção e manutenção dos insetos

Os insetos adultos da espécie *Callosobruchus maculatus* (Fab.) foram cedidos pelo Dr. J.H.R. Santos Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil. A manutenção e ampliação das colônias são atividades realizadas continuamente desde 1978, em ambiente contendo grãos de feijão-fradinho (*Vigna unguiculata*), com fotoperíodo natural, temperatura de 29°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) e umidade relativa de 65% ($\pm 5\%$). As atividades foram conduzidas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes, no Departamento de Química da UFRRJ.

3.1.2 Coleta das plantas

Os espécimes vegetais *Cymbopogon citratus* e *C. nardus* foram coletados na área experimental do Setor de Plantas Medicinais, Departamento de Fitotecnia, IA/UFRRJ, situado no município de Seropédica-RJ (22°45'39.65"S; 43°41'55.92"O). Depois foram secas a temperatura ambiente, protegidos da luz e umidade.

3.2 Extração, Análise Química e Identificação dos Compostos Voláteis

3.2.1 Extração do óleo essencial por hidrodestilação

Folhas de *C. citratus* e *C. nardus* (± 100 g) foram separadas para a extração dos óleos essenciais. O material foi adicionado ao balão de vidro de 1000 mL contendo 600 mL de água destilada e, em seguida, o aparelho de Clevenger foi conectado as partes restantes e ligada a manta aquecedora. Assim que se iniciou a condensação do hidrolato, foi definido o tempo de uma hora para o recolhimento da amostra de óleo essencial +

hidrolato (± 20 mL). O procedimento de isolamento do óleo iniciou-se com a partição, utilizando-se volume igual de óleo essencial + hidrolato e diclorometano (4 x 5 mL). A fase de menor polaridade contendo diclorometano + óleo essencial foi recolhido com uma pipeta Paster. O volume total recolhido foi seco em sulfato de sódio anidro e filtrado, em seguida, concentrado inicialmente em evaporador rotativo e depois o diclorometano restante foi totalmente eliminado com gás nitrogênio, utilizando-se Mini-Vap (Sigma-Aldrich, Brasil), em temperatura ambiente até peso constante (Figura 16)

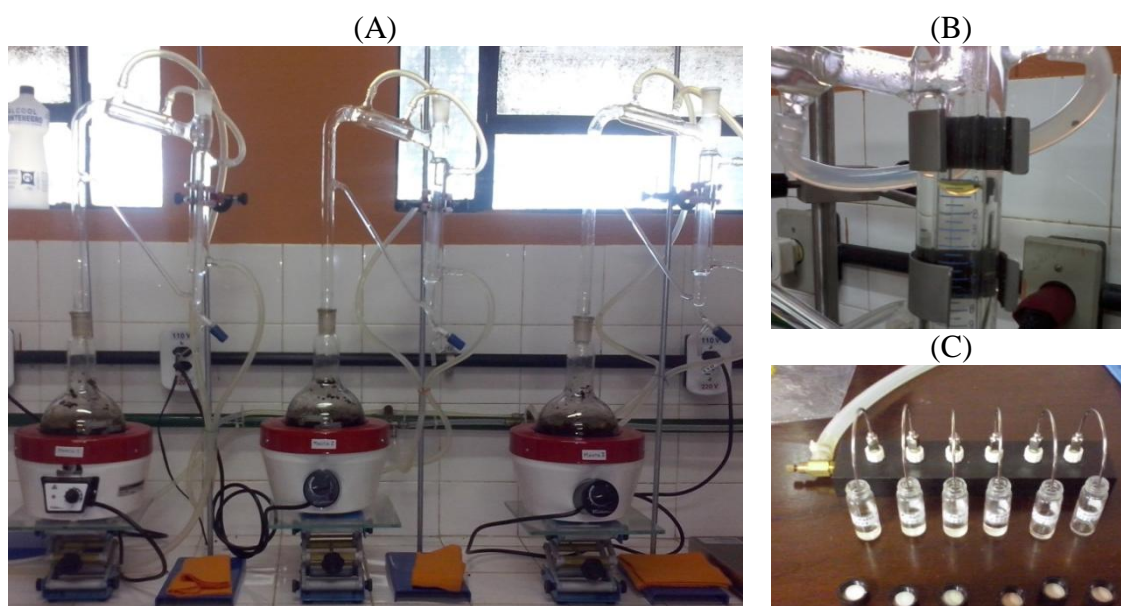


Figura 16. Sistema de hidrodestilação (A). Detalhe do óleo essencial e o do hidrolato no aparelho de Clevenger (B). Eliminação do solvente presente no óleo essencial com auxílio de N_2 gasoso (C). Laboratório de Plantas Aromáticas e Medicinais, DF/IA/UFRRJ.

3.2.2 Análise química dos óleos essenciais por CG-DIC e CG-EM

Um cromatógrafo Gasoso 5890 Series II (Hewlett-Packard, USA), equipado com um detector de ionização de chama em um injetor no modo “split” (1:20) foi utilizado para separar e detectar os constituintes do óleo essencial. As substâncias foram separadas em uma coluna capilar de sílicas fundida similar a DB5 (30 m H 0,25 mm H 0,25 μ m). O hélio foi utilizado como gás carreador com fluxo de 1 mL min^{-1} . A programação da temperatura da coluna foi de 60 $^{\circ}C$ por 2 min com incremento de 5 $^{\circ}C$ min^{-1} até 110 $^{\circ}C$, seguido por incremento de 3 $^{\circ}C$ min^{-1} até 150 $^{\circ}C$ e, finalmente, seguido por incremento de 15 $^{\circ}C$ min^{-1} até 290 $^{\circ}C$, mantidos por 15 minutos. As

temperaturas do injetor e do detector foram de 220 e 290 °C, respectivamente. Um cromatógrafo Gasoso – espectrômetro de massa QP-2010 Plus (Shimadzu, JPN) foi utilizado para separar e analisar as substâncias presentes no óleo essencial. O fluxo de hélio, a coluna capilar e a programação de temperatura para a análise por CG-EM foram as mesmas descritas para a análise por CG-FID. As temperaturas do injetor e de interface foram de 220 e 250 °C, respectivamente. O espectro de massa foi obtido em um detector quadrupolo operando a 70 e V, com intervalo de massa entre 40 e 400 m/z e a razão de 0,5 scan s⁻¹.

3.2.3 Identificação dos voláteis nos óleos essenciais

A identificação dos compostos voláteis no óleo essencial foi baseada nos índices de retenção linear (IRL) e os espectros de massas das amostras, comparado com os padrões autênticos injetados nas mesmas condições, com o banco de dados NIST (2008) e com o índice de Kovats, IK (Adams, 2007). O IRL foi calculado com base na co-injeção das amostras e a série de alcanos (Van Den Dool & Kratz 1963).

3.3 Atividade Biológica dos Óleos Essenciais X *Callosobruchus maculatus*

3.3.1 Concentrações crescentes dos óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus*

Insetos adultos com 3 dias de vida e sadios da espécie *C. maculatus* foram previamente selecionados e em seguida, em cada tubo falcon (50 mL) foram colocados 15 insetos na proporção de 1:2 (fêmea/macho) e 30 grãos de feijão (*Vigna unguiculata*). Depois, no lado interno das tampas dos tubos falcon, foram fixados disco de papel de filtro com dois centímetros de diâmetro, sobre os quais foram vertidos os óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus* proporcionando concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 µL cm⁻³. Os tratamentos controles não receberam óleos essenciais. Os testes foram realizados com cinco repetições. Os insetos foram monitorados nos tempos de 6, 12, 24 e 48 horas e armazenados em câmara climatizada com fotoperíodo natural, temperatura de 29°C (± 1°C) e umidade relativa de 65% (± 5%). Após 48 horas, os tubos falcon foram abertos para a contagem dos insetos mortos e da postura de ovos. Depois, as tampas foram removidas e substituídas por uma tela fina (filó). Após 28 dias foram realizadas as contagens dos insetos que emergiram dos grãos.

3.3.2 Efeito do óleo essencial de *C. citratus* X fêmeas virgens e copuladas

Para a verificar a hipótese de que o óleo essencial de *C. citratus* possui efeito sobre a reprodução das fêmeas de *C. maculatus*, foram utilizados tubos Falcon (50 mL) contendo 30 grãos do feijão e 9 insetos na proporção 1:2 (fêmea/macho), recém emergidos dos grãos. Os tratamentos foram realizados da seguinte forma: A) Controle 1 - fêmeas virgens sem o efeito do óleo essencial. B) Controle 2 - machos e fêmeas virgens sem o efeito do óleo essencial. C) Tratamento 1 - machos sob o efeito do óleo essencial e fêmeas virgens sem o efeito do óleo essencial. D) Tratamentos 2 - fêmeas virgens sob o efeito do óleo essencial e machos sem o efeito do óleo essencial. Os insetos tratados com o óleo essencial de *C. citratus* foram submetidos a uma concentração de $0,4 \mu\text{L cm}^{-3}$ do óleo por 12 horas. As repetições, condições de incubação e de monitoramento foram as mesmas citadas no item anterior (3.3.1).

3.3.3 Alguns aspectos metabólicos de *C. maculatus* sob efeito dos óleos essenciais

Foram utilizados tubos Falcon (50 mL) contendo 30 grãos do feijão e 10 insetos, recém emergidos. Para os tratamentos, foram utilizadas alíquotas de $20\mu\text{L}$ e $5\mu\text{L}$ dos óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus*, proporcionando as concentrações de $0,4$ e $0,1\mu\text{L cm}^{-3}$, para os tempos de incubação de 12 e 6 horas, respectivamente. O controle não recebeu óleo essencial. As concentrações e tempos de incubação foram definidos de modo a evitar a mortalidade dos insetos. As repetições, condições de incubação e de monitoramento foram as mesmas citadas no item anterior (3.3.1).

3.3.3.1 Conteúdo protéico no extrato bruto de *C. maculatus* sob efeito dos óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus*

Amostras de insetos tratados e não tratados com os óleos essenciais (10 insetos) foram congeladas em nitrogênio líquido, maceradas e homogeneizadas em 1 mL de solução tampão PBS (0,1 mM) pH 7,4. Depois o macerado foi recolhido, centrifugado por 10 minutos (14.000 rpm e 4°C) e o sobrenadante armazenado no freezer a -20°C (Bogamuwa *et al.* 2002). Para a determinação da concentração de proteínas no homogeneizado foi utilizada a metodologia proposta por Peterson (1977), com base na curva padrão de albumina bovina, em duplicata.

3.3.3.2 Determinação das atividades total de algumas enzimas no extrato bruto de *C. maculatus* sob efeito dos óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus*

As atividades das enzima alfa e beta-esterase foram determinadas através da hidrólise de alfa e beta-naftil-acetato, respectivamente; a atividade da carboxiesterase foi determinada através da hidrólise de *p*-nitrofenil-acetato; a atividade da acetilcolinesterase foi determinada utilizando o método de Ellman *et al.* (1961) modificado e a atividade da enzima glutathiona-S-stransferase foi determinada através do método proposto por Habig *et al.* (1974). O protocolo utilizado para a execução das atividades foi o desenvolvido pela Fundação Osvaldo Cruz com base em *Aedes aegypti* (FIOCRUZ 2006), Os ensaios foram realizados com 5 repetições e as análises em duplicata.

a) Determinação da atividade alfa e beta-esterase.

Para determinar a atividade enzimática da alfa ou beta-esterase foram adicionados 25 µg de proteínas do homogeneizado de insetos de *Callosobruchus maculatus* em cada tubo de ensaio contendo previamente 200 µL de alfa ou beta-naftil-acetato (1,5 mM) em tampão fosfato de sódio (20 mM) pH 7,2. O volume final da solução foi ajustado para 800 µL com tampão fosfato de sódio, o tempo de incubação foi de 15 minutos em temperatura ambiente. A atividade foi determinada após a adição de 200 µL de solução contendo Fast Blue (0,3%) e dodecil sulfato de sódio (SDS; 3,5%). A curva padrão foi realizada, com adição de 20 µL de alfa ou beta-naftol (0,05 µg/mL). O branco foi realizado sem a adição do extrato. As atividades da alfa ou beta-esterase foram realizada por colorimetria (leituras em 570 nm) e com auxílio de uma curva padrão de alfa ou beta-naftol calculada com base na quantidade de 25 µg de proteínas do homogeneizado.

b) Determinação da atividade da PNPA-carboxiesterase

Para a determinar atividade enzimática da PNPA-carboxiesterase no extrato protéico de *C. maculatus* foram adicionadas 50 µg de proteínas do homogeneizado nos tubos contendo previamente 20 µL de *p*-nitrofenilacetato (100 mM) em tampão fosfato de sódio (50 mM) pH 7,4. O volume final da reação foi ajustado para 1 mL. O branco foi realizado do mesmo modo porém o homogeneizado protéico foi substituído pelo mesmo volume de solução tampão. A atividade PNPA-carboxiesterase foi realizada por espectrofotometria (leituras em 405 nm), com base na variação de absorvância por

unidade de tempo e por unidade de proteína ($\mu\text{mol min}^{-1}(\text{PNPA})/\mu\text{g}$ de proteína), no intervalo de 30 a 90 segundos. A determinação da atividade total de carboxiesterases foi determinada segundo o coeficiente angular de afinidade pelo substrato de 18,4 e pela quantidade de 50 μg de proteínas do homogeneizado.

c) Determinação da atividade da acetilcolinesterase

Para a determinar atividade enzimática da acetilcolinesterase no extrato protéico de *C. maculatus* foram adicionadas 50 μg de proteínas do homogeneizado nos tubos contendo previamente água ultrapura, 1 mL de ácido-5,5-ditionitrobenzeno (DTNB; 0,32 mM) em tampão fosfato de sódio (0,1 M) pH 7,4. A atividade foi iniciada com a adição de 100 μL de iodeto de acetiltiocolina (1,5 mM) em água ultrapura. O volume final do meio reacional foi ajustado para 2200 μL . O branco foi realizado do mesmo modo, porém o homogeneizado protéico foi substituído pelo mesmo volume de solução tampão. A atividade da acetilcolinesterase foi realizada por espectrofotometria (leituras em 412 nm), com base no coeficiente de extinção molar do ânion 5-ditiobis-2-nitrobenzoato de 14,15, pela quantidade de 50 μg de proteínas do homogeneizado, observados por 100 segundos, em intervalos de 10 segundos e expressos em unidade absoluta (U).

d) Determinação da atividade da glutathiona-S-transferase

Para a determinar atividade enzimática da glutathiona-S-transferase no extrato protéico de *C. maculatus* foram adicionadas 40 μg de proteínas do homogeneizado nos tubos contendo previamente 100 μL de glutathiona reduzida (50 mM) e 20 μL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, 100 mM) em tampão fosfato de potássio (0,1 M) pH 6,1. O volume final do meio reacional foi ajustado para 1 mL. O branco foi realizado do mesmo modo, porém o homogeneizado protéico foi substituído pelo mesmo volume de solução tampão. A atividade da glutathiona-S-transferase foi realizada por espectrofotometria (leituras em 340 nm), com base no coeficiente de extinção molar do produto da reação 3-(2-cloro-4-nitrofenil)-glutathiona, utilizando o coeficiente de extinção molar, 340 nm = 9,6 mmol observados por 3 minutos, em intervalos de 30 segundos, pela quantidade de 40 μg de proteínas do homogeneizado e expressos em $\mu\text{mol. produto. min}^{-1}/\mu\text{g}$ proteína.

3.3.3.3 Determinação do conteúdo lipídico de fêmeas de *C. maculatus* sob efeito dos óleos essenciais de *C. citratus*.

Para a verificar a hipótese de que o óleo essencial de *C. citratus* promove alterações no conteúdo de lipídios em fêmeas de *C. maculatus*, foram utilizados tubos Falcon (50 mL) contendo 30 grãos do feijão e 10 fêmeas recém emergidas dos grãos e 30 insetos na proporção 1:2 (fêmea/macho), recém emergidos dos grãos. Após 24 horas as fêmeas foram separadas dos machos. Em seguida, as fêmeas virgens e copuladas foram submetidas ao óleo essencial de *C. citratus* na concentração de $0,4 \mu\text{L cm}^{-3}$ por 12 horas. Os testes foram realizados em triplicata, as condições de incubação e de monitoramento foram as mesmas citadas no item anterior (3.3.1). A testemunha consistiu no mesmo procedimento para fêmeas virgens e copuladas, porém sem o efeito do óleo essencial.

a) Extração dos lipídios

As amostras foram congeladas em N_2 líquido, maceradas e homogeneizadas em 1 mL de solução tampão PBS 0,1 mM e pH 7,4; depois o macerado foi recolhido, centrifugado por 10 minutos (14.000 rpm e 4°C) e o sobrenadante estocado no freezer a -80°C . Alíquotas de 100 μL de extrato bruto foram transferidos para tubo cônico contendo previamente 400 μL de água. Depois, foram adicionados 1 mL de metanol e 2 mL de clorofórmio, seguido por 2 minutos de agitação e 15 minutos de centrifugação (3000 rpm). Depois, a fase orgânica foi transferida para outro tubo cônico e novamente foram adicionados 1 mL de metanol e 500 μL de água, seguido por 2 minutos de agitação e 15 minutos de centrifugação (3000 rpm). Por fim, a fase orgânica foi novamente transferida para outro tubo, seca por arraste de gás N_2 a 36°C até completa eliminação do solvente (Bligh & Dyer, 1959).

b) Cromatografia de Camada Fina

Após a extração, os lipídios foram ressuspensos em 50 μL de clorofórmio e 10 μL das amostras foram aplicadas, em duplicata, em uma placa de TLC de sílica de gesso (20 X 20 cm). Nas mesmas condições foram aplicados à placa de TLC os padrões de colesterol + colesterol-éster e ácido graxo + triacilglicerol nas concentrações 2, 6 e 10 μg . Para dar início a corrida, em uma cuba grande de vidro foram colocados os solventes na proporção de 60:40:1 (hexano, éter etílico e ácido acético glacial) para a primeira corrida de até 7 cm de altura na TLC. A proporção de solventes utilizados para

a segunda corrida foram de 80:20:1 (hexano, clorofórmio e ácido acético glacial), até 15 cm de altura. A TLC secou em temperatura ambiente durante 30 minutos e no ar frio para revelação, após a primeira e a segunda corrida, respectivamente. A TLC foi revelada em solução Cherring (99,6 g de CuSO₄ diluído em 56,4 mL de H₃PO₄ e 600 mL de H₂O), em estufa a 100 °C por 20 minutos. A análise densitométrica foi feita no programa Image Lab Software 5.1 Bio Rad.

3.8 Análise Estatística

A análise de variância, o erro padrão, os testes de significância ($\alpha = 0,05$) e os gráficos a partir dos dados obtidos foram realizados através do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfil Químico dos Óleos Essenciais

4.1.1 Óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

O óleo essencial de *C. citratus* apresentou em sua composição apenas monoterpenos, dentre eles, os componentes majoritários foram neral (36,6%) e geranial (50,5%), isômeros que formam o citral. Além desses, observou-se a presença de beta-pineno (9,7%).

Tabela 1. Análise química (CG-EM) do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

| Substância e classe | IK | IRL | Porcentagem |
|------------------------------|------|------|-------------|
| β -Pineno | 979 | 983 | 9,7 |
| <i>cis</i> -Verbenol | 1141 | 1143 | 1,3 |
| <i>trans</i> -Verbenol | 1144 | 1149 | 1,9 |
| Neral | 1238 | 1235 | 36,6 |
| Geranial | 1267 | 1267 | 50,5 |
| Monoterpenos hidrocarbonados | | | 9,7 |
| Monoterpenos oxigenados | | | 90,3 |
| Total | | | 100 |

IK, índice de Kovats; IRL, índice de retenção linear; Porcentagem, com base na área total do cromatograma.

De modo geral, a composição química é condizente com aqueles encontrados na literatura para a espécie *C. citratus*. Os valores de geranial variaram de 27 a 50%, de neral de 4 a 50%, geraniol de 1,8 a 2,3% e de mirceno de 9 a 25% (Pinto *et al.* 2015; Kasali *et al.* 2001; Chisowa *et al.* 1998; Avoseh *et al.* 2015).

Considerando as informações disponíveis para consulta, a divergência quanto a composição diz respeito a presença de beta-pineno e a ausência de mirceno. Também não foram identificados sesquiterpenos. Essas variações no perfil químico dos óleos essenciais podem ser explicadas com base nos fatores ambientais, disponibilidade de nutrientes, interações ecológicas e diferenças genotípicas que modulam a qualidade do óleo essencial (Madhavan *et al.* 2011).

4.1.2 Óleo essencial de *Cymbopogon nardus*.

O óleo essencial de *C. nardus* apresentou um perfil químico mais complexo que o óleo de *C. citratus*. Verificou-se a presença de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoide, dentre eles, os componentes majoritários foram Citronelal (50,3%), nerol (10,8%). Observou-se também a presença de citronelol (6,8%), citronelil acetato (5,1%), geranil acetato (5,8%), elemol (5,7%) e germacren-4-ol (5,4%).

Tabela 2. Análise química (CG-EM) do óleo essencial de *Cymbopogon nardus*.

| Substância e classe | IK | IRL | Porcentagem |
|---------------------|------|------|-------------|
| Limoneno | 1029 | 1033 | 0,79 |
| Citronelal | 1153 | 1159 | 50,3 |
| Citronelol | 1225 | 1229 | 6,8 |
| Nerol | 1229 | 1231 | 10,8 |
| Citronelil acetato | 1352 | 1359 | 5,1 |
| Eugenol | 1359 | 1363 | 1,3 |
| Geranil acetato | 1381 | 1389 | 5,8 |
| γ -Muuroleno | 1479 | 1482 | 2,0 |
| β -Selineno | 1490 | 1491 | 1,4 |
| δ -Cadineno | 1522 | 1534 | 1,4 |
| Elemol | 1549 | 1559 | 5,7 |
| Germacren-4-ol | 1575 | 1587 | 5,4 |

| | |
|--------------------------------|-------------|
| Monoterpenos hidrocarbonados | 0,8 |
| Monoterpenos oxigenados | 67,9 |
| Ésteres de monoterpenos | 10,9 |
| Fenilpropanoides | 1,3 |
| Sesquiterpenos hidrocarbonados | 4,8 |
| Sesquiterpenos oxigenados | 11,1 |
| Total | 96,8 |

IK, índice de Kovats; IRL, índice de retenção linear; Percentagem, com base na área total do cromatograma.

O perfil químico do óleo essencial de *C. nardus* encontrados neste trabalho é semelhantes aos relatados por outros autores, os quais apresentaram para citronelal de 6 a 36%, citronelol de 4 a 13%, geraniol de 25 a 42%, citronelil acetato de 1,5 a 2,2%, geranil acetato de 1,5 a 10%, elemol de 5 a 17% e germacren-4-ol entorno de 1,4%.(Nakahara *et al.* 2013; Aguiar *et al.* 2014; Hamzah *et al.* 2014; Avoseh *et al.* 2015).

As principais diferenças entre o perfil químico do óleo essencial deste trabalho com os encontrados na literatura, dizem respeito a presença de nerol e a ausência de geraniol. Todavia, sequer na literatura disponível foi possível encontrar um óleo essencial de *C. nardus* com uma composição química que não apresentassem variações quanto a presença e ausência de alguns voláteis. Conforme discutido anteriormente isto pode estar relacionado ao efeito de diferentes fatores bióticos e abióticos.

4.2 Atividade Biológica dos Óleos Essenciais X *Callosobruchus maculatus*

4.2.1 Concentrações crescentes dos óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus*

Os insetos de *C. maculatus* sob efeito fumigante dos óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus*, em concentrações crescentes, apresentaram respostas diferentes. *C. citratus* mostrou-se resistente, apresentando mortalidade máxima de 55% na maior concentração (0,8 $\mu\text{L cm}^{-3}$). Por outro lado o óleo essencial de *C. nardus*, matou 95% da população na concentração de 0,6 $\mu\text{L cm}^{-3}$. Não foi possível calcular a CL_{50} para o tratamento com o óleo essencial de *C. citratus*, pois apresentou uma distribuição não linear, contudo os valores de CL_{50} para o tratamento com óleo essencial de *C. nardus* foi de 0,12 $\mu\text{L cm}^{-3}$.

Tabela 3. Mortalidade (%) e CL_{50%} de *Callosobruchus maculatus* após 48 horas sob o efeito fumigante dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *C. nardus*.

| Concentrações ($\mu\text{L cm}^{-3}$) | Mortalidade (%) | |
|--|------------------------------|------------------------------|
| | <i>Cymbopogon citratus</i> | <i>Cymbopogon nardus</i> |
| 0,1 | 22 | 42 |
| 0,2 | 11 | 46 |
| 0,4 | 44 | 91 |
| 0,6 | 33 | 95 |
| 0,8 | 55 | 95 |
| y | = $126,4/(1+10^{-0,8527-x})$ | = $111,5/(1+10^{-0,9075-x})$ |
| r ² | = 0,1939 | = 0,6527 |
| α | = n.s. | = 0,05 |
| CL _{50%} | = n.c. | = 0,12 $\mu\text{L cm}^{-3}$ |

n.s., Não significativo; n.c., Não calculado.

Resultados semelhantes mostraram baixa mortalidade de *C. maculatus* sob efeito do óleo essencial de *C. citratus* (Owolabi *et al.* 2009). Por outro lado, foram encontrados relatos de elevada mortalidade *C. maculatus* sob efeito do óleo *C. citratus* (Paranagama *et al.* 2002). Os diferentes resultados encontrados pode estar relacionada ao fato de haver variabilidade quanto a composição química dos óleos essenciais.

Todavia, resultados promissores têm sido apontados para os efeitos dos óleos essenciais de *C. citratus* contra outros insetos-pragas como *Sitophilus zeamais* (Owolabi *et al.* 2009), *Tribolium castaneum* (Olivero-Verbel *et al.* 2010), *Acanthoscelides obtectus* (Coleóptera: Bruchidae) e *Zabrotes subfasciatus* (Coleóptera: Bruchidae) (Procopio *et al.* 2015), *Trichoplusia ni* (Tak *et al.* 2015); insetos vetores de doenças *Anopheles gambiae* (Bossou *et al.* 2013) e *Musca domestica* (Kumar *et al.* 2011).

Os resultados relativos a alta toxicidade do óleo essencial de *C. nardus* sobre *C. maculatus* também são encontrados na literatura (Ketoh *et al.* 2002). Contudo, resultados contrastantes indicam que o óleo essencial de *C. nardus* pode apresentar baixa toxicidade sobre *C. maculatus* (Nyamador *et al.* 2010). Isto pode estar relacionado à composição química do óleo essencial entre outros fatores. Em outras pragas de grãos armazenados, como *Sitophilus zeamais* e *Callosobruchus spp* (Thein *et al.* 2013),

Callosobruchus subinnotatus (Nyamador *et al.* 2010) verificou-se toxicidade do óleo essencial de *C. nardus*.

A toxicidade do óleo essencial de *C. nardus* pode estar atribuída a sua constituição química. O eugenol um dos componentes minoritários do óleo essencial apresenta alta toxicidade por fumigação sobre *C. maculatus* (Ajayi *et al.* 2014).

Esses resultados mostram que os óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus* podem ser explorados como uma alternativa ao uso de inseticidas químicos tradicionais para controle de insetos- pragas de diversos segmentos.

Apesar do baixo efeito do óleo essencial de *C. citratus* sobre a mortalidade de *C. maculatus*, observou-se uma ação acentuada sobre a postura de ovos, com maior inibição (79%) no tratamento com 0,4 $\mu\text{L cm}^{-3}$. Por outro lado, o tratamento com 0,6 $\mu\text{L cm}^{-3}$ óleo essencial de *C. nardus* promoveu inibição de 96% na postura de ovos.

Tabela 4. Postura de ovos de *Callosobruchus maculatus* após 48 horas sob o efeito fumigante dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *C. nardus*.

| Concentrações ($\mu\text{L cm}^{-3}$) | Postura de ovos | | | | | |
|--|----------------------------|-----|--------------|--------------------------|-----|--------------|
| | Número | IC | Inibição (%) | Número | IC | Inibição (%) |
| | <i>Cymbopogon citratus</i> | | | <i>Cymbopogon nardus</i> | | |
| 0,0 | 70,0 | ± 7 | - | 118 | ±9 | - |
| 0,1 | 50,0 | ±4 | 29 | 36,6 | ±15 | 69 |
| 0,2 | 24,7 | ±8 | 65 | 25,2 | ±11 | 79 |
| 0,4 | 14,7 | ±6 | 79 | 10,2 | ±9 | 91 |
| 0,6 | 20,0 | ±1 | 71 | 4,8 | ±3 | 96 |
| 0,8 | 31,0 | ±2 | 56 | 5,4 | ±3 | 95 |

Número, média dos ovos depositados sobre os grãos; IC, intervalo de confiança ($\alpha=0,05$); Inibição (%), calculado com base na testemunha.

O óleo essencial de *C. citratus* mostrou efeito inibitório da postura de ovos para *C. maculatus* (Azeez & Pitan, 2014), também para outros insetos como *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* e *Anopheles dirus* (Siriporn & Mayura, 2012) e *Musca domestica* (Sinthusiri & Soonwera, 2014). Por outro lado, não foi observado para o ácaro- rajado *Tetranychus urticae* (Roh *et al.* 2011).

Verificou-se também que o óleo essencial de *Ocimum basilicum*, por fumigação, inibiu a oviposição de *C. maculatus* e que o geranial, um dos componentes majoritários do óleo essencial de *C. citratus*, pode ser o responsável em inibir a postura de ovos de

C. maculatus (Pascual-Villalobos & Ballesta-Acosta, 2003). Segundo a literatura, à natureza lipofílica dos voláteis presentes nos óleos essenciais pode estar relacionado com a diminuição da postura de ovos (Arshad *et al.* 2014).

Nyamador *et al.* (2010) observaram que o óleo essencial *C. nardus* inibiu a postura de ovos pelas fêmeas de *C. maculatus* mesmo apresentando baixa toxicidade. Resultado semelhante ao encontrado com o óleo essencial de *C. citratus* no presente trabalho. Contudo, em pesquisa conduzida por Ketoh *et al.* (2007) verificou-se que o ciclo reprodutivo de fêmea de *C. maculatus* não sofreu alteração após tratamento com o óleo essencial de *C. nardus*.

O óleo essencial de *C. nardus* inibiu o número de ovos viáveis em pragas de importância agrícola como o *Zabrotes subfasciatus* (França *et al.* 2012), *Bactrocera dorsalis* (YuZan *et al.* 2010) e *Helicoverpa armigera* (Setiawati *et al.* 2011). Também em insetos vetores como o *Aedes aegypti* (Warikoo *et al.* 2011).

4.2.2 Efeito do óleo essencial de *C. citratus* X fêmeas virgens e copuladas

Com o intuito de se verificar a hipótese de que o óleo essencial de *C. citratus* poderia estar afetando o comportamento dos insetos durante a cópula ou a postura de ovos, desenvolveu-se um experimento com fêmeas virgens e copuladas de *C. maculatus* sob o efeito fumigante do óleo essencial na concentração de $0,4 \mu\text{L cm}^{-3}$, por 12 horas.

Os resultados apresentados na Figura 17 mostram que as fêmeas do controle, independente de o macho ter sido tratado ou não, apresentaram os maiores valores de oviposição. Não foi observado uma variação na postura de ovos quando os machos foram tratados com o óleo essencial. Por outro lado o tratamento cuja fêmeas foi submetida ao efeito fumigante do óleo essencial apresentou diminuição significativa na postura de ovos.

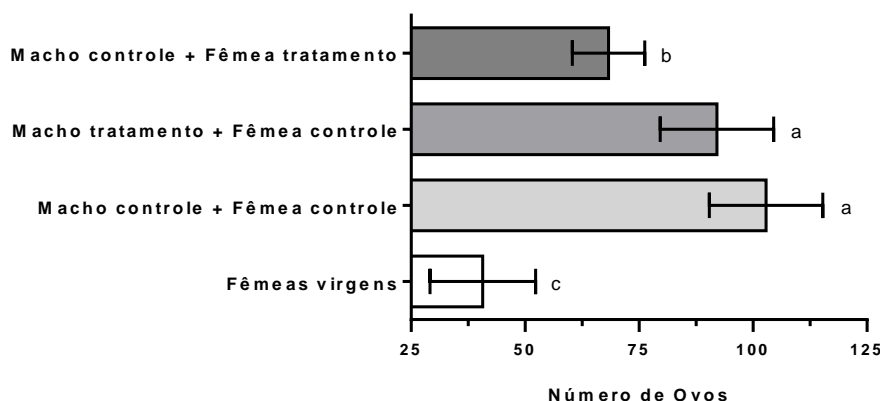


Figura 17. Efeito fumigante do óleo essencial de *C. citratus* ($0,4 \mu\text{L cm}^{-3}$) por 12 horas, sobre machos e fêmeas de *C. maculatus*. As barras representam o erro padrão entorno das médias e as letras o teste de significância one-way ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Este resultado demonstra que apesar de o óleo essencial de *C. citratus* não possuir forte efeito sobre a mortalidade, ele ainda apresenta propriedades tóxicas sobre o ciclo reprodutivo, afetando ou o comportamento sexual da fêmea, a ovogênese ou a própria postura de ovos e de acordo com Guarino *et al.* (2014), os voláteis geraniol e citral causam perturbações na percepção de feromônios, afetando a alimentação e oviposição de fêmeas de *Rhynchophorus ferrugineus*, praga das palmeiras.

Lingampally *et al.* (2012) verificaram que um terpenoide da *Andrographis paniculata* promove degeneração dos ovários das pupas de *Tribolium confusum*. também foram observados alterações morfológicas provocado pelo óleo essencial de *Piper hispidinervum* sobre os ovários e o oviduto da lagarta *Spodoptera frugiperda* (Alves *et al.* 2014).

Portanto, o modo de ação dos óleos essenciais sugerem efeitos múltiplos sobre o ciclo de vida dos insetos, com vários alvos fisiológicos e por que não moleculares, os quais serão avaliados a seguir.

4.2.3 Efeito dos óleos essenciais sobre aspectos do metabolismo de *C. maculatus*

4.2.3.1 Conteúdo lipídico em cromatografia de camada fina

Com a finalidade de se verificar o efeito do óleo essencial de *C. citratus* sobre a composição lipídica de fêmeas de *C. maculatus*, propôs-se um ensaio com fêmeas virgens e copuladas submetidas ou não ao óleo essencial na concentração de $0,4 \mu\text{L cm}^{-3}$ e os lipídios extraídos cromatografados em camada fina.

Observa-se que há uma redução significativa de 53% do conteúdo de ácidos graxos nas fêmeas copuladas em relação as virgens da testemunha, o que pode ser explicado com base na mobilização de reservas energéticas (Forte *et al.* 2002). Por outro lado, apesar de não ser significativo ao nível do teste ANOVA, pode-se observar tendência para diminuição dos níveis de ácidos graxos nas fêmeas copuladas em relação as virgens, sob efeito óleo de *C. citratus*.

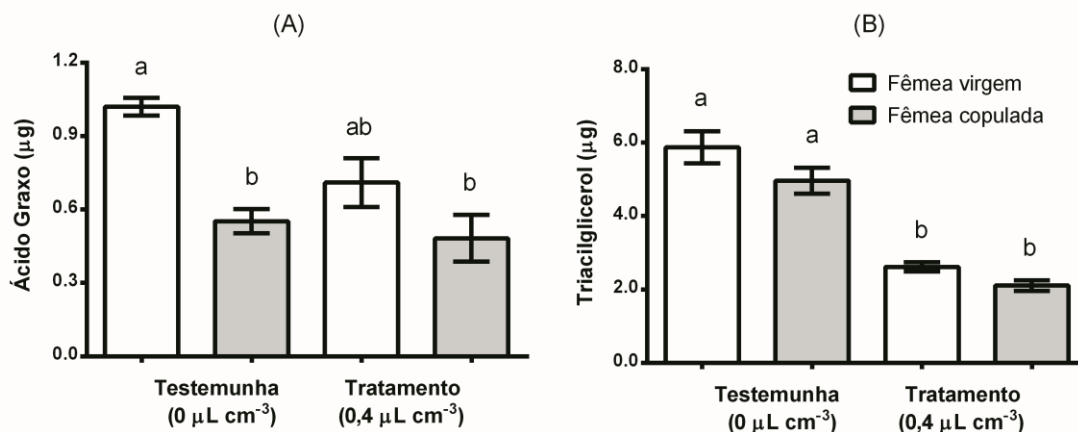


Figura 18. Conteúdo de ácidos graxos e triacilglicerol em fêmeas copuladas e virgens de *C. maculatus* sob efeito fumigante do óleo essencial de *C. citratus* ($0,4 \mu\text{L cm}^{-3}$), por 12 horas. As barras representam o erro padrão entorno das médias e as letras o teste de significância one-way ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Foi observado uma redução significativa no conteúdo de triacilglicerol nas fêmeas do tratamento, sob o efeito do óleo essencial, e aquelas da testemunha, indicando uma redução nestes conteúdos, independente da condição virgem ou copulada. Do mesmo modo, houve uma tendência a redução nos níveis de triacilglicerol dentro de cada grupo (tratado ou não com o óleo essencial), que apesar de não ser significante, foi verificada uma diferença entre fêmeas virgens e copuladas, com redução para esta última.

Os triacilgliceróis ou triglicerídeos são a maior reserva energética dos ovos de *Callosobruchus maculatus* (Nwanze *et al.* 1976) e a redução no conteúdo de lipídios após a oviposição já foi relatado anteriormente (Santos *et al.* 2011). Também foram verificadas diminuição nos conteúdos de lipídios neutros após exposição de *Phthorimaea operculella* ao óleo essencial de manjerona (Abd, 2011).

4.2.3.2 Conteúdo protéico

As fêmeas apresentaram um maior conteúdo protéico em relação ao macho de *C. maculatus* e isto pode estar relacionado com as diferentes necessidades energéticas entre os gêneros, como o processo de ovogênese nas fêmeas (O'Brien *et al.* 2005). Essa diferença de conteúdo protéico também foi encontrada entre os gêneros de *Spodoptera litura*, com maior conteúdo protéico nas fêmeas (Huang *et al.* 2004).

As fêmeas sob efeito dos óleos essenciais de *C. citronela* e *C. nardus* apresentaram aumento significativo de, respectivamente 0,79 e 1,49 mg mL⁻¹ no conteúdo protéico enquanto os machos apresentaram diminuição de 0,42 e 0,56 mg mL⁻¹, respectivamente.

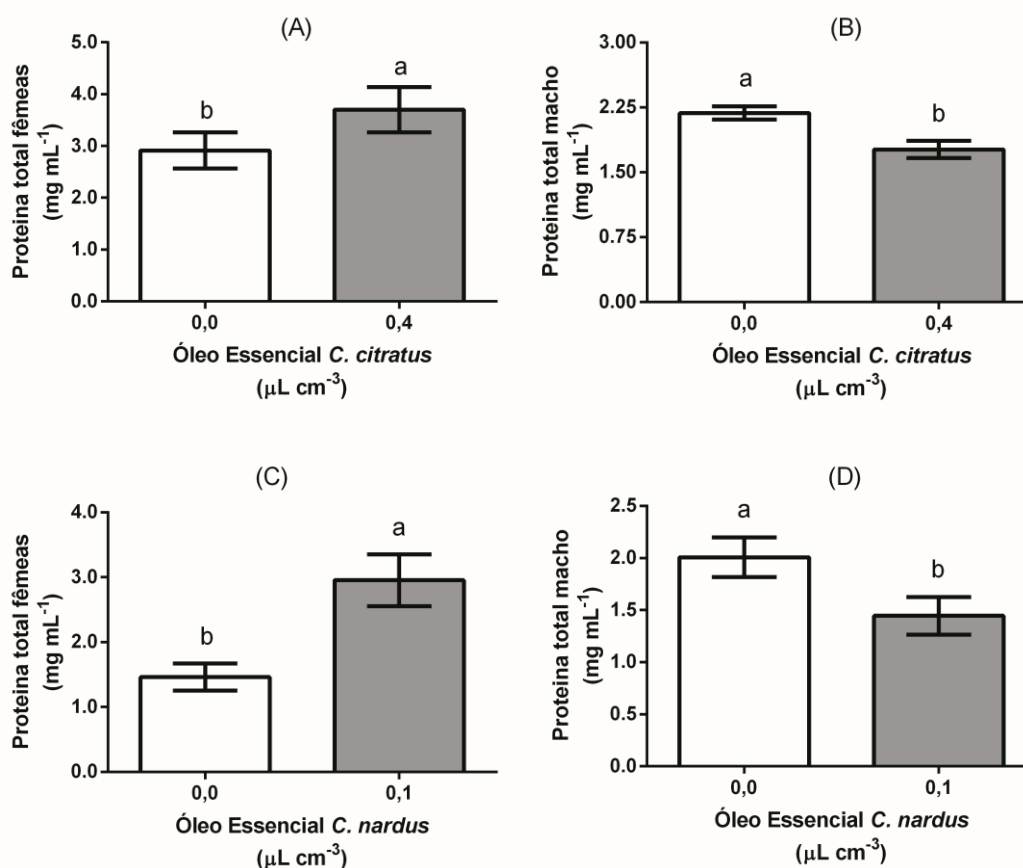


Figura 19. Proteína total (mg mL⁻¹) obtido de fêmeas (A e C) e machos (B e D) de *C. maculatus* sob o efeito ou não do óleo essencial de *C. citratus* (A e B) e *C. nardus* (C e D). As barras representam o erro padrão entorno das médias e as letras o teste t de significância ($\alpha = 0,05$).

Foram observados relatos de diminuição nos conteúdos protéicos de larvas de *C. maculatum* (Macedo *et al.* 2007), *Triboulium castaneum* (Ebadollahi *et al.* 2013b), *Glyphodes pylvalis* (Yazdani *et al.* 2014) submetidos aos efeitos de óleos essenciais e outros princípios naturais.

Este comportamento antagônico observado entre machos e fêmeas de *C. maculatus* pode estar relacionado aos transtornos metabólico proveniente da ação dos óleos essenciais envolvendo síntese de proteínas para a desintoxicação ou supressão da síntese de proteína (Vijayaraghavan *et al.* 2010).

4.2.3.3 Atividade da acetilcolinesterase

Observou-se a redução da atividade geral da AChE, nas fêmeas e machos de *C. maculatus* sob efeito do óleo essencial de *C. citratus*, respectivamente de 0,004 mU μg (44 e 33%). O mesmo foi observado nas fêmeas sob o efeito do óleo essencial de *C. nardus*, com redução de 0,03 mU μg (33%). Não foi observado variação significativa, ao nível do teste de médias, para a atividade da acetilcolinesterase em machos sob efeito do óleo essencial de *C. nardus*, contudo, pode-se observar tendência de diminuição da atividade.

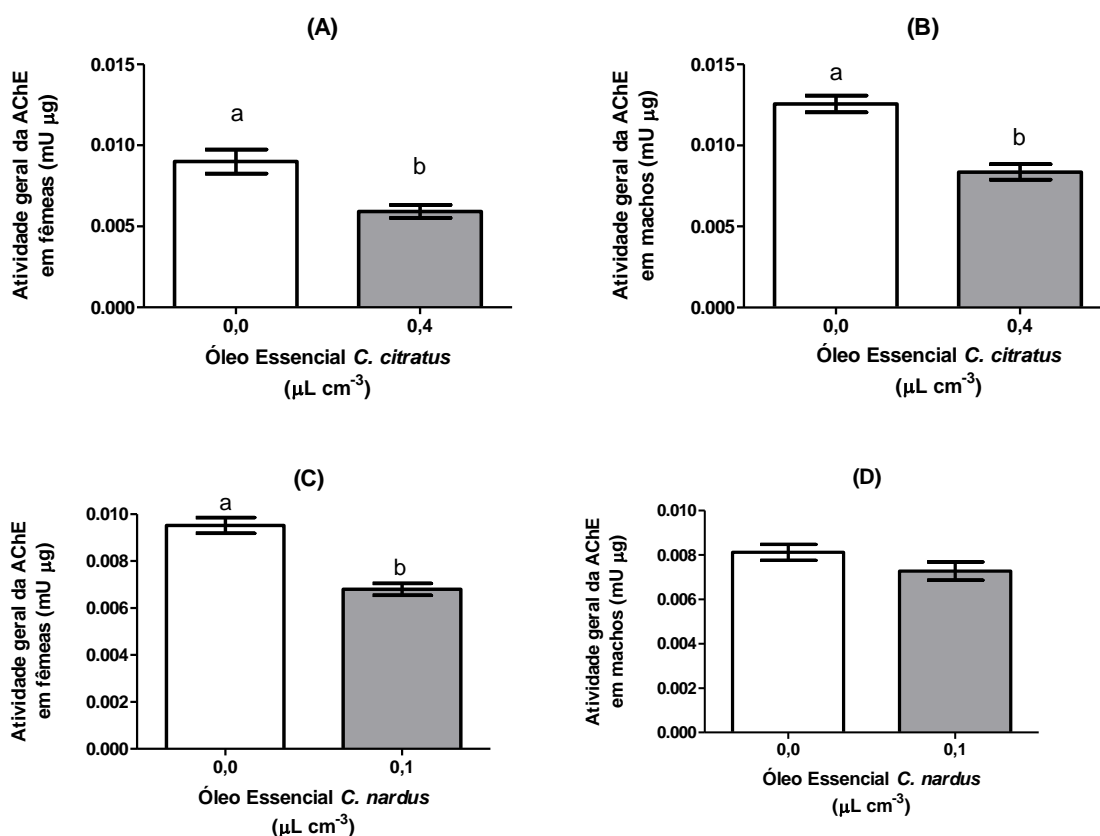


Figura 20. Atividade geral de acetilcolinesterase (mU μg) obtido de fêmeas (A e C) e machos (B e D) de *C. maculatus* sob o efeito ou não do óleo essencial de *C. citratus* (A e B) e *C. nardus* (C e D). As barras representam o erro padrão entorno das médias e as letras o teste t de significância ($\alpha = 0,05$).

Resultados semelhantes foram observados quanto a inibição da atividade total de acetilcolinesterase no estágio larval de *Culex quinquefasciatus* sob o efeito do óleo essencial de *Eucaliptus* (Sugumar *et al.* 2014). Relatos científicos apontam para a ação

de voláteis como inibidores competitivos (fenchona, geraniol, terpineno, linalol) e mistos (carvona, cânfora e estragol) para a atividade da acetilcolinesterase de insetos (López & Pascual-Villalobos, 2010). Existem também trabalhos que apontam a inibição da acetilcolinesterase por cumarinas, relacionando os efeitos nos insetos com os provocados por organosfosforados (Rajashekar *et al.* 2014; Anderson & Coats, 2012).

4.2.3.4 Atividade da alfa-esterase

Observou-se o aumento da atividade geral da alfa-esterase nas fêmeas e machos de *C. maculatus* sob efeito do óleo essencial de *C. citratus*, respectivamente de 0,003 e 0,002 $\mu\text{g min}^{-1}$ (33 e 40%). Por outro lado, o efeito do óleo essencial de *C. nardus* sobre os insetos de *C. maculatus* foi adverso, promovendo a redução na atividade total de alfa-esterase em 0,005 e 0,002 $\mu\text{g min}^{-1}$ (50%), respectivamente em fêmeas e machos.

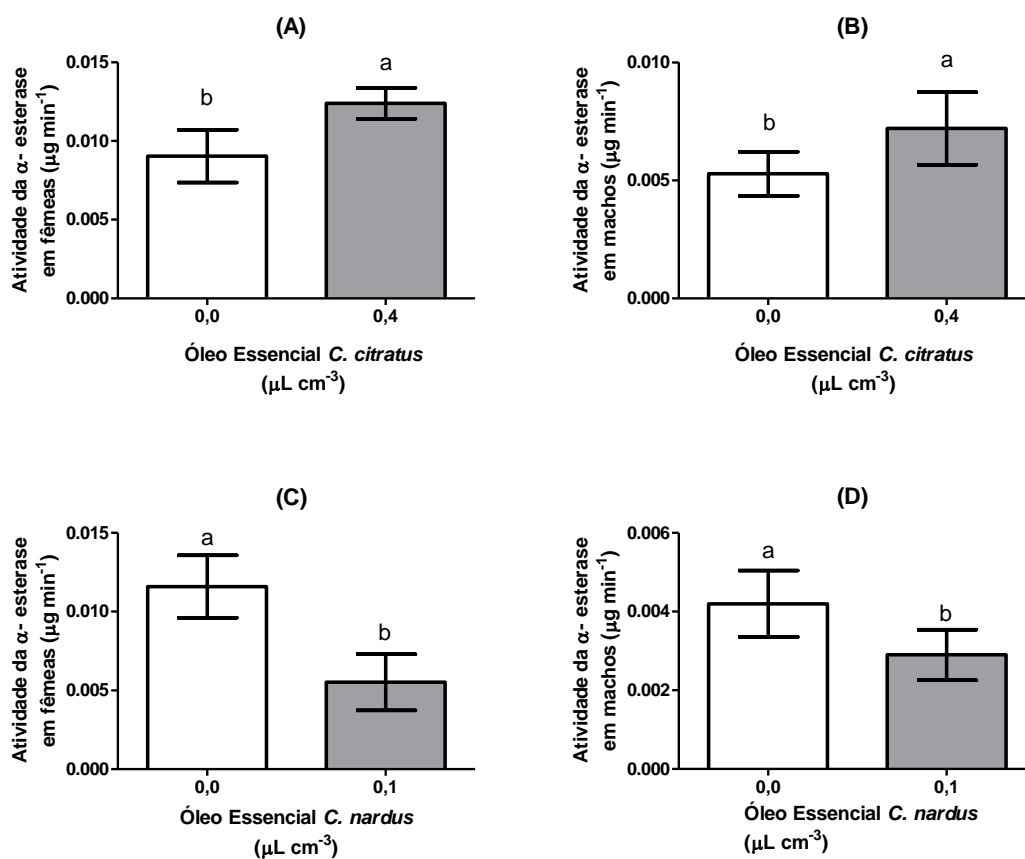


Figura 21. Atividade da alfa-esterase ($\mu\text{g min}^{-1}$) obtido de fêmeas (A e C) e machos (B e D) de *C. maculatus* sob o efeito ou não do óleo essencial de *C. citratus* (A

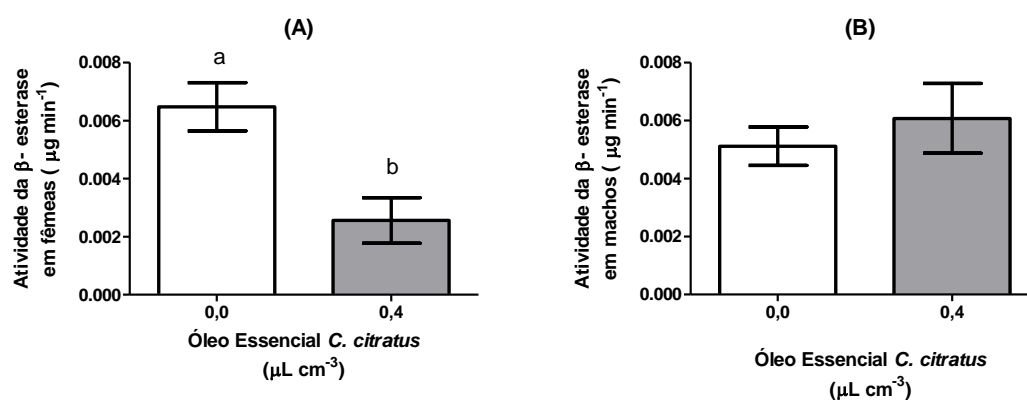
e B) e *C. nardus* (C e D). Atividade com base em 25 µg de proteína total. As barras representam o erro padrão entorno das médias e as letras o teste t de significância ($\alpha = 0,05$).

Existem trabalhos relacionando o aumento da atividade geral das esterases com a um dos mecanismos de resistência adquirida por insetos aos inseticidas, e que este aumento poderia ocorrer como uma resposta direta ao contato com xenobióticos de qualquer natureza (Gao *et al.* 2012). Neste contexto, autores confirmam o aumento da atividade geral de alfa-esterases em insetos submetidos a deltametrina e DDT (Das & Dutta, 2014; Rashwan 2013; Gamil *et al.* 2011; Afify *et al.* 2012).

Entretanto algumas plantas utilizadas como bioinseticidas mostraram-se eficazes em diminuir a atividade total de alfa-esterase, como os óleos essenciais de manjeriço e alho sobre *Tribolium confusum* (Anon, 2009) e o extrato da erva (*Clerodendrum phlomidis*) sobre *Helicoverpa armigera* (Baskar *et al.* 2013).

4.2.3.5 Atividade da beta-esterase

Foi observado a redução de 0,004 e 0,002 µg min⁻¹ (66 e 28%) na atividade geral das beta-esterases das fêmeas submetidas aos óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus*, respectivamente. Entretanto, os mesmos óleos essenciais não promoveram nenhuma alteração significativa nos machos.



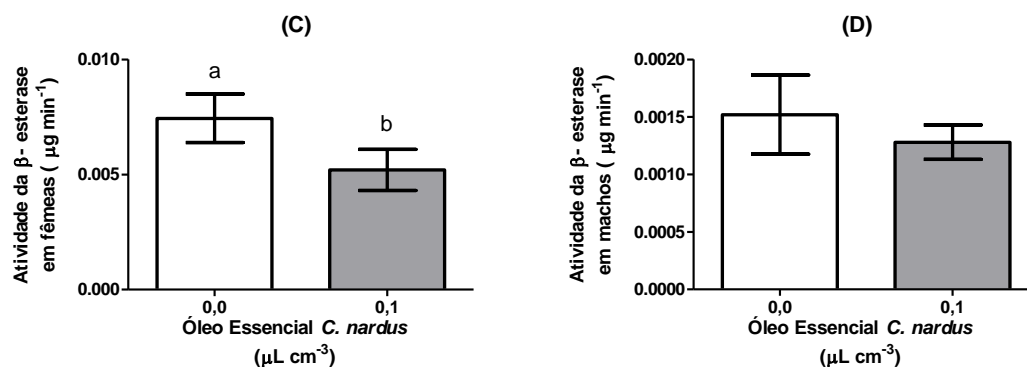


Figura 22. Atividade da beta-esterase ($\mu\text{g min}^{-1}$) obtido de fêmeas (A e C) e machos (B e D) de *C. maculatus* sob o efeito ou não do óleo essencial de *C. citratus* (A e B) e *C. nardus* (C e D). As barras representam o erro padrão entorno das médias e as letras o teste t de significância ($\alpha = 0,05$).

Autores observaram a inibição da beta-esterase de *Aedes aegypti* sob efeito dos voláteis timol, eugenol, terpineol, e citronelal (Waliwitiya *et al.* 2012), enquanto que (Yazdani *et al.* 2014) não observaram nenhuma variação significativa na atividade beta-esterases em *Glyphodes pyloalis* sob efeito dos óleos essenciais de tomilho e orégano.

Por outro lado, inseticidas sintéticos deltametrina e permetrina promoveram o aumento na atividade total da enzima beta-esterase na traça do tomateiro (Silva *et al.* 2015) e no besouro *Tribolium castaneum* (Gibe & Motoyama, 2014).

4.2.3.6 Atividade da PNPA-carboxiesterase ou PNPA-carboxilesterase

Efeitos antagônicos foram observados na atividade da PNPA-carboxiesterase quanto ao gênero e ao óleo essencial aplicado. O óleo essencial de *C. citratus* promoveu aumento da atividade geral da carboxiesterase em $0,03 \mu\text{mol min}^{-1}/\mu\text{g}$ (50%) em fêmeas e diminuição da atividade nos machos de $0,01 \mu\text{mol min}^{-1}/\mu\text{g}$ (20%). Por outro lado, O óleo essencial de *C. nardus* promoveu redução da atividade geral da carboxiesterase em $0,03 \mu\text{mol min}^{-1}/\mu\text{g}$ (42%) em fêmeas e acréscimo da atividade nos machos de $0,02 \mu\text{mol min}^{-1}/\mu\text{g}$ (50%).

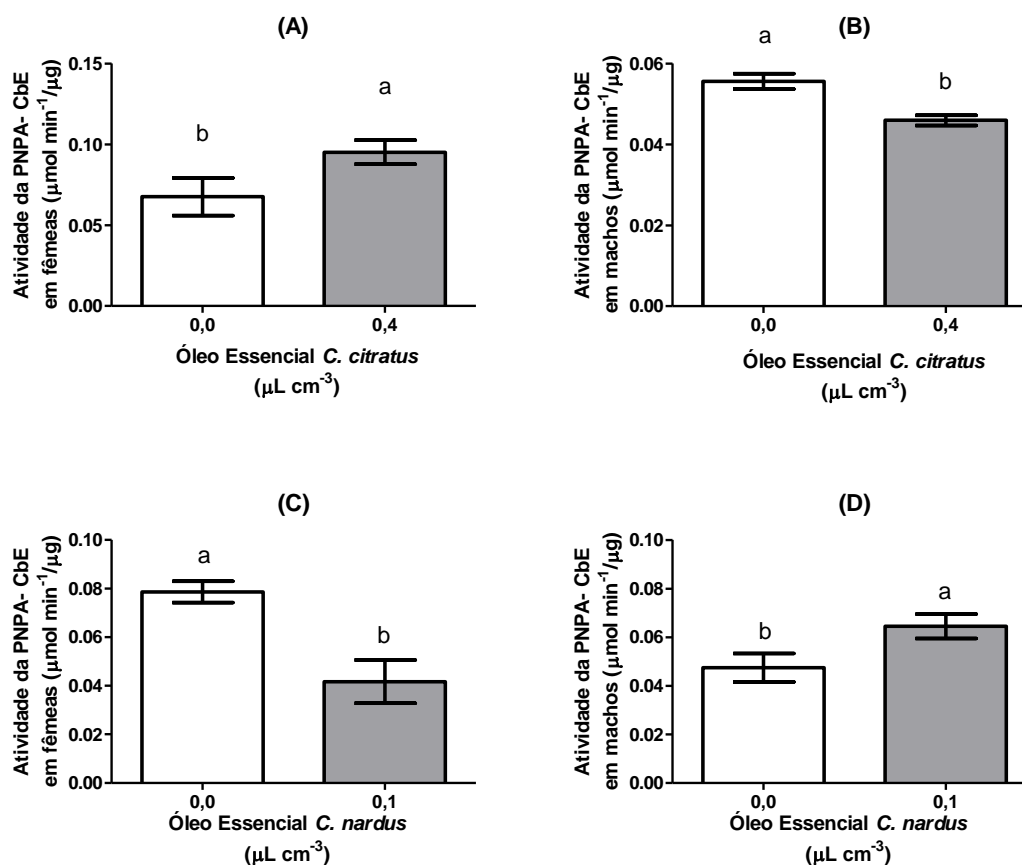


Figura 23. Atividade de PNPA-carboxiesterase ($\mu\text{mol min}^{-1}/\mu\text{g}$) obtido de fêmeas (A e C) e machos (B e D) de *C. maculatus* sob o efeito ou não do óleo essencial de *C. citratus* (A e B) e *C. nardus* (C e D). As barras representam o erro padrão em torno das médias e as letras o teste t de significância ($\alpha = 0,05$).

Trabalhos mais recentes apontaram diminuição da atividade carboxiesterase após exposição de insetos aos óleos essenciais de *Chenopodium ambrosioides* (Wei *et al.* 2015) e *Piper nigrum* (Lija-Escaline *et al.* 2015), por outro lado, não foi observado alterações na atividade carboxiesterase em insetos *Cotesia plutellae* sob efeito do timol, um inseticida botânico (Yotavong *et al.* 2015).

4.2.3.7 Atividade da glutathiona S-transferase

Os insetos fêmeas de *C. maculatus* sob efeito fumigante dos óleos essenciais de *C. citratus* apresentaram diminuição de $0,01 \mu\text{mol min}^{-1}/\mu\text{g}$ (16%) na atividade da glutathiona-S-transferase em fêmeas e, ao contrário, foi observado aumento da atividade de $0,034 \mu\text{mol min}^{-1}/\mu\text{g}$ (31%) nos machos. O óleo essencial de *C. nardus* não promoveu alterações significativas nos insetos *C. maculatus*.

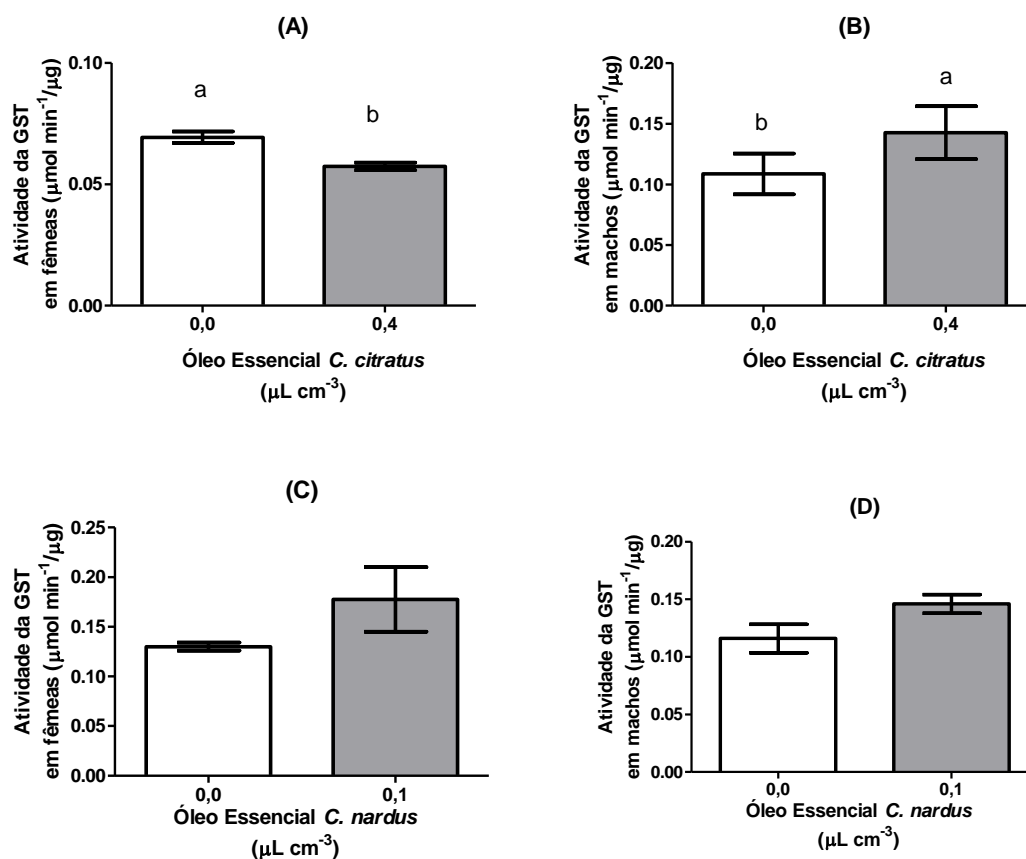


Figura 24. Atividade da glutiona S-transferase ($\mu\text{mol min}^{-1}/\mu\text{g}$) obtido de fêmeas (A e C) e machos (B e D) de *C. maculatus* sob o efeito ou não do óleo essencial de *C. citratus* (A e B) e *C. nardus* (C e D). Atividade com base em 40 μg de proteína total. As barras representam o erro padrão entorno das médias e as letras o teste t de significância ($\alpha = 0,05$).

Óleos essenciais e alguns voláteis como timol, eugenol, terpineol e citronelal promoveram redução na atividade geral de glutiona S-transferase em *Aedes aegypti* (Li *et al.* 2013; Waliwitiya *et al.* 2012), o óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* em *Plutella xylostella* (Wei *et al.* 2015) e os voláteis linalol e geraniol produziram efeitos tóxicos sobre o gorgulho-do-milho, besourinho-dos-cereais e escaravelho, assim com, diminuição na atividade total da glutiona S-transferase desses insetos (López *et al.* 2010).

Por outro lado, alguns trabalhos tem demonstrado o aumento da atividade da glutiona-S-transferase em insetos sob efeito de compostos voláteis como o timol e

1,8-cineol (Kumrungsee *et al.* 2014) e do óleo essencial de alecrim (Yazdani *et al.* 2013).

Segundo Wei *et al.* (2015) o aumento na atividade geral da glutathione-S-transferase aponta para um possível mecanismo de resistência ao inseticida, como observado por ele no inseto *Liriomyza sativae* e por Gunasekaran *et al.* (2011) em *Anopheles* spp.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu concluir que os óleos de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus* possuem propriedades tóxicas ao inseto-praga *Callosobruchus maculatus*.

Concluiu-se também que apesar de menor mortalidade o óleo de *C. citratus* promoveu redução na postura de ovos, e que isto pode estar relacionado com o comportamento sexual e com o conteúdo de lipídios de reserva e sua remobilização nas fêmeas.

Também foi possível concluir que os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus* afetaram de forma específica o conteúdo protéico no gênero masculino (diminuindo) e feminino (aumentando) e de modo não específico a atividade das enzimas alfa e beta-esterases, carboxiesterase, acetilcolinesterase e glutathione S-transferase.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD, M.F.E.-A., 2011. Bioactivities and Biochemical Effects of Marjoram Essential Oil used against Potato Tuber Moth *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera: Gelechiidae). *Life Science Journal*, 8(1), pp.288–297.
- ADAMS, R.P., 2007. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy* 4th ed., Carol Stream: Allured Publishing Corporation.
- AFIFY, A.E.M.M.R., ALI, F.S. & TURKY, A. F., 2012. Control of *Tetranychus urticae* Koch by extracts of three essential oils of chamomile, marjoram and Eucalyptus. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1), pp.24–30.
- AGNOLIN, C.A. et al., 2010. Eficácia do óleo de citronela [*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle] no controle de ectoparasitas de bovinos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 12(4), pp.482–487.
- AGROFIT-MAPA, 2014. Ministério da Agricultura MAPA. [Accessed April 24, 2015]. <http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/carta-de-servico-ao-cidadao/agrotoxicos/agrotoxicos-registrados-agrofit>
- AGUIAR, R.W. DE S. et al., 2014. Fumigant Antifungal Activity of *Corymbia citriodora* and *Cymbopogon nardus* Essential Oils and Citronellal against Three Fungal Species. *The Scientific World Journal*, 2014, pp.1–8.
- AHMED, M.E.A.E.-S., 2010. Fumigant toxicity of seven essential oils against the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (F.) and the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). *Egypt. Acad. J. biolog. Sci.*, 2(1), pp.1–6.
- AJAYI, OLUFUNMILAYO E.; APPEL,ARTHUR G. AND FADAMIRO, H.Y., 2014. Fumigation Toxicity of Essential Oil Monoterpenes to *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). *Journal of Insects*, pp.1–7.
- ALDAWSARI, H.M. et al., 2015. Design and formulation of a topical hydrogel integrating lemongrass-loaded nanospheres with an enhanced antifungal effect: in vitro/in vivo evaluation. *International journal of nanomedicine*, 10, pp.893–902.
- ALIBABAIE M., SAFARALIZADEH, H.M., 2015. New Horizons in Insect Science: Towards Sustainable Pest Management. In A. K. Chakravarthy, ed. *New Horizons in Insect Science: Towards Sustainable Pest Management*. New Delhi: Springer India, pp. 127–133.
- ALVAREZ, L.C. et al., 2013. Resistance to Malathion and Deltamethrin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) From Western Venezuela Resistance to Malathion and Deltamethrin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) From Western Venezuela. *Journal of Medical Entomology*, 50(5), pp.1031–1039.

- ALVES, T.J.S. *et al.*, 2014. Effects of *Piper hispidinervum* on spermatogenesis and histochemistry of ovarioles of *Spodoptera frugiperda*. *Biotechnic & histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission*, 89(4), pp.245–55.
- ANDERSON, J. A. & COATS, J.R., 2012. Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102(2), pp.124–128.
- ANON, 2009. Toxicity and biochemical efficacy of six essential oils against *Tribolium confusum* (du val) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Egypt. Acad. J. biolog. Sci*, 2(2), pp.1–11.
- ANVISA, 2009. Anvisa - Lei proíbe agrotóxico DDT em todo o país. *LEI Nº 11.936, DE 14 DE MAIO DE 2009.*, p.48.
- <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/200509.htm> [Accessed July 31, 2015].
- ARANDA, J. *et al.*, 2014. The catalytic mechanism of carboxylesterases: a computational study. *Biochemistry*, 53(36), pp.5820–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25101647> [Accessed July 5, 2015].
- ARRESE, E.L. *et al.*, 2001. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect biochemistry and molecular biology*, 31(1), pp.7–17.
- ARSHAD, Z., HANIF, M. A., QADRI, R.W.K. & KHAN, M.M., 2014. Role of Essential Oils in Plant Diseases Protection: A Review. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, 6, pp.11–17.
- ATHENSTAEDT, K. & DAUM, G., 2006. The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 63(12), pp.1355–69.
- AVOSEH, O. *et al.*, 2015. *Cymbopogon* Species; Ethnopharmacology, Phytochemistry and the Pharmacological Importance. *Molecules*, 20(5), pp.7438–7453.
- AZEEZ, O.M. & PITAN, O.O.R., 2014. Influence of cowpea variety on the potency and deterrent indices of six plant powders against the seed bruchid, *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae). *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 48(5), pp.441–451.
- AZEVEDO, F.R. & MOURA, M.A., 2013. INTERAÇÃO CULTIVAR DE FEIJÃO E CONDIÇÕES ATMOSFÉRICAS SOBRE *Callosobruchus maculatus* (COLEOPTERA: BRUCHIDAE) EM GRÃOS ARMAZENADOS. *HOLOS*, 6, pp.42–51.
- BARTH, V.G. & BIAZON, A.C.B., 2010. COMPLICAÇÕES DECORRENTES DA INTOXICAÇÃO POR ORGANOFOSFORADOS. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, 5(2), pp.27–33.

- BASKAR, K., MUTHU, C. & IGNACIMUTHU, S., 2013. Effect of pectolinarigenin, a flavonoid from *Clerodendrum phlomidis*, on total protein, glutathione S-transferase and esterase activities of *Earias vittella* and *Helicoverpa armigera*. *Phytoparasitica*, 42(3), pp.323–331.
- BECK, CHRISTOPHER W.; BLUMER, L.S., 2014. BeanBeetles.org/A Handbook on Bean Beetles: Laboratory Methods National Science Foundation, ed. , p.17. Available at: <http://www.beanbeetles.org/handbook/> [Accessed May 16, 2015].
- BELLUTA, I. *et al.*, 2014. INVESTIGAÇÃO DA POLUIÇÃO POR METAIS TÓXICOS NO CÓRREGO DO CINTRA. *Irriga*, 19(2), p.225.
- BERENBAUM, M.R. & JOHNSON, R.M., 2015. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*, 10, pp.51–58.
- BETTIOL, W., 2011a. Biopesticide Use and Research in Brazil. *Outlooks on Pest Management*, 22(6), pp.280–283.
- BIAZON, A.C.B. & BACCON, B.G., 2014. Exposição a agrotóxicos: perfil dos trabalhadores de uma comunidade rural de Campo Mourão-PR. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, 9(2), pp.13–19.
- BIRNER-GRUENBERGER, R. *et al.*, 2012. Functional fat body proteomics and gene targeting reveal in vivo functions of *Drosophila melanogaster* α -Esterase-7. *Insect biochemistry and molecular biology*, 42(3), pp.220–9.
- BLIGH, E.G. & DYER, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), pp.911–917.
- BOGAMUWA, M.M.S., WEERAKOON, K.C. & KARUNARATNE, S.H.P.P., 2002. Insecticide resistance in the bruchid *Callosobruchus maculatus* , a storage pest of legumes. *Cey. J. Sci. (Bio. Sci.)*, 30, pp.55–66.
- BOSSOU, ANNICK D; MANGELINCKX, S.H.Y. *et al.*, 2013. Chemical composition and insecticidal activity of plant essential oils from Benin against *Anopheles gambiae* (Giles). *Parasites & Vector*, 337(6), pp.1–17. Available at: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1756-3305-6-337.pdf> [Accessed July 13, 2015].
- BRITO, J.P. & BORTOLI, S.A. DE, 2006. (Fabr ., 1775) (Coleoptera : Bruchidae). *Toxicidade de óleos essenciais de Eucalyptus spp. sobre Callosobruchus maculatus (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae)*, 6(Ld), pp.96–103.
- CALDAS, E.D. & JARDIM, A.N.O., 2011. Exposure to toxic chemicals in the diet: is the Brazilian population at risk? *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, 22(1), pp.1–15.
- CAMPBELL, J.E., RICHARDSON, L.A. & SCHAFER, M.L., 1965. Insecticide Residues in The Human Diet. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 10(6), pp.831–836.

- CARLINI, E.A. *et al.*, 1986. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 17(1), pp.37–64.
- CARVALHO, R. DE O., LIMA, A.C.S. & * J.M.A.A., 2011. Resistência de genótipos de feijão-caupi ao *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Bruchidae) . *Revista Agroambiente On-line*, pp.50–56.
- CASARETT, S.& D., 2008. *Toxicology The Basic Science of Poisons*, Available at: <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0726/2007015656-b.html>.
- CASTRO, M. DE J.P. de *et al.*, 2013. Characterization of cowpea genotype resistance to *Callosobruchus maculatus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(9), pp.1201–1209.
- CASTRO, L. O. ; RAMOS, R.L.D. DE, 2003. *Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais*, Rio Grande do Sul – Brasil: FEPAGRO. n.11 ed. Available at: <http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/gramineas.pdf> [Accessed August 3, 2015].
- CHANDLER, D. *et al.*, 2011. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 366(1573), pp.1987–98.
- CHENG, A.-X. *et al.*, 2007. Plant Terpenoids: Biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(2), pp.179–186.
- CHISOWA, E.H., HALL, D.R. & FARMAN, D.I., 1998. Volatile constituents of the essential oil of *Cymbopogon citratus* Stapf grown in Zambia. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(1), pp.29–30.
- CLEMENTE, M.A. *et al.*, 2010. Acaricidal activity of the essential oils from *Eucalyptus citriodora* and *Cymbopogon nardus* on larvae of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) and *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). *Parasitology research*, 107(4), pp.987–92.
- COOK, S.M., KHAN, Z.R. & PICKETT, J.A., 2007. The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annual review of entomology*, 52, pp.375–400.
- CREDLAND, P.F., 1992. The structure of bruchid eggs may explain the ovicidal effect of oils. *Journal of Stored Products Research*, 28(1), pp.1–9.
- CREDLAND, P.F., DICK, K.M. & WRIGHT, A.W., 1986. Relationships between larval density, adult size and egg production in the cowpea seed beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Ecological Entomology*, 11(1), pp.41–50.
- CRUZ, C.S. *et al.*, 2012. Repelência do *Callosobruchus maculatus* (COLEOPTERA: BRUCHIDAE) sobre grãos de feijão caupi tratado com óleos vegetais. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 7(3), pp.01–05.

CUNHA, E. DE S.; MARTINS, D. D. S., CARVALHO, G.J.A.D. & ESPINDOLA, J.A.A., 2012. Adubação orgânica e teores de nutrientes no Capim-limão | Revista da Biologia. *Revista de Biologia USP*, 9(1), pp.1–5.

D'AMATO, C., TORRES, J.P.M. & MALM, O., 2002. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. *Química Nova*, 25(6a), pp.995–1002.

DAS, M. & DUTTA, P., 2014. Status of insecticide resistance and detoxifying enzyme activity of *Aedes albopictus* population in Sonitpur district of Assam , India. *International Journal of Mosquito Research*, 1(4), pp.35–41.

DELAPLANE, K.S., 2000. Pesticide Usage in the United States: History, Benefits, Risks, and Trends. *The University of Georgia, College of Agricultural and Environmental Sciences. Bulletin 1121/Reprinted November*, p.61.

DEVI, M. BHUBANESHWARI AND DEVI, N.V., 2014. Biology and morphometric measurement of cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* fabr. (Coleoptera: Chrysomelidae) in green gram. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2(3), pp.74–76.

DEWICK, P.M., 2002. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, Second Edition - Dewick - Wiley Online Library* Second Edi. J. W. & S. Ltd, ed., West Sussex.

Dewick, P.M., 2002. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Natural product reports*, 19(2), pp.181–222.

DIXON, R. & PAIVA, N., 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant cell*, 7(7), pp.1085–1097.

VAN DEN DOOL, H. & KRATZ, P.D., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11, pp.463–471.

DOU, D. *et al.*, 2013. Novel selective and irreversible mosquito acetylcholinesterase inhibitors for controlling malaria and other mosquito-borne diseases. *Scientific reports*, 3(1068), pp.1–11.

DOUMBIA, M.; YOBOUE, K.; KOUAMÉ, L. K.; COFFI, K.; KRA, D. K.; KWADJO, E.; DOUAN, B. G. AND DAGNOGO, M., 2014. Toxicity of *Cymbopogon nardus* (Glumales: Poacea) against four stored food products insect pests. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 3(8), pp.903–909.

EBADOLLAHI, A. *et al.*, 2013. Toxicity and Physiological Effects of Essential Oil from *Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze Against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera : Tenebrionidae) Larvae. , 3(4), pp.649–658.

ELLMAN, G.L. *et al.*, 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), pp.88–95.

El-Wakeil, N.E., 2013. Botanical Pesticides and Their Mode of Action. *Gesunde Pflanzen*, 65(4), pp.125–149.

EMBRAPA, 2015. Mercado e Comercialização. Available at: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoPrimSegSafraSulMG/mercado_comercializacao.htm [Accessed April 3, 2015].

ENAYATI, A. A., RANSON, H. & HEMINGWAY, J., 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, 14(1), pp.3–8.

FAO, 2015. Manual of fumigation for insect control - Chemicals used as fumigants (cont.) - Phosphine. *Agriculture and Consumer Protection*. Available at: <http://www.fao.org/docrep/x5042e/x5042e0a.htm> [Accessed August 1, 2015].

FAO, 2014. O crescimento populacional e a questão alimentar. Available at: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/faoweb/lisbon/docs/O_Pa%C3%ADs_25_7_2014.pdf [Accessed April 3, 2015].

FIGUEIREDO, A.C. *et al.*, 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(4), pp.213–226.

FIOCRUZ, 2006. Metodologia para Quantificação de Atividade de Enzimas Relacionadas com a Resistência a Inseticidas em *Aedes aegypti*. *Ministério da Saúde*, p.129.

FLORÃO, A.; FONSECA, R.V. ; LOPES, M. ; GABRIEL, M.M., 2004. Fosfina: riscos. *Visão Acadêmica*, 5(2), pp.101–107.

FORTE, S.N., FERRERO, A.A. & ALONSO, T.S., 2002. Content and composition of phosphoglycerols and neutral lipids at different developmental stages of the eggs of the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Archives of insect biochemistry and physiology*, 50(3), pp.121–30.

FRANÇA, S.M. de *et al.*, 2012. Toxicity and repellency of essential oils to *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae) in *Phaseolus vulgaris* L. *Acta Amazonica*, 42(3), pp.381–386.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; FILHO, E.B.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.I.; OMOTO, C., 2002. Entomologia Agrícola Volume 10., Piracicaba, SP, Brasil: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz-FEALQ.

GAMA, A.F., OLIVEIRA, A.H.B. DE & CAVALCANTE, R.M., 2013. Inventário de agrotóxicos e risco de contaminação química dos recursos hídricos no semiárido cearense. *Química Nova*, 36(3), pp.462–467.

GAMIL, W.E. *et al.*, 2011. Effect of Indoxacarb on some biological and biochemical aspects of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) larvae. *Annals of Agricultural Sciences*, 56(2), pp.121–126.

- GANG, D.R. *et al.*, 2001. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant physiology*, 125(2), pp.539–55.
- GANG, D.R., 2005. Evolution of flavors and scents. *Annual review of plant biology*, 56, pp.301–25.
- GAO, Y., LEI, Z. & REITZ, S.R., 2012. Western flower thrips resistance to insecticides: Detection, mechanisms and management strategies. *Pest Management Science*, 68(8), pp.1111–1121.
- GEORGIA C. ATELLA, D.M. E K.C.G., 2012. CAPÍTULO 6 - Metabolismo de Lipídeos. — INCT-Entomologia Molecular. *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT*, p.22.
- GIBE, A.J.G. & MOTOYAMA, and N., 2014. Multiple mechanisms of permethrin resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* Herbst. *The Philippine Entomologist*, 27(2), pp.187–198. A
- GILBERT, L.I. & CHINO, H., 1974. Transport of lipids in insects. *J. Lipid Res.*, 15(5), pp.439–456. A
- GOMES, E.C., NEGRELLE, R.R.B. & DONI FILHO, L., 2007. Caracterização da produção de capim-limão no Estado do Paraná, Brasil. *Scientia Agraria*, 8(4), p.385.
- GOULART, H.F. *et al.*, 2015. Feromônios: Uma Alternativa Verde para o Manejo Integrado de Pragas. *Revista Virtual de Química*, 7(4), pp.1205–1224.
- GUARINO, S. *et al.*, 2014. Behaviour-modifying compounds for management of the red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus* Oliver). *Pest management science*, 70(12).
- GUNASEKARAN, K. *et al.*, 2011. Glutathione S transferase activity in Indian vectors of malaria: A defense mechanism against DDT. *Journal of medical entomology*, 48(3), pp.561–569.
- HABIG, W.H., PABST, M.J. & JAKOBY, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of biological chemistry*, 249(22), pp.7130–9.
- HAINES, C.P., 1989. Observations on *Callosobruchus analis* (F.) in Indonesia, including a key to storage *Callosobruchus* spp (Col., Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 25(1), pp.9–16. A
- HAMZAH, M.H. *et al.*, 2014. Comparison of citronella oil extraction methods from *Cymbopogon nardus* grass by ohmic-heated hydro-distillation, hydro-distillation, and steam distillation. *BioResources*, 9(1), pp.256–272.

HEDJAL-CHEHHEB, A.M. *et al.*, 2013. Essential Oils Compositions of Six Conifers and Their Biological Activity Against the Cowpea Weevil , *Callosobruchus maculatus* Fabricius , 1775 (Coleoptera : Bruchidae) and *Vigna unguiculata* Seeds. , 1775.

HEMINGWAY, J. *et al.*, 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(7), pp.653–65.

HEMINGWAY, J. & RANSON, H., 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual review of entomology*, 45, pp.371–91.

HERNANDEZ-LAMBRAÑO, R. *et al.*, 2015. Essential oils from plants of the genus *Cymbopogon* as natural insecticides to control stored product pests. *Journal of Stored Products Research*, 62, pp.81–83.

HUANG, Z. *et al.*, 2004. Protein metabolism in *Spodoptera litura* (F.) is influenced by the botanical insecticide azadirachtin. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 80(2), pp.85–93.

IBGE, 2015. IBGE :: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção Agrícola*. http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201506_5.shtm [Accessed July 31, 2015].

ISMAN, M.B., 2015. A renaissance for botanical insecticides? *Pest management science*, 71(8).

ISMAN, M.B., 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51(1), pp.45–66.

ISMAN, M.B. & GRIENEISEN, M.L., 2014. Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. *Trends in Plant Science*, 19(3), pp.140–145.

ISO, I.S. 9235: 2013 Vocabulary. *ISO, International Standard 9235: 2013 Aromatic natural raw materials—vocabulary*. [WWW Document]. Organ. Stand. Geneva, Switz. URL http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=51017 [Accessed September 14, 2015].

JACKSON, C.J. *et al.*, 2013. Structure and function of an insect α -carboxylesterase (α Esterase7) associated with insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(25), pp.10177–82.

JAMES, C., 2011. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010 - ISAAA Brief 42-2010 | ISAAA.org. *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. ISAAA Brief, n. 42. ISAAA: Ithaca, NY.*, p.292. Available at: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/42/> [Accessed July 30, 2015].

JARDIM, A.N.O. & CALDAS, E.D., 2012. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food – Results from 2001 to 2010. *Food Control*, 25(2), pp.607–616.

JEON, J., KURTH, D. & HOLLENDER, J., 2013. Biotransformation pathways of biocides and pharmaceuticals in freshwater crustaceans based on structure elucidation of metabolites using high resolution mass spectrometry. *Chemical research in toxicology*, 26(3), pp.313–24.

JOHNSON, B.T. & KENNEDY, J.O., 1973. Biomagnification of p, p'-DDT and methoxychlor by bacteria. *Applied microbiology*, 26(1), pp.66–71.

KAMEL, A.M., 2007. Metabolic Transformations of Xenobiotics. *Pfizer Global Research and Development Groton Laboratories*, pp.0–12. Available at: <http://web2.uconn.edu/rusling/Amin.pdf>.

KASALI, A.A., OYEDEJI, A.O. & ASHILOKUN, A.O., 2001. Volatile leaf oil constituents of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. *Flavour and Fragrance Journal*, 16(5), pp.377–378.

KETOH, G.K. *et al.*, 2005. Essential oils residual effects on *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) survival and female reproduction and cowpea seed germination. *International Journal of Tropical Insect Science*, 25(02), pp.129–133.

KETOH, G.K., GLITHO, A.I. & HUIGNARD, J., 2002. Susceptibility of the bruchid *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae) to three essential oils. *Journal of economic entomology*, 95(1), pp.174–82.

KHAN, Z.R. *et al.*, 2014. Achieving food security for one million sub-Saharan African poor through push-pull innovation by 2020. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1639), pp.3–11.

KOLAWOLE, A.O., AJELE, J.O. & SIRDESHMUHK, R., 2011. Studies on glutathione transferase of cowpea storage bruchid, *Callosobrochus maculatus* F. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(3), pp.212–220.

Krebs, J.R. *et al.*, 1999. The second Silent Spring? *Nature*, 400, pp.611–612. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/23127> [Accessed July 31, 2015].

KUMAR, P. *et al.*, 2011. Repellent, larvicidal and pupicidal properties of essential oils and their formulations against the housefly, *Musca domestica*. *Medical and veterinary entomology*, 25(3), pp.302–10.

KUMRUNGSEE, N. *et al.*, 2014. Toxicity of essential oil compounds against diamondback moth, *Plutella xylostella*, and their impact on detoxification enzyme activities. *Journal of Pest Science*, 87(4), pp.721–729.

LAGO, J.H.G. *et al.*, 2011. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of Myrtaceae - *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(12), pp.9827–37.

LAMRI-SENHADJI, M.B. AND M., 2013. Nutritional Quality of Legumes, and Their Role in Cardiometabolic Risk Prevention: A Review. *Malika Bouchenak and Myriem*

Lamri-Senhadji. *Journal of Medicinal Food*. March 2013, 16(3): 185-198. doi:10.1089/jmf.2011.0238.

LEMOINE, TARA J. DO*; SCHOOLMAN, KRISTIN MD†; JACKMAN, GEOFFREY MD†; VERNON, D.D.M., 2011. Unintentional Fatal Phosphine Gas Poisoning of a Family. *Pediatric Emergency Care*., 21(9), pp.869–871.

LEWINSOHN, E., 1998. Histochemical Localization of Citral Accumulation in Lemongrass Leaves (*Cymbopogon citratus*(DC.) Stapf., Poaceae). *Annals of Botany*, 81(1), pp.35–39.

Li, S.-G. *et al.*, 2013. Fumigant activity of *Illicium verum* fruit extracts and their effects on the acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in adult *Sitophilus zeamais*. *Journal of Pest Science*, 86(4), pp.677–683.

Li, Y. *et al.*, 2014. Contribution to the knowledge of seed-beetles (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae) in Xinjiang, China. *ZooKeys*, (466), pp.13–28.

LICHTENTHALER, H.K., 1999. the 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 50, pp.47–65.

LICHTENTHALER, H.K., ROHMER, M. & SCHWENDER, J., 1997. Minireview Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum*, pp.643–652.

LIJA-ESCALINE, J. *et al.*, 2015. Physiological and biochemical effects of botanical extract from *Piper nigrum* Linn (Piperaceae) against the dengue vector *Aedes aegypti* Liston (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*.

LINGAMPALLY, VASUDHA ;SOLANKI, V.R.;RAJA, S.S., 2012. Andrographolide: An effective anti-fertility agent for the control of *Tribolium confusum*. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2(3), pp.313–317.

LODDÉ, B. *et al.*, 2015. Acute phosphine poisoning on board a bulk carrier: analysis of factors leading to a fatal case. *Journal of occupational medicine and toxicology (London, England)*, 10(1), p.10.

LÓPEZ, M.D., CONTRERAS, J. & PASCUAL-VILLALOBOS, M.J., 2010. Selection for tolerance to volatile monoterpenoids in *Sitophilus oryzae* (L.), *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Cryptolestes pusillus* (Schönherr). *Journal of Stored Products Research*, 46(1), pp.52–58.

LÓPEZ, M.D. & PASCUAL-VILLALOBOS, M.J., 2010. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Industrial Crops and Products*, 31(2), pp.284–288.

LORINI, I., 2012. Insetos que atacam grãos de soja armazenados. In *Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga*, Embrapa. pp. 421–444. Available at: <http://www.cnpso.embrapa.br/artropodes/Capitulo6.pdf> [Accessed July 31, 2015].

LORINI, I., 2011. Monitoramento da liberação do gas PH₃ por pastilhas de fosfina usadas para expurgo de sement. *Informativo Abrates*, 21(3), pp.57–60.

MACEDO, M.L.R. *et al.*, 2007. Insecticidal action of Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL) against Anagasta kuehniella (Lepidoptera: Pyralidae), Zabrotes subfasciatus and Callosobruchus maculatus (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 146(4), pp.486–98.

MADHAVAN, S., PARANIDHARAN, V. & VELAZHAHAN, R., 2011. Foliar application of Burkholderia sp. strain TNAU-1 leads to activation of defense responses in chilli (Capsicum annum L.). *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23(Silva 2002), pp.261–266.

MAESTRE, R.Y. *et al.*, 2010. Susceptibility status of Aedes aegypti to insecticides in la Guajira (Colombia). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(5), p.53

MAGALHÃES, R., 2014. Avaliação de políticas e iniciativas públicas de segurança alimentar e nutricional: dilemas e perspectivas metodológicas. *Ciência & Saúde Coletiva*, 19(5), pp.1339–1346.

MAPA, 2015. Feijão - MAPA. *Ministério da Agricultura*. Available at: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao> [Accessed April 3, 2015].

MARFRIG, G., 2013. DERAL - Departamento de Economia Rural Suinocultura - Análise da Conjuntura Agropecuária DERAL - Departamento de Economia Rural. *Revista Nacional da Carne*, 1(41), pp.1–16.

MARTINAZZO, A.P. *et al.*, 2007. Difusividade efetiva em folhas de Cymbopogon citratus (DC.) Stapf submetidas à secagem com diferentes comprimentos de corte e temperaturas do ar. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 9(1), pp.68–72..

MARTINS, M.B.G. [UNESP] *et al.*, 2004. Caracterização anatômica da folha de Cymbopogon citratus (DC.) Stapf (Poaceae) e perfil químico do óleo essencial. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 6(3), pp.20–29.

MARZANGHI, J., SAFARALIZADEH, M.H. & MOGHADDAM, P.N., 2013. Investigation on the insecticidal efficacy of novel pellet formulation against Callosobruchus maculatus (F.) (Col.: Bruchidae) in three different heights and compared with phosphine. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 46(6), pp.704–709.

MITCHELL, R., 1975. The Evolution of Oviposition Tactics in the Bean Weevil, Callosobruchus maculatus (F.) on JSTOR. *Ecology*, pp.696–702.

MOGHADAM, M. M.;GHADAMYARI, M. & TALEBI, K., 2012. Resistance mechanisms to fenazaquin in Iranian populations of two-spotted spider mite, Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae). *International Journal of Acarology*, 38(2), pp.138–145.

- MOHAMED, M.I. *et al.*, 2015. Ultrastructure and histopathological alteration in the ovaries of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera, Chrysomelidae) induced by the solar radiation. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 68, pp.19–32.
- MOHAPATRA, D.; GIRI, S.; KARI, A., 2014. Effect of Microwave Aided Disinfestation of *Callosobruchus Maculatus* on Green Gram Quality. *International Journal of Agriculture and Food Science Technology*, 5(2), pp.55–62.
- MONTELLA, I.R., SCHAMA, R. & VALLE, D., 2012. The classification of esterases : an important gene family involved in insecticide resistance - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(June), pp.437–449.
- MOREIRA, M.F., MANSUR, J.F. & FIGUEIRA-MANSUR, J., 2012. CAPÍTULO 15 Resistência e Inseticidas : Estratégias , Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos . In *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*. pp. 1–23.
- MUTHUSAMY, R. *et al.*, 2013. Biochemical mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in red hairy caterpillar *Amsacta albistriga* (Lepidoptera : Arctiidae). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 12(1), pp.47–52. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2012.06.002>.
- MWILA, K. *et al.*, 2013. The effect of mixtures of organophosphate and carbamate pesticides on acetylcholinesterase and application of chemometrics to identify pesticides in mixtures. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(3), pp.2315–2327.
- NAKAHARA, K. *et al.*, 2013. Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella Grass). *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 37(4), pp.249–252.
- NKYA, T.E. *et al.*, 2013. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: facts, evidences and prospects. *Insect biochemistry and molecular biology*, 43(4), pp.407–16.
- NWANZE, K., MASKARINEC, J. & HOPKINS, T., 1976. Lipid composition of the normal and flight forms of adult cowpea weevils, *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Insect Physiology*, 22(6), pp.897–899.
- NYAMADOR, S.W. *et al.*, 2010. Activités Ovicide et Larvicide des Huiles Essentielles de *Cymbopogon giganteus* Chiov. et de *Cymbopogon nardus* L. Rendle sur les stades immatures de *Callosobruchus maculatus* F. et de *Callosobruschus subinnotatus* Pic. (Coleoptera: Bruchidae). *Journal de la Société ouest-africaine de chimie*, (29), pp.67–79.
- NYAMADOR, W.S. *et al.*, 2010. Variation in the susceptibility of two *Callosobruchus* species to essential oils. *Journal of Stored Products Research*, 46(1), pp.48–51.
- O'BRIEN, D.M., BOGGS, C.L. & FOGEL, M.L., 2005. The amino acids used in reproduction by butterflies: a comparative study of dietary sources using compound-specific stable isotope analysis. *Physiological and biochemical zoology : PBZ*, 78(5), pp.819–27.

OAKLEY, A.J. *et al.*, 2001. The crystal structures of glutathione S-transferases isozymes 1-3 and 1-4 from *Anopheles dirus* species B. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 10(11), pp.2176–85.

OBERMAYR, U. *et al.*, 2015. Evaluation of a Push-Pull Approach for *Aedes aegypti* (L.) Using a Novel Dispensing System for Spatial Repellents in the Laboratory and in a Semi-Field Environment. *PloS one*, 10(6), p.e0129878.

OGIE-ODIA, E. *et al.*, 2010. Foliar epidermal and phytochemical studies of the grasses *Cymbopogon citratus* (stapf.), *Axonopus compressus* (P. Beauv.) and *Eragrostis tremula* (S. W. Beauv) in Ekpoma, Edo state, Nigeria. *Science World Journal*, 5(1), pp.20–25.

OLIVEIRA, J. DO V *et al.*, 2001. Determinação da porcentagem de fosfina obtida de produtos comerciais utilizados para fumigação na agricultura e em grãos armazenados. *Rev. bras. toxicol*, 14(2), pp.13–16.

OLIVERO-VERBEL, J., NERIO, L.S. & STASHENKO, E.E., 2010. Bioactivity against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils grown in Colombia. *Pest management science*, 66(6), pp.664–8.

OOTANI, M.A. *et al.*, 2013. Use of Essential Oils in Agriculture. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 4(May), pp.162–175.

ORGANIZATION, W.H., SAFETY, I.P. ON C. & PHOSPHIDES, W.T.G. ON P. AND S.M., 1988. *Phosphine and selected metal phosphides / published under the joint sponsorship of the United Nations Environment Programme, the International Labour Organisation, and the World Health Organization*, Geneva: World Health Organization. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/37212> [Accessed August 2, 2015].

OUALI-N'GORAN S-W. M., BOGA J.P., JOHNSON F., T.Y. AND F.K., 2014. Influence of dietary factors of five varieties of beans sold in Côte d'Ivoire on some biological parameters of *Callosobruchus maculatus* (Fab.) Coleoptera, Bruchidae. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 21(ISSN 2071-7024), pp.3251–3262.

OWOLABI, M.S. *et al.*, 2009. Bioactivity of three plant derived essential oils against the maize weevils *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) and cowpea weevils *Callosobruchus maculatus* (Fabricius). *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 8(9), pp.828–835.

PANIZZI, A.R., 2013. History and contemporary perspectives of the integrated pest management of soybean in Brazil. *Neotropical entomology*, 42(2), pp.119–27.

PARANAGAMA, P.A. *et al.*, 2002. Toxicity and repellent activity of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. and *Murraya koenigii* Sprang. against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera; Bruchidae). *Journal of Agricultural Research and Extension*, 2(5), pp.22–19.

PARRA, J.R.P., 2014. Biological Control in Brazil: an overview. *Scientia Agricola*, 71(5), pp.420–429.

- PASCUAL-VILLALOBOS, M. & BALLESTA-ACOSTA, M., 2003. Chemical variation in an *Ocimum basilicum* germplasm collection and activity of the essential oils on *Callosobruchus maculatus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(7), pp.673–679.
- PERINI, V.B.D.M., 2008. *Análise do óleo essencial, produção de biomassa e fungitoxicidade do capim citronela (Cymbopogon nardus)*. Universidade do Tocantins.
- PETERSON, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83(2), pp.346–356.
- PINTO, Z.T. *et al.*, 2015. Chemical composition and insecticidal activity of *Cymbopogon citratus* essential oil from Cuba and Brazil against housefly. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 24(1), pp.36–44.
- PINTO-ZEVALLOS, D.M. & ZARBIN, P.H.G., 2013. A Química na agricultura: perspectivas para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis. *Química Nova*, 36(10), pp.1509–1513.
- PRETTY, J., 2008. Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 363(1491), pp.447–65.
- PROCOPIO, S.D.O. *et al.*, 2015. Efeito de pós vegetais sobre *Acanthoscelides obtectus* (SAY) e *Zabrotes subfasciatus* (BOH.) (COLEOPTERA: BRUCHIDAE) / Effect of powders on *Acanthoscelides obtectus* (SAY) and *Zabrotes subfasciatus* (BOH.) (COLEOPTERA: BRUCHIDAE). *Ceres*, 50(289).
- PUNTA, M. *et al.*, 2011. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), pp.290–301.
- RAJA, N. *et al.*, 2001. Effect of plant volatile oils in protecting stored cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walpers against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) infestation. *Journal of Stored Products Research*, 37(2), pp.127–132.
- RAJASHEKAR, Y., RAGHAVENDRA, A. & BAKTHAVATSALAM, N., 2014. Acetylcholinesterase inhibition by biofumigant (Coumaran) from leaves of *Lantana camara* in stored grain and household insect pests. *BioMed research international*, 2014, pp.1–6.
- RASHWAN, M.H., 2013. Nature and Science 2013. Biochemical Impacts of Rynaxypyr (Coragen) and Spinetoram (Radiant) ,11(8), pp.40–47.
- RATTAN, R.S., 2010. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*, 29(9), pp.913–920.
- REDDY, B.N. *et al.*, 2012. Identification and classification of detoxification enzymes from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Bioinformation*, 8(9), pp.430–6.

REGMI, H. *et al.*, 2012. Efficacy of Natural Products Against *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae) in Nepal. *Journal of Economic Entomology*, 105(3), pp.1095–1099.

REGNAULT-ROGER, C., VINCENT, C. & ARNASON, J.T., 2011. Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. , 57, pp.405–424.

RICARDO, G.C., 2011. Indicadores de contaminação ambiental por agrotóxicos: instrumentos de avaliação pericial. *Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC*.

ROH, H.S. *et al.*, 2011. Acaricidal and oviposition deterring effects of santalol identified in sandalwood oil against two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Journal of pest science*, 84(4), pp.495–501.

ROSS, M.K., STREIT, T.M. & HERRING, K.L., 2010. Carboxylesterases: Dual roles in lipid and pesticide metabolism. *Journal of pesticide science*, 35(3), pp.257–264.

RUBASINGHEGE, G.R.S., PARANAGAMA, P. & ABEYWICKRAMA, K., 2006. Physicochemical changes of stored cowpea, *Vigna unguiculata*, treated with selected essential oils to control cowpea bruchid, *Callosobruchus maculatus* (F.). *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 4(3-4), pp.41–44.

RUSSELL, R.J. *et al.*, 2011. The evolution of new enzyme function: Lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects. *Evolutionary Applications*, 4(2), pp.225–248.

DE SÁ, L.F.R. *et al.*, 2014. Effects of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) seed coat on the embryonic and larval development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of insect physiology*, 60, pp.50–7.

SANTOS, F.C.C. & VOGEL, F.S.F., 2012. Avaliação in vitro da ação do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus*) sobre o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14(4), pp.712–716.

SANTOS, R. *et al.*, 2011. Lipid accumulation and utilization by oocytes and eggs of *Rhodnius prolixus*. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 77(1), pp.1–16.

SANTOS, V.M.R. dos *et al.*, 2007. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Química Nova*, 30(1), pp.159–170.

SAÚDE, M. DA, 2012. Segundo Ministério da Saúde, é preciso reduzir subnotificação de casos de intoxicação por agrotóxicos no País — Portal Brasil. Available at: <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2012/04/segundo-ministerio-da-saude-e-preciso-reduzir-subnotificacao-de-casos-de-intoxicacao-por-agrotoxicos-no-pais> [Accessed September 1, 2015].

SCHMIDT, A.A.M.L.G., 2009. O contato com agrotóxicos e os possíveis agravos à saúde de trabalhadores rurais. *Revista de Psicologia da UNESP*, 8(2), pp.184–188.

SETIAWATI, W., MURTININGSIH, R. & HASYIM, A., 2011. Laboratory and field evaluation of essential oils from *Cymbopogon nardus* as oviposition deterrent and ovicidal activities against *Helicoverpa armigera* Hubner ON Chili pepper. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 12(1), pp.9–16.

SHANG, Q. *et al.*, 2012. Biochemical characterization of acetylcholinesterase, cytochrome P450 and cross-resistance in an omethoate-resistant strain of *Aphis gossypii* Glover. *Crop Protection*, 31(1), pp.15–20.

SHASANY, A.K. *et al.*, 2000. Phenotypic and RAPD diversity among *Cymbopogon winterianus* Jowitt accessions in relation to *Cymbopogon nardus* Rendle. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 47(5), pp.553–559.

SILVA, W.M. *et al.*, 2015. Status of pyrethroid resistance and mechanisms in Brazilian populations of *Tuta absoluta*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 122, pp.8–14.

SINTHUSIRI, J. & SOONWERA, M., 2014. Oviposition deterrent and ovicidal activities of seven herbal essential oils against female adults of housefly, *Musca domestica* L. *Parasitology research*, 113(8), pp.3015–22.

SIRIPORN, P. & MAYURA, S., 2012. The effects of herbal essential oils on the oviposition-deterrent and ovicidal activities of *Aedes aegypti* (Linn.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Tropical biomedicine*, 29(1), pp.138–50.

SOARES, A.A. *et al.*, 2014. Efeito da adubação orgânica na produção de biomassa e bioatividade do óleo essencial do capim citronela. *Comunicata Scientiae*, 5(4), pp.427–434.

SOREQ, H. & SEIDMAN, S., 2001. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nature reviews. Neuroscience*, 2(4), pp.294–302.

SOSA-GÓMEZ, D.R., 2014. *Helicoverpa Armigera* the Old World Bollworm in the Neotropical Region : the Experience of Brazilian Growers With *Helicoverpa*. *Outlooks on Pest Management*, 25(4), pp.261–264.

SOUTO, R.N.P. *et al.*, 2012. Insecticidal activity of Piper essential oils from the Amazon against the fire ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *Neotropical entomology*, 41(6), pp.510–7.

SPARKS, T.C. & NAUEN, R., 2014. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, pp.122–128.

SREELATHA, K. B. AND GEETHA, P.R., 2010. Disruption of oocyte development and vitellogenesis in *Oryctes rhinoceros* treated with methanolic extract of *Eupatorium odoratum* leaves. *Journal of Biopesticides*, 3(1), pp.253–258.

- SUDAKIN, D., 2005. Occupational exposure to aluminium phosphide and phosphine gas? A suspected case report and review of the literature. *Human & Experimental Toxicology*, 24(1), pp.27–33.
- SUGUMAR, S. *et al.*, 2014. Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. *Bulletin of entomological research*, 104(3), pp.393–402.
- SVOBODA, K.P. *et al.*, 2000. *Secretory Structures of Aromatic and Medicinal Plants: A review and Atlas of Micrographs* Microscopix Publications.
- TAK, J.-H., JOVEL, E. & ISMAN, M.B., 2015. Contact, fumigant, and cytotoxic activities of thyme and lemongrass essential oils against larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Journal of Pest Science*, 98, pp.1–11.
- TANG, F. *et al.*, 2014. In vitro inhibition of glutathione S-transferases by several insecticides and allelochemicals in two moth species. *International Journal of Pest Management*, 60(1), pp.33–38.
- TAYLOR, E.L. & HOLLEY, A.G., 2007. Pesticide Development a Brief Look at the History. In *Southern Regional Extension Forestry*. Gordon Holley, Melanie Kirk (Eds), Southern Regional Extension Forest, pp. 3–7.
- THEIN, W.M., JAVIER, P.A. & CEBALLO, F.A., 2013. Insecticidal Activity of Crude Plant Extracts Against *Sitophilus* spp. (Coleoptera: Curculionidae) and *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae). *The Philippine Agricultural Scientist*, 96(2).
- TORRES, J.P.M. *et al.*, 2009. Persistent toxic substances in the Brazilian Amazon: contamination of man and the environment. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(6), pp.1175–1179.
- TRIPATHI, A.K. *et al.*, 2009. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 1(15).
- VEIGA, M.M. *et al.*, 2006. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 22(11), pp.2391–2399.
- VERMEULEN, S.J. *et al.*, 2012. Options for support to agriculture and food security under climate change. *Environmental Science & Policy*, 15(1), pp.136–144.
- VIJAYARAGHAVAN, C.;SIVAKUMAR, C.;KAVITHA, Z.;SIVASUBRAMANIAN, P., 2010. Effect of plant extracts on biochemical components of cabbage leaf webber, *Crociodomia binotalis* Zeller. *Journal of Biopesticides*, 3(1), pp.275–277.
- WAGNER, G.J. & HRAZDINA, G., 1984. Endoplasmic reticulum as a site of phenylpropanoid and flavonoid metabolism in *hippeastrum*. *Plant physiology*, 74(4), pp.901–6.

- WALIWIYIYA, R., NICHOLSON, R.A., *et al.*, 2012. The Synergistic Effects of Insecticidal Essential Oils and Piperonyl Butoxide on Biotransformational Enzyme Activities in *Aedes aegypti*(Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 49(3), pp.614–623.
- WARIKOO, R., WAHAB, N. & KUMAR, S., 2011. Oviposition-altering and ovicidal potentials of five essential oils against female adults of the dengue vector, *Aedes aegypti* L. *Parasitology research*, 109(4), pp.1125–31.
- WEI, H. *et al.*, 2015. The toxicity and physiological effect of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* against the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop Protection*, 76, pp.68–74.
- WEI, L.S. & WEE, W., 2013. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. *Iranian journal of microbiology*, 5(2), pp.147–52.
- WEI, Q.-B. *et al.*, 2015. Abamectin resistance in strains of vegetable leafminer, *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) is linked to elevated glutathione S-transferase activity. *Insect Science*, 22(2), pp.243–250.
- WINKEL-SHIRLEY, B., 1999. Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiologia Plantarum*, 107, pp.142–149.
- WRIGHT, R.J. *et al.*, 2000. Larval Susceptibility of an Insecticide-Resistant Western Corn Rootworm (Coleoptera : Chrysomelidae) Population to Soil Insecticides : Laboratory Bioassays , Assays of Detoxification Enzymes , and Field Performance Larval Susceptibility of an Insecticide. *J Econ Entomol*, 93(1), pp.7–13.
- XU, J. *et al.*, 2013. Detoxification and stress response genes expressed in a western North American bumble bee, *Bombus huntii* (Hymenoptera: Apidae). *BMC genomics*, 14(1), p.874.
- YAZDANI, E., SENDI, J.J. & ALIAKBAR, A., 2013. Chemical composition , toxicity and physiological effects of essential oil of *Rosemarinus officinalis* on lesser mulberry pyralid , *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera : Pyralidae. *Journal of Crop Protection*, 2(4), pp.461–476.
- YAZDANI, E., SENDI, J.J. & HAJIZADEH, J., 2014. Effect of *Thymus vulgaris* L. and *Origanum vulgare* L. essential oils on toxicity, food consumption, and biochemical properties of lesser mulberry pyralid *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Plant Protection Research*, 54(1), pp.53–61.
- YOTAVONG, P. *et al.*, 2015. Effects of the botanical insecticide thymol on biology of a braconid, *Cotesia plutellae* (Kurdjumov), parasitizing the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. *International Journal of Pest Management*, 61(2), pp.171–178.
- YUZAN, W. *et al.*, 2010. Oviposition deterrent effects of several plant essential oils on *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Journal of South China Agricultural University*, 31(2), pp.22–27.

ZIEGLER, R. & VANANTWERPEN, R., 2006. Lipid uptake by insect oocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(4), pp.264–272.

7 ANEXO

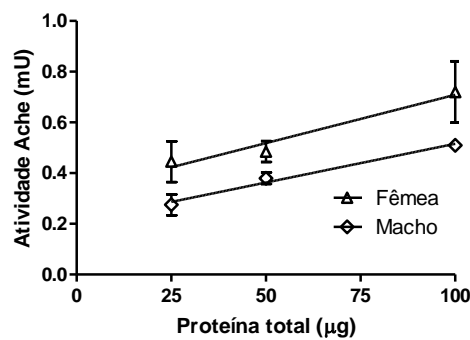


Figura 25. Atividade da acetilcolinesterase em macho e fêmea de *Callosobruchus maculatus* em função da concentração de proteína.

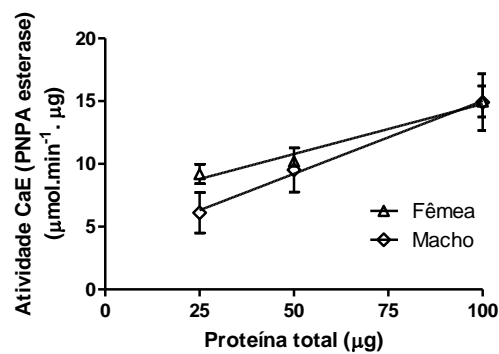


Figura 26. Atividade da carboxilesterase em macho e fêmea de *Callosobruchus maculatus* em função da concentração de proteína.

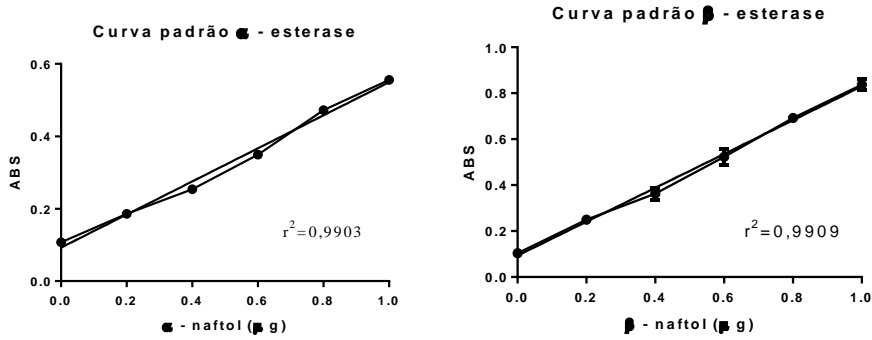


Figura 27. Curva padrão da alfa e beta-esterases.

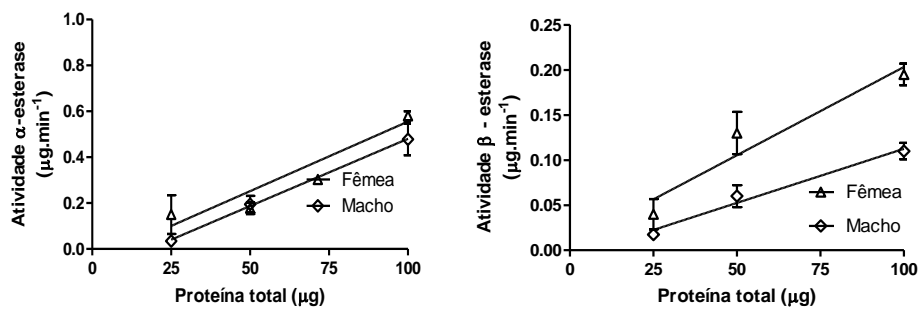


Figura 28. Atividade da alfa e beta-esterase em macho e fêmea de *Callosobruchus maculatus* em função da concentração de proteína.

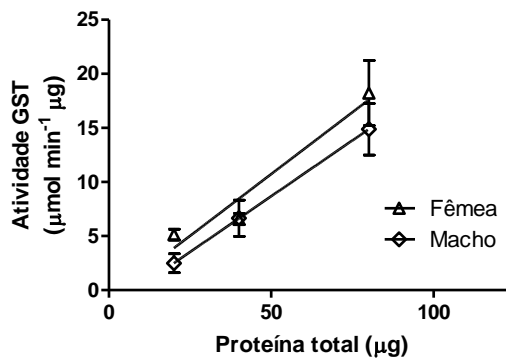
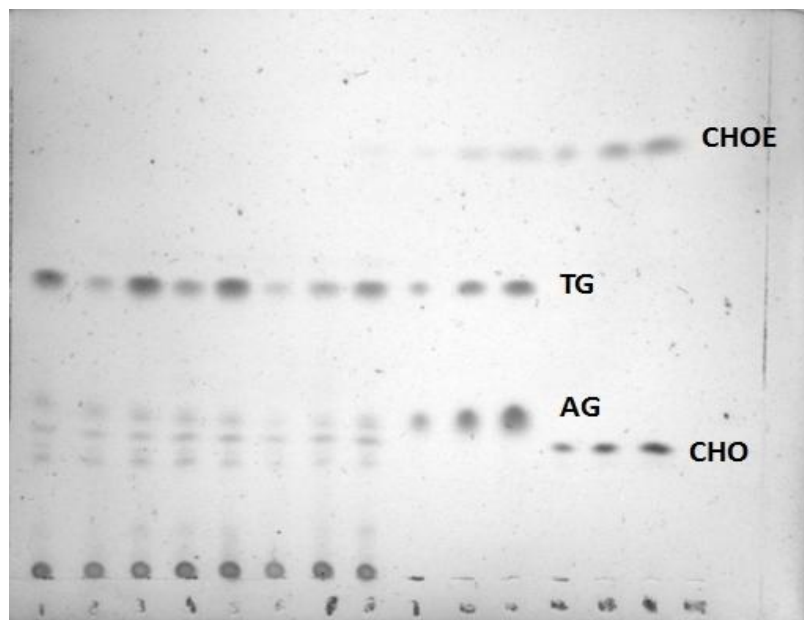


Figura 29. Atividade da glutathione S-transferase em macho e fêmea de *Callosobruchus maculatus* em função da concentração de proteína.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

Figura 30. Cromatografia de camada fina (TLC) do conteúdo lipídico presente em duas fêmeas de *C. maculatus*. Fêmeas Virgens= FV; Fêmeas Virgens Tratadas= FVT; Fêmeas Copuladas= FCC; Fêmeas Copuladas Tratadas= FCT; Padrões de Lipídios AG= ácidos graxos, TG= triacilglicerol, CHO= colesterol, CHOE= colesterol éster. Legenda: 1. FV 1; 2.FT1; 3.FV2; 4.FT2 5.FCC1; 6.FCT1; 7.FCC2; 8.FCT2; 9.AG + TG (2µg) 10. AG+TG (6 µg) 11. AG+TG (10 µg) 12. CHO + CHOE (2µg); 13. CHO+CHOE (6 µg); 14.CHO+CHOE (10 µg).