

UFRRJ
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

**ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO COMO PROTETOR
DE SEMENTES E GRÃOS ARMAZENADOS: UMA
ABORDAGEM DA BIOLOGIA QUÍMICA E MOLECULAR AO
MANEJO AGROECOLÓGICO DO CARUCNHO DO FEIJÃO-
CAUPI**

Seropédica, RJ

2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A474o Alves, Marcela de Souza, 26/02/1988-
Óleo Essencial de Capim-Limão como Protetor de
Sementes e Grãos Armazenados: Uma abordagem da
Biologia Química e Molecular ao Manejo Agroecológico do
Carucho do Feijão-Caupi. / Marcela de Souza Alves. -
Rio de Janeiro, 2021.
134 f.

Orientador: Marco André Alves de Souza.
Coorientador: Emerson Guedes Pontes.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química,
2021.

1. Agricultura Orgânica. 2. Controle de insetos
praga. 3. Biopesticidas. 4. Proteção de sementes. I.
Souza, Marco André Alves de, 1975-, orient. II.
Pontes, Emerson Guedes, 1974-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO COMO PROTETOR
DE SEMENTES E GRÃOS ARMAZENADOS: UMA
ABORDAGEM DA BIOLOGIA QUÍMICA E MOLECULAR AO
MANEJO AGROECOLÓGICO DO CARUNHO DO FEIJÃO-
CAUPI**

MARCELA DE SOUZA ALVES

Sob a orientação do professor:

Marco Andre Alves de Souza

e Co-orientação do professor:

Emerson Guedes Pontes

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração Química Biológica.

Seropédica, RJ
2021

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

MARCELA DE SOUZA ALVES

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Química,
no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química
Biológica

TESE APROVADA EM 21/12/2021

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

Membros da banca:

Marco André Alves de Souza
(Dr.) UFRRJ (Orientador)

André Marques dos Santos
(Dr.) UFRRJ

Elen de Lima Aguiar Menezes
(Dr.^a) UFFRJ

Antônia Elenir Amâncio Oliveira
(Dr.^a) UENF

Flávio José da Silva Dantas
(Dr.) UERJ



Emitido em 2021

TERMO Nº 1362/2021 - PPGQ (12.28.01.00.00.60)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 22/12/2021 17:13)

ANDRÉ MARQUES DOS SANTOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DBQ (11.39.00.24)
Matrícula: 1809123

(Assinado digitalmente em 22/12/2021 17:39)

ELEN DE LIMA AGUIAR MENEZES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptEF (12.28.01.00.00.49)
Matrícula: 2223814

(Assinado digitalmente em 23/12/2021 19:50)

MARCO ANDRÉ ALVES DE SOUZA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DBQ (11.39.00.24)
Matrícula: 2582213

(Assinado digitalmente em 23/12/2021 22:07)

FLAVIO JOSE DA SILVA DANTAS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 017.836.127-54

(Assinado digitalmente em 22/12/2021 15:57)

ANTONIA ELENIR AMANCIO ELENIR AMANCIO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 461.410.573-49

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número:
1362, ano: **2021**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **22/12/2021** e o código de verificação: **e5ee958cd8**

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à Deus, a mim mesma, 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 e todos da minha família e amigos que compreenderam minha ausência em muitos momentos, em especial ao meu noivo Helton Wagner Amazonas dos Santos.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade.

Ao professor Marco André Alves Souza pela orientação, pelos incentivos e por ser sempre solícito.

Ao professor Emerson Guedes Pontes pela orientação e apoio.

Ao professor Cristiano Riger pela colaboração.

A todos os meus amigos de laboratório e estagiários. Não quero citar nomes porque são muitos e isso seria imperdoável, pois todos foram importantes, afinal não se faz trabalho sozinho.

À direção, colegas (em especial a Professora Paula Fagundes Brandão) e alunos do Colégio Estadual Professor José Antônio Maia Vinagre (em especial a minha 801) pelo acolhimento, apoio e compreensão. Sabia desde sempre que iria lecionar neste colégio que com certeza, logo deixará saudades. Ressalto também as amigas especiais que a educação me deu, Camila Halford e Kahoma Andrade.

Aos amigos ex- alunos do CEDERJ que mesmo com a distância jamais nos separamos, o apoio de vocês é muito importante. E aos amigos tutores presenciais do CEDERJ Piraí-RJ, que alegria ter vocês como colegas de trabalho! Em especial a Nayara Francisco Cidreira que se tornou uma grande amiga e a Flávia Valim, que não está no polo, mas foi a pessoa que incentivou que eu procurasse estágio no laboratório durante a graduação.

Aos amigos do alojamento F1 da UFRRJ pela amizade e apoio, em especial a Lídia Almeida, que durante o Mestrado fazia-me companhia aos domingos no laboratório. Uma observação: Ela ia apenas para acompanhar-me, gratidão!

As minhas amigas Edlene Ribeiro (e afilhada), Daniele Rodrigues, Soraia John e Laurine Cristina, pela grande amizade que construímos!

A minha terapeuta Ana Cardoso, que abriu (abre) um mundo de possibilidades.

A minha professora de Yoga Tatiane Carmo, pelo carinho e amizade . Logo voltarei as aulas.

Aos amigos de infância Emanuel Hottes (ex-aluno do IQ) e Pablo Jordão. O grupo jovem foi o início de toda jornada.

Aos professores que aceitaram fazer parte da banca examinadora.

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

A eu mesma, porque se eu não acreditasse em primeiro lugar, nada faria sentido.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

ALVES, Marcela de Souza. **Óleo Essencial de Capim-Limão como Protetor de Sementes e Grãos Armazenados: Uma Abordagem Da Biologia Química e Molecular ao Manejo Agroecológico do Carucho Do Feijão-Caupi** 2021. 129p. Tese (Doutorado em Química, área de Concentração em Química Biológica). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Os óleos essenciais são promissores para proteção de sementes e grãos da infestação de insetos-pragas e fungos fitopatogênicos. Neste contexto, o presente estudo teve os seguintes objetivos: estudar os efeitos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e citral sobre as etapas do ciclo de vida do inseto, investigar os seguintes efeitos do óleo essencial: sobre o metabolismo de fêmeas copuladas de *C. maculatus*, na proteção das sementes em função do tempo, sobre a germinação de sementes de feijão (*Vigna unguiculata*), desenvolvimento de fungos da condição de armazenamento e sobre a viabilidade celular/ toxicidade na levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), modelo celular eucarioto. Para isso, foi realizada a caracterização química do óleo essencial de capim-limão, onde observou-se um perfil químico rico em monoterpenos, sendo os componentes majoritários neral (34,63%) e geranial (42,80%) que formam o isômero citral, no qual sementes de feijão-caupi foram lavadas com óleo essencial e armazenadas por até 180 dias, e verificou-se que as sementes revestidas com o óleo essencial apresentaram resíduos de citral em sua superfície e proteção contra gorgulhos por até 90 dias de armazenamento. Observou-se efeito tóxico da fumigação do óleo essencial sobre a mortalidade dos insetos de 61,43% na concentração de 0,92mg/cm³ e inibição de seu ciclo de vida. No perfil metabólico de fêmeas copuladas, verificou-se predominância de açúcares (trealose e glicose) e aminoácidos (prolina e alanina), no grupo controle, porém, nas fêmeas expostas ao óleo essencial, foram observados níveis aumentados de glicerol e diminuição da expressão relativa das enzimas hexoquinase, lactato desidrogenase e malato desidrogenase. O óleo essencial apresentou toxicidade sobre o crescimento de fungos da condição de armazenamento. A viabilidade celular em modelo celular eucarioto, a levedura de *S. cerevisiae*, foi observada em até 3 horas de exposição ao óleo essencial. Não houve efeito alelopático do óleo essencial na germinação de sementes de feijão-caupi. Com base nos testes realizados, conclui-se que o óleo essencial de capim-limão tem potencial para desenvolver estratégias de proteção de grãos e sementes em substituição ao controle tradicional, principalmente no atendimento ao setor de produção de sementes orgânicas.

Palavras-chave: Agricultura orgânica, controle de insetos-pragas, biopesticidas, proteção de sementes.

ABSTRACT

ALVES, Marcela de Souza. **Lemongrass Essential Oil as a Protector of Stored Seeds and Grains: A Chemical and Molecular Biology Approach to the Agroecological Management of Cowpea Beetle.** 129p. Thesis (Doctorate in Chemistry, area of concentration in Biological Chemistry). Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Essential oils are promising for protecting seeds and grains from infestation by insect pests and phytopathogenic fungi. In this context, the present study had the following objectives: to study the effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (lemon grass) and citral on the stages of the insect life cycle, to investigate the following effects of the essential oil: on the metabolism of females copulates of *C. maculatus*, on seed protection as a function of time, on bean (*Vigna unguiculata*) seed germination, on fungal development under storage conditions and on cell viability/toxicity in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), eukaryotic cell model. For this, the chemical characterization of lemongrass essential oil was carried out, where a chemical profile rich in monoterpenes was observed, with the majority components neral (34.63%) and geranial (42.80%) that form the isomer citral, in which cowpea seeds were washed with essential oil and stored for up to 180 days, and it was found that seeds coated with the essential oil showed citral residues on their surface and protection against weevils for up to 90 days of storage. A toxic effect of essential oil fumigation was observed on insect mortality of 61.43% at a concentration of 0.92mg/cm³ and inhibition of their life cycle. In the metabolic profile of mated females, there was a predominance of sugars (trehalose and glucose) and amino acids (proline and alanine), in the control group, however, in females exposed to essential oil, increased levels of glycerol and decreased relative expression were observed. of the enzymes hexokinase, lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase. The essential oil showed toxicity on the growth of fungi in the storage condition. Cell viability in a eukaryotic cell model, the yeast of *S. cerevisiae*, was observed in up to 3 hours of exposure to the essential oil. There was no allelopathic effect of the essential oil on the germination of cowpea seeds. Based on the tests carried out, it is concluded that lemongrass essential oil has the potential to develop strategies to protect grains and seeds to replace traditional control, especially in serving the organic seed production sector.

Keywords: Organic agriculture, insect pest control, biopesticides, seed protection.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

20-E 20-hidroxiecdisona

AG Ácidos Graxos

AKH hormônio adipocinético

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEPEA Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada

CG-EM Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas

CONAB Companhia Nacional de Abastecimento

DAG Diacilglicerol

FAO Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

GST Glutathione S-transferase

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INPI Instituto Nacional de Propriedade Intelectual

ISO Organização Internacional de Normatizações

JH Hormônio Juvenil

LMR Limite de Resíduo de Agrotóxicos

MAPA Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeOx Metoxilados

MEP Metiloeritritol-Fosfato

MEV Via Mevalônica

MIP Manejo Integrado de Pragas

MSTFA N-Metil-Trimetilsilil-Trifluoroacetamida

OE Óleos Essenciais

OMS Organização Mundial de Saúde

PIB Produto Interno Bruto

qPCR Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

TG Triacilglicerol

TMS Trimetilsililados

WIPO Sistema Internacional de Patentes

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Feijão-fradinho, *Vigna unguiculata* (A). Distribuição de espécies do gênero *Vigna* em 10 regiões (B). Número superior igual ao total de espécies de cada região e entre parênteses igual ao total de espécies endêmicas (FREIRE FILHO, 1988). (A) Retirado de: <http://www.reciclabag.com.br/site/noticia/44/seminario-sobre-feijao-caupi-em-mt-esta-com-inscricoes-abertas>, em 30.07.2020..... 7
- Figura 2 . Impacto negativo da infestação de *C. maculatus* em feijão caupi: perfurações nos grãos, contaminação com fungos oportunistas, diminuição do valor nutritivo, sanitário e germinativo. Retirado de BECK & BLUMER, 2011. 9
- Figura 3 . Morfologia do caruncho fêmea de *C. maculatus*. Vista dorsal (A) e vista lateral (B). Adaptado de RÊGO et al., 2019.10
- Figura 4. Fases do ciclo reprodutivo de *C. maculatus*. As fêmeas ovipositam sobre a superfície do grão. Em destaque a seta branca indicando o ovo (A). Formação de câmaras no grão indicam o desenvolvimento do inseto no interior do grão (B e C). Detalhe de pupa em estágio avançado (C). Diferentes estágios pupais (D). Formação da janela para saída do inseto adulto e detalhe da cavidade no grão após emergência do novo adulto (E). Fêmea de *C. maculatus* (visão ventral e dorsal) (F). Fêmea e macho de *C. maculatus*, dando início a uma nova geração (visão ventral). Acervo pessoal.10
- Figura 5. Fotografia do aparelho reprodutor da fêmea de *C. maculatus*. ROV= ovário direito; LOV= ovário esquerdo; OVA= ovariolo; SPE= espermateca; COV= oviduto; GO= gonoforo. Retirado de: (MOHAMED et al., 2015).11
- Figura 6. Síntese de trealose a partir de glicose no corpo gorduroso, a partir da indução do hormônio adipocínico (AKH) e mobilização do monossacarídeo gerado pela sua hidrólise nos ovários. TPS (trealose 6-fosfatase); TPP (trealose-6-P-sintetase); Treh (trealose hidrolase). Modificado de: MATSUDA et al., 2015 e ARRESE & SOULAGES, 2010.....14
- Figura 7. Síntese de glutamato e abastecimento de intermediários do Ciclo de Krebs (CK) em células musculares de insetos. ProDH, prolina desidrogenase; AAT, alanina aminotransferase; ME, enzima málica. Modificado de: (TEULIER et al., 2016a).14
- Figura 8. Mobilização de prolina do corpo gorduroso para o músculo de voo em insetos. CK, Ciclo de Krebs. Modificado de: (MORAES et al., 2012).15
- Figura 9. 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. 2001.16
- Figura 10. Diferentes formas de transformação dos agrotóxicos no ambiente. Retirado de Steffen et al., 2011. ...20
- Figura 11. Estrutura da fosfina (PH₃).21
- Figura 12. Esquema expondo a integração de diferentes táticas de controle de pragas utilizada no MIP. Modificado de: (PARRA, 2014).23
- Figura 13. Alguns compostos voláteis de plantas aromáticas. α -pineno (1), β -pineno (2), δ -3-careno (3), ρ -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 -transbergamotol (22), β -sinensal (23), eugenol (24) e metil eugenol (25).....28
- Figura 14. Biossíntese de OE no citoplasma e plastídeo da célula vegetal. Compostos precursores derivados do metabolismo de açúcares. PEP: fosfoenolpiruvato; D-ETP: D-eritrose-4- fosfato; IPP: isopentenil-difosfato; GPP: geranyl-difosfato; FPP: farnesil difosfato; MEP: metileritritol; DMAPP: dimetialil difosfato. Modificado de PAVELA & BENELLI, 2016 ; ÁVALOS & PÉREZ, 2009; CAVALCANTI et al., 2015. Created with BioRender.com29
- Figura 15. A biossíntese de metabólitos especiais do metabolismo secundário das plantas e suas funções: de defesa contra raios UV, patógenos e herbivoria; de interação: com organismos benéficos ou simbiotes; de reprodução: atração de polinizadores e dispersores de sementes; de nutrição: captação de nutrientes para reservas.29

Figura 16. Células parênquimais de <i>C. citratus</i> . As manchas vermelhas representam o acúmulo de citral (geranial e neral), monoterpenos. Microscopia eletrônica de fluorescência. Retirado de: LEWINSOHN, 1998.	30
Figura 17. Planta de capim-limão, em destaque folhas e talos.	32
Figura 18. Cromatograma dos compostos voláteis de <i>C. citratus</i> (neral e geranial), que formam o citral (composto majoritário), obtidos por CG-EM. Adaptado de: ALVES et al., 2019.	33
Figura 19. Esquema de análise global de metabólitos. 1. Coleta e preparo da amostra, 2. Análise instrumental, 3. Processamento de dados e identificação de metabólitos, 4. Análise estatística, 5. Interpretação biológica. Modificado de: CANUTO et al., 2018. Criado no BioRender.com.	36
Figura 20. Esquema representativo da preparação das amostras antes da injeção no CG-EM. 1. Amostra, 2. Extração de metabólitos, 3. Partição seguido de exclusão da fração polar, 4. Derivatização, 5. Análise por CG-EM. Criado com BioRender.com.	37
Figura 21. Esquema das reações de derivatização de uma amostra biológica. Esquema das reações de derivatização de uma amostra biológica. Modificado de: KANANI et al., 2008.	37
Figura 22. A expressão de um gene ocorre através da síntese de proteínas, englobando os processos de transcrição (síntese do RNA) no núcleo da célula e a tradução (síntese de proteínas) nos ribossomos no citoplasma. A perpetuação do material genético (DNA e RNA) ocorre através da replicação no núcleo celular. Criado com BioRender.com.	38
Figura 23. Diagrama esquemático da PCR com as três etapas de cada ciclo contém três etapas desnaturação, anelamento e extensão. Modificado de: SANTOS et al., 2004 e https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction	41
Figura 24. Extração do óleo essencial de <i>C. citratus</i> por hidrodestilação. Arquivo pessoal.	45
Figura 25. Tubos com sementes de caupi e aplicação do óleo essencial e do composto citral por fumigação em papel de filtro. Acervo pessoal.	46
Figura 26. Aparelho evaporador rotativo Arquivo pessoal.	47
Figura 27. Sementes revestidas com OE de capim-limão X <i>C. maculatus</i> . Emergência de Adultos. Acervo pessoal.	49
Figura 28. Elaboração de ensaios de avaliação do potencial fungicida do óleo essencial de <i>C. citratus</i> sobre fungos fitopatogênicos. Preparação de meio de cultura + OE (método de diluição); inserção de fragmento de fungo em meio de cultura; compilação de dados de inibição de crescimento micelial.	50
Figura 29. Teste de germinação, sementes peletizadas com OE de capim-limão nas concentrações de 0,1; 0,01; 0,001%, substrato areia. Acervo pessoal.	51
Figura 30. Delineamento qualitativo de exposição de leveduras ao óleo essencial de <i>C. citratus</i> em meio de cultura BDA. Linhas horizontais A à H (concentração de óleo essencial/ meio BDA), linhas verticais 1 à 11: tempo de exposição e controles (CM = apenas meio de cultura BDA; CC= células+ meio de cultura BDA).	52
Figura 31. Análise subtrativa das concentrações dos metabólitos (controle – tratamento) encontrados no extrato bruto de fêmeas de <i>C. maculatus</i> submetidos ou não ao tratamento com óleo essencial de capim-limão. Os dados foram submetidos a análise de variância (two-way ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Sidak (5%). ****, ***, ** e * significativo com valores de $p < 0,0001$; $< 0,001$; $< 0,01$ e $< 0,05$, respectivamente.	65
Figura 32. Análise subtrativa das concentrações das principais classes de substâncias (controle – tratamento) encontrados no extrato bruto de fêmeas de <i>C. maculatus</i> submetidos ou não ao tratamento com óleo essencial de capim-limão. Os dados foram submetidos a análise de variância (two-way ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Sidak (5%). ****, ***, ** e * significativo com valores de $p < 0,0001$; $< 0,001$; $< 0,01$ e $< 0,05$, respectivamente.	66
Figura 33. Níveis de expressão relativa (Cp) dos genes glicogênio fosforilase, hexoquinase, lactato desidrogenase e malato desidrogenase de fêmeas copuladas de <i>C. maculatus</i> , expostas ao OE de capim-limão. Os níveis de expressão foram normalizados com o gene de referência 18S. As diferenças estatísticas foram determinadas através de One-way ANOVA ($P > 0.0001$). Em asterisco, amostras significativamente diferentes ($P > 0.05$).	67

- Figura 34. Valores percentuais de mortalidade, oviposição e emergência de novos adultos de *C. maculatus* expostos as sementes de feijão caupi (variedade guariba), previamente tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de capim-limão (0,1, 0,001 e 0,0001%) e armazenadas durante 7, 30, 90 e 180 dias, calculados e corrigidos com base nos valores absolutos dos respectivos controles. As barras representam o desvio padrão.....68
- Figura 35. Quantificação dos isômeros neral e geranial (citral) presentes na superfície das sementes após lavagem com diclorometano. Sementes feijão caupi revestidas com diferentes soluções contendo óleo essencial de capim-limão (0,1; 0,01; 0,001%) e armazenadas por 30, 90 e 180 dias.69
- Figura 36. Efeito do OE de capim-limão sobre o crescimento dos fungos *Aspergillus spp.* (A), *Fusarium spp.* (B), *Colletotrichum spp.* (C) e *Penicillium spp.*(D). Análise estatística elaborada no programa Graph Pad Prism, Anova One-Way, Tukey multiplas comparações, $\alpha= 0,05$; (A), (B) (C), (D) $p<0,0001$,70
- Figura 37. Germinação de sementes de feijão caupi, variedade guariba submetidas ao óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) diluídas nos solventes orgânicos diclorometano (a), álcool 95% (b) e álcool de cereais (c). Anova One-Way, Tukey multiplas comparações, $\alpha= 0,05$; (a) $p=0,041$; (b) $p= 0,6588$; (c) $p=0,9647$,71
- Figura 38. Delineamento qualitativo de exposição de leveduras ao óleo essencial de *C. citratus* em meio de cultura BDA. Linhas horizontais A à H (concentração de óleo essencial/ meio BDA), linhas verticais 1à 11: tempo de exposição e controles (CC = apenas meio de cultura BDA; CM= células+ meio de cultura BDA). A resazurina é um indicador de metabolismo (rosa= presença de metabolismo; roxo= ausência de metabolismo).72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Biopesticidas para comercialização atualmente no mercado agroindustrial.....	25
Tabela 2. Substâncias derivadas de plantas para o controle de pragas	25
Tabela 3. Efeito fumigante de óleos essenciais sobre espécies do gênero <i>Calosobruchus</i>	31
Tabela 4. Dados da literatura mostrando o efeito de óleo essencial extraído de folhas de <i>C. citratus</i> sobre <i>C. maculatus</i>	34
Tabela 5. Estudos com abordagem metabolômica para o estudo de insetos-pragas de interesse agrícola	35
Tabela 6. Registro de patentes relacionados com óleos essenciais e substâncias voláteis.	42
Tabela 7. Sequência e eficiência (%) de primers amplificados dos genes de interesse de <i>C. maculatus</i>	57
Tabela 8. Análise química do OE de capim-limão por CG-EM.....	59
Tabela 9. Efeito do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf e citral sobre o ciclo reprodutivo de <i>Callosobruchus maculatus</i>	60
Tabela 10. Concentrações médias dos metabólitos presentes no extrato bruto de fêmeas de <i>C. maculatus</i> , submetidos ou não ao tratamento com óleo essencial de capim-limão. ...	62
Tabela 11. Teste qualitativo de exposição de leveduras ao OE de capim-limão em meio de cultura BDA.	71

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Produção de Grãos no Brasil e no Mundo	4
3.2. Impacto econômico das pragas de grãos no Brasil e no Mundo	5
3.3. Feijão-caupi	6
3.4. Caruncho do feijão-caupi	8
3.4.1. Biologia do inseto	8
3.4.2. Aspectos bioquímicos e fisiológicos	12
3.5. Desafios para o Controle de Pragas de Grãos Armazenados	18
3.5.1. Controle químico com agrotóxicos orgânicos e inorgânicos sintéticos.....	18
3.5.2. Manejo Integrado de Pragas-MIP	22
3.5.3. Controle alternativo com biopesticidas botânicos.....	24
3.6. Óleos Essenciais (OE).....	26
3.6.1. Atividade biológica de OE vs. <i>Callosobruchus maculatus</i> Fab. (Coleoptera Chrysomelidae)	30
3.7. Análise do perfil metabólico.....	34
3.7.1. Análise do perfil metabólico por CG-EM	36
3.7.2. Análise da expressão gênica	38
3.8. Patentes com Biopesticidas para o Controle de Pragas	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Local do estudo	44
4.2 Material.....	44
4.3 Extração e caracterização química do óleo essencial de capim-limão	45
4.4 Avaliação do efeito fumigante do óleo essencial de capim-limão e citral contra o caruncho.....	46
4.5 Revestimento das sementes de feijão-caupi com óleo essencial de capim-limão	47
4.6 Lavagem e caracterização química dos resíduos presentes na superfície das sementes de feijão-caupi.....	48
4.7 Avaliação da proteção conferida às sementes revestidas com óleo essencial de capim- limão contra o caruncho	48
4.8 Avaliação da toxicidade do óleo essencial de capim-limão contra fungos	49
4.9 Avaliação do efeito alelopático toxicidade do óleo essencial de capim-limão na germinação de sementes de feijão-caupi	50

4.10	Avaliação da toxicidade do óleo essencial de capim-limão sobre leveduras	51
4.11	Perfil metabólico de fêmeas do caruncho sob efeito fumigante do óleo essencial de capim-limão	52
4.12	Análise da Expressão gênica por qPCR em tempo real	53
5	RESULTADOS.....	59
7	BIBLIOGRAFIA	82

1 INTRODUÇÃO

Mundialmente há perdas de 20% de grãos armazenados por ano, o equivalente a 420 mil toneladas (MESTERHÁZY et al., 2020). Além das perdas da produção em larga escala, o manejo inadequado nas condições de armazenamento são maléficas para o pequeno produtor, prejudicando a economia local e a qualidade do alimento de populações menos favorecidas (STATHERS *et al.*, 2020).

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp., Fabaceae) é um alimento básico de grande importância para muitos brasileiros, principalmente das regiões Norte e Nordeste, sendo uma cultura típica da agricultura familiar. Contudo, parte das perdas econômicas no período de armazenamento do feijão-caupi são ocasionadas pela infestação de insetos-pragas, principalmente pelo caruncho do feijão-caupi, *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae) (GALLO et al., 2002; BRITO & BORTOLI, 2006; SILVA, 2007; MELO et al., 2010). No Brasil, o impacto da infestação do caruncho do feijão-caupi é devastador, podendo provocar perda de até 50% da produção do feijão-caupi por ano (MARANGONI, 2002). Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), as perdas mundiais provocadas por esse caruncho podem chegar até 90% em outros países (TARUVINGA et al., 2014).

A principal forma de controle dos insetos-pragas, entre eles os carunchos, é a utilização de agrotóxicos sintéticos. Em 2008, o Brasil se tornou o maior consumidor de agrotóxicos no mundo, atingindo a marca de mais de 700 mil toneladas de produtos consumidos, ocupando atualmente a quarta posição (PEDLOWSKI et al., 2012; PAUMGARTTEN, 2020) e cerca de 80% dos pequenos produtores brasileiros fazem uso desses tipos de agrotóxicos em suas lavouras (IBGE, 2009). Ademais, os agrotóxicos orgânicos sintéticos (e.g., organofosforados, carbamatos e piretróides) e alguns da classe dos inorgânicos (e.g., fosfina e seus precursores) não são permitidos em sistemas agroecológicos e orgânicos de produção vegetal no Brasil, incluindo no tratamento pós-colheita dos produtos vegetais, como no armazenamento de sementes e grãos (BRASIL, 2021).

Por outro lado, as restrições à utilização dos agrotóxicos sintéticos, as despesas para sua aquisição e os problemas de toxicidade decorrentes da utilização dos mesmos vêm estimulando a utilização de produtos fitossanitários de origens naturais, cujos impactos negativos de natureza ambiental e para a saúde humana são menores ou inexistentes e os custos para obtenção deles são menores (BARBOSA et al., 2002; DAMALAS & KOUTROUBAS, 2020).

Nesse cenário, os óleos essenciais, que são substâncias voláteis produzidas pelo metabolismo secundário das plantas, (ISO, 2013) vêm surgindo como uma alternativa promissora no controle de pragas de importância agrícola, sejam insetos, ácaros, fungos ou ervas-daninhas (FIERASCU et al., 2020) e em diversas formas de aplicação seja por fumigação, ação tópica ou no revestimento de sementes para proteção contra insetos, fungos, patógenos que inviabilizam os grãos. Além disso, os óleos essenciais constam na lista de substâncias e práticas para o uso nos sistemas orgânicos de produção no Brasil, particularmente no controle de insetos-pragas, fungos e doenças durante a produção, o beneficiamento e o armazenamento de produtos vegetais (MAPA, 2021). Alguns trabalhos vêm mostrando o efeito tóxico dos óleos essenciais sobre a biologia, aspectos bioquímicos de insetos- pragas (ABDEL-HAKIM et al., 2021) e contra fungos de produtos vegetais armazenados, tais como grãos e sementes (LEITE et al., 2018).

O óleo essencial de capim-limão, *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (Poaceae), possui propriedades medicinais (VIKTOROVÁ et al., 2020), na conservação de alimentos (MURMU & MISHRA, 2018), como antimicrobiano (DANGKULWANICH & CHARASLERTRANGSI, 2020), fungicida (SAHAL et al., 2020) e inseticida (PLATA-RUEDA et al., 2020). Deste modo, a substituição de agrotóxicos por produtos de origem natural, como o óleo essencial de capim-limão, constituído por substâncias naturais produzidas pelo metabolismo secundário das plantas, pode ser uma solução de menor impacto econômico, ambiental e para a saúde humana, principalmente dos agricultores. Soma-se a isso, o aumento da demanda de produtos fitossanitários de uso autorizado na agricultura orgânica brasileira, entre eles os óleos essenciais (MAPA, 2021). Neste contexto, fica evidente a possibilidade para o desenvolvimento de inovações tecnológicas aplicados à agricultura, baseados em formulações contendo princípios ativos naturais com propriedades inseticidas e fungicidas.

Mesmo que os princípios agroecológicos não se alinhem com patentes, pois deixam os pequenos produtores dependentes de grandes empresas, é importante que a produção agroecológica em larga escala tenha acesso à produtos que diminuem os impactos ocasionados

com o controle tradicional de pragas agrícolas. E de acordo com consulta realizada em 2021 no banco de dados públicos do INPI (Instituto Nacional de Propriedade Intelectual) não existem patentes registradas para formulações com o óleo essencial de capim-limão para a proteção de sementes e grãos de feijão-caupi contra *Callosobruchus maculatus* e fungos da condição de armazenamento de grãos como as espécies *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Colletrochium* sp. e *Fusarium* sp, que diminuem a densidade do grão, diminuem o seu potencial germinativo inviabilizando-as para consumo. São encontrados registros de associação de moléculas com o óleo essencial de capim-limão para efeito bactericida ou fungicida, como no invento BR 102017018474-9 em que o óleo essencial de capim-limão associado a quitosana, é utilizado para a proteção de frutos pós-colheita (INPI, 2021). Além disso, durante o desenvolvimento deste trabalho, não foi encontrado no WIPO (Sistema Internacional de Patentes), nenhum registro de patente para proteção de sementes de feijão caupi com o óleo essencial de capim-limão contra o caruncho do feijão-caupi. No entanto, óleos essenciais extraídos de outras plantas foram registrados com a finalidade de melhorar as condições de armazenamento de grãos. Como o óleo essencial de *Lippia sidoides* e timol BR 102017004264-2, para proteção de grãos e de *Ocimum basilicum* BR 102014024632-0 para controle de insetos pragas de grãos armazenados (INPI, 2021).

Portanto, este estudo explora o potencial biotecnológico do óleo essencial de capim-limão para a proteção de sementes e grãos armazenados contra a infestação do inseto praga do feijão-caupi e fungos da condição de armazenamento de modo a atender a demanda por tecnológicas agroecológicas, mas também possibilita sua inserção no mercado de novos bioinseticidas patenteáveis e como modelos para síntese de novos princípios ativos de inseticidas visando o controle de insetos-praga.

2 OBJETIVO

Neste contexto, o presente estudo teve o seguinte objetivo: estudar os efeitos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) sobre as etapas do ciclo de desenvolvimento e o metabolismo do *Callosobruchus maculatus* (caruncho do feijão-caupi) e, também, propor a elaboração de uma aplicação biotecnológica voltado à agricultura orgânica.

Nos quais foram os objetivos específicos:

- (i) Investigar os efeitos do óleo essencial de *C. citratus* sobre o metabolismo do *C maculatus* através do estudo do perfil metabólico e da expressão gênica;
- (ii) Avaliar o efeito residual do óleo essencial de *C. citratus* na proteção das sementes em função do tempo;
- (iii) Avaliar o efeito do óleo essencial sobre a germinação de sementes de feijão (*Vigna unguiculata*), desenvolvimento de fungos da condição de armazenamento e sobre viabilidade celular/ toxicidade na levedura (*Saccharomyces cerevisiae*).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Produção de Grãos no Brasil e no Mundo

Em 2018, a produção de grãos no Brasil foi de 226,5 milhões de toneladas de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019) e segundo a Companhia Nacional de Abastecimento para 2018/2019 a produção foi de 7,7 milhões de toneladas em relação à safra de 2016/2017 (CONAB, 2019). No país, os grãos de maior cultivo comercial são o milho, soja, feijão, arroz e trigo, sendo que 70% de toda a produção agrícola é destinada ao abastecimento do mercado interno (CONAB, 2019; USDA, 2019; FAO, 2020).

Segundo dados da literatura (SANTANA & CONTINI, 2011) o cenário de aumento da produtividade é devido ao aumento da população mundial. Na economia brasileira o agronegócio representa 20% do Produto Interno Bruto (PIB) (MAPA, 2018), com projeção de produção de 300,1 milhões de toneladas e exportação de 138 milhões de grãos para 2028/2029 (MAPA, 2019). Os índices positivos na produção de grãos, refletem nas relações internacionais no agronegócio que apresentou saldo positivo de US\$ 96 bilhões (USDA, 2020), e de acordo com o Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA) da USP, esse cenário permitiu ao Brasil alcançar patamares recordes, no qual a exportação de grãos apresentou aumento de 4,7% em 2018 (CEPEA, 2018).

Esse desempenho fez com que o Brasil assumisse, função geopolítica semelhante ao petróleo e ao dólar (OLIVEIRA, 2016; EMBRAPA, 2018) possibilitando estreitar fortes relações comerciais com outros países, como por exemplo a China (CONAB, 2019). E um dos fatores que beneficiam o Brasil nessas relações comerciais é a falta de recursos naturais para o desenvolvimento e cultivo de grãos nos outros países (WILKINSON et al., 2016), e a produção de biocombustível (CREMONEZ et al., 2015).

Contudo, com o aumento da produção agrícola, surgiram inúmeros problemas, entre eles, a infestação dos grãos armazenados por insetos-pragas, o tempo de prateleira do produto para o consumidor, entre outros. Devido aos novos desafios na produção, foi necessário utilizar a tecnologia para otimizar os processos de produção, com a utilização de drones, fertilizantes, automação na colheita (RESENDE et al. 2014), sementes transgênicas e a utilização de inseticidas (EDGERTON, 2009; ZUNJARE et al., 2015).

Além disso, a produção de grãos e a expansão das lavouras no Brasil ultrapassa a capacidade de armazenagem, impactando no tempo, nas condições de armazenamento, conseqüentemente, na qualidade do produto (BARONI et. al., 2017). Portanto, é necessário o investimento em tecnologias que assegurem qualidade e viabilidade durante o armazenamento de grãos.

3.2. Impacto econômico das pragas de grãos no Brasil e no Mundo

A viabilidade dos grãos armazenados pode estar em risco devido ao ataque de insetos-pragas, que provocam perdas e prejuízos da ordem de 25 milhões de toneladas de alimentos e biocombustíveis, que representa para o Brasil 7,7% da produção e 17,7 bilhões de dólares anuais (OLIVEIRA, C. M. et al., 2014). Garantir a viabilidade dos grãos na pós-colheita e armazenagem é estratégico, uma vez que o agronegócio é um setor de grande importância econômica para o Brasil e o mundo (FARONI & SILVA, 2008). Estima-se que mundialmente as perdas variam de um terço a um quarto de toda a produção de grãos devido ao ataque de insetos durante o armazenamento (SARWAR, 2015) e alguns autores afirmam que esse cenário pode ser agravado pelos efeitos climáticos, como o aumento da temperatura global (DEUTSCH et al., 2018).

Aproximadamente 1.025 espécies de insetos-pragas causam algum dano as culturas (SALLAM, 2013), e muitas das perdas econômicas na produção de grãos no Brasil é devido a espécies exóticas de insetos-pragas introduzidas desde o século XIX que se adaptaram as condições ambientais (OLIVEIRA, C. M. et al., 2013). Com a globalização das relações comerciais envolvendo commodities agrícolas, tem sido comum a migração de insetos pragas entre países, por exemplo, a África que sofreu inúmeras perdas de produção de milho e soja devido a introdução de *Chilo partellus*, uma mariposa proveniente da Ásia (SALLAM, 2013).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) as pragas agrícolas consideradas mais importantes no Brasil pertencem às ordens: Coleoptera,

Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera e Thysanoptera dentre elas são encontradas 24 espécies de insetos introduzidas (MAPA, 2008). De modo geral, os insetos-pragas perfuram os grãos, se alimentam dos cotilédones diminuindo a viabilidade, peso, valor nutricional e possibilitam a proliferação de fungos oportunistas, reduzindo a qualidade sanitária e valor do produto a ser comercializado, além disso, promovem danos econômicos indiretos devido a aplicação de agrotóxicos, prejudicando a saúde dos aplicadores e ocasionando danos ambientais (LORINI *et al.*, 2015).

Existem inúmeros relatos na literatura sobre os danos causados por insetos-pragas de culturas como milho (ZUNJARE *et al.*, 2015), feijão (BRITO, Sara Samanta Silva *et al.*, 2015), soja (SARWAR, 2015), arroz (BIANCOLILLO *et al.*, 2019) e trigo (KUMAR, Ritesh *et al.*, 2017). Por isso, a redução do dano econômico na produção de grãos, principalmente nos países em desenvolvimento, se faz necessário não apenas para conter prejuízos na economia, nas exportações, assim como, para melhorar a disponibilidade e o acesso aos alimentos nesses países (KUMAR & KALITA, 2017).

3.3. Feijão-caupi

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil reconhece apenas duas espécies de feijão: *Phaseolus vulgaris* L. (feijão comum) e *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (feijão-caupi ou feijão fradinho) (ambas Fabaceae) e aponta que o consumo deles no Brasil é de 19 kg/pessoa/ano (MAPA, 2008b; MAPA, 2018). O feijão é uma leguminosa cultivada em todas as regiões quentes do globo (Menezes Júnior, 1960) e possui resistência a acidez do solo, seca, altas temperaturas e, por isso, pode ser cultivado durante todo o ano no Brasil (IQBAL *et al.*, 2006).

O feijão é um alimento de grande importância no Brasil por ser a base da dieta dos brasileiros, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, sendo rico em aminoácidos essenciais como lisina e arginina (IQBAL *et al.*, 2006; IBGE, 2009). Devido alto potencial nutritivo dos feijões, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) elegeu em 2016 o ano das leguminosas com o intuito de erradicar a fome (FAO, 2016).

De acordo com SMARTT, 1985, o gênero *Vigna* inclui duas espécies africanas e duas asiáticas, entretanto alguns autores consideram todo o gênero *Vigna*, inclusive *V. unguiculata*, de origem africana (FREIRE FILHO, 1988) (Figura 1). A produção de feijão-caupi está associado a África, Ásia, Sul da Itália Sudeste e Sudoeste da América do Norte e na América

do Sul (EHLERS & HALL, 1997). Muitos autores acreditam que a chegada do feijão-caupi no Brasil foi a partir da África através do tráfico de escravos no século XVI/XVII e da Europa com os colonizadores (FREIRE FILHO, 1988; PASQUET, 1999).

A



B

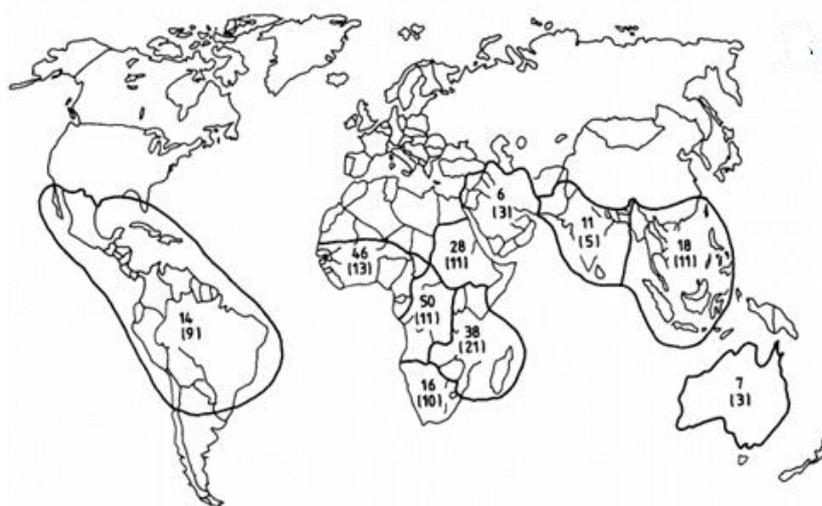


Figura 1. Feijão-fradinho, *Vigna unguiculata* (A). Distribuição de espécies do gênero *Vigna* em 10 regiões (B). Número superior igual ao total de espécies de cada região e entre parênteses igual ao total de espécies endêmicas (FREIRE FILHO, 1988). (A) Retirado de: <http://www.reciclabag.com.br/site/noticia/44/seminario-sobre-feijao-caupi-em-mt-esta-com-inscricoes-abertas>, em 30.07.2020.

Perdas pós-colheita podem ocorrer devido a variações climáticas, condições de armazenamento e infestação de insetos-pragas (Oliveira et al., 2014b) e o feijão-caupi possui inúmeras pragas como a mosca-branca (*Bemisia tabaci*), a cigarrinha (*Empoasca sp.*), ácaros (*Tetranychus spp.*), pulgões (*Aphis craccivora*) e besouros (*Callosobruchus maculatus*) que causam baixa qualidade do grão ou perda total de produção (OYEWALE & BAMAIYI, 2013).

Os insetos-pragas possuem enzimas específicas para digerir os constituintes dos grãos no geral, estabelecendo especificidades a determinadas espécies (DE SÁ et al., 2014b). Também, existem relatos na literatura indicando que a infestação do feijão-caupi pelo caruncho diminui o potencial germinativo, o vigor das sementes e o crescimento das plântulas, prejudicando a comercialização (CRUZ, L. P. et al., 2016), tornando relevante o desenvolvimento de tecnologias no processo de armazenamento, a fim de diminuir as perdas.

3.4. Caruncho do feijão-caupi

3.4.1. Biologia do inseto

O principal inseto praga que infesta o grão de feijão-caupi durante o armazenamento é o caruncho do feijão-caupi *Callosobruchus maculatus* Fab. (Coleoptera Chrysomelidae), também popularmente conhecido como gorgulho-do-feijão-de-corda, apesar de sua infestação poder ocorrer no campo (FREIRE FILHO, R. F., 2011). Os principais danos ocorrem no armazenamento, podendo levar a 90% de perdas do produto (ONYIDO et al., 2011). A infestação do feijão-caupi pelo caruncho ao longo do tempo proporciona a desvalorização do grão e redução do peso de 60 a 70% (GALLO et al., 2002, SCHOONHOVEN & CARDONA, 1980; TANZUBIL 1991; SILVA & XAVIER-FILHO 1991), provocado pela postura de ovos, disseminação de fungos e perda de massa, devido o desenvolvimento dos estágios larvais no interior do grão (OLUWAFEMI, 2012) (Figura 2).

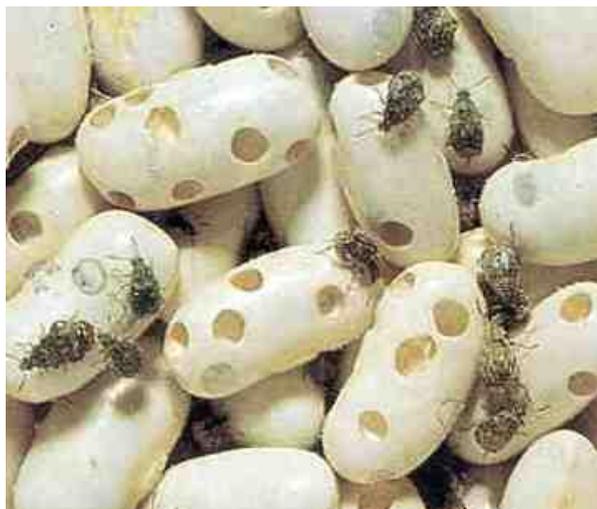
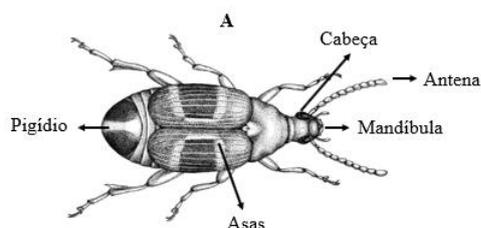


Figura 2 . Impacto negativo da infestação de *Callosobruchus maculatus* em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*): perfurações nos grãos, contaminação com fungos oportunistas, diminuição do valor nutritivo, sanitário e germinativo. Retirado de BECK & BLUMER (2011).

O caruncho *C. maculatus* apresenta dimorfismo sexual, sendo a fêmea maior que o macho, possui coloração escura com abdômen, tórax e cabeça pretos (Figura 3) (GALLO et al., 2002). E o adulto pode voar de acordo com as condições ambientais. No campo o adulto voa e é menos fértil em relação ao adulto da condição de armazenamento (menos ativo). Esse dimorfismo sazonal possibilita aumento de sua capacidade de infestação (KEDIA *et al.*, 2015). As fêmeas ovipositam de 80 a 90 ovos sobre o tegumento do grão e após aproximadamente em 6 dias, as larvas penetram nos grãos, alimentando-se do mesmo e formando câmaras. Depois de 25 a 30 dias, o inseto adulto emerge do grão, dando continuidade ao ciclo (CREDLAND, Peter F., 1987). Os adultos medem cerca de 3 mm, são totalmente maduros no período de 24-36 horas e após a emergência, não se alimentam, portanto, não requerem água nem alimento, e o período da fase adulta é curto, de 10 a 14 dias, durante o qual os adultos se acasalam e as fêmeas ovipositam (BECK & BLUMER, 2011).



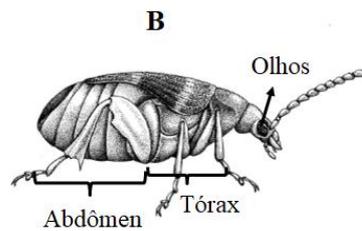


Figura 3 . Morfologia do caruncho fêmea de *Callosobruchus maculatus*. Vista dorsal (A) e vista lateral (B) (Desenho: Amy Springer. Adaptado de RÊGO et al., 2019).

As larvas são brancas e possuem mandíbulas capazes de romper os grãos; as pupas são esbranquiçadas (figura 4) medindo entre 2,5 e 3,5mm; as fêmeas expelem um líquido claro e pegajoso para efetuar a postura, sendo o ovo colocado nesse meio, que endurece rapidamente; os ovos são arredondados, medindo de 0,46 a 0,60 mm de comprimento, de 0,44 a 0,50 mm de largura e os férteis são brancos (devido a presença da larva) enquanto os inférteis mais claros (GALLO et al., 2002; DE SÁ et al., 2014). Além disso, a fêmea escolhe o local para ovipositar no grão para diminuir a competição entre larvas, a fim de garantir o desenvolvimento da prole (MESSINA & KARREN, 2003).

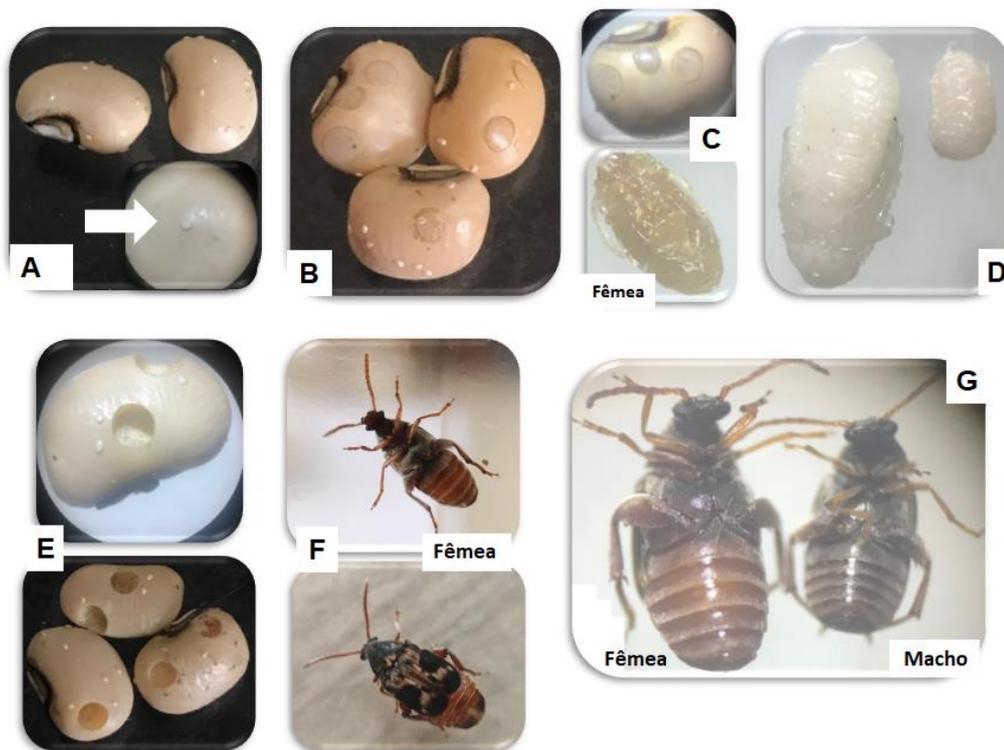


Figura 4. Fases do ciclo de vida de *Callosobruchus maculatus*. As fêmeas ovipositam sobre a superfície do grão. Em destaque a seta branca indicando o ovo (A). Formação de câmaras no grão indicam o desenvolvimento no interior do grão (B – grão com larvas e C - pupa). Detalhe

de pupa em estágio avançado (C). Pupa (à esquerda) e larva (à direita) (D). Formação da janela para saída do inseto adulto e detalhe da cavidade no grão após emergência do novo adulto (E). Fêmea de *C. maculatus* (visão ventral e dorsal) (F). Fêmea e macho de *C. maculatus* (visão ventral). (Fonte: Acervo pessoal).

As fêmeas armazenam os espermatozoides em um compartimento chamado espermateca (Figura 5) que se comunicam com dois ovários, constituídos por ovaríolos onde são formados os oócitos (MOHAMED, M. I. *et al.*, 2015). O espermatozoides do macho transfere nutrientes para a fêmea, aumentando a sua longevidade (FOX, C. W., 1993). Condições ambientais podem alterar a fisiologia, fertilidade e desenvolvimento de *C. maculatus* (Sgrò *et al.*, 2016; García-roa *et al.*, 2020) e de outras espécies do gênero *Callosobruchus* (APPLEBY & CREDLAND, 2007; OMAR & MAHMOUD, 2020).

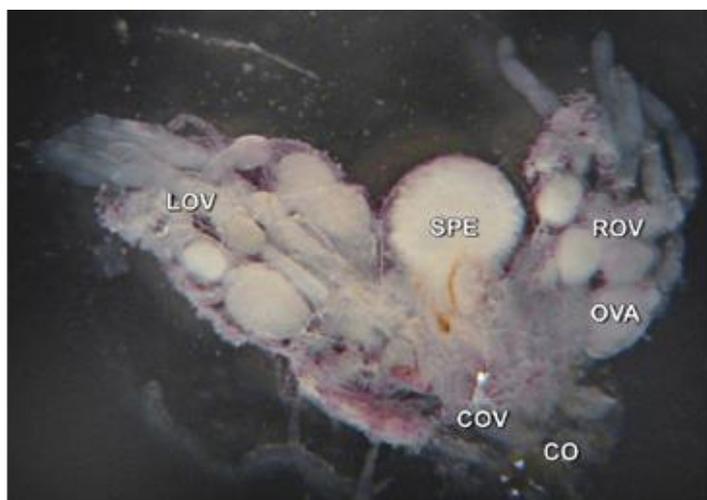


Figura 5. Fotografia do aparelho reprodutor da fêmea de *Callosobruchus maculatus*. ROV= ovário direito; LOV= ovário esquerdo; OVA= ovaríolo; SPE= espermateca; COV= oviduto; GO= gonóforo. Retirado de: (MOHAMED *et al.*, 2015).

As fêmeas na condição de armazenamento não voam, porém no campo a fêmea pode voar e suportar temperaturas mais baixas. Fêmeas que voam possuem maior longevidade e ovipositam maior número de ovos em relação as que não voam (UTIDA, 1972; MASON & MCDONOUGH, 2011). Baixa temperatura e alta umidade nas sementes também alteram a proporção de adultos que voam e não voam (OUEDRAOGO *et al.*, 1991).

Durante a fase larval o dimorfismo sexual sofre variações por fatores abióticos. Em temperaturas mais elevadas, a proporção de machos é menor em relação a fêmeas adultas (STILLWELL & FOX, 2007; OKPEZE, 2018). Quanto a fertilidade, a exposição excessiva a

radiação UV pode impedir o desenvolvimento de estruturas reprodutoras em fêmeas (Mohamed et al., 2015) e em temperaturas mais baixas a fertilidade dos machos é menor (MARTINOSSI-ALLIBERT et al., 2017 ; VASUDEVA et al., 2018). O caruncho do feijão-caupi possui capacidade de adaptação a diversas condições ambientais (CREDLAND, 1987; HALLSSON & BJÖRKLUND, 2012), que garante o surgimento de novas gerações e a continuidade do seu ciclo reprodutivo (DEVI & DEVI, 2014b).

3.4.2. Aspectos bioquímicos e fisiológicos

Os insetos demandam energia para desempenhar suas funções metabólicas e fisiológicas relacionadas ao voo, reprodução, desenvolvimento e interação com o meio. Em insetos holometabólicos, que se alimentam apenas no estágio larval, o tipo de alimentação determina quais substâncias serão demandadas para manter o metabolismo durante a fase adulta, principalmente no processo de reprodução (ARRESE & SOULAGES, 2010).

Os carboidratos, proteínas e lipídios envolvidos em processos de síntese e degradação em diferentes vias metabólicas, desempenham funções fisiológicas nos insetos que demandam poder redutor e energia, sendo que grande parte da energia obtida é proveniente do metabolismo aeróbio (YANG, Yunxia *et al.*, 2014). Os carboidratos são importantes para o desempenho de inúmeras funções bioquímicas e fisiológicas como a metamorfose; constituem o exoesqueleto dos insetos; são precursores de substâncias de reserva como glicogênio e lipídios; e são fonte para geração de energia (SAHAYARAJ, 2014; MATTILA & HIETAKANGAS, 2017).

Insetos fitófagos como o caruncho do feijão-caupi se alimentam dos cotilédones de sementes e não ingerem diretamente glicose. As larvas desses insetos convertem o açúcar trealose (LUNN ET AL., 2014; QUEIROZ & CAZETTA, 2016), e o utilizam para a formação de glicogênio e glicose, e de acordo com a necessidade energética utilizam trealose e glicogênio para a síntese de glicose (TANG, B. *et al.*, 2010).

A trealose é um dissacarídeo de glicose encontrado na hemolinfa dos insetos, sendo fonte de energia para manter o voo e maturação dos oócitos (DOWNER, 1981; SHUKLA ET AL., 2015) e está envolvido em processos de sinalização celular, de proteção de membranas contra estresse oxidativo (ELBEIN et al., 2003) e baixas temperaturas (STEWART & HE, 2019). É necessário o equilíbrio dos níveis de glicose e trealose na hemolinfa dos insetos (TANG et al., 2010), pois concentrações baixas de trealose ocasionam danos no

desenvolvimento corporal, como observado por Matsuda et al.(2015) em larvas de *Drosophila* submetidas a uma dieta pobre em trealose.

A concentração de trealose na hemolinfa é modulada pela atividade dos hormônios juvenil, ecdisona (SHUKLA et al., 2015) e o hormônio adipocinético (AKH) (LU, K. *et al.*, 2019). Sendo altamente consumida durante a fase de pupa, larva e armazenada no período embrionário (MATSUDA et al., 2015b). No entanto, outros fatores como a exposição a inseticidas (TOSI et al., 2017; MATASSINI et al., 2020), antibióticos (TANG et al., 2017) e fatores ambientais como temperaturas baixas, podem modular os níveis de trealose (STEWART& HE, 2019). De acordo com Shukla et al., 2015 a exposição a inseticidas altera a concentração de trealose na hemolinfa de insetos. O mesmo foi observado em outros insetos, em que Zhao et. al., 2011 verificaram que gafanhotos adultos expostos a imidacloprida, triazofos e deltametrina, apresentaram redução de trealose e trealase.

O glicogênio é um polissacarídeo formado por unidades de glicose que se acumula durante o desenvolvimento no corpo gorduroso e músculo dos insetos, e é utilizado como reserva energética importante para a metamorfose e fase reprodutiva. Pela indução do hormônio adipocinético (AKH) ou glucagon, o glicogênio é convertido em trealose e transferido para a hemolinfa (Figura 6) (STEELE, 1982). O estoque de glicogênio é imprescindível para a manutenção dos açúcares trealose e glicose circulantes na hemolinfa (YAMADA et al., 2018; TANG et al., 2018), principalmente em condições de estresse (REN, X. *et al.*, 2015).

Além de combustível energético, a glicose é necessária para a síntese de quitina, carboidrato presente na cutícula dos insetos (MUTHUKRISHNAN et al., 2012; PAN et al., 2019), para a síntese de álcoois importantes para a regulação térmica (LUBAWY et al., 2020) e desenvolvimento dos oócitos (SANTOS et al., 2008; AL BAKI et al., 2019), além de ser o principal açúcar disponível na hemolinfa quando os níveis de trealose declinam (ZHOU, L. *et al.*, 2015). Foram observados que níveis insuficientes de glicose causaram danos na oogênese e embriogênese em *Tribolium castaneum* (FRAGA et al., 2013).

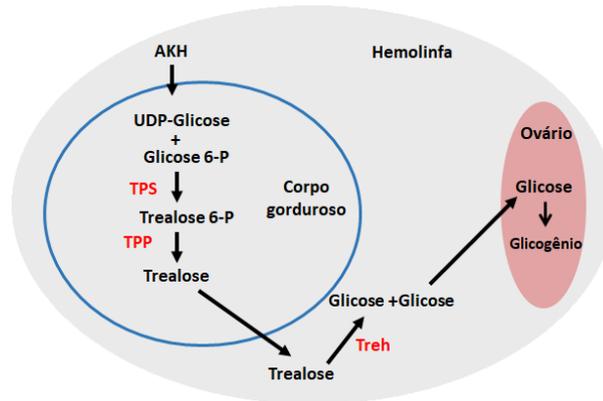


Figura 6. Síntese de trealose a partir de glicose no corpo gorduroso, a partir da indução do hormônio adipocinético (AKH) e mobilização do monossacarídeo gerado pela sua hidrólise nos ovários. TPS (trealose 6-fosfatase); TPP (trealose-6-P-sintetase); Treh (trealose hidrolase). (Modificado de: MATSUDA et al., 2015 e ARRESE & SOULAGES, 2010).

Além de carboidratos, são encontrados na hemolinfa dos insetos aminoácidos, principalmente prolina e glutamato, que são precursores energéticos importantes para o metabolismo aeróbico envolvendo o Ciclo de Krebs (Figura 7) (DOWNER, 1981; GIULIVI et al., 2008; STEC, 2018a).

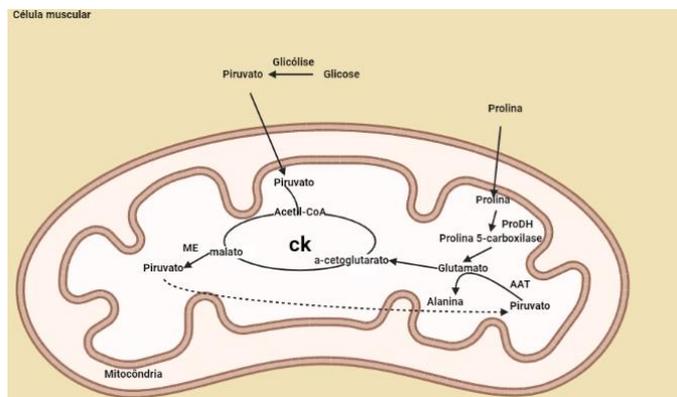


Figura 7. Síntese de glutamato e abastecimento de intermediários do Ciclo de Krebs (CK) em células musculares de insetos. ProDH, prolina desidrogenase; AAT, alanina aminotransferase; ME, enzima málica. Modificado de: TEULIER et al. (2016a).

Nos insetos, a oxidação de prolina está associada principalmente a musculatura do voo (figura 8) e como fonte energética para reprodução e desenvolvimento corpóreo (TEULIER et al., 2016b; PENNINGTON et al., 2003; MARTINS et al., 2018). Durante períodos de baixa demanda energética como a diapausa, os insetos estocam aminoácidos no corpo gorduroso e na hemolinfa (ZHANG et al., 2013). Foram observados aumento nos níveis de prolina na

hemolinfa de pupas de *Helicoverpa armigera* condicionadas ao estado de diapausa e o seu declínio após o período de diapausa (LU et al., 2014).

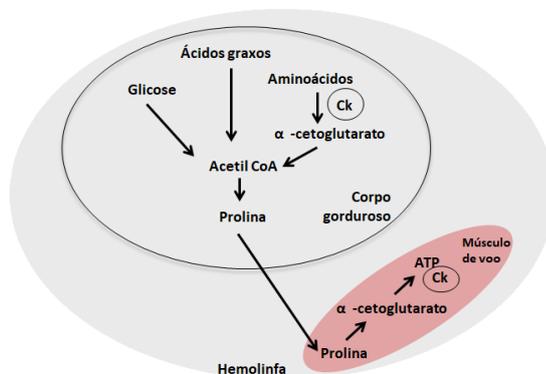


Figura 8. Mobilização de prolina do corpo gorduroso para o músculo de voo em insetos. CK, Ciclo de Krebs. Modificado de: (MORAES et al., 2012).

O acúmulo de prolina na hemolinfa está relacionado à síntese de piruvato e conseqüentemente aos processos de obtenção de energia, sendo recurso para a fase de diapausa e para a fase pós diapausa, de intensa atividade metabólica (XU et al., 2012). Importante para a obtenção de energia, a prolina está relacionada a mecanismos de sobrevivência e reprodução. Na mosca tsé-tsé a redução de prolina na hemolinfa está relacionada a diminuição da taxa de fecundidade (MICHALKOVA et al., 2014). Na mosca *Drosophila immigrans* foi observado que em condições ambientais a alteração dos níveis de prolina é uma alternativa para manter a homeostase e a sobrevivência (TAMANG et al., 2017). O mesmo foi observado em abelhas *Apis mellifera*, submetidas a uma dieta suplementada com prolina, que apresentaram tolerância a baixas temperaturas (MOLLAEI et al., 2013).

Outras condições de estresse como a exposição à inseticidas, alteram os níveis de prolina. Foi observado o aumento da expressão de prolina na praga-do-algodão *Apolygus lucorum* exposto a imidacloprida, beta-cipermetrina e phoxim (An et al., 2020). Além disso, a taxa de prolina mede a resistência à fármacos e a outras substâncias em organismos como o protozoário *Tripanossoma cruzi* (SAYE et al., 2014).

Os lipídios são outra fonte primária para obtenção de energia durante a reprodução, voo, diapausa, período sem alimentação, processo de maturação dos ovos, síntese de feromônios e de lipídios de membrana (MIURA, 2013). Os lipídios de grande importância para o metabolismo energético dos insetos são o triacilglicerol (TAG) (Heier & Kühnlein, 2018) e os seus derivados da degradação, como o diacilglicerol (DAG) e ácidos graxos (AG) (Van der

horst, 2003), assim como, os esteroides provenientes de dieta contendo colesterol e ergosterol, comuns em insetos fitófagos como o caruncho do feijão-caupi (OFFOR, 2011).

Nos insetos, os lipídios são armazenados no corpo gorduroso na forma de triacilglicerol, órgão análogo ao tecido adiposo e fígado em vertebrados (TOPRAK, 2020). O diacilglicerol é o precursor para a síntese de triacilglicerol e é formado a partir do ácido fosfatídico produzido pela via do glicerofosfato, do monoacilglicerol, e pela degradação de fosfolipídios ou desacilação de triglicerídeos catalisada por lipases. Além disso, outro precursor para a lipogênese nos insetos são os carboidratos (INAGAKI & YAMASHITA, 1986; KÜHNLEIN, 2012).

De acordo com a necessidade energética o triacilglicerol será degradado pela indução do hormônio adipocinético e por ação de uma enzima lipase (Athenstaedt & Daum, 2006), ou será sintetizado pela esterificação de glicerol com ácidos graxos livres (VAN DER HORST et al., 1983; HIDALGO & ZAMORA, 2015). O hormônio adipocinético (figura 9) modula as concentrações de AMPc e Ca^{2+} , desencadeando a ativação das lipases e a degradação parcial dos triacilgliceróis em ácidos graxos livres e glicerol e/ou diacilgliceróis (GILBERT & CHINO 1974; ARRESE *et al.* 2001).

O diacilglicerol é o lipídio mais abundante na hemolinfa (Palm et al., 2012), e é transportado por lipoproteínas de baixa densidade para maturação de oócitos nos ovários junto com o AG (figura 9) (MIURA, 2013). Esse processo é importante para o acúmulo de lipídios nos ovos dos insetos, compondo aproximadamente 40% de seu peso (ZIEGLER & VANANTWERPEN, 2006).

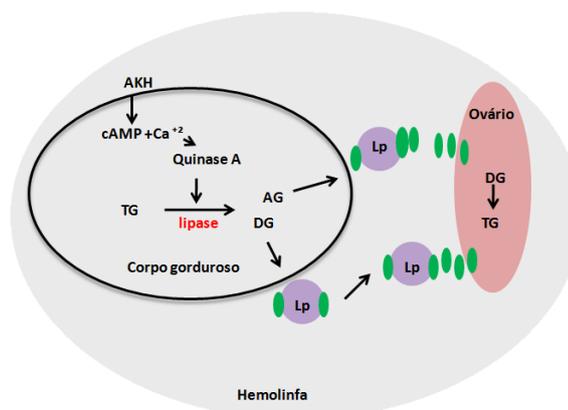


Figura 9. Mobilização de lipídios do corpo gorduroso para a ovogênese. AG= ácido graxo, DAG = diacilglicerol, Lp = lipoforinas. Modificado de Atella *et al.* 2012; Arrese *et al.* 2001.

Os ácidos graxos, por sua vez, constituem os lipídios da membrana, feromônios (Miura, 2013), cera cuticular e de secreções de defesa dos insetos (Klowden, 2013), além de serem utilizados para a síntese de energia na β -oxidação (TOPRAK *et al.*, 2020). A β -oxidação é uma via metabólica que produz poder redutor, que é convertido em energia (ATP) na cadeia transportadora de elétrons, importante para o metabolismo, inclusive de precursores hormonais (GREVENGOED *et al.*, 2014), uma vez que os insetos não fazem síntese *de novo* para os precursores esteroides (TOPRAK *et al.*, 2020). Assim, os insetos fitófagos convertem o ergosterol e outros fitoesteróis da alimentação em colesterol, para a síntese de hormônios esteroides (LEVINSON, 1962; JING & BEHMER, 2020).

Os hormônios, que são moléculas sintetizadas a partir de lipídios, são responsáveis pela muda, pelo desenvolvimento do inseto e processo de vitelogênese, como a ecdisona e o 20-hidroxicdisona (20-E) (CANAVOSO *et al.*, 2001). Esses hormônios podem ser sintetizados nos ovários, testículos e epiderme. A síntese de 20-E, a partir de colesterol nos ovários dos insetos, é regulada por enzimas do citocromo P450, localizada no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias (Roy *et al.*, 2016), como foi verificado em ovário da mosca-da-fruta oriental (*Bactrocera dorsalis*) (Wei *et al.*, 2017) e no corpo gorduroso de *Spodoptera littoralis* (IGA & SMAGGHE, 2010).

Algumas moléculas derivadas do fósforo, como o fosfato, também desempenham importantes funções no metabolismo de insetos, pois o fósforo é componente de moléculas como o DNA, RNA, fosfolipídios, nucleosídeos de adenina AMP, ADP, participa da transdução de energia através do ATP (Wiesenborn, 2013), está presente em vias metabólicas que possuem intermediários de fosfato como o gliceraldeído-3-fosfato e glicose-6-fosfato (Tian *et al.*, 2019) e de outros processos como a oogênese (Carvalho *et al.*, 2015) e por isso, a hemolinfa dos insetos possui grande quantidade de substâncias fosforiladas (WYATT *et al.*, 1963). O ácido fosfórico regula a atividade metabólica dos insetos entre o período pupa-adulto no período após a diapausa. Autores observaram alterações nos níveis de ácido fosfórico no cérebro da lagarta *Helicoverpa armigera* no período de diapausa. O seu acúmulo na hemolinfa e redução no cérebro no período de pupa indicam baixa atividade metabólica (LU *et al.*, 2014).

Quando expostos frequentemente a insumos químicos, ou a outras substâncias, os insetos podem sofrer desequilíbrio no metabolismo energético, adquirir resistência metabólica, ou sofrer danos fisiológicos, como a interrupção da postura de ovos. Em estudos recentes, Alves *et al.* (2019) verificaram redução expressiva na postura de ovos do caruncho *C. maculatus*

expostos ao óleo essencial de capim-limão, além disso, os autores verificaram que as fêmeas são mais susceptíveis aos efeitos do óleo essencial que os machos.

Os danos fisiológicos causados por xenobióticos podem ser ocasionados pela alteração nos níveis de moléculas essenciais para o metabolismo energético como os aminoácidos, carboidratos, lipídios, hormônios. A resistência metabólica aos xenobióticos está associada ao aumento da expressão de genes, seguido de ampliação na síntese de enzimas de resistência, que são capazes de metabolizar os xenobióticos, por hidrólise e adição de grupamentos polares, que facilitam sua eliminação (CASARETT, 2008; REDDY et al., 2012). Os mecanismos de resistência envolvem a redução na penetração do inseticida, aumento na atividade de enzimas de resistência a xenobióticos e alterações genéticas que promovem modificações estruturais em proteínas e enzimas relacionadas ao sistema nervoso, como a acetilcolinesterase (HEMINGWAY & RANSON, 2000; MONTELLA et al., 2012).

De acordo com Rand et al. (2015), o mecanismo de detoxificação de nicotina em abelhas (*Apis mellifera*) promoveram o aumento do metabolismo energético e de respostas antioxidantes mediadas por enzimas do citocromo P450, enzimas do grupo da GST e de vitelogenina para compensar a formação de espécies reativas, devido ao estresse provocado pela nicotina. As enzimas do citocromo P450 regulam a atividade de hormônios (Roy et al., 2016; Wei et al., 2017) e de carboidratos essenciais, como a quitina (SZTAL et al., 2012; DING et al., 2020).

3.5. Desafios para o Controle de Pragas de Grãos Armazenados

3.5.1. Controle químico com agrotóxicos orgânicos e inorgânicos sintéticos

Em decorrência da Revolução Verde, cujo o objetivo era aumentar a produção vegetal aliando tecnologia e variedades genéticas de alto valor agrônomico, de fato, promoveu o aumento da produtividade agrícola, entretanto também aumentou consideravelmente a utilização de agrotóxicos (PINGALI, 2012). Tempos depois, ocorreram outras revoluções buscando aperfeiçoar a tecnologia na agricultura, para o aumento da produtividade com menor impacto ao meio ambiente (PATEL, 2013; ARMANDA et al. 2019; KARUNARATHNE et al., 2020).

O Brasil é um dos maiores produtores de grãos no mundo, ao lado dos Estados Unidos, União Europeia e China, e conseqüentemente o aumento da produção ocasionou na elevação no consumo de insumos agrícolas (DONLEY, 2019). No entanto, no período de 2000 à 2012 o

consumo de agrotóxicos aumentou três vezes em relação a produtividade apenas para a cultura de soja (ALMEIDA, V. E. S. DE *et al.*, 2017). O Brasil permanece há uma década no posto de maior consumidor de agrotóxicos do mundo, gerando inúmeras consequências na saúde pública, especialmente em trabalhadores do campo, moradores do entorno de áreas agrícolas, além de toda população que consome os alimentos contaminados (CARNEIRO, 2015). Entre os 10 compostos ativos mais comercializados figuram as formulações contendo glifosato, 2,4-D, mancozebe, acefato, atrazina, paraquate e imidacloprido (IBAMA, 2017). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o resíduo de agrotóxicos nos alimentos, pode estar relacionado ao manuseio de insumo ignorando as considerações para uma boa prática agrícola (ANVISA, 2016). De acordo com a ANVISA existe um limite de resíduo de agrotóxicos encontrados nos alimentos (LMR), e estando dentro desse parâmetro o alimento pode ser considerado seguro para a saúde do consumidor.

Análises para verificar o resíduo de agrotóxicos em amostras de abacaxi, abobrinha, alface, arroz, banana, batata, beterraba, cebola, cenoura, couve, feijão, goiaba, laranja, maçã, mamão, mandioca (farinha), manga, milho (fubá), morango, pepino, pimentão, repolho, tomate, trigo (farinha) e uva, destes 38,3% apresentaram resíduos de agrotóxicos dentro do LMR permitido (ANVISA, 2016). Apesar dos órgãos competentes não sinalizarem os riscos, sabe-se que os princípios ativos dos agrotóxicos acumulam-se nos tecidos corporais e podem trazer danos a longo prazo e, de acordo com a literatura, esses princípios ativos em um sistema água-solo, apresentam adsorção na matéria orgânica, argila e alto poder de contaminação das águas superficiais e subterrâneas (CARMO, D. A. DO *et al.*, 2013).

Outro problema diz respeito ao descarte sem a devida lavagem da embalagem, que proporciona a contaminação do solo, com dinâmica de adsorção pelas partículas do solo e dessorção para a solução do solo (Steffen *et al.*, 2011). Além disso, existe a possibilidade de os ativos dos agrotóxicos serem biotransformados, surgindo novas moléculas com outras propriedades biológicas contaminando o solo, a água, o ar e os seres vivos como um todo (figura 10).

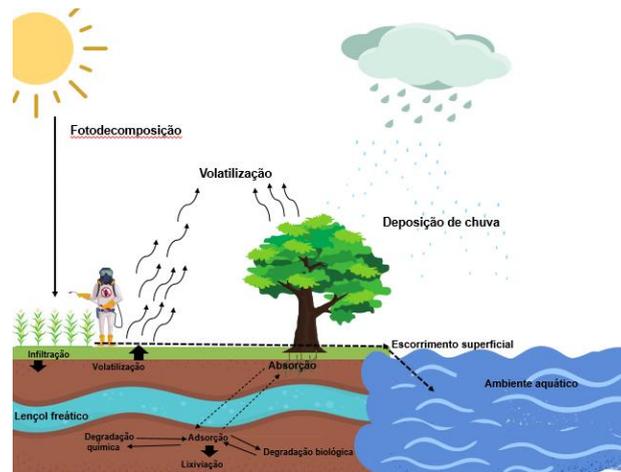


Figura 10. Diferentes formas de transformação dos agrotóxicos no ambiente. Retirado de STEFFEN et al., 2011.

A contaminação das águas pode ocasionar desequilíbrios ecológicos irreversíveis nas cadeias alimentares, partindo de animais aquáticos que são fonte de alimento para outros animais e os humanos (DE SOUZA et al., 2020). Além disso, são tóxicos para insetos benéficos como as abelhas, plantas não-alvos e pássaros (AKTAR et al., 2009; KAUR et al., 2019). Os pássaros e abelhas são contaminados pela dispersão de partículas voláteis de agrotóxico no ar. Um estudo no estado do Ceará (Brasil), avaliou os efeitos ambientais decorrentes da utilização de agrotóxicos entre 2010 e 2017, e constatou a contaminação do solo, água ar por resíduos de glifosato (CABRAL et al., 2019). A exposição aos agrotóxicos é uma ameaça para a extinção das abelhas (BARON et al., 2017), com consequência na diminuição da polinização, na diversidade florística e segmentos produtivos como a meliponicultura e a própria agricultura .

Além dos impactos ocasionados ao meio ambiente, as cadeias alimentares e consequentemente a produtividade agrícola, a exposição a esses princípios ativos tem como consequência, danos à saúde humana como transtornos mentais, depressão (CAMPOS et al., 2016), transtornos do humor, suicídio (MEYER et al., 2007; MEYER et al., 2010) impotência sexual, infertilidade (KAUR et al., 2015), câncer (ROCHA & GRISOLIA, 2019). De acordo com dados do Ministério da Saúde no período de 2007 a 2015 a maior causa de notificação da exposição por agrotóxicos foi por tentativa de suicídio (BRASIL, 2018). Informações do período de 1999 à 2014 na região Sul do Brasil indicam que a maioria dos casos registrados de intoxicação por agrotóxicos são homens entre 15-59 anos (HENDGES *et al.*, 2019).

Campos et al. (2016) verificaram que indivíduos com depressão foram expostos a piretróides em uma região produtora de tabaco em Dom Feliciano-RS, e de acordo com a OMS

(Organização Mundial de Saúde) quadros depressivos antecedem ao suicídio (SILVA & COLUCCI NETO, 2020), como foi verificado na Região Serrana do estado do Rio de Janeiro, em que a mortalidade por suicídio entre homens jovens que desempenhavam atividades no campo era duas vezes maior do que a taxa local de mortalidade (MEYER et al., 2010).

Outra consequência à exposição a insumos químicos como os organoclorados é a contaminação de crianças através do aleitamento ou do cordão umbilical, ocasionando problemas no desenvolvimento das coordenações motoras e nervosas. Resíduos do agrotóxico clordecona, utilizado contra pragas de grãos armazenados, no cordão umbilical de recém-nascidos ocasionou danos a função motora em meninos de até 1 ano e 6 meses, no qual as mães haviam sido expostas ao composto no período pré-natal (BOUCHER *et al.*, 2013).

Para o controle de pragas como o caruncho do feijão-caupi, as pastilhas fumigantes tradicionais à base de brometo de metila e fosfina são eficientes (figura 11) (JÚNIOR et al., 2012). Como a perda do princípio ativo é rápida e por ser de baixo custo, o uso prolongado sem o devido manejo desencadeia mecanismos de resistência em insetos e, conseqüentemente, perdas de grãos armazenados (MANGOBA & DE GUZMAN ALVINDIA, 2020; ZAKLADNOY, 2020).

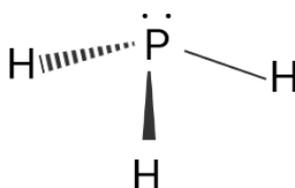


Figura 11. Estrutura da fosfina (PH₃) Criado com Biorender.com (TEM A FONTE DE ONDE OBTEVE?)

De fato, a resistência de pragas à fosfina já tem sido registrada para pragas de grãos armazenados (ZAKLADNOY, 2020). Esses princípios ativos são também recomendados e utilizados internacionalmente (NAYAK et al., 2020). Ocorre que esses produtos fumigantes representam perigo a saúde humana pela exposição durante a aplicação do produto e pelo resíduo deixado nos grãos (STREET, 2010; THABIT & ELGEDDAWY, 2018; PLUMIER et al., 2020) ocasionando danos ao metabolismo energético (EBERT et al., 2011), a órgãos vitais como o cérebro, fígado (SHUKLA, 2020) ou levar ao óbito por inalação (YAN, H. *et al.*, 2018).

No Brasil, o único inseticida registrado pelo MAPA para o controle do caruncho do feijão-caupi é a base de fosfeto de magnésio, na formulação fumigante, do grupo químico inorgânico precursor de fosfina, formulado em tabletes e são classificados como extremamente tóxico a saúde humana e perigoso ao meio ambiente (AGROFIT-MAPA, 2021), mas (MARSARO et al., 2013; BRASIL, 2020) citam como controle alternativo para proteção de grãos armazenados de cultivo orgânico, a utilização de terra de Diatomácea um pó inerte de sílica amorfa formado pelo acúmulo de carapaças fossilizadas de algas Diatomáceas, mas que possui desvantagens por ser prejudicial ao sistema respiratório dos aplicadores, devido à exposição ao pó de sílica (INCA, 2022) e além de inibir a germinação de grãos (RABELO, 2020).

Considerando todos os impactos causados pelo uso desses agrotóxicos, parte do segmento agrícola tem optado pelo controle químico com produtos naturais. Neste sentido, a academia tem contribuído com o desenvolvimento de tecnologias agroecológicas, utilizando substâncias bioativas para formulação de defensivos agrícolas naturais com menos impactos ao meio ambiente e à saúde humana (FERNANDES et al., 2005; ISMAN, 2020a), iniciando com racionalização no uso dos agrotóxicos orgânicos sintéticos por meio do desenvolvimento do MIP (Manejo Integrado de Pragas) (BARZMAN et al., 2015; DARA, 2019), ou mesmo sua exclusão do processo de produção de alimentos, incluindo seu beneficiamento e armazenamento, como aqueles produzidos por sistemas agroecológicos e/ou orgânicos de produção vegetal e animal (FERNANDES et al., 2005).

3.5.2. Manejo Integrado de Pragas-MIP

O Manejo Integrado de Pragas (MIP) surgiu visando um manejo mais sustentável, menor impacto no ambiente, diminuição no surgimento de espécies resistentes pelo uso descontrolado de agrotóxicos e as suas consequências, através de conhecimentos tradicionais, biológicos, químicos, físicos e culturais (BARZMAN et al., 2015; DARA, 2019). O MIP combina vários métodos, entre eles o controle químico tradicional e/ou com produtos naturais, biológico, uso de armadilhas de feromônio e/ou hormônios, introdução de plantas resistentes, controle físico do ambiente entre outros (PICANÇO, 2010; NARANJO et al., 2015) (figura 12).

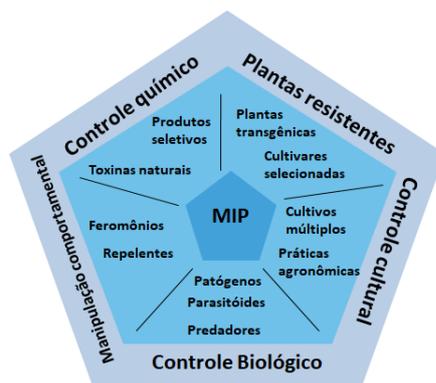


Figura 12. Esquema exposto a integração de diferentes táticas de controle de pragas utilizada no Manejo Integrado de Pragas (MIP). Modificado de: (PARRA, 2014).

Durante a década de 70, foi estabelecido no Brasil um programa de manejo integrado de pragas para a cultura de soja, um dos programas de MIP de maior sucesso do mundo, pois reduziu em 50% o uso de inseticidas tradicionais (PANIZZI, 2013). Infelizmente, de acordo com Bortolotto et al., 2015 o programa de soja-MIP foi abandonado no Brasil, o que aumentou o consumo de pesticidas tradicionais e os problemas decorrentes dessa prática. No entanto, com a necessidade de controlar as pragas e amenizar os danos a diversidade biológica, principalmente na região centro-oeste houve a retomada do MIP com estratégias para a sua implementação e conseqüentemente sustentação (GODOY et al., 2015).

Para a implementação do MIP são necessários três níveis de organização: um banco de conhecimentos básicos, como por exemplo, conhecer o movimento da praga de interesse e de seus predadores naturais, por busca de alimento; defesas para suprimir populações de pragas; retardar o progresso da praga ou reduzir a sua incidência e a capacidade de utilizar os pilares do MIP para controlar as pragas (Irwin, 1999; Dhaliwal & Arora, 2020). Portanto, a longo prazo o MIP diminui o uso de pesticidas tradicionais, confere segurança à saúde humana, minimiza os danos ao meio ambiente, aumenta a relação custo-benefício e proporciona maior economia ao agricultor (PAUDEL *et al.*, 2020).

Diversos produtores aderiram ao MIP para a produção de grãos como o feijão-caupi (Haddabi, 2020), arroz (Chatterjee et al., 2020), milho (Furlan et al., 2017) entre outros, pois o principal objetivo do Manejo Integrado de Pragas não é a erradicação do inseto-praga, mas mantê-lo em um nível baixo de dano econômico mantendo o equilíbrio entre as cadeias alimentares, além de minimizar os efeitos deletérios ao meio ambiente e a saúde humana,

utilizando metodologias às quais incluem os pesticidas de origem vegetal como os óleos essenciais (DEPING et al.,2019).

3.5.3. Controle alternativo com biopesticidas botânicos

Biopesticidas são produtos naturais derivados de plantas, microrganismos, animais utilizados para o controle de insetos-pragas com a finalidade de desenvolver uma agricultura sustentável autorizados e registrados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA/AGROFIT) (FENIBO et al., 2020), são classificados em diferentes categorias como: botânicos, microbianos e bioquímicos (KUMAR, 2012) e podem ser de diversas origens como plantas, microrganismos e pó de carapaças de algas diatomáceas fossilizadas (terra de diatomácea), utilizada na proteção de grãos armazenados contra insetos-pragas. O uso de biopesticidas, desde que não sejam oriundos do organismo geneticamente modificados ou processos radioativos, são permitidos como produtos fitossanitários, sejam para o controle de insetos, ácaros, fitopatógenos ou ervas-daninhas (MAPA, 2021b).

Os biopesticidas botânicos são extratos vegetais, possuem ação inseticida, acaricida, fungicida, herbicida (BARDIN et al., 2015) e, de modo geral, atuam nos sistemas biológicos sobre enzimas específicas e/ou na membrana plasmática da célula (SALUNKHE, 2020). Dentre as vantagens da aplicação de biopesticidas pode-se citar a decomposição mais rápida, menor toxicidade a biota e redução do impacto ambiental (MANZOOR & SHARMA, 2019).

As indústrias de pesticidas tradicionais que dominam o mercado atual são: Syngenta, Bayer, DuPont, Dow, BASF e Monsanto (PELAEZ & MIZUKAWA, 2017). No entanto, algumas destas empresas se somam a outras para explorar o mercado de biopesticidas voltados para a agricultura orgânica, como a Bayer Crop Science AG, BASF SE, Certis LLC, Agraquest, Koppert Biological systems, Marrone Bioinovações e Valent Biosciences (ABBEY, Lord *et al.*, 2019). Na tabela 1 seguem alguns dos produtos encontrados no mercado e seus respectivos fabricantes, incluindo no Brasil. Todavia, o mercado brasileiro ainda não tem produto à base de óleo essencial registrado pelo MAPA, mas eles constam da lista de produtos fitossanitários autorizados para uso na agricultura orgânica, havendo, porém, a necessidade de elaboração de especificações de referência para óleos essenciais para impulsionar o mercado desses biopesticidas (MAPA, 2021b).

Tabela 1. Biopesticidas para comercialização atualmente no mercado agroindustrial.

Produto natural	Aplicação/ Uso	Marca/ Empresa	Fonte
<i>Laminaria digitata</i>	Fungicida	Goemar	(Lagogianni & Tsitsigiannis, 2019)
α terpineno (59.7%)			
p- cimeno (22.4%)	Inseticida	Requiem/ Bayer	(Isman, 2020)
d-limoneno (17.9%)			
<i>Capsicum oleoresin</i>	Inseticida	Captiva/ Gowman	(Marrone, 2019)
		Align/ Sipcam	
		Fortune aza/ Sipcam_spa	(Solutions, 2020)
Azadiractina	Inseticida/ Acaricida	Agroneem/ Azact CE/ Azamax/ Bioexos/ DalNeem EC/ Fitoneem	(MAPA, 2021a)
<i>Sophora Flavescens</i>	Inseticida/ Acaricida	Jieliang	(Zanardi et al., 2015)
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Fungicida	Timorex Gold/ STK Bio-ag technologies e BASF	https://stk-ag.com/stk-and-basf-agree-timorex-gold-deal-for-brazil/
Piretrinas (1,4%) azadiractina (1,2%)	Inseticida	Azera/ MGK	(Iglesias et al., 2020)
<i>Mentha piperita,</i> Geraniol, <i>Salvia</i> <i>rosmarinus</i>	Acaricida/ Inseticida	Ecotrol / Keyplex	(Mossa, 2016)
Flavonas saponínicas do tipo rotenóides, <i>Tephosia candida</i>	Inseticida (formicida)		(MAPA, 2021a)

Muitos trabalhos tem apontado a eficácia de extratos vegetais e óleos essenciais para a proteção das culturas e seus produtos (LORINI *et al.*, 2015). Na Tabela 2 pode-se observar um levantamento de substâncias químicas naturais derivados de plantas para o controle de pragas.

Os óleos essenciais contém substâncias voláteis e podem perder as suas propriedades e seus componentes comprometendo a sua eficácia, devido exposição a luz, água e ar (ASBAHANI *et al.*, 2015). Neste contexto, foram desenvolvidos associações dos biopesticidas com biopolímeros, encapsulamento em microcápsulas de poliureia, maltodextrina e ceras com a finalidade de prolongar a vida útil e liberação destes (SCARFATO *et al.*, 2007; JO *et al.*, 2013; THUONG NHAN *et al.*, 2020; TRAN *et al.*, 2020).

Tabela 2. Substâncias derivadas de plantas para o controle de pragas

Produto	Controle/Praga	Referência
Óleo essencial <i>Ocimum basilicum</i>	<i>Sitophilus zeamais</i>	(Moura et al., 2020)
Extrato acetônico <i>Amorphophallus paeoniifolius</i>	<i>Sitophilus oryzae</i> e <i>Tribolium castaneum</i>	(Vijayakumar & Mohankumar, 2020)
Óleo essencial <i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Callosobruchus maculatus</i>	(Alves et al., 2015b 2019)
Extrato aquoso <i>Ocimum gratissimum</i>	<i>Callosobruchus maculatus</i>	(Ikechi – Nwogu & Omeke, 2020)
Extrato aquoso <i>Nicotiana Tabacum</i>	<i>Spodoptera Frugiperda</i>	(Sakadzo et al., 2020)
Extrato hexânico <i>Allium sativum</i>	<i>Tribolium castaneum</i>	(Mangang et al., 2020)
Extrato etanólico <i>Solanum lycocarpum</i>	<i>Zabrotes subfasciatus</i>	(Luiz et al., 2020)
Óleo essencial <i>Thymus vulgaris</i>	<i>Acanthoscelides obtectus</i>	(Lazarević et al., 2020)
Extrato etanólico <i>Brugmansia suaveolens</i>	<i>Zabrotes subfasciatus</i>	(Gonçalves et al., 2019)
Extrato aquoso <i>Azadirachta indica</i> , <i>Milletia ferruginea</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>	(Fite et al., 2020)

No entanto, o mercado de biopesticidas encontra inúmeras barreiras devido a processos burocráticos de regulação. De acordo com CHANDLER et al., 2011 os biopesticidas são regulados pelo mesmo sistema projetado para o uso de pesticidas químicos o que ocasiona em impactos na sua implementação. No Brasil, no ano de 2011, os biopesticidas representaram de 1 a 2% do total de produtos utilizados no combate a pragas e doenças nas lavouras (BETTIOL, 2011). Em 2018 esse índice chegou a 17% (MEYER et al., 2019), destes 70% para o controle biológico (MAPA, 2020), representando apenas 5% do mercado de proteção de grãos (DAMALAS & KOUTROUBAS, 2018).

Entre os motivos que dificultam a produção e comercialização de biopesticidas, pode-se apontar o distanciamento entre a pesquisa e o desenvolvimento de produtos ao nível industrial. Desta forma, os investimentos em ciência, tecnologia e desenvolvimento de produtos agroecológicos, envolvendo biopesticidas, são importantes para o segmento agrícola, meio ambiente e a saúde pública (THOMAS & READ, 2007; DUARTE et al., 2011).

3.6. Óleos Essenciais (OE)

De acordo com a ISO (Organização Internacional de Normatizações), óleo essencial (OE) é um produto natural obtido da matéria-prima vegetal, extraído por destilação a vapor d'água, por destilação a seco após a separação da fase aquosa, ou por expressão de pericarpo

de frutos cítricos (ISO 9235, 2013). Os óleos essenciais são constituídos principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos e de derivados de fenilpropanos (figura 13), metabólitos que conferem características como cor, odor, densidade, viscosidade aos óleos essenciais (ADAMS, 2007).

Dentre os métodos relacionados a extração de óleos essenciais, citamos a expressão de frutos cítricos, a hidrodestilação ou arraste com vapor de água, a hidrodestilação assistida por micro-ondas, ultrassom, por gravidade, agitação entre outros (BAPTISTA-SILVA *et al.*, 2020). Os óleos essenciais podem ser obtidos de todos os órgãos vegetais frescos ou secos, como folhas, flores, frutos e raízes (BOUTEBOUHART *et al.*, 2019). O perfil químico e o rendimento de óleo essencial extraído das plantas podem ser influenciados por diferentes fatores (MORAIS, 2009), como os edafoclimáticos, época, horário de colheita, manejo e pós colheita da planta, assim como o fator genético (BORGES *et al.*, 2019).

As principais substâncias que constituem os óleos essenciais são sintetizadas na via do ácido chiquímico (plastídio) que leva a formação de derivados de fenilpropanóides, e as vias mevalônica ou MEV (citosol) e metileritritol-fosfato ou MEP (plastidial), que têm como produto final unidades isoprênicas (cinco carbonos), blocos de síntese de monoterpenos e sesquiterpenos (ABBAS *et al.*, 2017).

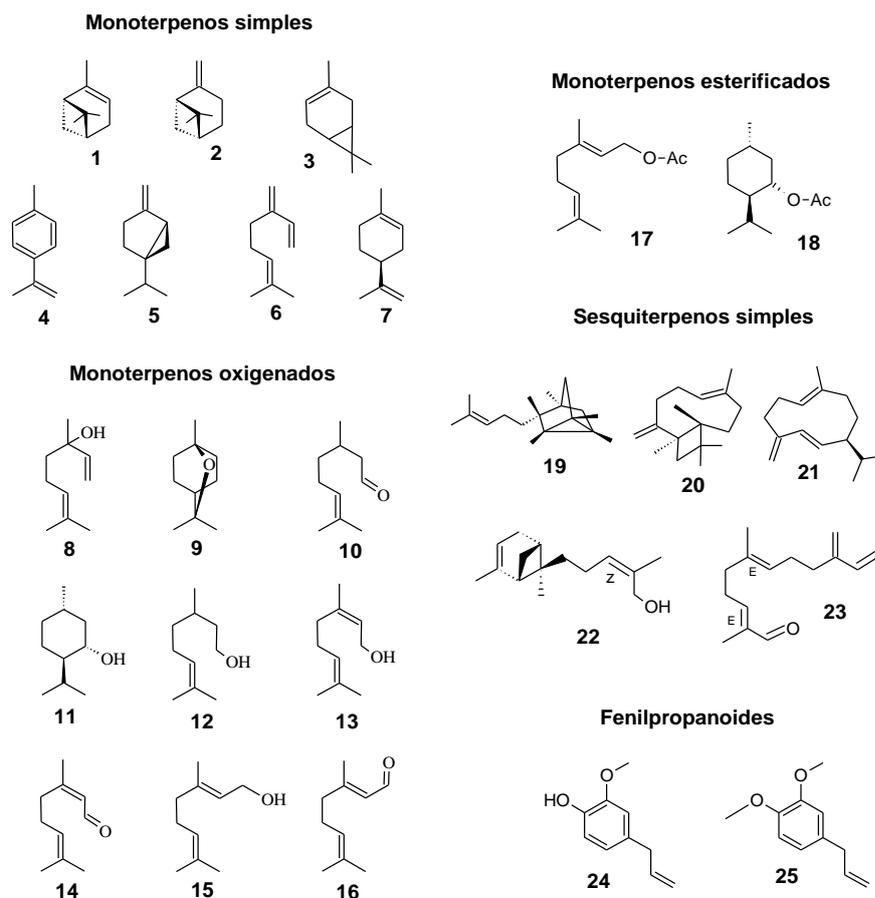


Figura 13. Alguns compostos voláteis de plantas aromáticas. α -pineno (1), β -pineno (2), δ -3-careno (3), p -cimeno (4), (-)-sabineno (5), mirceno (6), (-)-limoneno (7), linalol (8), eucaliptol (9), citronelal (10), mentol (11), citronelol (12), nerol (13), neral (14), geraniol (15), geranial (16) Acetato 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).

A via de síntese do ácido chiquímico tem como substratos de partida eritrose-4-fosfato e fosfoenolpiruvato, como intermediários os aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina e seus produtos são cinamato ou cumarato (KOCHHAR & GUJRAL, 2020). A via MEV tem como substratos três moléculas de acetil-CoA e a via MEP tem como ponto de partida a condensação de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato. Tanto a via MEV quanto a MEP produzem os isoprenos dimetilalil-pirofosfato e isopentenil-pirofosfato. As diferentes combinações de isoprenos e suas transformações dão origem, por exemplo, aos monoterpenos com 10 carbonos e sesquiterpenos com 15 carbonos (Figura 14).

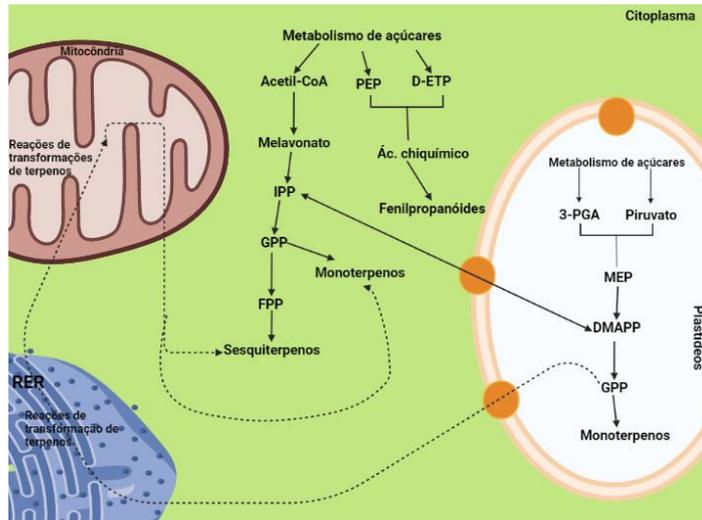


Figura 14. Biossíntese de óleo essencial (OE) no citoplasma e plastídio da célula vegetal. Compostos precursores derivados do metabolismo de açúcares. PEP: fosfoenolpiruvato; D-ETP: D-eritrose-4- fosfato; IPP: isopentenil-difosfato; GPP: geranyl-difosfato; FPP: farnesil difosfato; MEP: metileritritol; DMAPP: dimetialil difosfato. Modificado de PAVELA & BENELLI, (2016) ; ÁVALOS & PÉREZ, (2009); CAVALCANTI et al., (2015). Criado com BioRender.com

Os metabólitos secundários desempenham inúmeros papéis ecológicos como a proteção contra herbivoria, atração de insetos polinizadores e dispersores de sementes, além de possuir ação protetora contra estresses abióticos (ÁVALOS & PÉREZ, 2009) (figura 15).

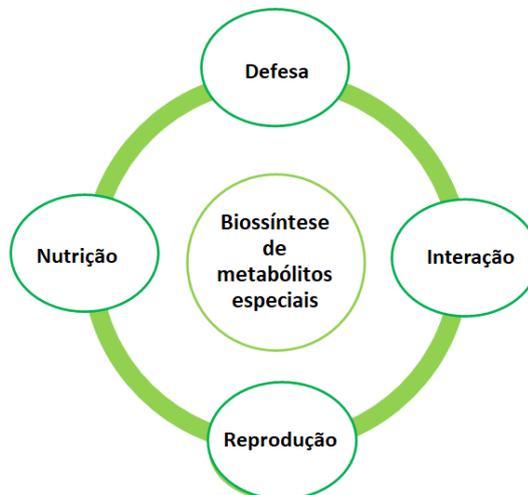


Figura 15. A biossíntese de metabólitos especiais do metabolismo secundário das plantas e suas funções: de defesa contra raios UV, patógenos e herbivoria; de interação: com organismos benéficos ou simbiotes; de reprodução: atração de polinizadores e dispersores de sementes; de nutrição: captação de nutrientes para reservas.

A secreção de substâncias que constituem os óleos essenciais pode ocorrer nos tecidos vegetais, em diferentes estruturas especializadas, como tricomas, cavidades ou bolsas, canais ou dutos e em células parenquimáticas diferenciadas como idioblastos. A liberação das substâncias que constituem os óleos essenciais para a atmosfera depende do rompimento físico dessas estruturas. Nas plantas do gênero *Cymbopogon*, as células parenquimáticas localizadas no mesófilo foliar (figura 16) é o local onde ocorre a secreção de substâncias lipofílicas e voláteis comuns ao óleo essencial (LEWINSOHN, 1998).

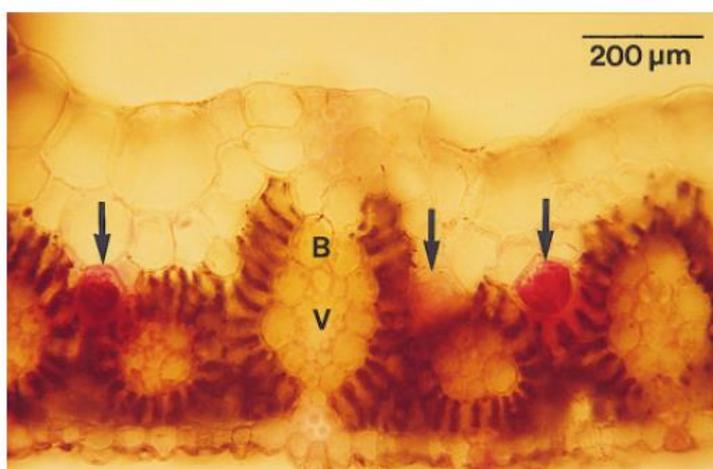


Figura 16. Células parenquimáticas de *Cymbopogon citratus*. As manchas vermelhas representam o acúmulo de citral (geranial e neral), monoterpenos. Microscopia eletrônica de fluorescência. Retirado de: LEWINSOHN, 1998.

3.6.1. Atividade biológica de OE vs. *Callosobruchus maculatus* Fab. (Coleoptera Chrysomelidae)

Os óleos essenciais são altamente explorados pela indústria cosmética (LAOTHAWEEERUNGSAWAT et al., 2020) e farmacêutica (BAPTISTA-SILVA et al., 2020). Pesquisas recentes demonstram a sua aplicação na agricultura, no qual os óleos essenciais e seus compostos voláteis isoladamente possuem efeito herbicida (IBÁÑEZ & BLÁZQUEZ, 2018), fungicida (SOUZA et al., 2018), inseticida (HASHEM et al., 2018) e acaricida (LEE et al., 2018) e aplicação biotecnológica para a proteção de grãos armazenados contra insetos-pragas e fungos oportunistas da condição de armazenamento. Trabalhos tem demonstrado o efeito de óleos essenciais sobre o ciclo de vida de insetos do gênero *Callosobruchus* (tabela 3).

Artigos científicos relatam o efeito inseticida e repelente de diversos óleos essenciais sobre o ciclo reprodutivo de *C. maculatus* apresentando toxicidade, afetando taxas de postura de ovos e conseqüentemente a emergência de insetos adultos (PARANAGAMA &

GUNASEKERA, 2011; BALACHANDRA et al., 2012;. DUTRA et al., 2016; NATTUDURAI et al., 2017). Esses resultados são promissores comparados a fosfina, fumigante tradicional utilizado no controle de pragas de armazenamento (MASSANGO et al., 2017).

Tabela 3.Efeito fumigante de óleos essenciais sobre espécies do gênero *Callosobruchus*.

<i>Espécie</i>	<i>Óleo essencial</i>	<i>Conc. letal/tempo</i>	<i>Fonte</i>
<i>C. maculatus</i>	<i>Ocimum tenuiflorum</i>	250 µL/L/24h	(Bhavaya et al.,2020)
	<i>Ocimum basilicum</i>	25 µL/L/12h	(Ke & Thor, 2001)
	<i>Cymbopogon schoenanthus</i>	2,7 µL/L/24h	(Ketoh et al., 2006)
	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	10 µL/L/24h	(Pandey et al., 2014)
	<i>Ocimum basilicum</i>	200 µL/L/48h	(Alves et al., 2015)
	<i>Citrus latifolia</i>	10 µL/L/48h	(Dutra et al., 2016)
	<i>Foeniculum vulgare</i>	40mg/L/72h	(Kaya et al., 2018)
<i>C. chinensis</i>	<i>Nigella sativa</i>	8,9 µL/L/24h	(Chaubey, 2008)
	<i>Cinnamomam verum</i>	1 mL/Kg/2 meses	(Ratnasekera & Nayanathara, 2013)
	<i>Syzygium aromaticum</i>	0,334 mg/L/24h	(Trivedi et al., 2017)
	<i>Lantana camera</i>	20,81 µL/L/24h	(Kathirvelu et al., 2019)
<i>C. subinnotatus</i>	<i>Cymbopogon giganteus</i>	100 µL/L/24h	(Nyamador et al., 2010)
<i>C. phaseoli</i>	<i>Acorus calamus</i>	10 µL/L/48h	(Rahman & Schmidt, 1999)

Além das alterações fisiológicas, o óleo essencial e seus constituintes podem afetar o metabolismo do caruncho do feijão-caupi diminuindo a eficiência do metabolismo de xenobióticos (BERENBAUM & JOHNSON, 2015), por exemplo, diminuindo a atividade das enzimas esterase, glutathione-S-transferase e acetilcolinesterase (NATTUDURAI et al., 2017). Existem relatos científicos de que os constituintes voláteis do óleo essencial, como os monoterpenos, atuam em sinergia provocando perturbações no metabolismo energético dos insetos (GRABARCZYK et al., 2020), como na mobilização de lipídios para processos que demandam de grande quantidade de energia, como a ovogênese (ALVES et al., 2019).

O metabolismo é constituído por reações químicas catalisadas por enzimas, que são controladas por diferentes fatores endógenos e exógenos nas células (ROBINSON *et al.*, 2020). Essas reações, são responsáveis por fornecer condições para a sobrevivência do ser vivo, incluindo a disponibilidade de energia para a manutenção de atividades, como o voo, metamorfose, reprodução (TOPRAK, 2020), e eliminação de substâncias tóxicas. O processo de eliminação de substâncias tóxicas é denominado de metabolismo de xenobióticos, que envolvem reações de biotransformação mediadas por enzimas das famílias das esterases, do citocromo P450 e Glutathione S-transferases (SCOTT & BUCHON, 2019; LU *et al.*, 2021). Neste contexto, para compreender o modo de ação das substâncias naturais, como o óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) sobre o metabolismo do inseto *C. maculatus* é necessária uma investigação sobre os prováveis alvos bioquímicos, estudar o perfil metabólico, ou seja, a composição química que pode indicar alvos moleculares para as enzimas de biotransformação, o metabolismo de lipídios e analisar sua expressão gênica.

3.6.2. Óleo essencial de capim-limão vs. *Callosobruchus maculatus* Fab. (Coleoptera Chrysomelidae)

O capim-limão, *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, pertence à família Poaceae e é uma planta herbácea (Figura 17), de origem indiana e aclimatada em nosso país no período colonial, sendo também conhecida como erva-cidreira, capim-santo, capim-cidró e citronela-de-java (CASTRO & RAMOS, 2003). Suas folhas são estreitas, longas, ásperas, aromáticas apresentando nervura central, e possuem odor de limão (DUARTE & ZANETI, 2004).



Figura 17. Planta de *Cymbopogon citratus* (capim-limão). À esquerda em destaque folhas (acima) e talos (abaixo). Retirado de: <https://gardenseedsmarket.com/cymbopogon-citratus-400-sementes.html>; <https://www.floresefolhagens.com.br/capim-limao-cymbopogon-citratus/>; <https://engenhariadasessencias.com.br/loja/ativos-cosmeticos/22-oleo-essencial-de-capim-limao-importado-lemongrass-capim-cidreira.html> . Em: 20.03.2020.

O capim-limão possui inúmeras propriedades farmacológicas como antibacteriana, hipoglicêmica, antifúngica, anti-inflamatória (Rojek et al., 2021) e são utilizadas popularmente como chá para inúmeras finalidades como calmante, desequilíbrios gastrointestinais (Carlini et al., 1986) e tratamento de anemia (EKPENYONG & ANTAI, 2015).

Devido a riqueza de compostos, o óleo essencial vem sendo muito explorado pela indústria farmacêutica e cosmética. Os principais constituintes do óleo essencial são os monoterpenos oxigenados neral e geranial, que constituem uma mistura de isômeros chamado de citral (figura 18) (AVOSEH et al., 2015). Além das indústrias farmacêuticas e de cosméticos, devido a suas propriedades terapêuticas, o óleo essencial de capim-limão possui aplicabilidade na agroindústria (MERCHAOUUI et al., 2018), no setor alimentício (CELINA et al., 2019) e na saúde pública (TEIXEIRA et al., 2015; LIMA et al., 2016).

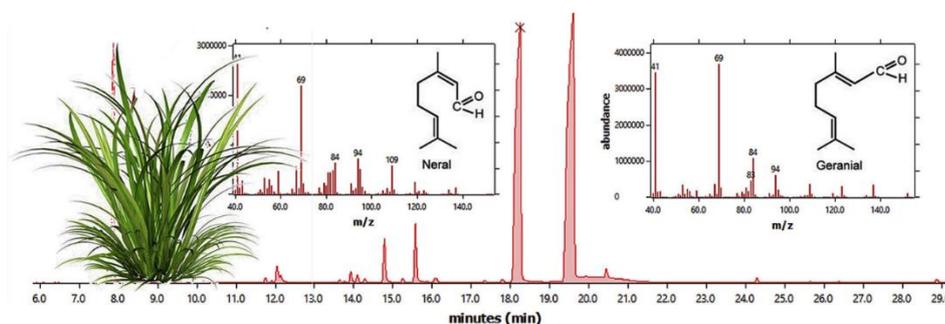


Figura 18. Cromatograma dos compostos voláteis de *Cymbopogon citratus* (neral e geranial), que formam o citral (composto majoritário), obtidos por CG-EM. Adaptado de: ALVES et al., 2019.

O óleo essencial de capim-limão é promissor no controle de células cancerígenas (GHOSH, 2013), no controle de candidíase, em processos inflamatórios em diabéticos (KANDIMALLA et al., 2016) e no tratamento de malária (TCHOUMBOUGNANG *et al.*, 2005). No campo da agroindústria, apresenta propriedades antifúngica, antibacteriana, inseticida e de repelência de insetos (GANJEWALA, 2009), e por isso, é de grande interesse para o controle de insetos- pragas (HERNANDEZ-LAMBRAÑO *et al.*, 2015).

Devido a diversas propriedades e formas de aplicação o óleo essencial de capim-limão apresenta potencial para o controle do caruncho do feijão-caupi como uma alternativa ao controle químico tradicional. Alguns trabalhos apresentados na tabela 4, relatam o efeito do óleo essencial de capim-limão como tóxico ou repelente. Ou também como capaz de inibir o

ciclo reprodutivo, alterar o comportamento sexual, a atividade de enzimas de biotransformação e de sinapses nervosas (ALVES et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2017; MADI et al., 2020).

Tabela 4. Dados da literatura mostrando o efeito de óleo essencial extraído de folhas de *Cymbopogon citratus* sobre *Callosobruchus maculatus*.

Efeito do óleo essencial	Fonte
Inseticida	(Ketoh et al., 2000)
Inseticida e repelente	(Paranagama et al., 2002)
Repelência	(Boeke et al., 2004b)
Inseticida	(Rubasinghege et al., 2006)
Inseticida	(Aziz & Abbass 2010)
Inseticida	(Ojebode et al., 2016)
Inseticida	(Oliveira et al., 2017)
Repelente	(Guerra et al., 2019)
Inseticida	(Alves et al., 2019)
Inseticida e repelente	(Omotoso et al. 2020)

3.7. Análise do perfil metabólico

Análise do perfil metabólico é uma estratégia para o estudo da composição e alteração dos metabólitos de um organismo (Ding et al., 2009), através de técnicas analíticas como a cromatografia acoplada a espectrometria de massas (CG-MS), cromatografia líquida acoplada a massas (LC-MS) e a ressonância magnética nuclear (RMN) (EMWAS *et al.*, 2019). Estas técnicas são empregadas em inúmeras áreas do conhecimento, como ambiental (Lankadurai et al., 2013), saúde humana (Mitsuwan et al., 2017; Han et al., 2017), melhoramento esportivo (Al-Khelaifi et al., 2018), investigação criminal (Joseph et al., 2011; Presley et al., 2019) e agrícola (BARRAJÓN-CATALÁN *et al.*, 2020). Além de inúmeras aplicações, existem dois tipos de perfil metabólico: uma análise alvo, que é a quantificação de metabólitos pertencentes a uma determinada classe de moléculas, com participação em determinada rota metabólica e, uma análise metabolômica global, que se refere a quantidade de metabólitos totais que um

organismo possui (Canuto et al., 2018), sendo que a escolha do tipo de perfil metabólico está alinhado com o objetivo da investigação realizada e da escolha da amostra de estudo.

Esta técnica permite realizar associações dos metabólitos presentes em um organismo com aspectos fenotípicos, fisiológicos e comportamentais (SNART et al., 2015). Vários trabalhos tem buscado uma abordagem metabolômica com o objetivo de encontrar alvos bioquímicos em organismos vivos (KANG et al., 2019; LIU et al., 2016; PENG et al., 2016), assim como em insetos-pragas de interesse agrícola (Tabela 5).

Tabela 5. Estudos com abordagem metabolômica para o estudo de insetos-pragas de interesse agrícola.

Inseto-praga	Cultura infestada	Fonte
<i>Helicoverpa armigera</i>	Soja, milho, algodão	(Zhang et al., 2012)
<i>Trogoderma granarium</i>	Trigo	(Hafiz et al., 2016)
<i>Nilaparvata lugens</i>	Arroz	(Peng et al., 2016)
<i>Chilo suppressalis</i>	Arroz	(Liu et al., 2016b)
<i>Phorodon humuli</i>	Lúpulo	(Undas et al., 2018)
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Milho	(Abdelgaffar et al., 2019)
<i>Callosobruchus chinensis</i>	Feijão	(Cui et al., 2019)
<i>Plutella xylostella</i>	Alface, alfava, algodão, beterraba, amendoim	(Wang et al., 2020)
<i>Aphis gossypii</i>	Algodão	(Lv et al., 2021)

Inúmeras técnicas cromatográficas hífenadas podem ser utilizadas para análise de perfil metabólico como a cromatografia em fase gasosa ou líquida acopladas a espectrometria de massa (SHUMAN et al., 2011; TSUGAWA et al., 2015), eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massa (CE-MS) (SASAKI et al., 2019) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (MONTUSCHI et al., 2018). A cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa é altamente sensível, precisa, reprodutível e possibilita o fornecimento de dados confiáveis para análises multivariadas (ZHANG et al., 2012), além da possibilidade de identificação das substâncias presentes nos extratos (LOPES et al., 2017).

3.7.1. Análise do perfil metabólico por CG-EM

A técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) é altamente vantajosa para identificar metabólitos de baixo peso molecular (GARCIA & BARBAS, 2011). As etapas da análise do perfil metabólico envolvem a preparação da amostra, extração das substâncias do tecido do organismo vivo, derivatização das substâncias extraídas, injeção no cromatógrafo, processamento e identificação das substâncias, análises estatísticas e interpretação dos resultados (figura 19).

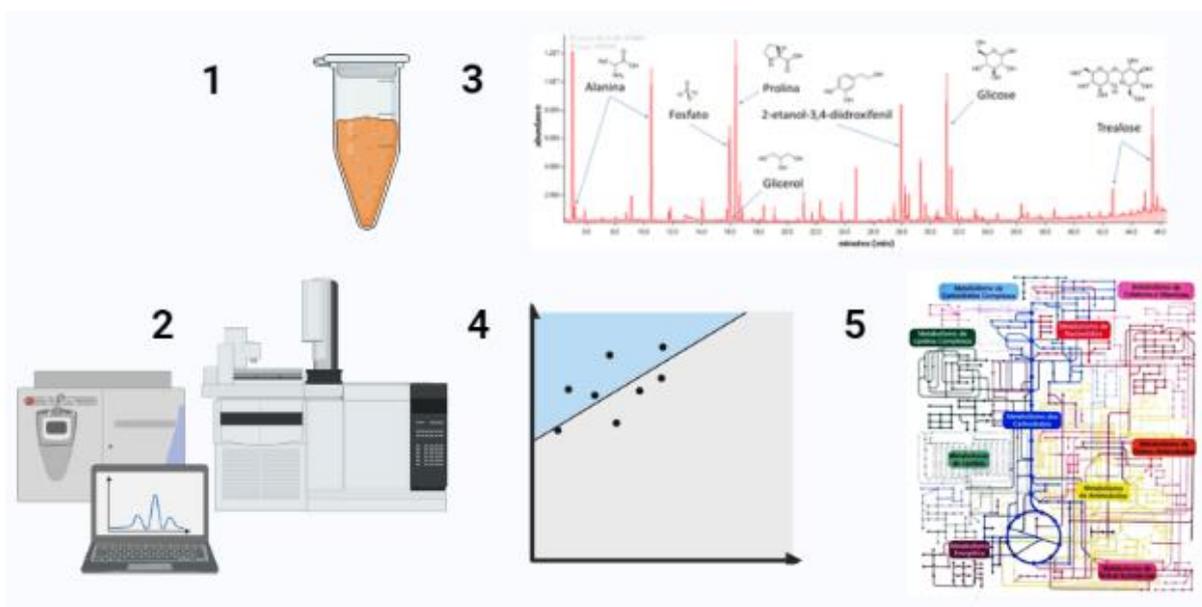


Figura 19. Esquema de análise global de metabólitos. 1. Coleta e preparo da amostra, 2. Análise instrumental, 3. Processamento de dados e identificação de metabólitos, 4. Análise estatística, 5. Interpretação biológica. Modificado de: CANUTO et al., 2018. Criado no BioRender.com

Para a realização da análise metabolômica, é preciso extrair os metabólitos das amostras biológicas e após, é feita uma partição com solvente, seguido de exclusão da fração polar e posteriormente é realizado o processo de derivatização, para que a amostra seja preparada para ser aplicada no injetor do cromatógrafo (KANANI & KLAPA, 2007). Na etapa de extração é adicionado um padrão interno, o ribitol. Por ser um açúcar, o ribitol pode ser usado para corrigir perdas da amostra em análise, garantindo a precisão do método (TREZZI *et al.*, 2017).

A derivatização com metoxiamina e MSTFA (n-metil-trimetilsilil-trifluoroacetamida) garantem proteção dos centros reativos dos metabólitos e conferem estabilidade a estrutura química (PASIKANTI et al., 2008; PAPADIMITROPOULOS et al., 2018). Na figura abaixo, segue as etapas de perfil metabólico traçado pela técnica de CG-EM. (figura 20).

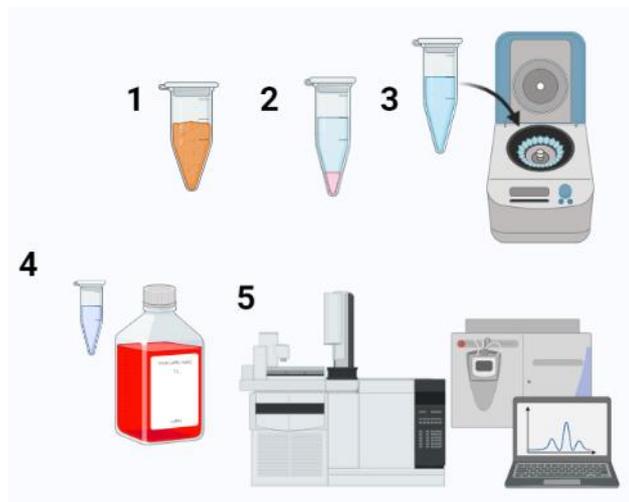


Figura 20. Esquema representativo da preparação das amostras antes da injeção no CG-EM. 1. Amostra, 2. Extração de metabólitos, 3. Partição seguido de exclusão da fração polar, 4. Derivatização, 5. Análise por CG-EM. Criado com BioRender.com

O MSTFA substitui os hidrogênios trocáveis dos grupos, carboxila e amina dos metabólitos. Os grupos carboxila e hidroxila sofrem silição mais rápido do que os grupos NH_2 . A metoxiamina reage com os grupos cetônicos ($\text{C}=\text{O}$), formando metoximas. (figura 21). Assim, os derivados dessas reações são metoxilados (MeOx) e/ou trimetilsililados (TMS) (KANANI & KLAPA, 2007; KANANI et al., 2008).

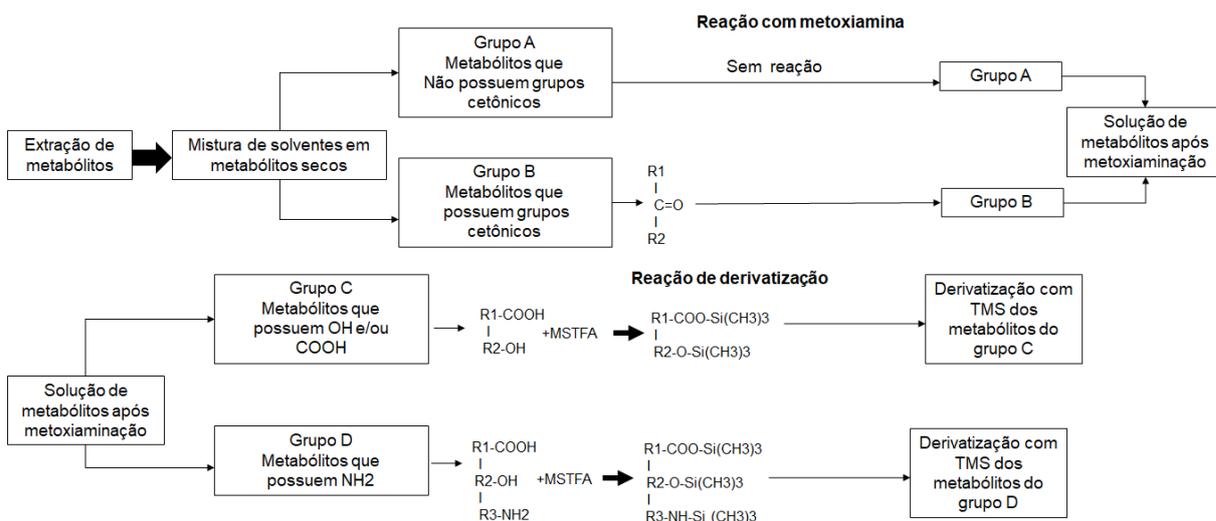


Figura 21. Esquema das reações de derivatização de uma amostra biológica. Esquema das reações de derivatização de uma amostra biológica. Modificado de: KANANI et al., 2008.

Segundo a literatura, a técnica de CG-EM é a mais utilizada para investigação do perfil metabólico em plantas (FIEHN, 2016). Para análises de insetos, é mais utilizada para a busca de alvos celulares para combate de insetos-pragas, buscando a melhoria na produção de seda (LI et al., 2020), interação inseto-parasita (XU et al., 2015), investigação de transmissão de parasitas a plantas (KILLINY et al., 2018) e de vetores de doenças (CHAMPION *et al.*, 2017).

Essa técnica analítica permite a construção de uma biblioteca de espectros, baseada nos índices de retenção e no padrão de fragmentação dos íons, possibilitando a identificação dos metabólitos (HILL & ROESSNER, 2013). E por ser uma técnica de alta precisão, a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, possibilita a repetição de dados quantitativos, e por isso, é uma técnica central no estudo de análises metabolômicas (TSUGAWA & FUKUSAKI, 2013).

3.7.2. Análise da expressão gênica

A expressão gênica é um processo de várias etapas que ocorre durante a etapa S da interfase do ciclo celular. Consiste na transcrição (síntese de RNA), no núcleo celular das células eucariotas e a tradução (síntese de proteínas), no citoplasma da célula (figura 22). Assim, as características de um indivíduo são determinadas pelos genes expressos nele.

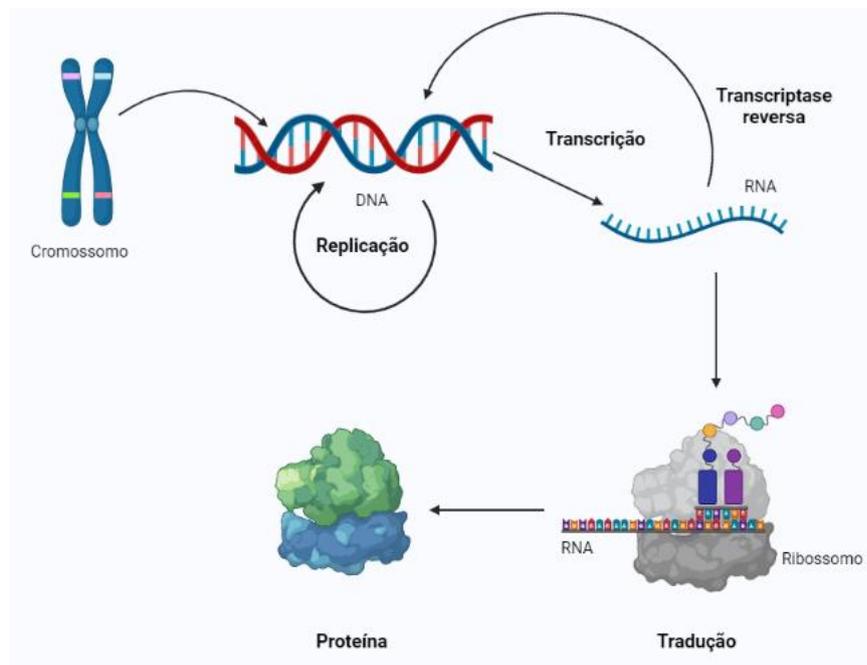


Figura 22. A expressão de um gene ocorre através da síntese de proteínas, englobando os processos de transcrição (síntese do RNA) no núcleo da célula e a tradução (síntese de

proteínas) nos ribossomos no citoplasma. A perpetuação do material genético (DNA e RNA) ocorre através da replicação no núcleo celular. Criado com BioRender.com

A análise da expressão gênica é a determinação do padrão de genes expressos, em circunstâncias específicas, direcionados para detectar e quantificar o RNA mensageiro (mRNA) de um gene específico (SEGUNDO-VAL & SANZ-LOZANO, 2016). A manipulação do DNA iniciou-se na década de 70, permitindo o desenvolvimento de inúmeras tecnologias (PORTIN, 1993) e marcando o início da engenharia genética, com a descoberta de técnicas como o DNA recombinante, abrindo os caminhos para a terapia gênica (Wolff & Lederberg, 1994; Glorioso & Lemoine, 2017) e os transgênicos (YUAN & HU, 2017). No qual, um grande marco para o avanço nos estudos em genética, foi a conclusão do projeto genoma humano, contribuindo para o conhecimento dos fatores genéticos, impactando na investigação das doenças humanas, com 1800 genes de doenças identificados (DURMAZ *et al.*, 2015).

Além de possibilitar o tratamento de inúmeras doenças, a biotecnologia trouxe inovações ao setor agrícola, pressionada pelo aumento da população mundial e por consequência da maior demanda de alimento e necessidade de minimizar perdas da produção (VARSHNEY *et al.*, 2011). Com isso, a obtenção de novas características nutricionais ou de defesa nas plantas, ocorreu através da identificação de genes com características benéficas, para uso como marcadores moleculares para seleção assistida, expressão de um organismo em outro por transgenia, como a soja Bt e criação de bancos de germoplasma (CARRER *et al.*, 2010). Os avanços em biotecnologia não só possibilitaram a modificação genética em plantas, mas em 2014 foi aprovado o primeiro inseto agrícola geneticamente modificado nos Estados Unidos (HARTLEY *et al.*, 2016).

Com isso, as tecnologias voltadas para a manipulação do DNA e especificamente para a expressão gênica possibilitam o desenvolvimento sustentável da agricultura (FANG *et al.*, 2016), diminuindo os impactos ao meio ambiente e a saúde humana decorrentes do uso exacerbado de agrotóxicos.

De acordo com autores (Segundo-Val & Sanz-Lozano, 2016), as técnicas mais utilizadas para expressão gênica são o qPCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real), microarranjos de expressão e RNAseq para a análise do transcriptoma. O qPCR é altamente utilizado para estudos em biologia molecular, pois demanda de pouca quantidade de amostra e possui alta especificidade. Tem a capacidade de ampliar um ou mais fragmentos específicos de DNA em milhões de vezes, otimizando a capacidade da geração de dados (ROBERTSON *et*

al., 2018). A elaboração da técnica exige algumas etapas como o isolamento do RNA e sua caracterização pela quantidade e integridade. Para reação de uma etapa, o RNA é utilizado como modelo, no entanto para reação com duas etapas, o cDNA é sintetizado e usado como modelo (Bustin et al., 2009), e apesar de muitos protocolos utilizarem DNA, há preferência por RNA pois é menos estável que o DNA. Para que a amplificação ocorra é necessário iniciadores ou primers, pequenas sequências de genes conhecidas ou de organismos próximos, retirados de banco de dados genômicos (WONG & MEDRANO, 2005).

A amplificação ocorre sobre temperatura e tempo controlados no aparelho termociclador. Neste aparelho a amplificação ocorre em três etapas: desnaturação, anelamento e extensão (figura 23) (BUSTIN *et al.*, 2009). É na etapa de desnaturação que os primers se ligam ao DNA desnaturado a uma temperatura de até 95°C. Na fase de anelamento, a temperatura é reduzida para que as sequências de primers possam se encaixar nas regiões respectivas complementares. A etapa de extensão consiste na ação da enzima DNA-polimerase (Taq- DNA polimerase) em temperatura de aproximadamente 72°C que junto com o co-fator de Magnésio, ocorra a síntese de DNA (SANTOS, C. F. Dos *et al.*, 2004). Após o término de um ciclo, o mesmo pode ser repetido por várias vezes, ocorrendo o aumento exponencial de sequências. O processamento da amplificação é feito através de eletroforese por gel de agarose (PRAY, 2008).

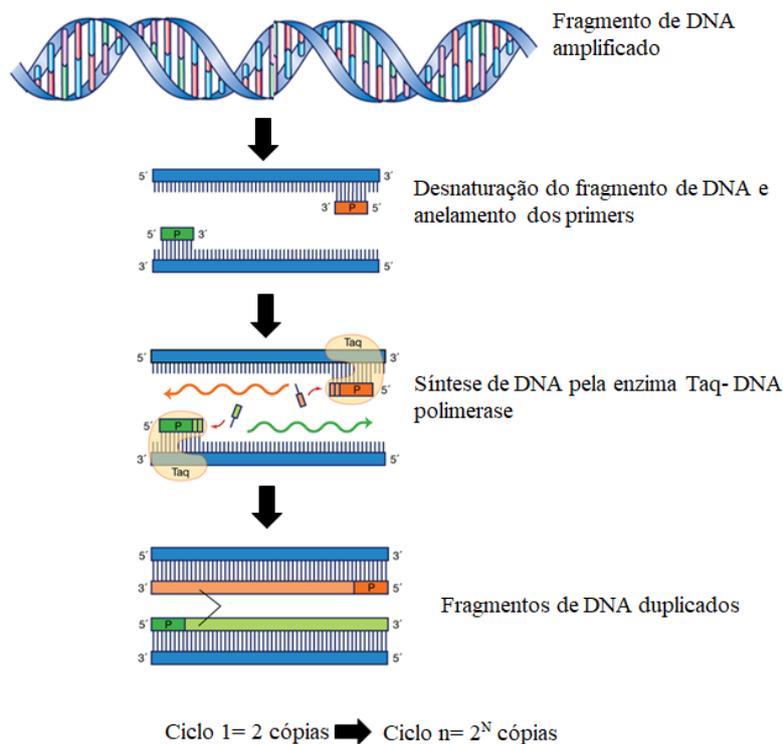


Figura 23. Diagrama esquemático da PCR com as três etapas de cada ciclo contém três etapas desnaturação, anelamento e extensão. Modificado de: SANTOS et al., 2004 e <https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction>

As mudanças no padrão da expressão gênica de um organismo, são acompanhadas de suas alterações fisiológicas (HAL, VAN *et al.*, 2000). Por isso, a análise da expressão gênica de fêmeas copuladas de *C. maculatus* expostas ao óleo essencial de capim-limão pode trazer respostas sobre o comportamento do inseto, a fim de elucidar os resultados obtidos através da análise do perfil metabolômico com o objetivo de identificar um alvo celular ou via metabólica da ação do óleo essencial sobre as fêmeas de *C. maculatus*.

Assim é possível obter informações para a elaboração de uma patente do óleo essencial de capim-limão para o controle de *C. maculatus*.

3.8. Patentes com Biopesticidas para o Controle de Pragas

Para serem comercializados como produto, os biopesticidas precisam ser registrados no MAPA, ANVISA e IBAMA e também pode ser registrado como produto fitossanitário de uso aprovado na agricultura orgânica (MAPA, 2021b), e para a produção em larga escala é necessário o registro de patentes no INPI (Instituto Nacional de Propriedade Intelectual) (TIMMERMANN, 2014). Patentes podem ser referentes a uma invenção ou alguma utilidade

para a sociedade. As de natureza inventiva, devem possuir capacidade reprodutiva, aplicação industrial e ser inéditas (Duarte et al., 2011), enquanto que o modelo de utilidade está relacionado à um objeto de uso prático e seu aprimoramento (BRANCO *et al.*, 2011). Na literatura, encontram-se inúmeras patentes de invenções registradas como biopesticidas, conforme demonstra a tabela 6.

Tabela 6. Registro de patentes relacionados com óleos essenciais e substâncias voláteis.

Óleo essencial/ substância.	Alvo de controle	Fonte
<i>Artemisia absinthium</i>	Fungos fitopatogênicos e nematóides	(Coloma, et al., 2012)
Linalol, cinamato de metila sintéticos	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	(Marques et al., 2013)
Eucalipto, citronela e pinheiros.	Carrapato	(Howard, 2014)
Citronela	<i>Aedes aegypti</i>	(Pinto & Caritá Júnior, 2017)
<i>Citrus</i> spp., <i>Eugenia caryophyllus</i> , <i>Eucalyptus globulus</i> , <i>E. citriodora</i> , <i>Melaleuca leucadendra</i> , <i>M. alternifolia</i> e <i>Azadirachta indica</i>	<i>Plutella xylostella</i>	(Câmara et al., 2018)
Cravo da Índia	<i>Candidatus liberibacte</i>	(Pinto., 2019)

Os óleos essenciais podem apresentar diferenças em sua composição química devido a diferentes fatores, como tempo de coleta da planta, estação do ano, tipo de solo gerando quimiótipos diferentes de uma mesma espécie. Por isso, COLOMA et al., 2012 propõe o quimiótipo Candial de *Artemisia absinthium* para o controle de fungos fitopatogênicos e nematóides.

E além da importância da definição do quimiotipo da espécie para a obtenção do óleo essencial, algumas patentes propõem formulações com efeito sinérgico com associação de inseticidas tradicionais, de compostos voláteis isolados e de diferentes tipos de óleos essenciais. Câmara et al, 2018 sugere a combinação de deltametrina a diversos óleos essenciais aplicado em folhas de *Brassica* spp., para o controle de *Plutella xylostella*. Para o combate ao *Aedes aegypti* foram registrados por Pinto & Caritá Júnior, 2017 o óleo essencial de citronela combinado a permetrina e cipermetrina, e por Marques et al., 2013 os compostos linalol e cinamato de metila para efeito repelente.

A combinação de diferentes óleos essenciais é promissora, pois somatiza o efeito tóxico dos óleos essenciais sobre os insetos-pragas. Howard, 2014 registrou a utilização dos óleos essenciais de eucalipto, citronela e pinheiro para a elaboração de sabonetes e spray repelente contra carrapatos.

Como foi verificado, os óleos essenciais podem ser utilizados como biopesticidas de diferentes maneiras: sabonete, spray, tintas repelentes e também podem ser incorporados a soluções fertilizantes, como o óleo essencial de cravo com a finalidade de proteger a cultura de Citros contra fungos e bactérias fitopatogênicos (PINTO, 2019).

O registro de patentes de biopesticidas é importante, pois para a indústria a patente remete a confiabilidade, proteção e de acordo com Glare et al., 2012 biopesticidas patenteados atraí investidores.

No Brasil, patentes para biopesticidas são limitadas (VAN LENTEREN, 2012), apesar de haver o aumento de biopesticidas de origem microbiano patenteados a partir dos anos 2000 (KABALUK *et al.*, 2010). Contudo, biopesticidas direcionados para o controle de pragas de grãos armazenados ainda são escassos no mercado (HOLZMANN, 2010).

Por isso, um dos objetivos do presente trabalho é o depósito de propriedade intelectual (patente) da utilização do óleo essencial de capim-limão como alternativa ao uso de agrotóxicos tradicionais no controle de *C. maculatus*, através de dispositivo fumegante, possibilitando que agricultores protejam a produção de feijão-caupi de maneira segura e sustentável.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do estudo

Os experimentos e análises foram realizados nos Laboratórios de Plantas Aromáticas e Medicinais, de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes e de Estresse Oxidativo em Microrganismos situados no Instituto de Ciências Exatas (ICE) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, *campus* de Seropédica, Rio de Janeiro.

4.2 Material

O capim-limão (*Cymbopogon citratus*) foi coletado na área experimental do Setor de Grandes Culturas, Departamento de Fitotecnia, Instituto de Agronomia/UFRRJ, (22°45'39.65"S; 43°41'55.92"O) em junho de 2017. Padrões analíticos, solventes e reagentes foram adquiridos na Sigma-Aldrich (São Paulo, SP) e Vetec (Duque de Caxias, RJ).

Sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) da variedade Guariba, de cultivo orgânico, foram doadas pela PESAGRO (Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do RJ)-Seropédica, RJ. 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. Desde então a colônia vem sendo mantida no Laboratório de Plantas Aromáticas e Medicinais (Instituto de Química/UFRRJ) com substrato feijão-caupi, em ambiente controlado: fotoperíodo natural, temperatura de 29°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) e umidade relativa de 65% ($\pm 5\%$). Os fungos *Fusarium oxysporum*. (registro: C.110) e *Colletrochium gloeosporioides* (registro: C.103) foram disponibilizados pela micoteca do setor de microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde /UFRRJ e *Aspergillus* spp. e *Penicilium* spp. foram isolados de grãos de milho seco adquiridos no comércio local e identificadas pelos manuais de identificação (KLICH, 2002)

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (isolado BY4741) foi doada pelo Laboratório de Estresse Oxidativo em microrganismos (Instituto de Química/UFRRJ) obtida da Euroscarf (Frankfurt, Alemanha).

4.3 Extração e caracterização química do óleo essencial de capim-limão

O óleo essencial foi obtido das folhas secas de capim limão após uma hora de hidrodestilação (Figura 24), separado por diferença de fase, seco com sulfato de sódio anidro e armazenado no freezer -20 °C.



Figura 24. Extração do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* por hidrodestilação (Fonte: Arquivo pessoal).

Um cromatógrafo gasoso Hewlett-Packard 5890 Series II equipado com um detector de ionização de chama (CG-DIC) com um injetor no modo “split” (1:20) foi utilizado para separar e detectar os constituintes de 1 µL do óleo essencial. A separação e análise das substâncias presentes no óleo essencial foi feita com o uso de um cromatógrafo gasoso – espectrômetro de massa Shimadzu QP-2010 Plus (CG-EM) também com um injetor no modo “split”.

Em ambos os equipamentos as substâncias foram separadas em uma coluna capilar de sílica fundida similar a DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm DI). As condições de análise e programação foram as mesmas utilizadas por (Cavalcanti et al. 2015). 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 70V, com intervalo de massa entre 40 e 400 m/z e a razão de 0,5 scan s⁻¹. A identificação das substâncias foi realizada com base na análise CG-EM, na comparação dos tempos de retenção e espectros de massa das amostras contra os dos padrões autênticos injetados nas mesmas condições, comparação dos espectros de massa das amostras contra os do banco de dados e o cálculo dos índices de retenção para auxiliar na busca (VAN

DEN DOOL & KRATZ, 1963; ADAMS, 2007). A quantificação das substâncias foi realizada com base na normalização das áreas relativas das substâncias (CG-DIC).

4.4 Avaliação do efeito fumigante do óleo essencial de capim-limão e citral contra o caruncho

Tubos de 50 mL contendo 30 grãos de feijão-caupi e 10 insetos saudáveis com dois dias de idade (1:1 fêmea/macho) foram utilizados como unidade experimental, com oito repetições para cada tratamento. O primeiro ensaio foi realizado com óleo essencial de capim-limão, que foi transferido para discos de papel filtro, previamente fixados em tampas tubulares, nas concentrações de 0,09; 0,18; 0,37; 0,55; 0,74 e 0,92 mg/cm³. O segundo ensaio foi realizado com citral, mistura de isômeros adquirido na Sigma-Aldrich Brasil (id: C83007), nas concentrações de 0,04, 0,09; 0,18; 0,27; 0,45 e 0,89 mg/cm³. (figura 25). O mesmo procedimento foi realizado para os controles, que não receberam o óleo essencial de capim-limão ou citral.



Figura 25. Tubos com sementes de feijão-caupi e aplicação do óleo essencial de capim-limão e do composto citral por fumigação em papel de filtro. Acervo pessoal.

Os tubos foram então fechados e armazenados em uma câmara a 27° C (\pm 1° C) e umidade relativa de 65% (\pm 5%). A mortalidade e a postura de ovos foram registradas 48h após a aplicação do óleo essencial e do citral. A porcentagem de oviposição foi calculada pelo número total de ovos no grupo controle. Em seguida, as tampas foram removidas e substituídas por uma tela fina e a emergência de novos adultos foi avaliada após 27 dias, e contabilizou-se o número de indivíduos emergidos. A porcentagem de emergência foi calculada pelo número

de indivíduos emergentes no grupo controle. Os testes com óleo essencial e citral foram realizadas duas vezes sob as mesmas condições.

A análise estatística dos dados de mortalidade foi corrigido com o grupo controle de acordo com ABBOTT (1925). A porcentagem de oviposição e emergência de insetos adultos, foram avaliadas pelas seguintes fórmulas: $P = T \times 100/C$, onde P, T e C são a porcentagem, média registrada nos grupos de tratamento e média registrada no grupo controle, respectivamente. Os dados foram expressos como médias aritméticas \pm SE e submetidos à ANOVA, e as diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey em $P = 0,05$, usando o software GraphPad Prism 6.0.

4.5 Revestimento das sementes de feijão-caupi com óleo essencial de capim-limão

Foram preparadas soluções (20 mL) com diferentes concentrações de óleo essencial diluídos em diclorometano (foram preparados também com etanol 95% e álcool de cereais), proporcionando soluções com 0,1; 0,01 e 0,001% de óleo essencial. A proporção de 2mL de solução para 3 g de sementes foi mantida para o procedimento de revestimento. Aquelas soluções foram utilizadas para revestir 30 g de sementes de feijão-caupi (aproximadamente 150 sementes). O modo operacional para o revestimento foi de batelada (dentro de um balão de fundo redondo acoplado a um evaporador rotativo (figura 26), programado para operar com vácuo de 350 mbar, a 70 rpm e banho maria a 30 °C até o esgotamento dos solventes orgânicos). O mesmo procedimento foi realizado para o controle (diclorometano), que não recebeu o óleo essencial de capim-limão. As sementes revestidas foram armazenadas em frascos de plástico com tampa em câmara a 7° C (\pm 1° C) protegido da luz e umidade por até 180 dias.



Figura 26. Aparelho evaporador rotativo (Laboratório de Plantas Medicinais e Aromáticas, Instituto de Agronomia-UFRRJ) Arquivo pessoal.

4.6 Lavagem e caracterização química dos resíduos presentes na superfície das sementes de feijão-caupi

Foram utilizadas 30 sementes de feijão-caupi, aproximadamente 6 g em média, revestidas previamente com óleo essencial de capim-limão nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1% e armazenadas por 30, 90 e 180 dias (Item 3.5). As amostras de sementes foram lavadas com 5,0 mL de diclorometano, em duplicata, para avaliar que substâncias do óleo essencial ainda estavam presente na superfície das sementes, ou seja, o resíduo. Em seguida, a solução foi reduzida a 1 mL sob fluxo constante de N₂ gasoso. Por fim, uma alíquota de 1,0 µL da solução foi injetada em um CG-DIC e CG-EM operando nas mesmas condições da análise de óleos essenciais (Item 3.3). O mesmo procedimento foi adotado para a injeção de alíquotas de 1,0 µL de soluções de citral (C83007- Sigma Aldrich) nas concentrações de 89,3; 0,893 e 0,089 mg/mL, como padrão externo, para aferição da concentração de neral e geranial na solução resíduo.

4.7 Avaliação da proteção conferida às sementes revestidas com óleo essencial de capim-limão contra o caruncho

O efeito protetor do revestimento com óleo essencial de capim-limão nas sementes de feijão-caupi foi observado em quatro tempos diferentes, após 7, 30, 90 e 180 dias de armazenamento. Tubos de 50 mL contendo 30 grãos de feijão-caupi e 10 insetos saudáveis com dois dias de idade (1:1 fêmea/macho) foram utilizados como unidade experimental, com cinco repetições para cada tratamento. Os tubos foram então fechados e armazenados em uma câmara a 27° C (\pm 1° C) e umidade relativa de 65% (\pm 5%).

A mortalidade e a postura de ovos foram registradas 48h após a aplicação do óleo essencial, em seguida, as tampas foram removidas e substituídas por uma tela fina e a emergência de novos adultos foi avaliada após 27 dias. Óleo essencial e ensaios de citral foram realizadas duas vezes sob as mesmas condições (figura 27).



Figura 27. Sementes revestidas com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre *C. maculatus*. Emergência de Adultos. Acervo pessoal.

A análise estatística dos dados de mortalidade foi corrigido com o grupo controle de acordo com ABBOTT (1925). A porcentagem de oviposição e emergência de insetos adultos, foram avaliadas pelas seguintes fórmulas: $P = T \times 100/C$, onde P, T e C são a porcentagem, média registrada nos grupos de tratamento e média registrada no grupo controle, respectivamente. Os dados foram expressos como médias aritméticas \pm SE e submetidos à ANOVA, e as diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey de múltiplas comparações em $P = 0,05$, usando o software GraphPad Prism 6.0.

4.8 Avaliação da toxicidade do óleo essencial de capim-limão contra fungos

Foi utilizado o método da diluição. O óleo essencial de capim-limão foi diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO) e misturado ao meio de cultura Batata-dextrose-ágar (BDA), produzindo as concentrações de óleo essencial em meio de cultura de 0,25; 0,50; 1,00, 2,00 e 4,00 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Utilizou-se o fungicida Folicur 200 EC (tebuconazol) (0,08 $\mu\text{L}/\text{ml}$) como controle positivo (+), dimetilsulfóxido (DMSO, 12 $\mu\text{L}/\text{ml}$) como controle negativo (-) e somente BDA como testemunha. Em seguida, os meios de culturas foram vertidos para as placas de Petri, no centro delas inoculados discos de ágar contendo estruturas propagativas dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Colletrochium gloeosporioides*, *Aspergillus* spp. e *Penicilium* spp., por fim, incubados por 48 horas à 26° C. Após 48 horas, as placas foram digitalizadas (Scanner HP ScanJet G2410), as imagens foram convertidas para 8-bit, processadas, analisadas e transformado em área com auxílio do Software ImageJ 1.49v (RUEDEN et al., 2016) (figura 28).



Figura 28. Elaboração de ensaios de avaliação do potencial fungicida do óleo essencial (OE) de *Cymbopogon citratus* sobre fungos fitopatogênicos. Preparação de meio de cultura + OE (método de diluição); inserção de fragmento de fungo em meio de cultura; compilação de dados de inibição de crescimento micelial.

A Análise estatística foi calculada com a média de crescimento micelial do controle em comparação com o tratamento elaborada no programa Graph Pad Prism, com a análise Anova One-Way e Tukey múltiplas comparações com $\alpha= 0,05$.

4.9 Avaliação do efeito alelopático toxicidade do óleo essencial de capim-limão na germinação de sementes de feijão-caupi

Foram utilizadas sementes orgânicas de feijão-caupi (variedade Guariba PESAGRO) previamente revestidas com óleo essencial de capim-limão nas concentrações de 0,1; 0,01 e 0,001% (item 3.5). Para avaliar a germinação das sementes foram transferidas para substrato areia 12 sementes por potes de germinação (unidade experimental). Realizou-se o teste de drenagem de água utilizando-se 10 ml de água para a irrigação, os potes foram incubados em ambiente controlado ± 25 °C, durante sete dias para realização da primeira contagem e a germinação avaliada conforme descrito na Regra de Análise de Sementes (MAPA 2009) (figura 29).

A análise estatística foi realizada com base nas médias do grupo controle, análise de variância (Anova One-Way) e teste Tukey de múltiplas comparações com $\alpha= 0,05$, utilizando o programa Graph Pad Prism 6.0.



Figura 29. Teste de germinação, sementes revestidas com óleo essencial de capim-limão nas concentrações de 0,1; 0,01; 0,001%, substrato areia. Acervo pessoal.

4.10 Avaliação da toxicidade do óleo essencial de capim-limão sobre leveduras

A determinação da concentração mínima inibitória (CIM) do óleo essencial foi realizada através da técnica da micro diluição em placa de 96 poços de fundo chato e com tampa, método adaptada de CASTRO & LIMA (2010). Inicialmente, foram vertidos nos poços 50 μL de caldo YPD, constituído de peptona 2%, glicose 2% e extrato de levedura 1%. Em seguida, verteu-se em um dos poços 50 μL de mistura de óleo essencial e meio YPD, obtendo concentração inicial de 10 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$. A partir de metade do volume da concentração inicial foram constituídas as demais diluições, pelo método da diluição seriada, como pode ser observado na figura 30. Em seguida, foram adicionados 10 μL de inóculo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (isolado BY4741) em meio YPD, de forma a obter Densidade Óptica de 600 nm com leitura de espectro da suspensão de células que foi colocada em cada poço de 0,3. O controle negativo foi preparado com meio de cultura sem o óleo essencial de capim-limão e o controle positivo com o meio de cultura não inoculado. Após 1, 3 e 24h de contato com as leveduras, a citotoxicidade do óleo essencial nas diferentes concentrações foi avaliada pelo método da capacidade metabólica das células vivas de converter resazurina em resorufina. Desta forma, 10 μL de solução de resazurina 0,01% (m/v) foi adicionado aos poços e, após 30 min, observado a coloração dos poços, que quando rosa indicaram a presença de atividade metabólica, portanto que as células estavam vivas, enquanto a violeta indicou a ausência de células vivas.

O teste de exposição do óleo essencial a leveduras é um teste qualitativo, colorimétrico e por isso não houve aplicação de teste estatístico.

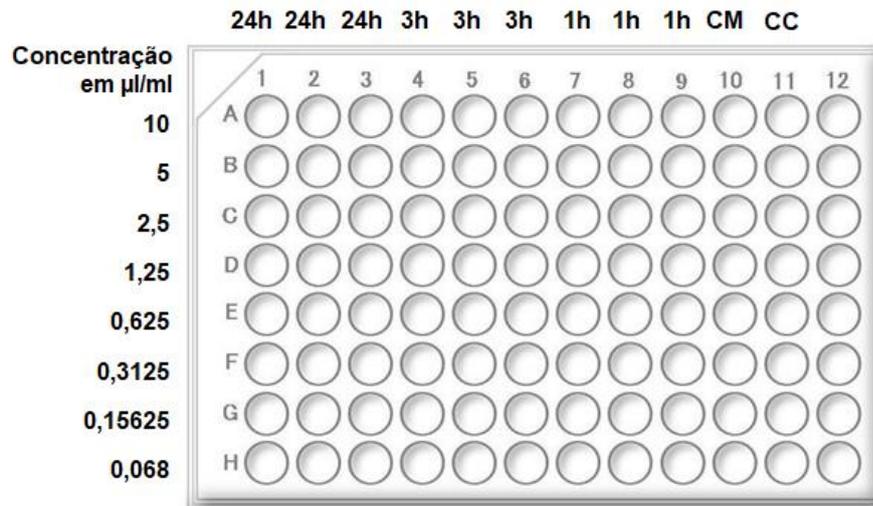


Figura 30. Delineamento qualitativo de exposição de leveduras ao óleo essencial de *C. citratus* em meio de cultura BDA. Linhas horizontais A à H (concentração de óleo essencial/ meio YPD), linhas verticais 1 à 11: tempo de exposição e controles (CM = apenas meio de cultura BDA; CC= células+ meio de cultura BDA).

4.11 Perfil metabólico de fêmeas do caruncho sob efeito fumigante do óleo essencial de capim-limão

a) Extração:

Em tubos Falcon de 50 mL contendo 30 sementes de feijão-caupi foram adicionadas 21 fêmeas copuladas do caruncho e expostas ao efeito fumigante do óleo essencial (procedimento do item 3.4), na concentração de 0,37 mg/cm³ (condição de subletalidade) por 12 horas. Foram produzidas 4 repetições para o tratamento com óleo essencial e sem óleo essencial (controle). As amostras contendo 100 mg dos insetos (21 fêmeas) dos tratamentos foram transferidas para microtubos e armazenadas a -80°C. Os insetos foram homogeneizados por 5 min a 20 Hz em etanol absoluto gelado com 60 µl de padrão interno ribitol (0,2 µg/ µl) como padrão interno. Depois, agitado em vórtex por 15 min a 70 °C em termomix a 950 rpm e centrifugado por 10 min a 11.000 g. O sobrenadante foi transferido para um frasco de vidro e a ele adicionado 750 µl de clorofórmio (pré-resfriado a -20°C) e 1500 µl de água (pré-resfriada a 4°C). A solução foi novamente agitada em vórtex por 30 s e centrifugada a 11.000 g por 5 minutos. A fase polar (superior) foi retirada (150 µL, transferidas para microtubos de 1,5 ml e seca em um concentrador de vácuo sem aquecimento, onde foi armazenada a -80°C.

b) Derivatização das substâncias no extrato:

As amostras nos microtubos foram colocados por 30 min no concentrador a vácuo e após foi adicionado 40 µL de cloridrato de metoxiamina. Os tubos foram agitados por 2 horas a 37°C no Thermomixer e posteriormente, adicionou-se 70µL de MSTFA (n-metil-n-trimetilsilil trifluoracetamida). Em seguida, os tubos foram agitados por 30 min a 37°C, no Thermomixer. As amostras foram transferidas para “vials” apropriados para CG-EM.

c) Análise química, quantificação e caracterização dos metabólitos:

Após a derivatização, alíquotas de 1 µL foram injetadas no CG/MS para a análise do perfil metabólico. A identificação dos picos e construção da biblioteca foi estabelecida considerando o índice de retenção calculado com base nos tempos de retenção dos metabólitos detectados nas amostras e nas misturas de ésteres metílicos de ácidos graxos, também por comparação com os padrões analíticos injetados nas mesmas condições e por comparação com a biblioteca NIST 2008. A biblioteca de aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares e outros compostos foram feitas com base em padrões analíticos adquiridos na Sigma-Aldrich (realizadas pelo professor Marco André Alves de Souza IQ/UFRRJ em outro projeto) a partir de dois parâmetros, o índice de retenção e fragmentos de massa específicos para cada metabólito.

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).

4.12 Análise da Expressão gênica por qPCR em tempo real

Foi realizada análise da expressão gênica de fêmeas copuladas de *C. maculatus* expostas ao óleo essencial de capim-limão de acordo com o item 3.4 (PFAFFL et al., 2002; ALMEIDA-OLIVEIRA et al., 2017) Os kits reagentes utilizados foram da Sigma-Aldrich , Thermo Fisher Scientific e Firepol. A escolha das enzimas para verificação da expressão foi baseada nos dados obtidos do perfil metabólico de fêmeas copuladas expostas e não expostas ao óleo essencial de capim-limão.

a) Tratamento das fêmeas

As fêmeas de *C. maculatus* foram expostas ao óleo essencial de capim-limão de acordo com o item 3.4. A exposição das fêmeas copuladas de *C. maculatus* ao óleo essencial ocorreu da seguinte maneira: em tubos Falcon (50 mL) contendo 30 grãos do feijão e 5 fêmeas em quintuplicata, foram submetidas ao tratamento com o óleo essencial na concentração de 0,37 mg/cm³ de *C. citratus*, durante 12 hrs. A metodologia modificada de exposição ao óleo essencial foi de acordo com ALVES et al. (2015a).

b) Extração do RNA total

Cinco fêmeas copuladas de *C. maculatus* expostas e não expostas ao óleo essencial de *C. citratus* foram maceradas com pistilo em 600 µL de trizol (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) (o trizol rompe as membranas) e o RNA foi extraído conforme as instruções do fabricante. A amostra foi mantida em temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugada por 15 minutos a 14.000 rpm a 4°C. em seguida 500 microlitros do sobrenadante foi transferido para um outro tubo. Em seguida adicionou-se 200 µL de clorofórmio e agitado em vórtex e posteriormente mantido por 2 minutos em temperatura ambiente. Em seguida a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 14.000 rpm a 4°C. a fase superior aquosa (polar) 200 µL foi transferida para um outro tubo. Foi adicionado 500 µL de isopropanol, misturado por inversão 4 vezes para isolar o RNA, mantido por 10 min em temperatura ambiente e centrifugado por 15 minutos a 14.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao pellet formado foi adicionado 500 µL de etanol absoluto, centrifugado por 15 minutos a 14.000 rpm a 4°C. Após, o etanol foi descartado, adicionou-se de entre 20-30 µL de água RNase e agitado em vórtex para diluir o pellet.

c) Quantificação do RNA total extraído

A pureza das amostras foi quantificada em Nanodrop spectrophotometer ND-1000 (Thermo Fischer Scientific), utilizando 1 µL de água nucleasse free para calibrar o aparelho. Todas as amostras tiveram taxas de A260/A280 entre 1,8 e 2,0. Após a quantificação do RNA extraído a integridade e qualidade do RNA foi analisada com uma eletroforese em gel de agarose 1,5% e um micrograma de RNA foi tratado com DNaseI livre de RNase, usado para sintetizar amostras de cDNA usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade.

d) Tratamento do RNA total com DNase

O protocolo utilizado foi do fabricante (Sigma-Aldrich), aplicou-se 2 µL do mix (1 µL de DNase e 1 µL de tampão de DNase) por 30 minutos a 37°C em um volume final de 10µL nas amostras. Depois disso, a reação foi interrompida com a incubação em 70°C e adição de 50 mmol de EDTA.

e) Síntese de cDNA fita simples (sscDNA)

O RNA tratado foi utilizado para sintetizar o cDNA com o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) em um volume final de 20µL. Para 1 µg de RNA. Adicionando-se a amostra 2 µL do tampão transcriptase (RT buffer), 1 µL de transcriptase reverse, 0,8 µL de dNTP mix e 2 µL de Randon primer. Em seguida, foi realizada uma diluição de 5 vezes, adicionando 80 µL de água miliq. Utilizamos o termociclador com a seguinte programação: Step 1 (25 C°, 10 min); Step 2 (37 C°, 120 min); Step 3 (80 C°, 5 min) e Step 4 (4 C°, ∞).

f) Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)

As reações de polimerase em cadeia utilizaram o kit Taq PCR Master Mix (Qiagem) em duas condições: um ciclo por 2 minutos a 96°C, seguido por 40 ciclos de 45 segundos a 96°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C e no final, 72°C por 5 minutos. O primer ribossomal (18S) foi utilizado para verificar a viabilidade e foi adotado como controle : Sense ATTCGTATTGCGACGTTAGAG e Anti-sense CTGGCATCGTTTATGGTTAGA, desenhado no programa Transeq. O outro ciclo por 2 minutos a 96°C, seguido por 40 ciclos de 45 segundos a 96°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C e no final, 72°C por 5 minutos. Os primers (MSA35) Glicogênio fosforilase, (MSA38) Hexocinase, (MSA40) Lactato desidrogenase, (MSA41) Malato desidrogenase, (MSA50) 18S proteína ribossomal sintetizados utilizando o software Primer3, foram programados para anelarem a 59° e 61°C. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,8% e visualizado sobre luz UV.

g) Construção dos primers

As sequencias de interesse foram obtidas a partir do banco de dados do transcriptoma dos diferentes estágios de desenvolvimento (larva, pupa e adultos) (Sayadi A., et al 2016)

(Dados da referência: Sayadi A, Immonen E, Bayram H, Arnqvist G. The De Novo Transcriptome and Its Functional Annotation in the Seed Beetle *Callosobruchus maculatus*. PLoS One. 2016 Jul 21;11(7):e0158565. doi: 10.1371/journal.pone.0158565. PMID: 27442123; PMCID: PMC4956038.). As sequências dos contigs foram traduzidas em todos os frames usando o programa Transeq (MADEIRA et al., 2019). As proteínas de interesse foram identificadas utilizando perfis HMM (Hidden Markov Model) com o programa HMMsearch do pacote HMMER v3.1b2 (Eddy, 2011) com o pipeline FAT (cedido pela professor Rafael Dias Mesquita, IT, Departamento de Bioquímica - UFRJ). Os perfis HMM foram obtidos no base de dados (FINN et al., 2014; EL-GEBALI et al., 2019). Para a proteína ribossomal 18 S de *C. maculatus* foi utilizado sequência de referência, número de acesso FJ000512. Para as enzimas Hexocinase, glicogênio fosforilase, lactato desidrogenase e malato desidrogenase as sequencias de referência de *Drosophila melanogaster* com seguintes números de acesso no NCBI: NP_524848.1, NP_001027219.1, np_001261474.1 e NP_650696.1, respectivamente. Todas as proteínas selecionadas foram automaticamente anotadas pelo pipeline FAT, por similaridade contra os bancos de dados Uniprot-Swissprot (Bateman et al., 2021) e uniref90 (Suzek et al., 2015) usando o programa blastp do pacote blast+ v2.2.31 (CAMACHO et al., 2009). Finalmente o pipeline FAT identificou todos os domínios conservados de cada proteína também usando perfis HMM do banco de dados PFAM-A (Mistry et al., 2021) com o programa hmmscan do pacote HMMER . Os contigs obtidos para Hexocinase, glicogênio fosforilase, lactato desidrogenase e malato desidrogenase foram GEUF01021993.1, GEUF01026757, GEUD01105108.1, GEUD01162009.1. Todas as sequências foram então manualmente conferidas para escolha do contig para uso em biologia molecular. .construção dos primers foi necessário a sequência de nucleotídeos de um banco de dados do NCBI a partir do código de acesso fornecido em artigos e Pubmed das proteínas de interesse. As proteínas foram escolhidas com base nos resultados observados na análise do perfil metabólico de fêmeas de *Callosobruchus maculatus*.

h) Teste de eficiência dos primers sintetizados

As reações de polimerase em cadeia utilizaram o kit Taq PCR Master Mix (Firepol) em duas condições: um ciclo por 2 minutos a 96°C, seguido por 40 ciclos de 45 segundos a 96°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C e no final, 72°C por 5 minutos. Os primers foram sintetizados (tabela 7) de acordo com o item anterior (3.11.2.7). Os produtos do PCR foram

definidos em tamanhos entre 120 e 200 pares de base e programados para anelarem a 59° e 61°C. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,8% e visualizado sobre luz UV.

Tabela 7. Sequência e eficiência (%) de primers amplificados dos genes de interesse de *C. maculatus*

Código	Tamanho	Proteína	Sentido	Sequência	Eficiência
MSA35f	237 bp	Glicogênio fosforilase	Sense	GACAGAAACCTGGCCGAGAA	96,748%
MSA35r			Anti-sense	AATAGCCAGAGACGGATGCG	
MSA38f	226 bp	Hexocinase	Sense	CAGGTACCACCCCATTTCC	98,854%
MSA38r			Anti-sense	CAGATAACCGCGCAGTGTTG	
MSA40f	243 bp	Lactato desidrogenase	Sense	AATCAATGTAGCCGGCGTGA	90,965%
MSA40r			Anti-sense	TCGATACCGTGAAGTCCCCT	
MSA41f	221 bp	Malato desidrogenase	Sense	GTCAAGGCGTAGAACCGGAA	89,83%
MSA41r			Anti-sense	AAACCGCGCAGTAGCAAAAG	
MSA50f	240bp	18S	Sense	ATTCGTATTGCGACGTTAGAG	93,632%
MSA50r			Anti-sense	CTGGCATCGTTTATGGTTAGA	

i) PCR em tempo real

A qPCR foi realizada em um sistema StepOnePlus (Thermo Fischer Scientific) com Power SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems). A reação continha 7,5µL do SYBR, 0,3µL dos primers forward e reverse e 0,75µL de cDNA avolumado com água para obter um volume final de 15µL. As reações foram realizadas em MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystems), com a seguinte programação: 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, e uma curva de dissociação. Controle negativo foi executado para determinar se as misturas de reação estavam contaminadas com DNA exógeno. O primer de referência utilizado foi a proteína ribossomal 18S (conforme tabela 7). Com os resultados do qPCR foi realizado o cálculo de eficiências dos primers (tabela 7).

j) Cálculo da expressão relativa dos genes

A eficiência dos primers foi determinada pelos valores do ciclo de quantificação (Cq) obtidos após qPCR utilizando amostras de cDNA diluídas em série (MEUER et al., 2001). Para

o cálculo da expressão relativa dos genes e quantificação da expressão baseada no primer de referência da proteína ribossomal 18S, foi utilizado o software REST de acordo com PFAFFL et al., 2002. As representações gráficas foram construídas utilizando o Prism 8.0 software (GraphPad Software, San Diego, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização Química do Óleo Essencial de Capim-Limão

O óleo essencial (OE) apresentou cor amarelo ouro, odor forte cítrico, densidade entorno de 0,89 g/cm³ e rendimento de 1,2% (m/m). A análise química do óleo essencial (tabela 8) revelou um perfil rico em citral (neral +geranial) (77,493%) Também se verificou a presença dos monoterpenos mirceno (12,57%), (Z)-isocitral (1,22%) e (E)-isocitral (1,76%).

Tabela 8. Composição química do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*).

N	Nome	IRc	IRLt	A (%)
1	5,6 dimetil-hepten-2-ona	986	981	0.620
2	Mirceno	991	988	12.45
3	(Z) β-Ocimeno	1037	1032	0.38
4	(E) β-Ocimeno	1047	1044	0.24
5	6,7 Epoximirceno	1093	1090	0.22
6	Linalool	1101	1095	0.96
7	Isocitral	1144	1140	0.49
8	N.I.	1148	–	0.26
9	Citronelal	1153	1148	0.17
10	(Z)-Isocitral	1164	1160	2.14
11	Epóxido de rosefurano	1175	1173	0.19
12	(E)-Isocitral	1183	1177	2.98
13	Dihidrocarveol	1195	1193	0.30
14	Citronelol	1223	1223	0.12
15	N.I.	1234	–	0.21
16	Neral	1244	1235	34.63
17	Geranial	1275	1264	42.80
18	Undecanona	1294	1293	0.44
19	Geranil acetato	1385	1379	0.24
20	Triidecanona	1496	1496	0.160

Total	100
-------	-----

A composição química foi analisada por CG-EM e organizada na tabela por ordem de eluição na coluna cromatográfica. A(%) = concentração [Conc. (%)] foi calculada com base na área total do pico por CG-DIC. IRLC e IRLI representam respectivamente os índices de retenção linear calculados e da literatura (tabelado). Não identificado (n.i.).

5.2 Efeito fumigante do óleo essencial contra o caruncho

Observa-se que o óleo essencial de *C. citratus* não apresenta alta toxicidade sobre os insetos adultos de *C. maculatus*, apresentando mortalidade de 61% na concentração de 0,92 mg/cm³. No entanto, foi possível verificar de acordo com a tabela 9 que a concentração mínima de 0,37 mg/cm³, foi suficiente em inibir a oviposição e reduzir a emergência dos adultos provenientes das sementes de feijão-caupi tratadas.

Tabela 9. Efeito letal¹ e subletal² do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e citral sobre *Callosobruchus maculatus* em condições de laboratório.

Concentração (mg/cm ³)	Mortalidade (%) ¹	Oviposição (%) ²	Emergência (%) ²
Óleo essencial de capim-limão			
0,00	1,25 ±0.85f	100,00a	100,00a
0,09	4,28 ±1.37ef	32,87 ±9.57b	48,95 ±16.68b
0,18	10,00 ±1.62de	4,00 ±1.92c	10,32 ±6.27c
0,37	18,56 ±3.87cd	2,27 ±1.17c	2,25 ±1.17c
0,55	30,00 ±3.62bc	0,93 ±0.37c	0,97 ±0.39c
0,74	38,11 ±2.165b	1,07 ±0.73c	1,05 ±0.72c
0,92	61,43 ±4.55a	0,93 ±0.51c	0,95 ±0.52c
F (df)	= 49.69 (6, 105)	= 98.23 (6, 98)	= 31.53 (6, 98)
P	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Citral (neral + geranial)			
0,00	0,00f	100,00a	100,00a
0,04	17,14 ±1.25e	61,45 ±9.60b	18,49 ±9.03b
0,09	30,00 ±1.48d	55,71 ±6.52bc	1,51 ±0.82c
0,18	31,43 ±0.97d	29,51 ±3.83d	0,86 ±0.86c

0,27	40,00c	26,38 ±4.73d	0,00c
0,45	53,33 ±2.84b	34,09 ±4.22cd	0,00c
0,89	85,00 ±3.16a	28,95 ±2.79d	1,96 ±1.25c
F (df)	= 246,3 (6, 105)	= 25,33 (6, 103)	= 154,30 (6, 103)
P	<0.0001	<0.0001	<0.0001

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey ($\alpha=0.05$). Os dados foram expressos como média aritmética \pm o erro padrão de dois experimentos independentes.

Ao contrário do óleo essencial de *C. citratus*, o composto isolado citral apresentou maior índice de mortalidade, onde a concentração de 0,89 mg cm³, foi suficiente para provocar a mortalidade de 85% da população de insetos (Tabela 9).

Em comparação com o óleo essencial de *C. citratus* o composto citral não apresentou efeito similar em relação a postura de ovos e isto pode estar relacionado ao fato do óleo essencial ser a combinação de compostos voláteis. No entanto, o citral apresentou similar efeito sobre a emergência de novos adultos, indicando que o citral é o provável bioativo do óleo essencial de *C. citratus* responsável pela toxicidade.

5.3 Análise do perfil metabólico por CG-EM

Após a análise foram identificadas mais de 50 substâncias em fêmeas copuladas expostas e não expostas ao óleo essencial de *C. citratus*, das quais foram selecionadas 36 de interesse ao estudo, entre elas: ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares e álcoois (tabela 10). Observou-se redução significativa de ácidos orgânicos, açúcares e álcoois nas fêmeas copuladas de *C. maculatus* submetidas ao óleo essencial de capim-limão (Figura 31 e 32).

Entre os metabólitos, verificou-se redução significativa de alanina, prolina, glicose, trealose, ácido fosfórico e aumento de glicerol nos insetos tratados com óleo essencial. A redução dos teores dos açúcares trealose e glicose e de prolina apontam para o esgotamento das reservas energéticas nas fêmeas expostas ao OE, enquanto o aumento de glicerol pode estar relacionado a degradação de lipídios para atender as necessidades energéticas.

O 2-etanol-3,4-diidroxifenil é uma substância que apresenta papel antioxidante e foi encontrado em maior concentração nas fêmeas copuladas não submetidas ao óleo essencial de *C. citratus*, por outro lado, a redução de 2-etanol-3,4-diidroxifenil nas fêmeas tratadas com óleo essencial pode estar associado ao estresse oxidativo ao qual os insetos sob efeito do óleo essencial foram submetidos.

A concentração de glicerol foi maior nos insetos sob efeito do óleo essencial. O glicerol é um produto da degradação de lipídios e provavelmente as reservas energéticas estão sendo mobilizadas para manter o inseto vivo, uma vez que foi observado que o óleo essencial de *C. citratus* apresenta baixa toxicidade em *C. maculatus*.

Tabela 10. Concentrações médias dos metabólitos presentes no extrato bruto de fêmeas de *Callosobruchus maculatus*, submetidos ou não ao tratamento com óleo essencial de *Cymbopogon citratus*

Metabólitos	----- Concentração (µg/g mf) -----			
	Controle	± EP	Tratamento	± EP
1-Monoestearilglicerol	8,0	± 8,0	0,0	± 0,0
1-Monooleoilglicerol	87,4	± 41,1	12,5	± 4,2
ácido esteárico	33,2	± 5,4	20,1	± 0,4
ácido oleico	96,0	± 19,3	46,3	± 2,4
ácido palmítico	18,3	± 10,9	7,7	± 4,5
Total de lipídios	243,0	± 82,7	86,6	± 8,2
2-etanol-3,4-diidroxifenil	1035,0	± 78,0	711,7	± 14,8
ácido 3,4-diidroxifenilacetico	560,0	± 58,5	592,2	± 20,0
Catequenina	233,4	± 26,6	155,7	± 7,2
Diidroxifenilglicol	75,0	± 3,3	61,2	± 1,0
Total de aromáticos	1903,4	± 99,8	1520,9	± 7,3
ácido 3-fosfoglicérico	210,1	± 14,0	187,9	± 23,7
ácido a-cetoglutárico	176,8	± 13,5	164,7	± 16,1
ácido glicérico	36,4	± 0,9	30,2	± 1,2
ácido glúcarico	67,3	± 4,7	38,7	± 4,8
ácido láctico	127,9	± 16,0	76,5	± 6,9
ácido málico	69,7	± 6,1	45,9	± 5,0
ácido oxálico	73,6	± 6,2	79,7	± 2,3
ácido propanoico	53,8	± 1,7	29,2	± 10,0
ácido succínico	97,0	± 5,9	86,3	± 8,7
β-lactato	100,9	± 5,3	86,1	± 5,1

Total de ácidos orgânicos	1013,4 ± 36,2	825,2 ± 18,5
ácido glutâmico	481,0 ± 41,9	430,9 ± 12,9
Alanina****	1474,4 ± 88,2	1069,4 ± 33,8
Aspartato	35,7 ± 12,2	49,1 ± 4,3
b-alanina	35,9 ± 15,7	59,4 ± 14,0
GABA	53,4 ± 3,9	44,7 ± 3,4
Glicina	291,1 ± 12,8	179,6 ± 2,1
Isoleucina	112,8 ± 10,5	113,1 ± 4,5
Lisina	111,9 ± 10,3	85,0 ± 4,6
Metionina	83,0 ± 11,7	95,9 ± 3,4
Oxoprolina	182,9 ± 8,8	138,0 ± 5,7
Prolina***	1770,6 ± 74,0	1507,1 ± 27,1
Serina	166,3 ± 23,3	135,6 ± 5,8

Continuação da Tabela 11.

Treonina	114,1 ± 7,4	104,2 ± 3,2
Valina	195,6 ± 15,9	177,9 ± 5,8
Total de aminoácidos	5108,6 ± 270,1	4189,9 ± 46,1
Frutose	28,6 ± 1,5	22,5 ± 0,8
Galactose	126,4 ± 24,3	106,6 ± 19,5
Glicose***	1232,3 ± 48,3	973,8 ± 23,9
glicose-6-fosfato	0,0 ± 0,0	8,0 ± 4,7
Sacarose	38,5 ± 6,3	21,3 ± 1,4
Trealose****	1193,7 ± 74,2	863,8 ± 22,5
Total de açúcares	2619,5 ± 140,2	1996,1 ± 36,0
Glicerol*	0,0 ± 0,0	187,2 ± 37,7
glicerol-3-fosfato	305,1 ± 13,2	277,4 ± 18,8
Manitol	380,7 ± 13,7	307,4 ± 15,4
Mioinositol	63,4 ± 5,0	52,3 ± 3,7
Xilitol	19,3 ± 6,6	19,7 ± 1,1
Total de poliálcoois	768,5 ± 18,3	844,0 ± 40,1
ácido fosfórico****	1186,3 ± 57,5	759,7 ± 39,1
NI-3	229,1 ± 25,3	8,0 ± 4,7
NI-4	71,5 ± 15,6	242,3 ± 13,9
NI-5	13,4 ± 13,4	77,7 ± 3,5

Concentração relativa à área dos picos dos cromatogramas (CG-EM) normalizados com referência no padrão interno de ribitol. Média de n=4 ± o erro padrão (EP). NI representa picos não identificados.

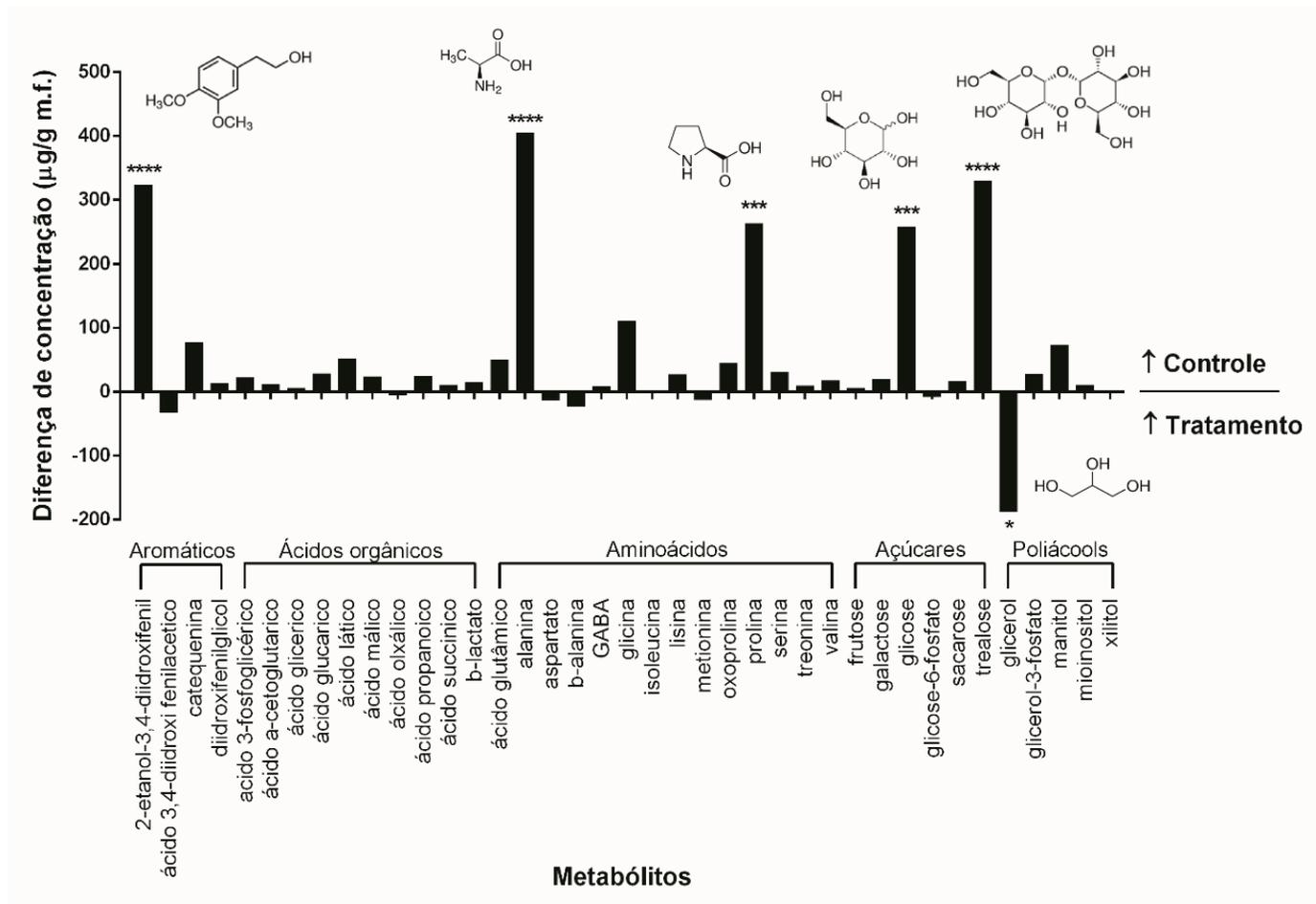


Figura 31. Análise subtrativa das concentrações dos metabólitos (controle – tratamento) encontrados no extrato bruto de fêmeas de *Callosobruchus maculatus* submetidos ou não ao tratamento com óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. Os dados foram submetidos a análise de variância (two-way ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Sidak (5%). ****, ***, **, * e * significativo com valores de $p < 0,0001$; $< 0,001$; $< 0,01$ e $< 0,05$, respectivamente.

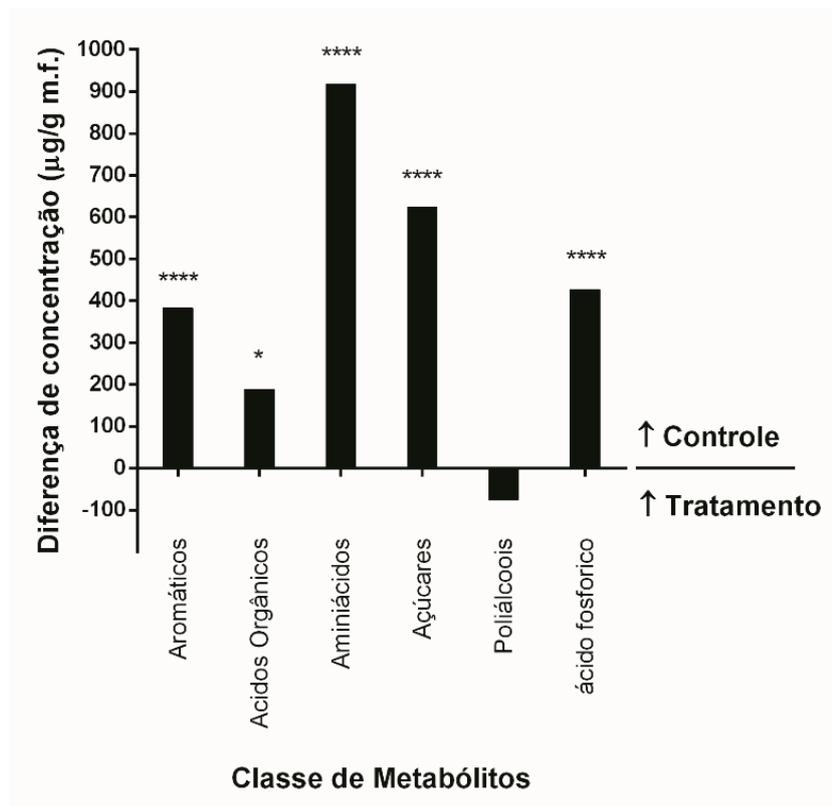


Figura 32. Análise subtrativa das concentrações das principais classes de substâncias (controle – tratamento) encontrados no extrato bruto de fêmeas de *Callosobruchus maculatus* submetidos ou não ao tratamento com óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. Os dados foram submetidos a análise de variância (two-way ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Sidak (5%). ****, ***, ** e * significativo com valores de $p < 0,0001$; $< 0,001$; $< 0,01$ e $< 0,05$, respectivamente.

5.4 Análise da expressão gênica

De acordo com a figura 33, ocorreu a diminuição significativa da expressão relativa dos genes da hexoquinase (96,3%), lactato desidrogenase (88,7%) e malato desidrogenase (82,4%), enzimas relacionadas ao metabolismo de açúcares em fêmeas copuladas expostas ao OE de capim-limão.

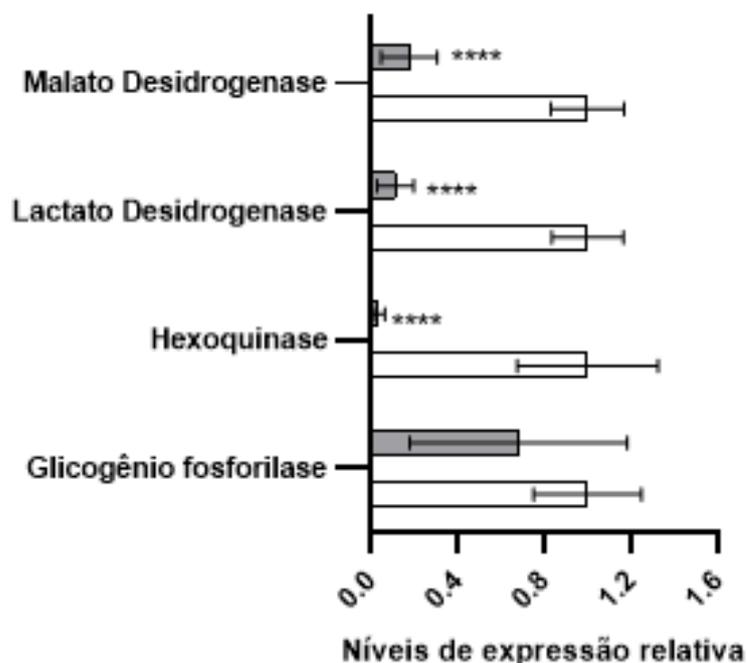


Figura 33. Níveis de expressão relativa (Cp) dos genes glicogênio fosforilase, hexoquinase, lactato desidrogenase e malato desidrogenase de fêmeas copuladas de *C. maculatus*, expostas ao OE de capim-limão. Os níveis de expressão foram normalizados com o gene de referência 18S. Barra branca (fêmea copulada controle), barra cinza (fêmea copulada exposta ao óleo essencial de *C. citratus*). As diferenças estatísticas foram determinadas através de One-way ANOVA ($P > 0.0001$). Em asterisco, amostras significativamente diferentes ($P > 0.05$).

5.5 Proteção de sementes de feijão com OE de capim-limão

As sementes de feijão-caupi revestidas com o óleo essencial de *C. citratus* apresentaram efeito tóxico sobre *C. maculatus* proporcionando proteção a semente. Na concentração de 0,1% observou-se 79,5% de mortalidade após 7 dias de armazenamento das sementes. Entretanto, observou-se da mortalidade para 5,3% aos 180 dias de armazenamento. Este mesmo comportamento foi observado nos tratamentos com 0,01% e 0,001% (Figura 34).

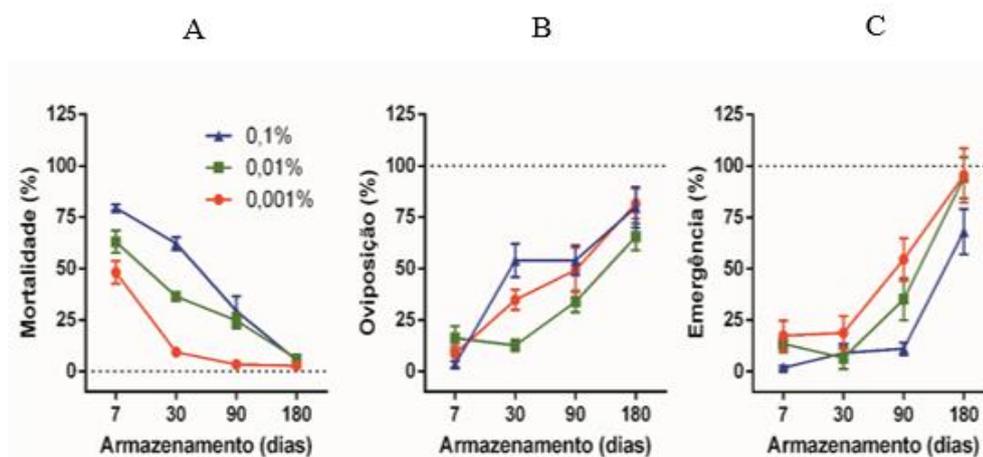


Figura 34. Valores percentuais de (A) mortalidade, (B) oviposição e (C) emergência de novos adultos de *Callosobruchus maculatus* expostos as sementes de feijão-caupi (variedade guariba), previamente tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (0,1%, 0,001% e 0,0001%) e armazenadas durante 7, 30, 90 e 180 dias, calculados e corrigidos com base nos valores absolutos dos respectivos controles. As diferenças estatísticas foram determinadas através de One-way ANOVA ($P > 0.0001$).

Em consequência ao declínio na mortalidade observou-se aumento progressivo na oviposição que passaram de 16%, 8% e 3% aos 7 dias de armazenamento para 65%, 81% e 79% aos 180 dias, respectivamente nos tratamentos com 0,1%; 0,01% e 0,001% de óleo essencial. Consequentemente, o mesmo comportamento foi observado para o surgimento de novos adultos (Figura 34). De modo geral, foi possível observar um efeito protetor até 90 dias de armazenamento, considerando a diminuição no surgimento de novos adultos, redução de 89%.

Muito provavelmente, o efeito protetor está associado a presença de substâncias protetoras na superfície do feijão de modo duradouro, como efeito residual. Deste modo, foi realizada a lavagem dos grãos e posterior a análise química, que revelou a presença de neral e geranial (citrál) na superfície dos grãos até 90 dias de armazenamento (Figura 35), com exceção das sementes revestidas com solução contendo 0,001% de óleo essencial, condição que apresentou citral na superfície somente até os até 30 dias de armazenamento.

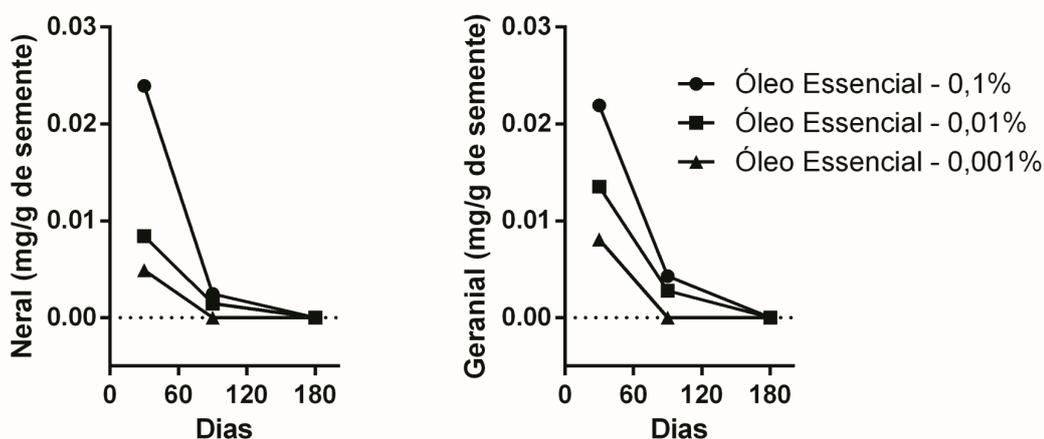


Figura 35. Quantificação dos isômeros neral e geranial (citral) presentes na superfície das sementes após lavagem com diclorometano. Sementes de *Vigna unguiculata* (feijão-caupi) revestidas com diferentes soluções contendo óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) (0,1; 0,01; 0,001%) e armazenadas por 30, 90 e 180 dias.

A concentração de neral aos 30 dias de armazenamento foi de 0,024 e 0,008 mg/g semente lavada e reduziu para 0,002 e 0,001 mg/g, após 60 dias de armazenamento, respectivamente nos tratamentos com 0,1 e 0,01%. Este mesmo comportamento foi observado para o isômero geranial, que teve as concentrações reduzidas de 0,021 e 0,013 mg/g de sementes para 0,004 e 0,003 mg/g de sementes lavadas, respectivamente nos tratamentos com 0,1 e 0,01% (Figura 35).

5.6 Atividade do OE de capim-limão sobre fungos de armazenamento

O óleo essencial de *C. citratus* foi eficiente em inibir o crescimento dos halos de todos os fungos avaliados (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp. e *Penicillium* spp.). Para todos os fungos testados o veículo (DMSO) utilizado para emulsificar o óleo essencial não inibiu o crescimento dos fungos (Figura 36). A maior concentração de óleo essencial aplicada (4 μ L/mL) foi suficiente para inibir totalmente o crescimento dos fungos equiparando-se com o controle negativo Folicur (fungicida comercial).

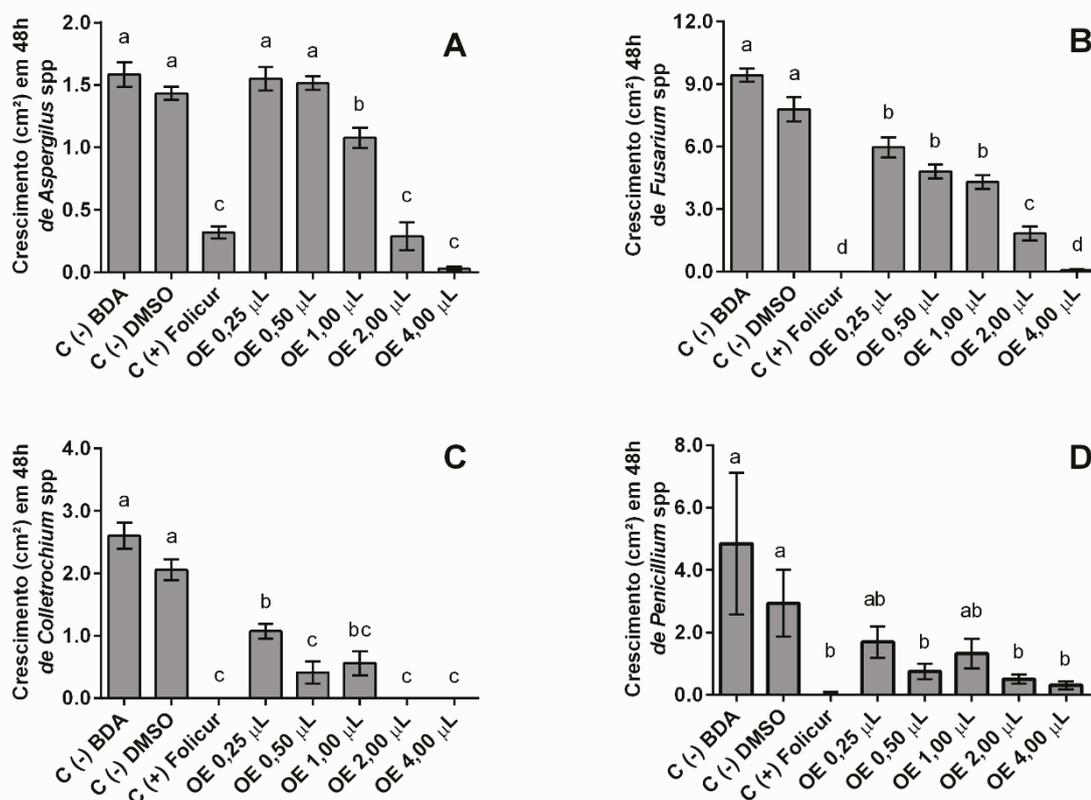


Figura 36. Efeito do óleo essencial (OE) de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) sobre o crescimento dos fungos *Aspergillus spp.* (A), *Fusarium spp.* (B), *Colletotrichum spp.* (C) e *Penicillium spp.* (D). Análise estatística elaborada no programa Graph Pad Prism, Anova One-Way, Tukey múltiplas comparações, $\alpha = 0,05$; (A), (B) (C), (D) $p < 0,0001$,

5.7 Atividade do OE de capim-limão sobre a germinação de sementes de feijão

Foi observado que o óleo essencial não interfere na germinação da semente de feijão-caupi (variedade Guariba). Não houve diferença significativa entre os grupos controles e as concentrações de óleo essencial (0%, 0,1%; 0,01%) diluídas em solventes orgânicos diclorometano (a), álcool 95% (b) e álcool de cereais (c) (Figura 37). Esse resultado demonstra que o óleo essencial de *C. citratus* além de ser promissor no controle da praga do feijão-caupi, *C. maculatus*, não interfere na germinação das sementes.

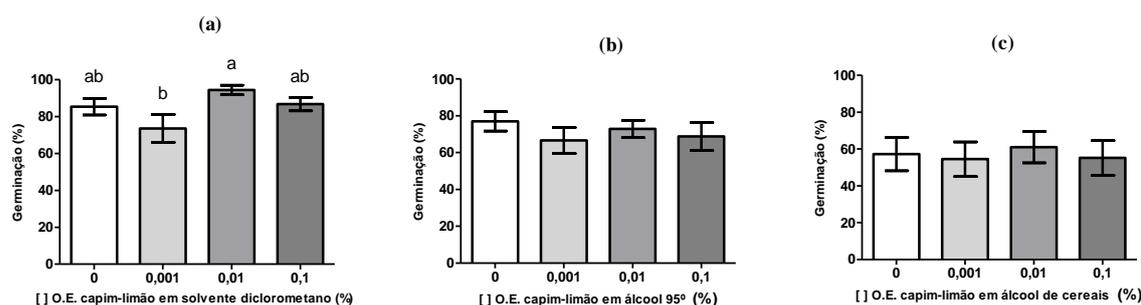


Figura 37. Germinação de sementes de *Vigna unguiculata* (feijão-caupi), variedade Guariba, submetidas ao óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) diluídas nos solventes orgânicos diclorometano (a), álcool 95% (b) e álcool de cereais (c). Anova One-Way, Tukey múltiplas comparações, $\alpha = 0,05$; (a) $p=0,041$; (b) $p= 0,6588$; (c) $p=0,9647$,

5.8 Toxicidade do OE de capim-limão as células de levedura

No teste qualitativo para a verificação de toxicidade do óleo essencial de capim-limão sobre levedura (*Saccharomyces cerevisiae* BY4741), observou-se que o óleo essencial não apresentou toxicidade no período de 1 a 3 horas de exposição nas concentrações de 2,5 à 0,068 $\mu\text{L}/\text{ml}$ de óleo essencial aplicado (Tabela 11, Figura 38).

Tabela 11. Teste qualitativo de exposição de leveduras ao OE de capim-limão em meio de cultura BDA.

Concentração ($\mu\text{L}/\text{ml}$)	Poços	24 H			3H			1H		CM	CC	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
10	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
5	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2,5	C	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
1,25	D	-	-	-	+	+	+	+	+	+		
0,625	E	-	-	-	+	+	+	+	+	+		
0,3125	F	-	-	-	+	+	+	+	+	+		
0,15625	G	-	-	-	+	+	+	+	+	+		
0,068	H	-	-	-	+	+	+	+	+	+		

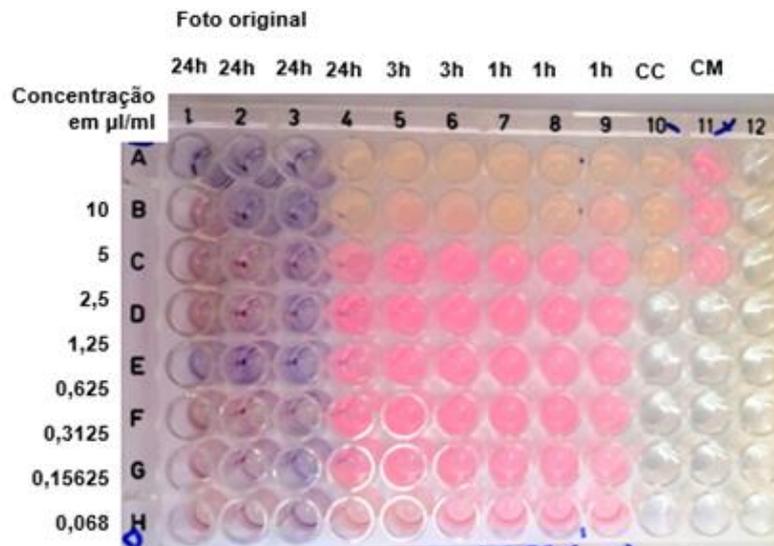
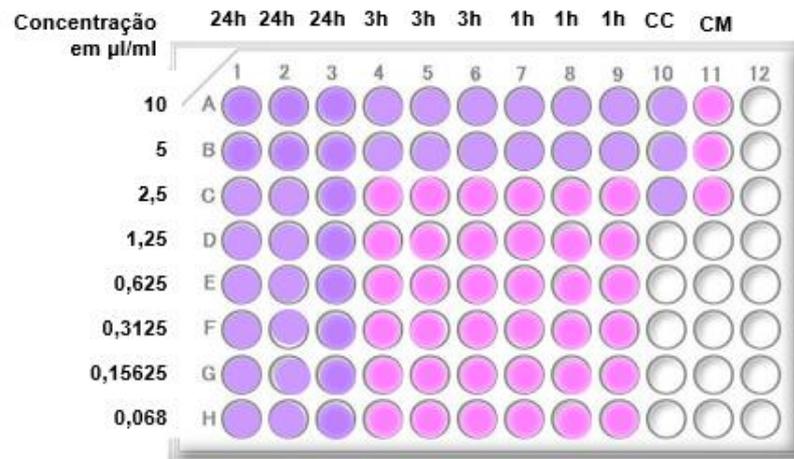


Figura 38. Delineamento qualitativo de exposição de *Saccharomyces cerevisiae* (leveduras) ao óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em meio de cultura BDA. Linhas horizontais A à H (concentração de óleo essencial/ meio BDA), linhas verticais 1 à 11: tempo de exposição e controles (CC = apenas meio de cultura BDA; CM= células+ meio de cultura BDA). A resazurina é um indicador de metabolismo (rosa= presença de metabolismo; roxo= ausência de metabolismo).

5 DISCUSSÃO

O óleo essencial de capim-limão (*C. citratus*) apresentou toxicidade de 61,43% na concentração de 92 mg/cm³ para *C. maculatus*, e inibiu seu ciclo reprodutivo (Tabela 9). Na literatura encontra-se resultados semelhantes que apresentam baixa mortalidade de *C. maculatus* sob efeito do óleo essencial de capim-limão (OWOLABI et al. 2009; OLIVEIRA et al. 2017) e para outras pragas agrícolas (TAK & ISMAN, 2016). No entanto, apesar do baixo percentual de mortalidade, o óleo essencial de *C. citratus*, mostrou-se eficiente na redução da postura de ovos pelas fêmeas de *C. maculatus*, também observado anteriormente por (KUMAR et al., 2017). Por outro lado, há relatos na literatura de elevada mortalidade de *C. maculatus* sob efeito do óleo essencial de *C. citratus* nas concentrações de 0,15 g/L (PARANAGAMA et al. 2002), 0,3 g (OJEBODE et al., 2016).

O citral, mistura dos isômeros neral e geranial, compõe mais de 76% do óleo essencial de capim-limão (Tabela 8), semelhante a outros trabalhos que também avaliaram a composição química do óleo essencial de capim-limão (ANTONIA et al. 2016; AJAYI et al. 2016; VAZQUEZ-BRIONES et al. 2015). Tanto o óleo essencial de capim-limão quanto o citral puro, foram eficazes em inibir o ciclo reprodutivo do inseto por fumigação (Tabela 9). De acordo com relatos da literatura, o citral isolado ou associado a outros monoterpenos apresenta efeito no controle de insetos-pragas (DU et al., 2016; LIMA et al., 2016; TAK & ISMAN, 2016).

As diferenças nos resultados observados na literatura, podem estar relacionados com a variabilidade na composição química dos óleos essenciais. Essas diferenças no perfil químico dos óleos essenciais podem ser explicadas por fatores ambientais, disponibilidade de nutrientes no solo, interações ecológicas, idade da planta, variações genótípicas e metodologias de extração que modulam a sua qualidade (MAHMOUD & CROTEAU, 2001; FIGUEIREDO et al. 2008). No entanto, até o momento não foi encontrado na literatura resultados semelhantes aos nossos, de baixa mortalidade associada à alta inibição da postura de ovos e emergência de insetos adultos de *C. maculatus*. Mesmo que a exposição ao óleo de capim-limão não seja 100% letal para o caruncho verificou-se excelente resultado para postura dos ovos e emergência de novos adultos. Nossos resultados mostraram que o citral é o princípio ativo no óleo essencial que apresenta a propriedade tóxica para o ciclo reprodutivo.

Resultados anteriores de Alves et al. (2019) apontaram para redução na atividade da acetilcolinesterase e consequente redução nos teores de lipídios em fêmeas de *C. maculatus* sob efeito do óleo essencial de capim-limão, como provável motivo para o aumento da mortalidade, diminuição na postura de ovos e surgimento de novos adultos. Os autores sugerem que o fluxo de energia necessário para a cópula, oogênese e a própria subsistência do adulto foram afetadas pelo estresse provocado pelo óleo essencial com ação na acetilcolinesterase.

No presente trabalho observamos nos insetos sob efeito do óleo essencial de capim-limão redução nas concentrações de glicose e trealose, que são fonte imediata de energia disponível aos insetos. Também observamos diminuição nos teores de alanina e prolina, que são aminoácidos comumente utilizados como fonte de energia pelos insetos e aumento na concentração de glicerol, um poliálcool envolvido na síntese e degradação de lipídios (Tabela 10).

O aminoácido prolina é fonte de energia proveniente da degradação de aminoácidos, com a alanina e glicose a partir de acetil-CoA e α -cetoglutarato no corpo gorduroso, no músculo de voo utilizada para a síntese de ATP (MOLLAEI et al., 2013). Por isso, após a oxidação de seus precursores, a prolina passa a ser encontrada em predominância na hemolinfa, sendo substrato para o ciclo de Krebs (metabolismo aeróbico) (STEC, 2018b). Resultados semelhantes de redução da concentração de prolina, foram observados por TEULIER et al. (2016b) em abelhas, os quais concluíram que a prolina é amplamente utilizada como fonte energética no metabolismo aeróbio para a síntese de ATP nos músculos de voo.

Segundo Downer (1981), a oxidação da prolina para síntese de ATP é desenvolvida em insetos fitófagos e alterações nos níveis de prolina e trealose em condições de estresse, seria um dos mecanismos de sobrevivência em insetos, uma maneira de manter o metabolismo ativo (TAMANG et al., 2017), e no perfil metabólico foi observado a redução da concentração de prolina em fêmeas copuladas de *C. maculatus* expostas ao óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim-limão). Portanto, a exposição ao óleo essencial de *C. citratus*, provoca a alteração do equilíbrio de moléculas importantes para o metabolismo de *C. maculatus*. Por isso, sugere-se que o aumento de glicerol pode estar relacionado ao processo de hidrólise de lipídios, ou de mobilização de outros precursores da via glicolítica ou ciclo de Krebs, para a síntese de prolina a partir de acetil-CoA e alanina. Relatos da literatura mencionam que para manter a homeostase em zangões de *Bombus impatiens* Cresson (Hymenoptera: Apidae), durante o voo, é necessário manter a concentração de trealose, ocorrendo o declínio dos níveis de prolina,

indicando preferência no estoque de carboidrato como reserva energética (STEC, 2018b). Por isso, supõe-se que a redução de glicose e trealose em fêmeas copuladas expostas ao óleo essencial de capim-limão (Figura 31), pode ser a resposta para a observação da redução de ovos postos por fêmeas de *C. maculatus* em trabalho anterior pelos presentes autores (ALVES et al., 2019). Uma vez que a oxidação da glicose, proporciona a síntese de hormônio juvenil (JH) e consequentemente vitelogenina, moléculas disparadoras do processo de maturação de oócitos nas fêmeas (MATSUDA et al., 2015a). Além disso, a concentração de trealose é regulada pelo hormônio adipocinético (AKH) que também controla a concentração de JH, vitelogenina (LU et al., 2019) e a incorporação de lipídios nos ovários, que também são importantes para o desenvolvimento dos oócitos (LILIAN et al., 2001; ATELLA et al., 2012). E no presente trabalho, ocorreu o aumento nos níveis de glicerol (Tabela 10) em fêmeas copuladas do caruncho expostas ao óleo essencial de capim-limão. Esse resultado, está em conformidade com o que foi observado por (ALVES et al., 2019) em trabalho anterior onde houve redução nos níveis de ácidos graxos e triacilglicerol em fêmeas copuladas expostas ao óleo essencial de capim-limão.

No entanto, outros autores verificaram que em ninfas de *Acanthococcus lagerstroemiae* (Kuwana) (Hemiptera: Eriococcidae) não houve alteração das concentrações de glicerol submetidas a condições ambientais de estresse. Esses insetos estocaram triacilglicerol (TG) para sobreviver durante o inverno (WANG et al., 2019). Por isso, pode-se sugerir que provavelmente com o declínio das reservas energéticas de carboidratos e aminoácidos, as fêmeas de *C. maculatus* expostas ao óleo essencial de *C. citratus*, utilizaram os lipídios como fonte energética e, por isso, houve aumento dos níveis de glicerol.

Os resultados encontrados no perfil metabólico de fêmeas copuladas expostas ao óleo essencial de capim-limão estão em conformidade com a redução da expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo de açúcares. Observou-se redução da expressão gênica relativa da enzima hexoquinase (enzima chave da via glicolítica) (Figura 33) e no perfil metabólico, observou-se declínio de glicose (Tabela 10). Isso pode estar relacionado, ao fato de que em insetos, os níveis de trealose esgotam-se rapidamente, e por isso é necessária a mobilização de glicogênio estocado no corpo gorduroso para a formação de trealose e glicose (STEC, 2018a).

Estes resultados podem indicar que está ocorrendo a mobilização de reservas em fêmeas copuladas expostas ao OE, devido ao declínio nos níveis de glicose (Tabela 10), sugerindo que

possivelmente a glicose está sendo mobilizada para sobrevivência do inseto, pois de acordo com Zhou et al. (2015), a glicose é rapidamente mobilizada quando os níveis de trealose declinam. Além disso, de acordo com autores mesmo que o glicogênio seja convertido em trealose, os seus níveis podem não permanecer elevados pois a glicose-6-fosfato pode estar sendo utilizada para a via glicolítica (CANDY et al., 1997). Autores encontraram resultados semelhantes de declínio dos níveis de trealose e glicose em larvas de *Pyrearinus termitilluminans* Costa (Coleoptera: Elateridae) submetidos a estresse hídrico (TORRES, 2007).

Parâmetro semelhante de redução significativa de expressão gênica foi observado para malato desidrogenase, enzima que converte o malato em oxaloacetato no Ciclo de Krebs. O Ciclo de Krebs, via metabólica do metabolismo energético, produz precursores para a síntese de ATP em outra etapa da respiração aeróbica, a Cadeia Transportadora de Elétrons e participa da biossíntese de aminoácidos como o glutamato, a partir de α -cetoglutarato. O glutamato é precursor de outros aminoácidos como a prolina e de intermediários do Ciclo de Krebs (figura 7) (CANDY, 1975; TEULIER et al., 2016b).

A lactato desidrogenase, enzima responsável pela formação de lactato a partir de piruvato no metabolismo anaeróbico, também apresentou redução na expressão relativa indicando que pode ter ocorrido o declínio de processos fermentativos nas fêmeas do caruncho expostas ao óleo essencial de capim-limão. Segundo autores, a enzima é importante para manter o equilíbrio redox nas células, por isso verificaram que a sua inibição promove o aumento de glicerol-3-fosfato em larvas de *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae), apresentando disfunção no metabolismo glicolítico e inibindo o crescimento corpóreo (LI et al., 2019).

Diante do exposto, observou-se que o óleo essencial de capim-limão altera a concentração de moléculas essenciais para o metabolismo energético de fêmeas de *Callosobruchus maculatus*, provavelmente impedindo o recrutamento de moléculas essenciais como a prolina, alanina, glicose, trealose, ácido fosfórico para o processo de maturação de ovos, inibindo a postura de ovos e o aumento de glicerol indicando o esgotamento das reservas energéticas em fêmeas de *C. maculatus* copuladas expostas ao óleo essencial de capim-limão.

Buscando formas alternativas de proteção ao feijão-caupi contra *Callosobruchus maculatus* e os fungos da condição de armazenamento de grãos, o revestimento das sementes com óleo essencial de capim-limão mostrou a existência de uma relação positiva entre a

concentração da solução de óleo essencial utilizada para proteção das sementes e a mortalidade (%), até os noventa dias de armazenamento das sementes tratadas com o óleo essencial de capim-limão. Por outro lado, observou-se a diminuição na mortalidade com o aumento do tempo de armazenamento, sendo que aos 180 dias o revestimento não apresentou efeito protetor às sementes (Figura 34). Os resultados do presente estudo mostraram que o tempo de proteção das sementes com óleo capim-limão foi relativamente superior a outros óleos estudados por diferentes autores: Ilboudo et al. (2010) observaram efeito protetor de sementes revestidas de feijão-caupi com os óleos essenciais de *Hyptis suaveolens* (alfazema-brava) e *Lippia multiflora* (chá-de-gambia) de 12 e 14 dias de armazenamento, contra *C. maculatus*. Outros relatos na literatura também apontam a redução de danos e o efeito protetor dos óleos essenciais em insetos-pragas, como óleo essencial de *C. citratus* (KUMAR et al., 2017) e *C. martinii* (KUMAR et al., 2007) sobre a infestação do *C. chinenses* em sementes de ervilha e o óleo essencial de *Ocimum basilicum* (manjeriço) e *C. winterianus* contra a infestação de *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae) em sementes de feijão preto (*Phaseolus vulgaris*) (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al. 2019).

No presente trabalho, a perda do efeito protetor das sementes de feijão-caupi revestidas com o óleo essencial de capim-limão, está relacionado a perda do composto volátil citral (neral + geranial) no tempo de armazenamento das sementes de feijão-caupi (Figura 35). A maior concentração residual de neral e geranial ficou um pouco acima de 0,02 mg/g (óleo essencial/sementes) tratadas com a solução de 0,1% (que equivale a 0,17 mg/g de semente) aos 30 dias de armazenamento. Até os 90 dias de armazenamento foi possível observar diferença significativa entre o controle e o tratamento com sementes revestidas com solução contendo 0,1% de óleo essencial. Apesar de ter observado a diminuição da mortalidade em função do tempo, até os 90 dias verificou-se proteção significativa das sementes com redução de mortalidade, na postura de ovos e no surgimento de novos adultos. Resultados semelhantes da relação armazenamento *versus* atividade biológica também foi relatado por outros autores em que verificaram o declínio da concentração de citral e perda de seu efeito protetor nematocida (SINGH, 2006) e inseticida (JOVANOVIĆ et al., 2020) em outras culturas como o trigo (DUDAI et al., 2000; MATASYOH et al., 2011). De acordo com esses autores, a perda de citral seria pela sua degradação a dióxido de carbono ou mesmo por sua volatilização. Isso se deve ao fato de que os monoterpenos em geral são compostos voláteis, no qual alguns fatores influenciam na sua integridade e funcionalidade como: luz, temperatura e disponibilidade de oxigênio (GUIMARÃES et al., 2008; TUREK & STINTZING, 2013), conforme observado

pelos autores em outro trabalho, a perda da concentração do monoterpeneo α -terpineno, armazenado no período de 21 dias a 38°C em luz natural (TUREK & STINTZING, 2012), e (GUIMARÃES *et al.*, 2008) relataram que a perda de citral foi de 31,79% no período de 120 dias em temperatura média de 18°C.

Por isso, a indústria alimentícia utiliza algumas estratégias para reduzir as taxas de redução de compostos voláteis como o citral, que é a utilização combinada de antioxidantes, surfactantes e encapsulação (YANG *et al.*, 2011), aumentando o tempo de efeito protetor do óleo essencial como foi verificado por (JOVANOVIĆ *et al.*, 2020), em que observaram o efeito inseticida do óleo essencial de capim-limão encapsulado prolongado por 48 horas.

De acordo com os dados apresentados, verificou-se que o óleo essencial de capim-limão foi eficiente na proteção e em manter a viabilidade das sementes de feijão caupi. Observou-se que as sementes de feijão caupi da variedade guariba revestidas com o óleo essencial de capim-limão não sofreram inibição da germinação (Figura 37). Relatos semelhantes encontrados na literatura apontam que o óleo essencial de capim-limão não é prejudicial a germinação de grãos (não apresenta efeito alelopático), como o feijão (*Phaseolus vulgaris*) (DEGAGA, 2015) e ervilha (KUMAR *et al.* 2017). No entanto, resultados contrários foram encontrados em sementes de feijão-preto (*Phaseolus vulgaris*) revestidas com óleo essencial de capim-limão e armazenadas em saco kraft por 120 dias (LEITE *et al.*, 2018), em sementes de sorgo tratadas com o extrato aquoso de capim-limão (SCHÉMAEZA *et al.*, 2012), óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* comercial revestindo sementes de caupi (XAVIER *et al.* 2012), e em sementes de milho e sorgo tratadas com o óleo essencial de *Lippia multiflora* (MOHAMED *et al.*, 2020). Entretanto, outros autores observaram que os óleos essenciais de *Hyptis marruboides* (hortelã do campo), *Aloysia gratissima* (alfazema-do-Brasil) e *Cordia verbenacea* (erva baleeira) não influenciam a germinação de sementes de soja (SILVA, A. C. Da *et al.*, 2012).

Óleos essenciais extraídos de outras plantas, também podem apresentar resultados promissores no revestimento do feijão-caupi. Barreto *et al.* (2017) verificaram que a qualidade fisiológica de sementes de feijão-caupi revestidas com os óleos essenciais de copaíba e andiroba, foi mantida não interferindo no vigor e no poder germinativo das sementes, além de inibir a incidência de fungos oportunistas decorrentes da condição de armazenamento. Leite *et al.*, (2018) também observou o efeito protetor em sementes de *Phaseolus vulgaris* (feijão-preto) armazenadas por 60 dias em garrafa pet, pelos óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum*

(canela), *Citrus sinensis* (laranja doce), *Melissa officinalis* (erva-cidreira) contra o fungo *Aspergillus* sp.

De acordo com a literatura e os resultados do presente trabalho, o óleo essencial de capim-limão é promissor para proteção de sementes contra a infestação de insetos pragas, sem comprometer o vigor das sementes e seu potencial germinativo, além de ser eficaz contra fungos oportunistas da condição do armazenamento (Figura 36). Na literatura há relatos em conformidade com os apresentados no trabalho, no qual o óleo essencial de capim-limão é eficiente no controle de fungos da condição de armazenamento de grãos, dos gêneros *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp. e *Penicilium* spp. Matasyoh et al. 2011, verificaram que o óleo essencial de capim-limão inibiu o crescimento micelial de cinco espécies de *Aspergillus* isolado do milho (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. niger* e *A. famigatus*) e segundo Helal et al., 2007 o efeito do óleo essencial de capim-limão inibindo o crescimento micelial e consequentemente reduzindo o diâmetro hifal de *Aspergillus* é devido ao rompimento da membrana plasmática e desorganização de mitocôndrias do fungo.

Outros autores analisaram a toxicidade do óleo essencial de capim-limão no desenvolvimento micelial de sete espécies de *Fusarium* spp e concluíram que as espécies *F. moniliforme* e *F. roseum* apresentam maior sensibilidade ao óleo essencial (GawaI, 2015) e os óleos essenciais de gerânio, rosa, limão e hortelã também mostraram-se eficazes no controle de *Fusarium*, em sementes de feijão preto revestidas (EL-MOUGY et al., 2007). De acordo com Sharma et al., 2017 o mecanismo de ação do óleo essencial nos fungos é provocar a plasmólise (rompimento das células), pois ocasiona o aumento da rugosidade e alteração da morfologia de hifas e esporos de *Fusarium* spp.

Foi verificado no presente trabalho a inibição do crescimento micelial de *Penicillium* spp. (figura 36D), e autores relataram que a inibição dos fungos *Penicillium verrucosum* e *Penicillium expansum* é devido a presença de monoterpênos oxigenados como o citral no óleo essencial de *C. citratus* (APARECIDA et al., 2008). Outros resultados promissores também foram observados na proteção de sementes contra o fungo *Penicillium* spp. Como as sementes de feijão preto, tratadas com o óleo essencial de *C. citratus*. (Gomes et al., 2016) e os óleos essenciais de louro, cravo e canela que apresentaram eficiência na proteção de trigo (ALDRED et al., 2008).

No entanto, resultados diversos ao presente trabalho referentes ao fungo *Colletotrichum* spp. (Figura 36 C) foram relatados na literatura, onde o óleo essencial de *C. citratus* apresentou

baixa inibição do crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* (Rabari et al., 2018) e de alta inibição em exposição ao composto majoritário isolado, o citral (HONG *et al.*, 2015).

Os resultados encontrados no presente trabalho, corroboram com as perspectivas futuras encontradas na literatura. De acordo com autores (EKPENYONG & AKPAN 2017), o óleo essencial de capim-limão é promissor na conservação de grãos contra fungos fitopatogênicos oportunistas da condição de armazenamento e insetos-pragas, pois a sua ação é devido a interação com a membrana plasmática dos fungos fitopatogênicos, desestabilizando-a e ocasionando no extravasamento de eletrólitos do citoplasma, inibindo a produção de micotoxinas, o crescimento micelial e a germinação de esporos levando à morte celular (HONG *et al.*, 2015).

Foi possível verificar que o óleo essencial de capim-limão demonstrou ser eficaz no controle de *C. maculatus*, de fungos oportunistas de armazenamento, além de não apresentar prejuízos na germinação de sementes de feijão-caupi, porém para a sua aplicação é necessário que não ocorra danos aos aplicadores ou no consumo de grãos. Por isso, foi realizado o teste qualitativo de toxicidade sobre a levedura (*Saccharomyces cerevisiae* BY4741). Leveduras são modelos eucariotos unicelulares similares às células humanas (CAZZANELLI *et al.*, 2018), e por isso são muito utilizados para possíveis índices de toxicidades aos humanos (YU & NIELSEN, 2020) e observou-se que o óleo essencial não apresenta toxicidade no período de 1 à 3 horas de exposição nas concentrações de 2,5 à 0,068 $\mu\text{L}/\text{ml}$ de óleo essencial de *C. citratus* aplicado (Tabela 11).

Resultados semelhantes foram encontrados por IRKIN & KORUKLUOGLU, 2009 em que observaram uma concentração mínima inibitória de *S. cerevisiae* de 5 $\mu\text{L}/\text{ml}$ de óleo essencial de capim-limão. No entanto, autores observaram que as concentrações de 1 e 3,0 $\mu\text{L}/\text{ml}$ do óleo essencial de *C. citratus* inibiram o crescimento de *S. cerevisiae* ocasionando alterações estruturais como o rompimento da membrana plasmática e redução da espessura da parede celular (HELAL *et al.*, 2006). Outros óleos essenciais também podem apresentar resultados similares, SIMIONATTO *et al.*, 2005 observaram que o óleo essencial de alfazema (*Aloysia sellowii*) revelou variação de 2 à 4 mg. mL na concentração mínima inibitória.

No entanto, verificou-se que o óleo essencial de *C. citratus* apresentou toxicidade a *S. cerevisiae* com 24 horas de exposição em todas as concentrações aplicadas (Tabela 11), e o mesmo foi observado por (SACCHETTI *et al.*, 2005). Entretanto, resultado contrário foi verificado por outros autores (ŠUMIGA *et al.*, 2019), em que não houve morte celular de *S.*

cerevisiae durante 24 horas de exposição ao óleo essencial de capim-limão. Provavelmente, a desconformidade em resultados encontrados na literatura e no presente trabalho, se deve a diferença na composição do óleo essencial de capim-limão. De acordo com autores, outros fatores como o solvente utilizado para emulsificação do óleo essencial, meio de cultura e condições de incubação podem influenciar na concentração mínima inibitória de óleos essenciais sobre microrganismos (VAN DE VEL et al., 2019).

Portanto, o óleo essencial de capim-limão, na concentração de 0,1%, é promissor como protetor de sementes de feijão-caupi contra *C. maculatus* em condições de armazenamento por até 90 dias, por inibir o ciclo reprodutivo desse inseto, não afetar a germinação das sementes, inibir crescimento de fungos oportunistas e com baixos índices de causar toxicidade a modelo celular eucarioto. Por isso, o óleo essencial de capim-limão possui potencial biotecnológico na proteção de sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*).

6 CONCLUSÕES

Foi possível verificar (i) o efeito letal (tóxico) e efeito subletal sobre aspectos biológicos de *Callosobruchus maculatus* administrado via tratamento de sementes de feijão-caupi com o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) armazenadas em diferentes concentrações no laboratório por um período de até 90 dias, sem que seja afetado o poder germinativo das sementes, o efeito fumigante do óleo essencial de capim-limão e citral sobre o ciclo de vida do inseto (ii) o efeito residual do óleo essencial de capim-limão nas sementes tratadas e sua relação do efeito protetor do óleo essencial de capim-limão contra o inseto, a toxicidade contra fungos da condição de armazenamento de grãos, a viabilidade de células eucariotas sobre o efeito do óleo essencial de capim-limão. (iii) a análise do perfil metabólico e expressão gênica de proteínas de importância para o metabolismo de fêmeas copuladas expostas ao óleo essencial, mostrou que há inibição da expressão relativa de enzimas atuantes no metabolismo glicídico, redução de metabólitos como aminoácidos, glicídios e aumento na concentração de glicerol indicando desequilíbrio energético em fêmeas copuladas de *C. maculatus* expostas ao óleo essencial de *C. citratus*.

7 BIBLIOGRAFIA

- ABBAS, F. *et al.* **Volatile terpenoids: multiple functions, biosynthesis, modulation and manipulation by genetic engineering.** *Planta*. Springer Verlag.
- ABBEY, Lord *et al.* Biopesticides and Biofertilizers. **Byproducts from Agriculture and Fisheries.** [S.l.]: Wiley, 2019, p. 479–500.
- ABBOTT, W. S. The Value of the Dry Substitutes for Liquid Lime. **Journal of Economic Entomology**, 1925. v. 18, p. 265–267.
- ABDEL-HAKIM, E. A.; IBRAHIM, S. S.; SALEM, N. Y. Effect of Garlic and Lemongrass Essential Oils on Some Biological and Biochemical Aspects of Corn Stem Borer *Sesamia*

cretica Larvae (Lepidoptera: Noctuidae) During Diapausing Phase. **Proceedings of the Zoological Society**, 2021. v. 74, n. 1, p. 73–82.

ABDELGAFFAR, H. *et al.* Midgut metabolomic profiling of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) with field-evolved resistance to Cry1F corn. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 2019. v. 106, n. November 2018, p. 1–9.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007.

ADEILDO CABRAL, S. Environmental Effects In Areas With Intensive Pesticide Application: Risk For Exposure At State Of Ceará, Northeast Of Brasil. **Environmental Science: Current Research**, 19 dez. 2019. v. 2, n. 3, p. 1–6.

AGROFIT-MAPA. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. 2021.

AKTAR, W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. **Interdisciplinary Toxicology**, 2009. v. 2, n. 1, p. 1–12.

AL-KHELAIIFI, F. *et al.* Metabolomics profiling of xenobiotics in elite athletes: Relevance to supplement consumption. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, 2018. v. 15, n. 1, p. 1–10.

ALDRED, D.; CAIRNS-FULLER, V.; MAGAN, N. Environmental factors affect efficacy of some essential oils and resveratrol to control growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus westerdijkiae* on wheat grain. **Journal of Stored Products Research**, 2008. v. 44, n. 4, p. 341–346.

ALMEIDA-OLIVEIRA, F. *et al.* Reference genes for quantitative PCR in the adipose tissue of mice with metabolic disease. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2017. v. 88, p. 948–955.

ALMEIDA, V. E. S. DE *et al.* Uso de sementes geneticamente modificadas e agrotóxicos no Brasil: Cultivando perigos. **Ciencia e Saude Coletiva**, 2017. v. 22, n. 10, p. 3333–3339.

ALVES, M. De S. *et al.* Efficacy of lemongrass essential oil and citral in controlling *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae), a post-harvest cowpea insect pest. **Crop Protection**, 1 maio. 2019. v. 119, p. 191–196.

ALVES, M. S. *et al.* Essential Oils composition and toxicity tested by fumigation against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) pest of stored cowpea. **Revista Virtual de Quimica**, 2015. v. 7, n. 6, p. 2387–2399.

- AN, J. *et al.* Analysis of differentially expressed transcripts in *apolygus lucorum* (Meyer-dür) exposed to different temperature coefficient insecticides. **International Journal of Molecular Sciences**, 2020. v. 21, n. 2.
- ANDRÉ CREMONEZ, P. *et al.* Biodiesel production in Brazil: Current scenario and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2015. v. 42, n. 2015, p. 415–428.
- ANVISA. **Programa De Análise De Resíduos De Agrotóxicos Em Alimentos Para Relatório Das Análises De Amostras Monitoradas No Período De 2013 A 2015**. Brasília: [s.n.], 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relatório+PARA+2013-2015_VERSÃO-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8>. Acesso em: 13 fev. 2019.
- APARECIDA, L. *et al.* Atividade Antifúngica De Óleos Essenciais Em Sementes De Feijão Cv. Carioquinha. **Horticultura Brasileira**, 2008. v. 26, n. 2, p. 6261–6266.
- APPLEBY, J. H.; CREDLAND, P. F. The role of temperature and larval crowding in morph determination in a tropical beetle, *Callosobruchus subinnotatus*. **Journal of Insect Physiology**, 2007. v. 53, n. 10, p. 983–993.
- ARMANDA, D. T.; GUINÉE, J. B.; TUKKER, A. The second green revolution: Innovative urban agriculture's contribution to food security and sustainability – A review. **Global Food Security**, 2019. v. 22, n. August 2018, p. 13–24.
- ARRESE, E L *et al.* Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. **Insect biochemistry and molecular biology**, jan. 2001. v. 31, n. 1, p. 7–17.
- ARRESE, Estela L.; SOULAGES, J. L. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. **Annual Review of Entomology**, 2010. v. 55, n. 1, p. 207–225.
- ASBAHANI, A. El *et al.* Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, 2015. v. 483, n. 1–2, p. 220–243.
- ATHENSTAEDT, K.; DAUM, G. The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, jun. 2006. v. 63, n. 12, p. 1355–69.
- ÁVALOS, A. Y PÉREZ, E. Metabolismo secundario de plantas. REDUCA (Biología). **REDUCA (Biología)**, 2009. v. 2, n. 3, p. 119–145.
- AVOSEH, O. *et al.* *Cymbopogon* Species; Ethnopharmacology, Phytochemistry and the Pharmacological Importance. **Molecules**, abr. 2015. v. 20, n. 5, p. 7438–7453.
- AZIZ, EE ; ABBASS, M. Composição química e eficiência de cinco óleos essenciais contra o besouro-do-pulso *Callosobruchus maculatus* (F.) em sementes de *Vigna radiata*. **American-**

Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science, 2010. v. 8, n. 4, p. 411–419.
Disponível em: <<https://www-cabdirect.ez30.periodicos.capes.gov.br/cabdirect/abstract/20103319503>>. Acesso em: 11 fev. 2021.

AZUCENA GONZÁLEZ COLOMA, MARÍA FE ANDRÉS YEVES, CARMEN ELISA DÍAZ HERNÁNDEZ, JESÚS BURILLO ALQUÉZAR, RAIMUNDO CABRERA PÉREZ, J. U. N. **Use of essential oils, supercritical extracts and aqueous residues generated during a process for obtaining organic extracts from the artemisia absinthium l plant.**

BAKI, M. A. AL *et al.* Insulin signaling mediates previtellogenic development and enhances juvenile hormone-mediated vitellogenesis in a lepidopteran insect, *Maruca vitrata*. **BMC Developmental Biology**, 2019. v. 19, n. 1, p. 1–14.

BALACHANDRA, B. A. H. E.; PATHIRATHNA, P. U.; PARANAGAMA, P. A. Control of stored grain pest, *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) using the essential oil isolated from *Plectranthus zeylanicus*. **Natural product research**, 23 jan. 2012. v. 26, n. 23, p. 2219–22.

BAPTISTA-SILVA, S. *et al.* The progress of essential oils as potential therapeutic agents: a review. **Journal of Essential Oil Research**, 3 jul. 2020. v. 32, n. 4, p. 279–295.

BARBOSA, F. R. *et al.* **Controle do caruncho-do-feijoeiro *Zabrotes subfasciatus* com óleos vegetais, munha, materiais inertes e malathion.** **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Disponível em: <<https://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/6458>>. Acesso em: 14 fev. 2016.

BARDIN, M. *et al.* Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? **Frontiers in Plant Science**, 27 jul. 2015. v. 6, n. JULY, p. 566.

BARON, G. L. *et al.* Pesticide reduces bumblebee colony initiation and increases probability of population extinction. **Nature Ecology and Evolution**, 1 set. 2017. v. 1, n. 9, p. 1308–1316.

BARONI, G.; BENEDETI, P.; SEIDEL, D. Cenários prospectivos da produção e armazenagem de grãos no Brasil. **Revista Thema**, 2017. v. 14, n. 4, p. 55–64.

BARRAJÓN-CATALÁN, E. *et al.* Metabolomic analysis of the effects of a commercial complex biostimulant on pepper crops. **Food Chemistry**, 2020. v. 310, n. February 2019, p. 125818.

BARRETO, G. G. *et al.* Óleos Essenciais Sobre A Sanidade De Sementes De Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* L. Walp). **I Congresso Internacional da Diversidade do Semiárido.**

2017. Disponível em: <www.conidis.com.br>.
- BARZMAN, M. *et al.* Eight principles of integrated pest management. **Agronomy for Sustainable Development**, 2015. n. 35, p. 1199–1215.
- BECK, C. W.; BLUMER, L. S. A Handbook on Bean Beetles , *Callosobruchus maculatus*. **Caryologia**, 2011. n. September.
- BERENBAUM, M. R.; JOHNSON, R. M. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. **Current Opinion in Insect Science**, 2015. v. 10, p. 51–58.
- BETTIOL, W. Biopesticide use and research in Brazil. - Portal Embrapa. **Outlooks on Pest Management**, 2011. v. 22, n. 6, p. 280–283.
- BHAVYA, M. L.; OBULAXMI, S.; DEVI, S. S. Efficacy of *Ocimum tenuiflorum* essential oil as grain protectant against coleopteran beetle, infesting stored pulses. **Journal of Food Science and Technology**. Springer India. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13197-020-04871-y>>.
- BIANCOLILLO, A. *et al.* Determination of insect infestation on stored rice by near infrared (NIR) spectroscopy. **Microchemical Journal**, 2019. v. 145, n. October 2018, p. 252–258.
- BOEKE, S. J. *et al.* Toxicity and repellence of African plants traditionally used for the protection of stored cowpea against *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Stored Products Research**, 1 jan. 2004. v. 40, n. 4, p. 423–438.
- BORGES, F. F., ROCHA, R. P., SANTI, A., SMANIOTTO ,T. A. DE S. Efeito da secagem sobre o rendimento de óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). **Global Science and Tchechnology**, 2019. v. 12, n. 3, p. 1–19.
- BORTOLOTTO, O. C. *et al.* The use of soybean integrated pest management in Brazil: a review. **Agronomy Science and Biotechnology**, 2015. v. 1, n. 1, p. 25.
- BOUCHER, O. *et al.* Exposure to an organochlorine pesticide (chlordecone) and development of 18-month-old infants. **NeuroToxicology**, 2013. v. 35, n. 1, p. 162–168.
- BOUKHATEM, M. N. *et al.* Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. **Libyan Journal of Medicine**, 2014. v. 9.
- BOUTEBOUHART, H. *et al.* Effect of Extraction and Drying Method on Chemical Composition, and Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils from *Salvia officinalis* L. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, 2019. v. 22, n. 3, p. 717–727.
- BRANCO, G. *et al.* **PROPRIEDADE INTELECTUAL**. Shirlei Fr ed. Curitiba: UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ (UTFPR), 2011.

BRASIL. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. [S.l.]: [s.n.], 2018.

_____. Decreto nº 6323. 2021. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/decreto/d6323.htm>. Acesso em: 20 jan. 2022.

BRITO, J. P.; BORTOLI, S. A. De. (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). **Toxicidade de óleos essenciais de Eucalyptus spp. sobre Callosobruchus maculatus (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae)**, 2006. v. 6, n. Ld, p. 96–103.

BRITO, Sara Samanta Silva *et al.* Bioatividade de óleos essenciais sobre *Zabrotes subfasciatus* Boh. (Coleoptera: Chrysomelidae) em feijão-comum armazenado. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, 2015. v. 10, n. 2, p. 243–248.

BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, 2009. v. 55, n. 4, p. 611–622.

CÂMARA, C. A.; GOMES DA; MELO, JOAO PAULO RAMOS DE; MORAES, M. M. DE. Produto A Base De Uma Formulação Contendo Mistura De Deltametrina E Óleos Essenciais Para O Controle Da Traça Das Crucíferas (*Plutella Xylostella*).

CAMPOS, É. *et al.* Exposure to pesticides and mental disorders in a rural population of Southern Brazil. **NeuroToxicology**, 2016. v. 56, p. 7–16.

CANUTO, G. A. B. *et al.* Metabolomics: Definitions, state-of-the-art and representative applications. **Química Nova**, 2018. v. 41, n. 1, p. 75–91.

CARLINI, E. A. *et al.* Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, jul. 1986. v. 17, n. 1, p. 37–64.

CARMO, D. A. DO *et al.* Environmental behavior and toxicity of herbicides atrazine and simazine. **Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, 30 abr. 2013. v. 8, n. 1, p. 133–143.

CARNEIRO, F. F. **Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro/São Paulo: 2015. v. 15, n. 1, p. 628. Disponível em: <<http://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/l241.pdf>>. Acesso em: 13 fev. 2019.

CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. Biotecnologia na agricultura. **Estudos Avancados**, 2010. v. 24, n. 70, p. 149–164.

CARVALHO, K. *et al.* A soluble pyrophosphatase is essential to oogenesis and is required for polyphosphate metabolism in the red flour beetle (*Tribolium castaneum*). **International**

Journal of Molecular Sciences, 2015. v. 16, n. 4, p. 6631–6644.

CASARETT, S. & D. **Toxicology The Basic Science of Poisons**. [S.l.]: [s.n.], 2008. V. 12.

CASTRO, L. O. ; RAMOS, R. L. D. De. **Principais Gramíneas Produtoras De Óleos Essenciais**. n. 11 ed. Rio Grande do Sul – Brasil: FEPAGRO, 2003.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. D. O. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de. **Revista de Odontologia da UNESP**, 2010. v. 39, n. 3, p. 179–184.

CAZZANELLI, G. *et al.* **The Yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a Model for Understanding RAS Proteins and their Role in Human Tumorigenesis**. [S.l.]: [s.n.], 2018. V. 7.

CELINA, A.; RAHMAWATI, D.; PERMANA, T. Application of Lemongrass Essential Oil as a Natural Preservative Agent for Pineapple Juice. **Iconiet Proceeding**, 2019. v. 2, n. 2, p. 69–78.

CEPEA - CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA, ESALQ, U. **ÍNDICES EXPORTAÇÃO DO AGRONEGÓCIO**. Esalq, USP. USP. Disponível em: <www.cepea.esalq.usp.br>.

CHAMPION, C. J. *et al.* ***Anopheles gambiae* : Metabolomic Profiles in Sugar-Fed, Blood-Fed, and Plasmodium falciparum -Infected Midgut** . **Dataset Papers in Science**, 2017. v. 2017, p. 1–49.

CHANDLER, D. *et al.* The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 2011. v. 366, n. 1573, p. 1987–1998.

CHATTERJEE, S. *et al.* Input-based assessment on integrated pest management for transplanted rice (*Oryza sativa*) in India. **Crop Protection**, 2020. n. October, p. 105444.

CHAUBEY, M. K. Fumigant toxicity of essential oils from some common spices against pulse beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Oleo Science**, 2008. v. 57, n. 3, p. 171–179.

CONAB. Acompanhamento da safra de grãos 2018/19. **SAFRA 2018/19- N. 7 - Sétimo levantamento**. Brasília- DF: [s.n.], 2019, p. 119.

CREDLAND, Peter F. Effects of host change on the fecundity and development of an unusual strain of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, 1987. v. 23, n. 2, p. 91–98.

CRUZ, L. P. *et al.* Evaluation of resistance in different cowpea cultivars to *Callosobruchus maculatus* infestation. **Journal of Pest Science**, 2016. v. 89, n. 1, p. 117–128.

- CUI, S. F. *et al.* Effects of hypoxia/hypercapnia on the metabolism of *Callosobruchus chinensis* (L.) larvae. **Journal of Stored Products Research**, 2019. v. 83, p. 322–330.
- DAMALAS, C. A.; KOUTROUBAS, S. D. Current status and recent developments in biopesticide use. **Agriculture (Switzerland)**, 2018. v. 8, n. 1.
- DAMALAS, C. A.; KOUTROUBAS, S. D.. Botanical Pesticides for Eco-Friendly Pest Management. **Pesticides in Crop Production**. [S.l.]: Wiley, 2020, p. 181–193.
- DANGKULWANICH, M.; CHARASLERTRANGSI, T. Hydrodistillation and antimicrobial properties of lemongrass oil (*Cymbopogon citratus*, Stapf): An undergraduate laboratory exercise bridging chemistry and microbiology. **Journal of Food Science Education**, 2020. v. 19, n. 2, p. 41–48.
- DARA, S. K. The New Integrated Pest Management Paradigm for the Modern Age. **Journal of Integrated Pest Management**, 2019. v. 10, n. 1.
- DEGAGA, E. Grain Health Protectant Activity of Essential Oils against Infestation and Damage of Haricot Bean by *Zabrotes subfasciatus* (Boheman). **American Journal of Experimental Agriculture**, 2015. v. 9, n. 1, p. 1–7.
- DEPING, G.; YONGQUAN, L.; WENLIU, G. A Review of the History and Development of Integrated Pest Management (IPM): EBSCOhost. **Plant Diseases and Pests**, 2019. v. 10, n. 2, p. 37–40.
- DEUTSCH, C. A. *et al.* Increase in crop losses to insect pests in a warming climate. **Science**, 2018. v. 361, n. 6405, p. 916–919.
- DEVI, M. BHUBANESHWARI AND DEVI, N. V. Biology and morphometric measurement of cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* fabr. (Coleoptera: Chrysomelidae) in green gram. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, 2014. v. 2, n. 3, p. 74–76.
- DING, J. *et al.* Development of extractive electrospray ionization ion trap mass spectrometry for in vivo breath analysis. **Analyst**, 2009. v. 134, n. 10, p. 2040–2050.
- DING, N. *et al.* Silencing Br-C impairs larval development and chitin synthesis in *Lymantria dispar* larvae. **Journal of Insect Physiology**, 2020. v. 122, n. September 2019, p. 104041.
- DONLEY, N. The USA lags behind other agricultural nations in banning harmful pesticides. **Environmental Health: A Global Access Science Source**, 2019. v. 18, n. 1, p. 1–12.
- DOOL, H. VAN DEN; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, jan. 1963. v. 11, p. 463–471.
- DOWNER, R. G. H. **ENERGY METABOLISM IN INSECTS**. PLENUM PRE ed. [S.l.]: A

Division of Plenum Publishing Corporation 233 Spring Street, New York, N.Y. 10013, 1981.

DU, W. *et al.* A Primary Screening and Applying of Plant Volatiles as Repellents to Control Whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) on Tomato. **Scientific Reports**, 24 abr. 2016. v. 6, n. 1, p. 22140.

DUARTE, C.; CABRAL DE ALMEIDA, G.; SANTOS, M. E. Dos. Revista Brasileira de Zootecnia Registro de Propriedade Intelectual: a patente como ferramenta de integração de instituições científicas e setor produtivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2011. v. 40, p. 181–188.

DUARTE, M. Do R.; ZANETI, C. C. Estudo Farmacobotânico De Folhas De Capim-Limão: *Cymbopogon Citratus* (Dc.) Stapf, Poaceae. **Visão Acadêmica**, 2004. v. 5, n. 2, p. 117–124.

DUDAI, N. *et al.* Biotransformation of constituents of essential oils by germinating wheat seed. **Phytochemistry**, 2000. v. 55, n. 5, p. 375–382.

DURMAZ, A. A. *et al.* Evolution of genetic techniques: Past, present, and beyond. **BioMed Research International**, 2015. v. 2015.

DUTRA, K. De A. *et al.* Control of *Callosobruchus maculatus* (FABR.) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in *Vigna unguiculata* (L.) WALP. with essential oils from four Citrus spp. plants. **Journal of Stored Products Research**, 2016. v. 68, p. 25–32.

EBERT, P. R. *et al.* Mechanisms of phosphine toxicity. **Journal of Toxicology**, 2011. v. 2011, p. 1–9.

EDGERTON, M. D. Increasing crop productivity to meet global needs for feed, food, and fuel. **Plant Physiology**, 2009. v. 149, n. 1, p. 7–13.

EKPENYONG, C. E.; DANIEL, N. E.; ANTAI, A. B. Bioactive natural constituents from lemongrass tea and erythropoiesis boosting effects: Potential use in prevention and treatment of Anemia. **Journal of Medicinal Food**, 2015. v. 18, n. 1, p. 118–127.

EL-MOUGY, N. S.; EL-GAMAL, N. G.; ABDEL-KADER, M. M. Control of wilt and root rot incidence in *Phaseolus vulgaris* L. By some plant volatile compounds. **Journal of Plant Protection Research**, 2007. v. 47, n. 3.

ELBEIN, A. D. *et al.* New insights on trehalose: A multifunctional molecule. **Glycobiology**, 2003. v. 13, n. 4, p. 17–27.

EMBRAPA. **Visão 2030: Futuro da Agricultura Brasileira**. Embrapa. Brasília-DF: [s.n.], 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/visao/trajetoria-da-agricultura-brasileira>>.

EMWAS, A. H. *et al.* Nmr spectroscopy for metabolomics research. **Metabolites**, 2019. v. 9, n. 7.

- ESTHER OJEBODE, M.; OJO OLAIYA, C. Efficacy of Some Plant Extracts as Storage Protectants against *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Biotechnology & Biomaterials**, 2016. v. 06, n. 01.
- F., M. J. J. B. O Feijão comum. Taxinomia, morfologia, histologia, parasitologia, microbiologia, composição química e usos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 1960. p. 83–104.
- FANG, J. *et al.* Applications of DNA Technologies in Agriculture. **Current Genomics**, 2016. v. 17, n. 4, p. 379–386.
- FAO. **Food Outlook – Biannual Report on Global Food Markets**. [S.l.]: [s.n.], 2020.
- FAO, O. Das N. U. Para A. E A. Resultados do Ano Internacional das Leguminosas devem permanecer para além de 2016 | FAO no Brasil | Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação**., 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/471433/>>. Acesso em: 18 jan. 2020.
- FARONI, L. R. D.; SILVA, J. De S. E. Manejo de Pragas no Ecosistema de Grãos Armazenados. **Manejo de Pragas no Ecosistema de Grãos Armazenados**. Viçosa: [s.n.], 2008, p. 371–405.
- FENIBO, E. O.; IJOMA, G. N.; MATAMBO, T. Biopesticides in sustainable agriculture : current status and future prospects. **Preprints**, 2020. v. Pré-impres, n. November, p. 1–47.
- FERNANDES, M. C. A.; RIBEIRO, R. L. D.; AGUIAR-MENEZES, E. L. Manejo Ecológico de Fitoparasitas. **Agroecologia: princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável**. [S.l.]: [s.n.], 20025, p. 273–322.
- FIEHN, O. Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling. **Current Protocols in Molecular Biology**, 1 abr. 2016. v. 2016, p. 30.4.1.
- FIERASCU, R. C. *et al.* The application of essential oils as a next-generation of pesticides: Recent developments and future perspectives. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, 2020. v. 75, p. 183–204.
- FITE, T. *et al.* Effect of *Azadirachta indica* and *Milletia ferruginea* extracts against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) infestation management in chickpea. **Cogent Food & Agriculture**, 1 jan. 2020. v. 6, n. 1, p. 1712145.
- FOX, C. W. Multiple Mating , Lifetime Fecundity and Female Mortality of the Bruchid Beetle , *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae) Author (s): C . W . Fox Published by : British Ecological Society Stable .**Functional Ecology**, 1993. v. 7, n. 2, p. 203–208.

- FRAGA, A. *et al.* Glycogen and Glucose Metabolism Are Essential for Early Embryonic Development of the Red Flour Beetle *Tribolium castaneum*. **PLoS ONE**, 2013. v. 8, n. 6.
- FREIRE FILHO, F. R. Origem, Evolução e Domesticação do caupi. **O caupi no Brasil**. Embrapa-CN ed. Goiânia: Embrapa Meio-Norte, 1988, p. 722.
- FREIRE FILHO, R. F. **Feijão-Caupi no Brasil**. [S.l.]: [s.n.], 2011.
- FURLAN, L. *et al.* Risk assessment of soil-pest damage to grain maize in Europe within the framework of Integrated Pest Management. **Crop Protection**, 2017. v. 97, p. 52–59.
- 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. **Entomologia Agrícola**. Volume 10 ed. Piracicaba, SP, Brasil: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz-FEALQ, 2002.
- GANJEWALA, D. *Cymbopogon* essential oils: Chemical compositions and bioactivities. **International Journal of Essential Oil Therapeutics**, 2009. v. 3, n. 2–3, p. 56–65.
- GARCÍA-ROA, R. *et al.* Temperature as a modulator of sexual selection. **Biological Reviews**, 2020. v. 3, p. brv.12632.
- GARCIA, A.; BARBAS, C. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, 2011. v. 708, p. 191–204.
- GAWAI, D. U. Antifungal activity of essential oil of *Cymbopogon citratus* stapf against different fusarium species. **Bionano Frontier**, 2015. v. 8, n. December, p. 8–11.
- GEORGIA C. ATELLA, D. M. E K. C. G. CAPÍTULO 6 - Metabolismo de Lipídeos. — INCT-Entomologia Molecular. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT**, 2012. Disponível em: <<http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/biblioteca/arthrolivro-1/capitulo-6-metabolismo-de-lipideos/view?searchterm=metabolis>>.
- GILBERT, L. I.; CHINO, H. Transport of lipids in insects. **J. Lipid Res.**, 1 set. 1974. v. 15, n. 5, p. 439–456. Disponível em: <<http://www.jlr.org/content/15/5/439>>. Acesso em: 4 jun. 2015.
- GIULIVI, C. *et al.* Metabolic pathways in *Anopheles stephensi* mitochondria. **Biochemical Journal**, 2008. v. 415, n. 2, p. 309–316.
- GLARE, T. *et al.* Have biopesticides come of age? **Trends in Biotechnology**, 2012. v. 30, n. 5, p. 250–258.
- GLORIOSO, J. C.; LEMOINE, N. **Gene therapy-from small beginnings to where we are now**. **Gene Therapy**. Nature Publishing Group.
- GODOY, C. V.; BUENO, A. De F.; GAZZIERO, D. L. P. Brazilian soybean pest management

- and threats to its sustainability. **Outlooks on Pest Management**, 1 jun. 2015. v. 26, n. 3, p. 113–117.
- GOMES, R. S. S. *et al.* Eficiência de óleos essenciais na qualidade sanitária e fisiológica em sementes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2016. v. 18, n. 1 suppl 1, p. 279–287.
- GONÇALVES, G. L. P. *et al.* Effects of brugmansia suaveolens fractions on *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). **Journal of Biopesticides**, 2019. v. 12, n. 1, p. 19–29.
- GRABARCZYK, M. *et al.* Transformations of monoterpenes with the p-menthane skeleton in the enzymatic system of bacteria, fungi and insects. **Molecules**, 2020. v. 25, n. 20, p. 1–24.
- GREVENGOED, T. J.; KLETT, E. L.; COLEMAN, R. A. Acyl-CoA metabolism and partitioning. **Annual Review of Nutrition**, 2014. v. 34, p. 1–30.
- GUERRA, A M N DE M ; SILVA, D DOS S; SANTOS, P S; SANTOS, L. B. Teste de repelência de óleos essenciais sobre. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, 2019. v. 9, n. 3, p. 110–117.
- GUIMARÃES, L. G. D. L. *et al.* Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) STAPF). **Química Nova**, 2008. v. 31, n. 6, p. 1476–1480.
- HADDABI, A. S. Promotion of integrated pest management (ipm) in cowpea production in fufore local government area, adamawa state, Nigeria. **International Journal of Engineering Technologies and Management Research**, 10 jun. 2020. v. 7, n. 6, p. 11–40.
- HAFIZ, A.; RIAZ, T.; SHAKOORI, F. R. Metabolic Profile of a Stored Grain Pest *Trogoderma granarium* Exposed to Deltamethrin. **Pakistan Journal of Zoology**, 2016. v. 49, n. 1, p. 183–188.
- HAL, N. L. W. VAN *et al.* The application of DNA microarrays in gene expression analysis. **Journal of Biotechnology**, 2000. v. 78, n. 3, p. 271–280.
- HALLSSON, L. R.; BJÖRKLUND, M. Selection in a fluctuating environment leads to decreased genetic variation and facilitates the evolution of phenotypic plasticity. **Journal of Evolutionary Biology**, 2012. v. 25, n. 7, p. 1275–1290.
- HAN, W. *et al.* Profiling novel metabolic biomarkers for Parkinson’s disease using in-depth metabolomic analysis. **Movement Disorders**, 2017. v. 32, n. 12, p. 1720–1728.
- HARTLEY, S. *et al.* Essential Features of Responsible Governance of Agricultural Biotechnology. **PLoS Biology**, 2016. v. 14, n. 5, p. 1–7.

- HEIER, C.; KÜHNLEIN, R. P. Triacylglycerol metabolism in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, 2018. v. 210, n. 4, p. 1163–1184.
- HELAL, G. A. *et al.* Effect of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on growth and morphogenesis of *Saccharomyces cerevisiae* ML2-strain. **Journal of Basic Microbiology**, 2006. v. 46, n. 5, p. 375–386.
- HELAL, G. A. *et al.* Effects of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on the growth, morphogenesis and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* ML2-strain. **Journal of Basic Microbiology**, 2007. v. 8, n. 2, p. 5–15.
- HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual review of entomology**, 28 jan. 2000. v. 45, p. 371–91. 2015.
- HENDGES, C. *et al.* Human intoxication by agrochemicals in the region of South Brazil between 1999 and 2014. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, 2019. v. 54, n. 4, p. 219–225.
- HERNANDEZ-LAMBRANO, R. *et al.* Essential oils from plants of the genus *Cymbopogon* as natural insecticides to control stored product pests. **Journal of Stored Products Research**, 2015. v. 62, p. 81–83.
- HIDALGO, F. J.; ZAMORA, R. Triacylglycerols: Structures and Properties. **Encyclopedia of Food and Health**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2015, p. 351–356.
- HILL, C. B.; ROESSNER, U. Metabolic Profiling of Plants by GC-MS. **The Handbook of Plant Metabolomics**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013, p. 1–23.
- HIROSHI TSUGAWA, E. F. **Effectiveness of Metabolomics Research Using Gas Chromatograph / Quadrupole Mass Spectrometer with High-Sensitivity and High-Speed Scanning**. [S.l.]: [s.n.], 2013.
- HOLZMANN, A. **Latest developments in the registration of SPP chemicals in Germany and Europe.** **Julius-Kühn-Archiv.** Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123011205>>.
- HONG, J. K. *et al.* Application of volatile antifungal plant essential oils for controlling pepper fruit anthracnose by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Pathology Journal**, 2015. v. 31, n. 3, p. 269–277.
- HORST, D. J. VAN DER *et al.* Glycerol dynamics and metabolism during flight of the locust, *Locusta migratoria*. **Insect Biochemistry**, 1983. v. 13, n. 1, p. 45–55.
- HORST, Dick J. VAN DER. Insect adipokinetic hormones: Release and integration of flight

energy metabolism. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, 2003. v. 136, n. 2, p. 217–226.

HOWARD, B. **Ph modified insect foreign patent documents repellent/nsecticide soap of plantessential oils**. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US8647684B2/en>

IBAMA. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. **Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil**, 2017. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios>.

IBGE. **Censo Agropecuário 2006**. [S.l.]: [s.n.], 2009.

_____. **Indicadores IBGE - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (Janeiro/2019)**. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=72415>.

IGA, M.; SMAGGHE, G. Identification and expression profile of Halloween genes involved in ecdysteroid biosynthesis in *Spodoptera littoralis*. **Peptides**, 2010. v. 31, n. 3, p. 456–467.

IGLESIAS, L. *et al.* Evaluating combinations of bioinsecticides and adjuvants for managing *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) in onion production systems. **Crop Protection**, 2020. v. 142, n. December 2020, p. 105527.

IKECHI – NWOGU, GC; ZOMEKE, C. *aethiopica*, *Azadirachta indica* and *Zingiber officinale* Formulation on Cowpea Leaves. **J. Appl. Sci. Environ. Manage.**, 2020. v. 24, n. 1, p. 133–138.

ILBOUDO, Z. *et al.* Biological activity and persistence of four essential oils towards the main pest of stored cowpeas, *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, 2010. v. 46, n. 2, p. 124–128.

INAGAKI, S.; YAMASHITA, O. Metabolic shift from lipogenesis to glycogenesis in the last instar larval fat body of the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Biochemistry**, 1986. v. 16, n. 2, p. 327–331.

INCA. Poeira de sílica | INCA - Instituto Nacional de Câncer. **Ministério da Saúde**, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/poeiras/poeira-de-silica>.

INTELECTUAL, I. N. De P. INPI. 2021. Disponível em: [https://www.gov.br/inpi/pt-br/search?SearchableText=patente óleo essencial X inseto praga](https://www.gov.br/inpi/pt-br/search?SearchableText=patente%20%C3%B3leo%20essencial%20X%20inseto%20praga).

INTERNATIONAL-ORGANIZATION-FOR-STANDARDIZATION - ISO 9235:2013. Aromatic natural raw. **European Standard ISO**, 2013. p. 14.

- IQBAL, A. *et al.* Nutritional quality of important food legumes. **Food Chemistry**, 2006. v. 97, n. 2, p. 331–335.
- IRKIN, R.; KORUKLUOGLU, M. Effectiveness of *Cymbopogon citratus* L. essential oil to inhibit the growth of some filamentous fungi and yeasts. **Journal of Medicinal Food**, 2009. v. 12, n. 1, p. 193–197.
- IRWIN, M. E. Implications of movement in developing and deploying integrated pest management strategies. **Agricultural and Forest Meteorology**, 1999. v. 97, n. 4, p. 235–248. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0168-1923\(99\)00069-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1923(99)00069-6)>.
- ISMAN, M. B. Bioinsecticides based on plant essential oils: A short overview. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, 2020a. v. 75, n. 78, p. 179–182.
- ISMAN, M.B. Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. **Phytochemistry Reviews**, 2020b. v. 19, n. 2, p. 235–241. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11101-019-09653-9>>.
- J.D. EHLERS *, A. E. H. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Field Crops Research**, 1997. v. 53, p. 187–204.
- JING, X.; BEHMER, S. T. Insect sterol nutrition: Physiological mechanisms, ecology, and applications. **Annual Review of Entomology**, 2020. v. 65, p. 251–271.
- JO, H.-J. *et al.* Development of an Anti-Insect Sachet Using a Polyvinyl Alcohol–Cinnamon Oil Polymer Strip Against *Plodia interpunctella*. **Journal of Food Science**, 1 nov. 2013. v. 78, n. 11, p. E1713–E1720. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1750-3841.12268>>.
- JOSEPH, I. *et al.* The use of insects in forensic investigations: An overview on the scope of forensic entomology. **Journal of Forensic Dental Sciences**, 2011. v. 3, n. 2, p. 89.
- JOVANOVIĆ, J. *et al.* Effect of encapsulated lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against potato tuber moth *Phthorimaea operculella*. **Crop Protection**, 2020. v. 132, n. February, p. 105–109.
- JÚNIOR, A. F. De L. *et al.* Controle de pragas de grãos armazenados: uso e aplicação de fosfetos. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, 28 set. 2012. v. 5, n. 4. Disponível em: <<http://www.fmb.edu.br/revistaFmb/index.php/fmb/article/view/93/87>>.
- KABALUK, J. T. *et al.* **The Use and Regulation of Microbial Pesticides in Representative Jurisdictions Worldwide**. [S.l.]: [s.n.], 2010.
- KANANI, H. H.; KLAPA, M. I. Data correction strategy for metabolomics analysis using gas chromatography-mass spectrometry. **Metabolic Engineering**, 2007. v. 9, n. 1, p. 39–51.
- KANDIMALLA, R. *et al.* Chemical composition and anti-candidiasis mediated wound healing

- property of *Cymbopogon nardus* essential oil on chronic diabetic wounds. **Frontiers in Pharmacology**, 2016. v. 7, n. JUN, p. 1–8.
- KANG, K. *et al.* Comparative metabolomics analysis of different resistant rice varieties in response to the brown planthopper *Nilaparvata lugens* Hemiptera: Delphacidae. **Metabolomics**, 2019. v. 15, n. 4, p. 1–13.
- KARUNARATHNE, A. *et al.* How many premature deaths from pesticide suicide have occurred since the agricultural Green Revolution? **Clinical Toxicology**, 2020. v. 58, n. 4, p. 227–232.
- KATHIRVELU, C. & MANGAYARKARASI S. & MALINE, A. S. . Oviposition deterency and ovicidal effect of selected essential oils against *Callosobruchus chinensis* in laboratory **IJRAR- International Journal of Research and Analytical Reviews**, 2019. v. 6, n. 2, p. 718–722.
- KAUR, R. *et al.* Pesticides Classification and its Impact on Environment. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 2019. v. 8, n. 03, p. 1889–1897.
- KAUR, R. P. *et al.* Potential pathways of pesticide action on erectile function - A contributory factor in male infertility. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, 2015. v. 4, n. 4, p. 322–330.
- KAVISA GHOSH. Anticancer effect of lemongrass oil and citral on cervical cancer cell lines. **Pharmacognosy Communications**, 2013. v. 3, n. 4, p. 41–48.
- KAYA, K. *et al.* Bazı tıbbi bitkilerden elde edilen uçucu yağların kimyasal bileşenlerinin belirlenmesi ve Börülce tohum böceği, *Callosobruchus maculatus* erginlerine karşı fümigant insektisidal aktivitelerinin belirlenmesi. **Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi**, 2018. v. 21, n. 5, p. 708–714.
- KE, M.; THOR, J. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L . and *O . g ratissimum* L . applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab .) [Coleoptera : Bruchidae]. **Journal of Stored Products Research**, 2001. v. 37, n. 4, p. 339–349.
- KEDIA, A. *et al.* Botanicals as eco friendly biorational alternatives of synthetic pesticides against *Callosobruchus* spp. (Coleoptera: Bruchidae)—a review. **Journal of Food Science and Technology**, 2015. v. 52, n. 3, p. 1239–1257.
- KETOH, G. K. *et al.* Evaluation of essential oils from six aromatic plants in togo for *callosobruchus maculatus* f. pest control. **Insect Science and its Application**, 1 mar. 2000. v. 20, n. 1, p. 45–49.
- KETOH *et al.* Comparative effects of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil and piperitone on *Callosobruchus maculatus* development. **Fitoterapia**, 2006. v. 77, n. 7–8, p. 506–510.

KILLINY, N. *et al.* A plant pathogenic bacterium exploits the tricarboxylic acid cycle metabolic pathway of its insect vector. **Virulence**, 2018. v. 9, n. 1, p. 99–109.

KLICH; MA. **Identification of common Aspergillus species**. [S.l.]: [s.n.], 2002.

KLOWDEN, M. Physiological Systems in Insects- 3rd Edition. **Elsevier**, 2013. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/books/physiological-systems-in-insects/klowden/978-0-12-415819-1>>.

KOCHHAR, S. L.; GUJRAL, S. K. Secondary Plant Metabolites. **Plant Physiology**, 2020. v. 11, n. 1, p. 590–610.

KÜHNLEIN, R. P. Thematic review series: Lipid droplet synthesis and metabolism: From Yeast to man. Lipid droplet-based storage fat metabolism in *Drosophila*. **Journal of Lipid Research**, 2012. v. 53, n. 8, p. 1430–1436.

KUMAR, D.; KALITA, P. Reducing Postharvest Losses during Storage of Grain Crops to Strengthen Food Security in Developing Countries. **Foods**, 2017. v. 6, n. 1, p. 8.

KUMAR, L.; VERMA, S. C.; SHARMA, P. L. Studies on effect of essential oils on quality characters of pea seeds (*Pisum sativum* L.) damaged by *Callosobruchus chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Entomology and Zoology Studies**, 2017. v. 5, n. 1, p. 562–564.

KUMAR, Rajesh; SRIVASTAVA, M.; DUBEY, N. K. Evaluation of *Cymbopogon martinii* oil extract for control of postharvest insect deterioration in cereals and legumes. **Journal of Food Protection**, 2007. v. 70, n. 1, p. 172–178.

KUMAR, Ritesh *et al.* A Review on Insect Pest Complex of Oats (*Avena sativa* L.). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 2017. v. 6, n. 12, p. 525–534.

KUMAR, S. Biopesticides: A Need for Food and Environmental Safety. **Journal of Biofertilizers & Biopesticides**, 2012. v. 3, n. 4.

LAGOGIANNI, C. S.; TSITSIGIANNIS, D. I. Effective Biopesticides and Biostimulants to Reduce Aflatoxins in Maize Fields. **Frontiers in Microbiology**, 2019. v. 10, n. November, p. 1–8.

LANKADURAI, B. P.; NAGATO, E. G.; SIMPSON, M. J. Environmental metabolomics: An emerging approach to study organism responses to environmental stressors. **Environmental Reviews**, 2013. v. 21, n. 3, p. 180–205.

LAOTHAWEEERUNGSAWAT, N.; SIRITHUNYALUG, J.; CHAIYANA, W. Chemical Compositions and Anti-Skin-Ageing Activities of *Origanum vulgare* L. Essential Oil from

- Tropical and Mediterranean Region. **Molecules**, 1 mar. 2020. v. 25, n. 5, p. 1101.
- LAZAREVIĆ, J. *et al.* Toxic, Oviposition Deterrent and Oxidative Stress Effects of *Thymus vulgaris* Essential Oil against *Acanthoscelides obtectus*. **Insects**, 24 ago. 2020. v. 11, n. 9, p. 563.
- LEITE, K. *et al.* Óleos essenciais no tratamento de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. durante o armazenamento. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, 2018. v. 13, n. 2, p. 186.
- LEENTEREN, J. C. VAN. The state of commercial augmentative biological control: Plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **BioControl**, 2012. v. 57, n. 1, p. 1–20.
- LEVINSON, Z. H. The function of dietary sterols in phytophagous insects. **Journal of Insect Physiology**, 1962. v. 8, n. 2, p. 191–198.
- LEWINSOHN, E. Histochemical Localization of Citral Accumulation in Lemongrass Leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., Poaceae). **Annals of Botany**, 1 jan. 1998. v. 81, n. 1, p. 35–39.
- LI, G. *et al.* Gas chromatography-mass spectrometry based midgut metabolomics reveals the metabolic perturbations under naf stress in *bombyx mori*. **Insects**, 2020. v. 11, n. 1.
- LILIAN E CANAVOSO, ZEINA E JOUNI, K JOY KARNAS, J. E.; PENNINGTON, And M. A. W. Fat metabolism in insects. **Annu. Rev. Entomol.**, 2001. v. 21, p. 23–46.
- LIMA, A. E. F. *et al.* Rendimento, caracterização química e atividade antibacteriana do óleo essencial de capim limão coletado em diferentes horários. **Magistra**, 2016. v. 28, n. 3/4, p. 369–378.
- LIU, Q. *et al.* Combined transcriptome and metabolome analyses to understand the dynamic responses of rice plants to attack by the rice stem borer *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). **BMC Plant Biology**, 2016. v. 16, n. 1, p. 1–17.
- LOPES, A. S. *et al.* Metabolomic strategies involving mass spectrometry combined with liquid and gas chromatography. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [S.l.]: Springer New York LLC, 2017, V. 965, p. 77–98.
- LORINI, I. *et al.* **Manejo Integrado de Pragas de Grãos e Sementes Armazenadas**. [S.l.]: [s.n.], 2015.
- LU, K. *et al.* Adipokinetic Hormone Receptor Mediates Trehalose Homeostasis to Promote Vitellogenin Uptake by Oocytes in *Nilaparvata lugens*. **Frontiers in Physiology**, 2019. v. 10, n. JAN, p. 1–12.
- LU, K.; SONG, Y.; ZENG, R. The role of cytochrome P450-mediated detoxification in insect

- adaptation to xenobiotics. **Current Opinion in Insect Science**, 2021. v. 43, p. 103–107.
- LU, Y. X.; ZHANG, Q.; XU, W. H. Global metabolomic analyses of the hemolymph and brain during the initiation, maintenance, and termination of pupal diapause in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. **PLoS ONE**, 2014. v. 9, n. 6.
- LUBAWY, J. *et al.* Role of the Insect Neuroendocrine System in the Response to Cold Stress. **Frontiers in Physiology**, 2020. v. 11, n. April, p. 1–11.
- LUIZ, G. *et al.* Ecología bioactivity of extracts from solanaceae against *Zabrotes subfasciatus* bioactividad de extractos de *Solanaceae* contra *Zabrotes subfasciatus*. **ACTA BIOLÓGICA COLOMBIANA**, 2020. v. 26, n. 1, p. 62–71.
- LUNN, J. E. *et al.* Trehalose metabolism in plants. **Plant Journal**, 2014. v. 79, n. 4, p. 544–567.
- LV, N. *et al.* Sublethal and lethal effects of the imidacloprid on the metabolic characteristics based on high-throughput non-targeted metabolomics in *Aphis gossypii* Glover. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2021. v. 212, p. 111969.
- MADI, Y. F. *et al.* Essential oil of *Cymbopogon citratus* cultivated in Egypt: seasonal variation in chemical composition and anticholinesterase activity. **Natural Product Research**, 2020. v. 0, n. 0, p. 1–5.
- MAHMOUD, S. S.; CROTEAU, R. B. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. **Plant Biology**, 2001. v. 98, n. 15, p. 8915–8920.
- MANGANG, I. B. *et al.* Comparative laboratory efficacy of novel botanical extracts against *Tribolium castaneum*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2020. v. 100, n. 4, p. 1541–1546.
- MANGOBA, M. A. A.; GUZMAN ALVINDIA, D. DE. Phosphine Resistance in Psocid, *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera) in the Philippines. **International Journal of Tropical Insect Science**, 27 jul. 2020. p. 1–7.
- MANZOOR, J.; SHARMA, M. Impact of Textile Dyes on Human. **Health and Environment**. 2019. v. 2, n. December, p. 162–169.
- MAPA; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E A. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: [s.n.], 2009.
- MAPA; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E A. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2018/19 a 2028/29, projeções de longo prazo**. [S.l.]: [s.n.], 2019.
- MAPA. **Instrução Normativa MAPA 41/2008. Diário Oficial da União**. Ministério da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/vegetal/dsv/sistemasweb_agricultura_gov_br_sislegis_action_detalhaAt.pdf>.

MAPA. **Mercado de biodefensivos cresce mais de 70% no Brasil em um ano**, 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/feffmercado-de-biodefensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil>>. Acesso em: 6 jan. 2021.

MARANGONI, S. Copaíba contra o caruncho. **Pesquisa FAPESP**, 2002. v. 10, n. 71, p. 46. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/publicacao/2386/copaiba-contra-o-caruncho/>>.

MARQUES, F DE A; RAMIRES, E N; ANNIES, V; DA SILVA, M. A. N. **Pesticide, repellent, fungicide and vermifuge compositon and use of the same**. Disponível em: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2014094100>

MARRONE, P. G. Pesticidal natural products – status and future potential. **Pest Management Science**, 15 maio. 2019. v. 75, n. 9, p. ps.5433.

MARSARO, J, A. L.; CORDEIRO, M DE O J, M.; VALLE, D S P, P. R. Eficiência da terra de diatomácea no controle de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) Em Feijão-Caupi Armazenado. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, 2013. v. 11, n. March 2015, p. 13.

MARTINOSSI-ALLIBERT, I.; ARNQVIST, G.; BERGER, D. Sex-specific selection under environmental stress in seed beetles. **Journal of Evolutionary Biology**, 2017. v. 30, n. 1, p. 161–173.

MARTINS, R. *et al.* The dynamics of energy metabolism in the tick embryo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, 2018. v. 27, n. 3, p. 259–266.

MASON, L.; MCDONOUGH, M. Biology, Behavior, and Ecology of Stored Grain and Legume Insects. **Stored Product Protection**, 2011. p. 1–14.

MASSANGO, H. G. L. L. *et al.* Toxicity and metabolic mechanisms underlying the insecticidal activity of parsley essential oil on bean weevil, *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Pest Science**, 2017. v. 90, n. 2, p. 723–733.

MATASSINI, C.; PARMEGGIANI, C.; CARDONA, F. New frontiers on human safe insecticides and fungicides: An opinion on trehalase inhibitors. **Molecules**, 2020. v. 25, n. 13.

MATASYOH, J. C. *et al.* Chemical composition of *Cymbopogon citratus* essential oil and its effect on mycotoxigenic *Aspergillus* species. 2011. v. 5, n. March, p. 138–142.

MATSUDA, H. *et al.* Flies without trehalose. **Journal of Biological Chemistry**, 2015a. v. 290, n. 2, p. 1244–1255.

- MATSUDA, *et al.* Flies without trehalose. **Journal of Biological Chemistry**, 2015b. v. 290, n. 2, p. 1244–1255.
- MATTILA, J.; HIETAKANGAS, V. Regulation of carbohydrate energy metabolism in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, 2017. v. 207, n. 4, p. 1231–1253.
- MELO, R. De A. *et al.* Use of X-ray to evaluate damage caused by weevils in cowpea seeds. **Horticultura Brasileira**, dez. 2010. v. 28, n. 4, p. 472–476.
- MERCHAOU, H.; HANANA, M.; KSOURI, R. Ethnobotanical and phytopharmacological notes on *Cakile maritima*. **Phytotherapie**, 2018. v. 16, n. 1, p. 197-S202.
- MESSINA, F. J.; KARREN, M. E. Adaptation to a novel host modifies host discrimination by the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. **Animal Behaviour**, 1 mar. 2003. v. 65, n. 3, p. 501–507.
- MESTERHÁZY, Á.; OLÁH, J.; POPP, J. Losses in the grain supply chain: Causes and solutions. **Sustainability (Switzerland)**, 2020. v. 12, n. 6, p. 1–18.
- MEUER, S., WITTEW, C., NAKAGAWARA, K. **Rapid Cycle Real-Time PCR**. [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2001.
- MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. Da. **Mofobranco em soja - ensaios cooperativos**. [S.l.]: [s.n.], 2019.
- MEYER, A. *et al.* Mood disorders hospitalizations, suicide attempts, and suicide mortality among agricultural workers and residents in an area with intensive use of pesticides in Brazil. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, 2010. v. 73, n. 13–14, p. 866–877.
- MEYER, T. N.; RESENDE, I. L. C.; ABREU, J. C. De. Incidência de suicídios e uso de agrotóxicos por trabalhadores rurais em Luz (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, 2007. v. 32, n. 116, p. 24–30.
- MICHALKOVA, V. *et al.* Vitamin B6 generated by obligate symbionts is critical for maintaining proline homeostasis and fecundity in tsetse flies. **Applied and Environmental Microbiology**, 2014. v. 80, n. 18, p. 5844–5853.
- MAPA. Ministério Da Agricultura, P. E. A. **PORTARIA Nº 52, DE 15 DE MARÇO DE 2021**. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n-52-de-15-de-marco-de-2021-310003720>>. Acesso em: 20 jan. 2022.
- MAPA. Ministério Da Agricultura, P. E. A. **Plano Nacional Para O Desenvolvimento Da Cadeia Produtiva Do Feijão E Pulses**. Secretaria Executiva da União. Disponível em: <<https://www.uam.es/gruposinv/meva/publicaciones>>

jesus/capitulos_espanyol_jesus/2005_motivacion para el aprendizaje Perspectiva alumnos.pdf%0Ahttps://www.researchgate.net/profile/Juan_Aparicio7/publication/253571379_Los_estudios_sobre_el_cambio_conceptual_>.

MITSUWAN, W. *et al.* Integrated proteomic and metabolomic analysis reveals that rhodomyltone reduces the capsule in *Streptococcus pneumoniae*. **Scientific Reports**, 2017. v. 7, n. 1, p. 1–13.

MIURA, Y. The biological significance of ω -oxidation of fatty acids. **Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences**, 2013. v. 89, n. 8, p. 370–382.

MOHAMED, C. *et al.* Use of bioactive chitosan and lippia multiflora essential oil as coatings for maize and sorghum seeds protection. **EurAsian Journal of BioSciences**, 2020. v. 14, n. 1, p. 27–34.

MOHAMED, M. I. *et al.* The Egyptian German Society for Zoology Ultrastructure and histopathological alteration in the ovaries of *Callosobruchus maculatus* (F .) (Coleoptera , Chrysomelidae) induced by the solar radiation. **THE JOURNAL OF BASIC & APPLIED ZOOLOGY**, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jobaz.2014.12.004>>.

MOLLAEI, M. *et al.* Impact of the amino acid proline on the cold hardiness of honey bee, *Apis mellifera* L. **Spanish Journal of Agricultural Research**, [S.l.], 2013. v. 11, n. 3, p. 714–717.

MONTELLA, I. R.; SCHAMA, R.; VALLE, D. The classification of esterases : an important gene family involved in insecticide resistance - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2012. v. 107, n. June, p. 437–449.

MONTUSCHI, P. *et al.* Metabolomic analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy as a new approach to understanding inflammation and monitoring of pharmacological therapy in children and young adults with cystic fibrosis. **Frontiers in Pharmacology**, 2018. v. 9, n. JUN, p. 1–17.

MORAES, J.; CAMPOS1, E.; LOGULLO2, E C. Metabolismo Energético Durante a Embriogênese do Carrapato Bovino *Rhipicephalus microplus* . **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. [S.l.]: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT – EM – 2012., 2012, p. 25.

MORAIS LAS. Influência Dos Fatores Ambientais Na Composição Química Dos Óleos Essenciais. **Horticultura Brasileira**, 2009. v. 27, n. 2, p. 4050–4063.

MOSSA, A. T. H. Green Pesticides: Essential oils as biopesticides in insect-pest management. **Journal of Environmental Science and Technology**, 2016. v. 9, n. 5, p. 354–378.

MURMU, S. B.; MISHRA, H. N. The effect of edible coating based on Arabic gum, sodium

- caseinate and essential oil of cinnamon and lemon grass on guava. **Food Chemistry**, 2018. v. 245, n. December 2017, p. 820–828.
- MUTHUKRISHNAN, S. *et al.* **Chitin Metabolism in Insects**. [S.l.]: [s.n.], 2012.
- NARANJO, S. E.; ELLSWORTH, P. C.; FRISVOLD, G. B. Economic Value of Biological Control in Integrated Pest Management of Managed Plant Systems. **Annual Review of Entomology**, 2015. v. 60, p. 621–645.
- NATTUDURAI, G. *et al.* Toxic effect of *Atalantia monophylla* essential oil on *Callosobruchus maculatus* and *Sitophilus oryzae*. **Environmental Science and Pollution Research**, 2017. v. 24, n. 2, p. 1619–1629.
- NAYAK, M. K. *et al.* Resistance to the fumigant phosphine and its management in insect pests of stored products: A global perspective. **Annual Review of Entomology**, 2020. v. 65, p. 333–350.
- NYAMADOR, W. S. *et al.* Variation in the susceptibility of two *Callosobruchus* species to essential oils. **Journal of Stored Products Research**, jan. 2010. v. 46, n. 1, p. 48–51.
- OFFOR, E. The Nutritional Requirements of Phytophagous Insects: Why do Insects Feed on Plants? **SSRN Electronic Journal**, 2011. p. 1–16.
- OJEBODE, M. E. *et al.* Efficacy of Some Plant Extracts as Storage Protectants against *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Biotechnology & Biomaterials**, 2016. v. 06, n. 01.
- OKPEZE, V. E. Residual Effect of Different Temperature Regimes on the Developmental Stages of F₁ Progeny of *Callosobruchus maculatus* (F) (Coleoptera : Bruchidea) on Cowpea Seeds. **International Journal of Agriculture Innovations and Research**, 2018. v. 6, n. 6, p. 302–304.
- OLIVEIRA, C. M. *et al.* Economic impact of exotic insect pests in Brazilian agriculture. **Journal of Applied Entomology**, 2013. v. 137, n. 1–2, p. 1–15.
- OLIVEIRA, C. M. *et al.* Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, 2014. v. 56, p. 50–54.
- OLIVEIRA, D. M. De *et al.* Considerações Acerca Da Produção E Qualidade De Grãos De Feijão. **Journal of Agronomic Sciences**, 2014. n. 3, p. 16–22.
- OLIVEIRA, G. De L. T. The geopolitics of Brazilian soybeans. **Journal of Peasant Studies**, 2016. v. 43, n. 2, p. 348–372.
- OLIVEIRA, J. V. De *et al.* Fumigation and repellency of essential oils against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Chrysomelidae : Bruchinae) in cowpea. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 2017. v. 52, n. 1, p. 10–17.

- OLUWAFEMI, A. R. Comparative Effects of Three Plant Powders and Pirimiphos-methyl against the Infestation of *Callosobruchus maculatus* (F .) (Coleoptera : Bruchidae) in Cowpea Seeds. 2012. v. 1, n. 2, p. 87–99.
- OMAR, Y. M.; MAHMOUD, M. A. Effects of three constant temperature ranges to control *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae): a serious pest of pulses in Egypt. **International Journal of Tropical Insect Science**, 26 maio. 2020. p. 1–8.
- OMOTOSO, S. E.; AKINPELU, B. A.; SOYELU, O. J. Insecticidal effect of lemongrass oil on behavioural responses and biochemical changes in cowpea weevil , *Callosobruchus maculatus* (Fabricius). **Journal of Phytopathology and Pest Management**, 2020. v. 7, n. 1, p. 14–30.
- ONYIDO, A. *et al.* Damage Caused By the Bean Bruchid, *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) on Different Legume Seeds on Sale in Awka and Onitsha Markets, Anambra State, South Eastern Nigeria. **African Research Review**, 2011. v. 5, n. 4.
- OUEDRAOGO, P. A.; MONGE, J. P.; HUIGNARD, J. Importance of temperature and seed water content on the induction of imaginal polymorphism in *Callosobruchus maculatus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 1 abr. 1991. v. 59, n. 1, p. 59–66.
- OWOLABI, M. S. *et al.* 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**, 2009. v. 8, n. 9, p. 828–835.
- OYEWALE, R.; BAMAIYI, L. Management of cowpea insect pests. **Sch. Acad. J. Biosci**, 2013. v. 1, n. 5, p. 217–226.
- PALM, W. *et al.* Lipoproteins in *Drosophila melanogaster-assembly*, function, and influence on tissue lipid composition. **PLoS Genetics**, 2012. v. 8, n. 7.
- PAN, B. Y. *et al.* Glucose Utilization in the Regulation of Chitin Synthesis in Brown Planthopper. **Journal of Insect Science**, 2019. v. 19, n. 5, p. 1–9.
- PANDEY, A. K.; PALNI, U. T.; TRIPATHI, N. N. Repellent activity of some essential oils against two stored product beetles *Callosobruchus chinensis* L. and *C. maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) with reference to *Chenopodium ambrosioides* L. oil for the safety of pigeon pea seeds. **Journal of Food Science and Technology**, 2014. v. 51, n. 12, p. 4066–4071.
- PANIZZI, A. R. History and Contemporary Perspectives of the Integrated Pest Management of Soybean in Brazil. **Neotropical Entomology**, 2013. v. 42, n. 2, p. 119–127.
- PAPADIMITROPOULOS, M. E. P. *et al.* Untargeted GC-MS metabolomics. **Methods in Molecular Biology**. [S.l.]: Humana Press Inc., 2018, V. 1738, p. 133–147.

PARANAGAMA, P. A. *et al.* 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**, 2002. v. 2, n. 5, p. 22–19.

PARANAGAMA, P. A.; GUNASEKERA, J. J. The efficacy of the essential oils of Sri Lankan *Cinnamomum zeylanicum* fruit and *Micromelum minutum* leaf against *Callosobruchus maculatus* (f.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Essential Oil Research**, 2011. v. 23, n. 1, p. 75–82.

PARRA, J. R. P. Biological Control in Brazil: an overview. **Scientia Agricola**, out. 2014. v. 71, n. 5, p. 420–429.

PASIKANTI, K. K.; HO, P. C.; CHAN, E. C. Y. Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2008. v. 871, n. 2, p. 202–211.

PASQUET, R. S. Genetic relationships among subspecies of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. based on allozyme variation. **Theoretical and Applied Genetics**, 1999. v. 98, n. 6–7, p. 1104–1119.

PATEL, R. The Long Green Revolution. **Journal of Peasant Studies**, 2013. v. 40, n. 1, p. 1–63.

PAUDEL, S. *et al.* Conservation agriculture and integrated pest management practices improve yield and income while reducing labor, pests, diseases and chemical pesticide use in smallholder vegetable farms in Nepal. **Sustainability (Switzerland)**, 2020. v. 12, n. 16.

PAUMGARTTEN, F. J. R. Pesticides and public health in Brazil. **Current Opinion in Toxicology**, 2020. v. 22, p. 7–11.

PAVELA, R.; BENELLI, G. Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. **Trends in Plant Science**, 2016. v. 21, n. 12, p. 1000–1007.

PELAEZ, V.; MIZUKAWA, G. Diversification strategies in the pesticide industry: from seeds to biopesticides. **Ciência Rural**, 2017. v. 47, n. 2, p. 1–7.

PENG, L. *et al.* Comparative metabolomics of the interaction between rice and the brown planthopper. **Metabolomics**, 2016. v. 12, n. 8, p. 1–15.

PENNINGTON, J. E.; GOLDSTROHM, D. A.; WELLS, M. A. The role of hemolymph proline as a nitrogen sink during blood meal digestion by the mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, 2003. v. 49, n. 2, p. 115–121.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time

- PCR. **Nucleic acids research**, 2002. v. 30, n. 9.
- PICANÇO, M. C. **Manejo integrado de pragas**. Universidade Federal De Viçosa Departamento De Biologia Animal. Viçosa - MG - BRASIL, 2010.
- PINGALI, P. L. Green revolution: Impacts, limits, and the path ahead. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2012. v. 109, n. 31, p. 12302–12308.
- PINTO, J. F. **Processo Para A Fabricação De Composto Multipotente À Base De Óleos Vegetais Usado No Aumento Da Produtividade E Controle De pragas E Doenças Na Agricultura**. BR 102019004942-1 A2. Instituto Nacional de Propriedade Intelectual, 2019.
- PLATA-RUEDA, A. *et al.* Acute Toxicity and Sublethal Effects of Lemongrass Essential Oil and Their Components against the Granary Weevil, *Sitophilus granarius*. **Insects**, 2020. v. 11, n. 6, p. 1–13.
- PLUMIER, B. M. *et al.* Modeling post-fumigation desorption of phosphine in bulk stored grain. **Journal of Stored Products Research**, 2020. v. 85, p. 101548.
- PORTIN, P. **The Concept of the Gene: Short History and Present Status. The Quarterly Review of Biology**. The University of Chicago Press. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/2829967>>.
- PRAY, L. A. The Biotechnology Revolution: PCR and Cloning Expressed Genes | Learn Science at Scitable. **Nature Education**, 2008. v. 1, n. 94.
- PRESLEY, B. C.; LOGAN, B. K.; JANSEN-VARNUM, S. A. In Vitro Metabolic Profile Elucidation of Synthetic Cannabinoid APP-CHMINACA (PX-3). **Journal of Analytical Toxicology**, 2019. v. 44, n. March 2019, p. 226–236.
- QUEIROZ, R. J. B.; CAZETTA, J. O. Proline and trehalose in maize seeds germinating under low osmotic potentials. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 2016. v. 20, n. 1, p. 22–28.
- RABARI, V. P.; CHUDASHAMA, K. S.; THAKER, V. S. In vitro Screening of 75 Essential Oils Against *Colletotrichum gloeosporioides*: A Causal Agent of Anthracnose Disease of Mango. **International Journal of Fruit Science**, 2018. v. 18, n. 1, p. 1–13.
- RABELO, L. M. ; J. M. De M. M. DeCarvalho. Produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica. **Agroecologia: métodos e técnicas para uma agricultura sustentável - Volume 1**. [S.l.]: [s.n.], 2020, p. 1.
- RAHMAN, M. M.; SCHMIDT, G. H. Effect of *Acorus calamus* (L.) (Araceae) essential oil vapours from various origins on *Callosobruchus phaseoli* (Gyllenhal) (Coleoptera: Bruchidae).

- Journal of Stored Products Research**, 1999. v. 35, n. 3, p. 285–295.
- RATNASEKERA, D.; NAYANATHARA, K. H. G. Efficacy of Cinnamon and Citronella Oil Vapours in the Control of. **Journal of Food and Agriculture**, 2013. v. 3, n. 1, p. 1–6.
- REDDY, B. N. *et al.* Identification and classification of detoxification enzymes from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Bioinformation**, jan. 2012. v. 8, n. 9, p. 430–6.
- RÊGO, A.; MESSINA, F. J.; GOMPERT, Z. Dynamics of genomic change during evolutionary rescue in the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. **Molecular Ecology**, 1 maio. 2019. v. 28, n. 9, p. 2136–2154.
- REIS, S. L. *et al.* Insecticidal and repellent activity of typical monoterpenes from plant essential oils against *Callosobruchus maculatus* (Fabr. 1775). **BMC Proceedings**, 2014. v. 8, n. Suppl 4, p. P115.
- REN, X. *et al.* Metabolic adaption and evaluation of cold hardiness on diapausing ladybird, *Coccinella septempunctata* L. **J. Environ. Entomol.**, 2015. v. 37, n. 6, p. 1195–1202.
- RESENDE1, Á. V. De *et al.* Aplicações da agricultura de precisão em sistemas de produção de grãos no Brasil. In: EMBRAPA (Org.). **Agricultura de precisão: resultados de um novo olhar**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2014, p. 19.
- ROBERTSON, K. M.; LAUF, M. L.; MORIN, P. A. Genetic sexing of pinnipeds: a real-time, single step qPCR technique. **Conservation Genetics Resources**, 2018. v. 10, n. 2, p. 213–218.
- ROBINSON, J. L. *et al.* An atlas of human metabolism. **Science Signaling**, 2020. v. 13, n. 624, p. 1–12.
- ROCHA, G. M.; GRISOLIA, C. K. Why pesticides with mutagenic, carcinogenic and reproductive risks are registered in Brazil. **Developing World Bioethics**, 2019. v. 19, n. 3, p. 148–154.
- ROJEK, K. *et al.* Neurobehavioral properties of *Cymbopogon* essential oils and its components. **Phytochemistry Reviews**, 2021. v. 0, p. 1–12.
- ROY, S. *et al.* **Regulation of Reproductive Processes in Female Mosquitoes**. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Ltd., 2016. V. 51.
- RUBASINGHEGE, G. R. S.; PARANAGAMA, P.; ABEYWICKRAMA, K. 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**, 2006. v. 4, n. 3–4, p. 41–44.
- S. DHALIWAL, G.; ARORA, R. Integrated Pest Management: Concepts and Approaches. **Agronomic Crops Program Team**, 2020.

SÁ, Leonardo Figueira Reis DE *et al.* 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**, jan. 2014. v. 60, p. 50–7.

SACCHETTI, G. *et al.* Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, 2005. v. 91, n. 4, p. 621–632.

SAHAL, G. *et al.* Antifungal and biofilm inhibitory effect of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) essential oil on biofilm forming by *Candida tropicalis* isolates; an in vitro study. **Journal of Ethnopharmacology**, 2020. v. 246, n. May 2019, p. 112188.

SAHAYARAJ, K. Short Views on Insect Biochemistry and Molecular Biology. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. [S.l.]: Printed in the United States of America, 2014, p. 57 – 74.

SAKADZO, N.; MAKAZA, K.; CHIKATA, L. Biopesticidal Properties of Aqueous Crude Extracts of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Against Fall Armyworm (*Spodoptera Frugiperda* J.E Smith) on Maize Foliage (*Zea mays* L.) Diets. **Agricultural Science**, 2020. v. 2, n. 1, p. p47.

SALLAM, M. N. **Insect damage Post-harvest Operations-Post-harvest Compendium**. AGSI/FAO: ed. [S.l.]: [s.n.], 2013.

SALUNKHE, A. D. A review of biopesticide and their mode of action *Archana dilip* Salunkhe Navsahyadri College of Pharmacy, Nasarapur - 412213, Maharashtra, India. **International Journal of Farmacognosy**, 2020. v. 7, n. 11, p. 307–310.

SANTANA, CARLOS AUGUSTO M; CONTINI, E. Prioridade do Brasil e do mundo ! **Agroanalysis**, 2011. v. 31, n. 9, p. 16–18.

SANTOS, C. F. Dos *et al.* Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. **Journal of Applied Oral Science**, 2004. v. 12, n. 1, p. 1–11.

SANTOS CAVALCANTI, A. DOS *et al.* Volatiles composition and extraction kinetics from *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* leaves and fruit. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2015. v. 25, n. 4, p. 356–362.

SANTOS, R. *et al.* Carbohydrate accumulation and utilization by oocytes of *Rhodnius prolixus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 1 fev. 2008. v. 67, n. 2, p. 55–62.

SARWAR, M. M. M. Distinguishing and Controlling Insect Pests of Stored Foods for Improving Quality and Safety. **American Journal of Market Research**, 2015. v. 1, n. 3, p. 201–207.

SASAKI, K. *et al.* Metabolomics Platform with Capillary Electrophoresis Coupled with High-Resolution Mass Spectrometry for Plasma Analysis. **Analytical Chemistry**, 2019. v. 91, n. 2, p. 1295–1301.

SAYE, M. *et al.* Proline modulates the *Trypanosoma cruzi* resistance to reactive oxygen species and drugs through a novel D, L-Proline transporter. **PLoS ONE**, 2014. v. 9, n. 3.

SCHÉMAEZA, B. *et al.* Effects of plant aqueous extract of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. on sorghum seed germination and its efficacy in controlling *Phoma sorghina* (Sacc.) Boerema Dorenbosh and Van Kesteren transmission from naturally infected seed to sorghum plant organs. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, 2012. v. 45, n. 20, p. 2429–2436.

SCOTT, J. G.; BUCHON, N. *Drosophila melanogaster* as a powerful tool for studying insect toxicology. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2019. v. 161, n. August, p. 95–103.

SEGUNDO-VAL, I. S.; SANZ-LOZANO, C. S. Introduction to the gene expression analysis. **Methods in Molecular Biology**. [S.l.]: Humana Press Inc., 2016, V. 1434, p. 29–43.

SGRÒ, C. M.; TERBLANCHE, J. S.; HOFFMANN, A. A. What Can Plasticity Contribute to Insect Responses to Climate Change? **Annual Review of Entomology**, 2016. v. 61, p. 433–451.

SHARMA, A. *et al.* Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici 1322, with emphasis on syzygium aromaticum essential oil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2017. v. 123, n. 3, p. 308–313.

SHUKLA, E. *et al.* Insect trehalase: Physiological significance and potential applications. **Glycobiology**, 2015. v. 25, n. 4, p. 357–367.

SHUKLA, V. Detrimental effects of aluminium phosphide powder residue: a short note on detrimental effects of aluminium phosphide powder. **Journal Env. Bio-Sci**, v.33, n.83-84, 2019.

SHUMAN, J. L. *et al.* Plant metabolomics by GC-MS and differential analysis. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, 2011. v. 678, p. 229–246.

SILVA, A. C. Da *et al.* Effectiveness of essential oils in the treatment of *Colletotrichum truncatum*-infected soybean seeds. **Tropical Plant Pathology**, out. 2012. v. 37, n. 5, p. 305–313.

SILVA, C. M. Da; COLUCCI NETO, V. O suicídio: uma reflexão sobre medidas preventivas. **Archives of Health Investigation**, 2020. v. 9, n. 1, p. 80–86.

SILVA, C. P.; XAVIER-FILHO, J. Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinases of the larval midguts of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Zabrotes subfasciatus*

(BOH.) (Coleoptera: bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, jan. 1991. v. 99, n. 3, p. 529–533.

SILVA MOURA, E. DA *et al.* Optimal extraction of *Ocimum basilicum* essential oil by association of ultrasound and hydrodistillation and its potential as a biopesticide against a major stored grains pest. **Molecules**, 2020. v. 25, n. 12, p. 1–16.

SIMIONATTO, E. *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Aloysia sellowii*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2005. v. 16, n. 6 B, p. 1458–1462.

SINGH, Y. K. Quality of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) oils under different storage conditions and their nematicidal activity. **International Journal of Agriculture, Environment & Biotechnology**, 7(4), 903-909, 2006.

SMARTT, J. Evolution of grain legumes. iii. pulses in the genus vigna. **Experimental Agriculture**, 1985. v. 21, n. 2, p. 87–100.

SNART, C. J. P.; HARDY, I. C. W.; BARRETT, D. A. Entometabolomics: Applications of modern analytical techniques to insect studies. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 2015. v. 155, n. 1, p. 1–17.

SOLUTIONS, S. A. U. **Produtos Fitofarmacêuticos autorizados em Modo de Produção Biológico (atualizado em Março de 2020)**.

SOUZA, R. M. DE *et al.* Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: A review. **Process Safety and Environmental Protection**, 2020. v. 135, p. 22–37.

STATHERS, T. E. *et al.* Measuring the nutritional cost of insect infestation of stored maize and cowpea. **Food Security**, 2020. v. 12, n. 2, p. 285–308.

STEC, N. **The Role of Proline Oxidation and Metabolome Dynamics During the Flight of Bombus Impatiens**. University of Ottawa, 2018. Disponível em: <<https://ruor.uottawa.ca/handle/10393/37257>>.

STEELE, J. E. Glycogen Phosphorylase In Insects. **Insect Biochemistry**, 1982. v. 12, n. 2.

STEFFEN, G. P. K.; STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I. Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. **Tecno-Lógica**, 21 jan. 2011. v. 15, n. 1, p. 15–21.

STEWART, S.; HE, X. Intracellular Delivery of Trehalose for Cell Banking. **Langmuir**, 2019. v. 35, n. 23, p. 7414–7422.

STILLWELL, R. C.; FOX, Charles W. Environmental effects on sexual size dimorphism of a seed-feeding beetle. **Oecologia**, 2007. v. 153, n. 2, p. 273–280.

STREET, S. **Evaluation of headspace Solid Phase Micro-extraction method for analysis of**

phosphine residues in wheat. 10th International Working Conference on Stored Product Protection Solid-phase, 2010.

ŠUMIGA, Boštjan; ŠUMIGA, Barbara; PODGORNIK, D. R. And B. B. Microencapsulated *Cymbopogon citratus* Oil. **Coatings**, 2019. v. 9, n. 470, p. 1–21.

SZTAL, T. *et al.* A cytochrome p450 conserved in insects is involved in cuticle formation. **PLoS ONE**, 2012. v. 7, n. 5, p. 1–9.

TAK, J. H.; ISMAN, M. B. Metabolism of citral, the major constituent of lemongrass oil, in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and effects of enzyme inhibitors on toxicity and metabolism. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2016. v. 133, p. 20–25.

TAMANG, A. M.; KALRA, B.; PARKASH, R. Cold and desiccation stress induced changes in the accumulation and utilization of proline and trehalose in seasonal populations of *Drosophila immigrans*. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology**, 2017. v. 203, p. 304–313.

TANG, B. *et al.* Characterization of a trehalose-6-phosphate synthase gene from *Spodoptera exigua* and its function identification through RNA interference. **Journal of Insect Physiology**, 2010. v. 56, n. 7, p. 813–821.

TANG, B. *et al.* Suppressing the activity of trehalase with validamycin disrupts the trehalose and chitin biosynthesis pathways in the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2017. v. 137, p. 81–90.

TANG, B. *et al.* Invertebrate trehalose-6-phosphate synthase gene: Genetic architecture, biochemistry, physiological function, and potential applications. **Frontiers in Physiology**, 2018. v. 9, n. JAN, p. 1–13.

TANZUBIL, P. B. Control of some insect pests of cowpea (*Vigna unguiculata*) with neem (*Azadirachta indica* A Juss.) in Northern Ghana. **Tropical Pest Management**, 13 nov. 1991. v. 37, n. 3, p. 216–217. 2016.

TARUVINGA, C.; MEJIA, D.; ALVAREZ, J. S. **Appropriate Seed and Grain Storage Systems for Small-scale Farmers**. [S.l.]: [s.n.], 2014.

TCHOUMBOUGNANG, F. *et al.* In vivo antimalarial activity of essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Ocimum gratissimum* on mice infected with *Plasmodium berghei*. **Planta Medica**, 27 jan. 2005. v. 71, n. 1, p. 20–23.

TEIXEIRA, Z. *et al.* Chemical composition and insecticidal activity of *Cymbopogon citratus* essential oil from Cuba and Brazil against housefly. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 2015. v. 24, n. 1, p. 36–44.

TEULIER, L.; WEBER, J. M.; *et al.* **Proline as a fuel for insect flight: Enhancing carbohydrate oxidation in hymenopterans. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.**

TEULIER, L.; WEBER, J.-M.; *et al.* Proline as a fuel for insect flight: enhancing carbohydrate oxidation in hymenopterans. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 13 jul. 2016. v. 283, n. 1834, p. 20160333..

THABIT, T. M. A. M.; ELGEDDAWY, D. I. H. Determination of Phosphine Residues in Wheat and Yellow Corn with a New Developed Method Using Headspace and SIM Mode GC-MS. **Journal of AOAC International**, 2018. v. 101, n. 1, p. 288–292.

THOMAS, M. B.; READ, A. F. Can fungal biopesticides control malaria? **Nature**, 2007. v. 5, n. May, p. 377–383.

THUONG NHAN, N. P. *et al.* Microencapsulation of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil via spray drying: Effects of feed emulsion parameters. **Processes**, 2020. v. 8, n. 1, p. 13.

TIAN, T. *et al.* Phosphates as energy sources to expand metabolic networks. **Life**, 2019. v. 9, n. 2, p. 1–12.

TIMMERMANN, C. Pesticides and the Patent Bargain. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, 2014. v. 28, n. 1, p. 1–17.

TOPRAK, U. The Role of Peptide Hormones in Insect Lipid Metabolism. **Frontiers in Physiology**, 2020. v. 11, n. May, p. 1–33.

TOPRAK, U. *et al.* A journey into the world of insect lipid metabolism. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 2020. v. 104, n. 2, p. 1–67.

TOSI, S. *et al.* Neonicotinoid pesticides and nutritional stress synergistically reduce survival in honey bees. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 2017. v. 284, n. 1869.

TRAN, T. K. N. *et al.* Development of an aromatic wax product containing natural Lemongrass (*Cymbopogon Citratus*) essential oil. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, 2020. v. 736, n. 2, p. 8.

TREZZI, J. P. *et al.* Metabolic profiling of body fluids and multivariate data analysis. **MethodsX**, 2017. v. 4, p. 95–103.

TRIVEDI; NAYAK; KUMAR. Fumigant toxicity study of different essential oils against stored grain pest *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, 2017. v. 6, n. 4, p. 1708–1711.

TSUGAWA, H. *et al.* MS-DIAL: Data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive

- metabolome analysis. **Nature Methods**, 2015. v. 12, n. 6, p. 523–526.
- TUREK, C.; STINTZING, F. C. Impact of different storage conditions on the quality of selected essential oils. **Food Research International**, 2012. v. 46, n. 1, p. 341–353.
- TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of essential oils: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2013. v. 12, n. 1, p. 40–53.
- UNDAS, A. K. *et al.* The Use of Metabolomics to Elucidate Resistance Markers against Damson-Hop Aphid. **Journal of Chemical Ecology**, 2018. v. 44, n. 7–8, p. 711–726.
- USDA. **Grain and Feed Annual Corn Production Forecast Grows on Expanded Safrinha Area and Good Weather Conditions**. [S.l.]: [s.n.], 2019.
- USDA. Grain: World Markets and Trade. [S.l.]: United States Department of Agriculture, 2020. p. 42.
- UTIDA, S. Density dependent polymorphism in the adult of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera, Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, 1972. v. 8, n. 2, p. 111–125.
- VARSHNEY, R. K. *et al.* Agricultural biotechnology for crop improvement in a variable climate: Hope or hype? **Trends in Plant Science**, 2011. v. 16, n. 7, p. 363–371.
- VASUDEVA, R.; DEEMING, D. C.; EADY, P. E. Larval developmental temperature and ambient temperature affect copulation duration in a seed beetle. **Behaviour**, 1 jan. 2018. v. 155, n. 1, p. 69–82.
- VEL, E. VAN DE; SAMPERS, I.; RAES, K. A review on influencing factors on the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2019. v. 59, n. 3, p. 357–378.
- VIJAYAKUMAR, G.; MOHANKUMAR, B. S. A potential biopesticide from *Amorphophallus paeoniifolius* to increase the shelf life of stored food grains. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2020. n. November, p. 1–8.
- VIKTOROVÁ, J. *et al.* Lemon grass essential oil does not modulate cancer cells multidrug resistance by citral—its dominant and strongly antimicrobial compound. **Foods**, 2020. v. 9, n. 5.
- WANG, D. *et al.* Mechanism of the different metabolome responses between *Plutella xylostella* and *Pieris rapae* treated with the diamide insecticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2020. v. 203, n. July, p. 111033.
- WEI, D. *et al.* Comparative Proteomic Profiling Reveals Molecular Characteristics Associated with Oogenesis and Oocyte Maturation during Ovarian Development of *Bactrocera dorsalis* (Hendel). **International Journal of Molecular Science**, 2017. v. 18, n. 7, p. 1–23.

WIESENBORN, W. D. Phosphorus contents in desert riparian spiders and insects vary among taxa and between flight capabilities. **Florida Entomologist**, 2013. v. 96, n. 2, p. 424–432.

WILKINSON, J.; WESZ JUNIOR, V. J.; LOPANE, A. R. M. Brazil and China: the agribusiness connection in the Southern Cone context. **Third World Thematics: A TWQ Journal**, 2016. v. 1, n. 5, p. 726–745.

WOLFF, J. A.; LEDERBERG, J. An Early History of Gene Transfer and Therapy. **Human Gene Therapy**, 1994. v. 5, n. 4, p. 469–480.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. **Real-time PCR for mRNA quantitation**. BioTechniques. Eaton Publishing Company.

WYATT, G. R.; KROPF, R. B.; CAREY, F. G. The chemistry of insect haemolymph-IV. Acid-soluble phosphates. **Journal of Insect Physiology**, 1963. v. 9, n. 2, p. 137–152.

XAVIER, M. V. A. *et al.* Viabilidade de sementes de feijão caupi após o tratamento com óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2012. v. 14, n. spe, p. 250–254.

XU, W. H.; LU, Y. X.; DENLINGER, D. L. Cross-talk between the fat body and brain regulates insect developmental arrest. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2012. v. 109, n. 36, p. 14687–14692.

XU, Y.-J. *et al.* Metabolomics reveals insect metabolic responses associated with fungal infection. **Analytical and bioanalytical chemistry**, jun. 2015. v. 407, n. 16, p. 4815–21.

YAMADA, T. *et al.* Erratum: Correction: Fat body glycogen serves as a metabolic safeguard for the maintenance of sugar levels in *Drosophila*. **Development (Cambridge, England)**, 2018. v. 145, n. 7.

YAN, H. *et al.* Phosphine Analysis in Postmortem Specimens Following Inhalation of Phosphine: Fatal Aluminum Phosphide Poisoning in Children. **Journal of analytical toxicology**, 2018. v. 42, n. 5, p. 330–336.

YANG, X. *et al.* Inhibition of citral degradation by oil-in-water nanoemulsions combined with antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 8 jun. 2011. v. 59, n. 11, p. 6113–6119.

YANG, Yunxia *et al.* Adaptive evolution of mitochondrial energy metabolism genes associated with increased energy demand in flying insects. **PLoS ONE**, 2014. v. 9, n. 6.

YU, Rosemary; NIELSEN, J. Yeast systems biology in understanding principles of physiology underlying complex human diseases. **Current Opinion in Biotechnology**, 2020. v. 63, p. 63–69.

- YUAN, C. L.; HU, Y. C. A Transgenic core facility's experience in genome editing revolution. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. Springer New York LLC, 2017, V. 1016, p. 75–90.
- ZAKLADNOY, G. A. Analysis of the Resistance of Grain Pests To Phosphine. Review. **Food systems**, 2020. v. 3, n. 1, p. 21–24.
- ZANARDI, O. Z. *et al.* Bioactivity of a matrine-based biopesticide against four pest species of agricultural importance. **Crop Protection**, 2015. v. 67, p. 160–167.
- ZHANG, A. *et al.* Modern analytical techniques in metabolomics analysis. **Analyst**, 2012. v. 137, n. 2, p. 293–300.
- ZHANG, Q.; LU, Y. X.; XU, W. H. Integrated proteomic and metabolomic analysis of larval brain associated with diapause induction and preparation in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Journal of Proteome Research**, 2012. v. 11, n. 2, p. 1042–1053.
- ZHANG, Q.; LU, Y. X.; XU, W. H. Proteomic and metabolomic profiles of larval hemolymph associated with diapause in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. **BMC Genomics**, 2013. v. 14, n. 1.
- ZHAO KEFEI ; GE LINQUAN ; CHENG YAO ; WU JINCAI ; YANG GUOQING. Effects of three insecticides on trehalose content and trehalase activity in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae). **Acta Entomologica Sinica**, 2011. v. 54, n. 7, p. 786–792.
- ZHOU, L. *et al.* Developmental changes for the hemolymph metabolome of silkworm (*Bombyx mori* L.). **Journal of Proteome Research**, 2015. v. 14, n. 5, p. 2331–2347.
- ZIEGLER, R.; VANANTWERPEN, R. Lipid uptake by insect oocytes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, abr. 2006. v. 36, n. 4, p. 264–272.
- ZUNJARE, R. *et al.* Genetics of resistance to stored grain weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in maize. **Cogent Food & Agriculture**, 2015. v. 1, n. 1, p. 1–9.