

UFRRJ
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

**ESTUDO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS
ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi
E *Lippia alba* [Mill] N.E.Br ex Britton & P. Wilson PARA
A PROTEÇÃO DE SEMENTES CONTRA
Callosobruchus maculatus Fabricius, 1775**

Rafael Torre

Seropédica

2022



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

**ESTUDO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS
ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi
E *Lippia alba* [Mill] N.E.Br ex Britton & P. Wilson PARA
A PROTEÇÃO DE SEMENTES CONTRA
Callosobruchus maculatus Fabricius, 1775**

Rafael Torre

Sob a orientação do Professor

Marco André Alves de Souza

e Coorientação do Professor

Emerson Guedes Pontes

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

Seropédica, RJ

Dezembro, 2022

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

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

T689e Torre, Rafael, 1994-
Estudo e avaliação da toxicidade dos óleos essenciais de *Schinus terebinthifolius* Raddi e *Lippia alba* [Mill] N.E.Br ex Britton & P. Wilson para a proteção de sementes contra *Callosobruchus maculatus* Fabricius, 1775 / Rafael Torre. - Seropédica, 2022.
73 f.

Orientador: Marco André Alves de Souza.
Coorientador: Emerson Guedes Pontes.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química, 2022.

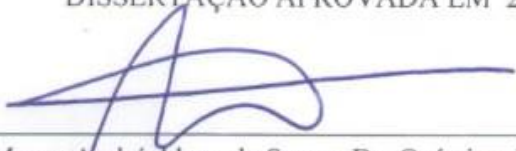
1. Defensivo Botânico. 2. Insetos-praga de grãos armazenados. 3. feijão-caupi. I. Souza, Marco André Alves de, 1975-, orient. II. Pontes, Emerson Guedes, 1974-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

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

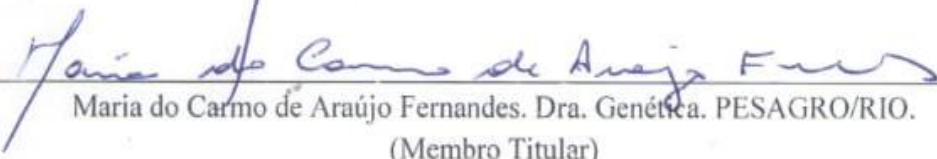
RAFAEL TORRE

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


DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22/12/2022



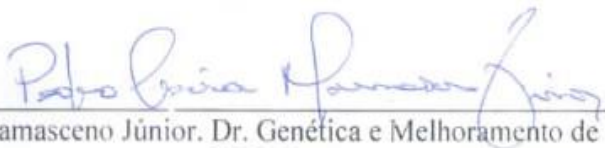
Marco André Alves de Souza. Dr. Química. UFRRJ.
(Orientador)



Maria do Carmo de Araújo Fernandes. Dra. Genética. PESAGRO/RIO.
(Membro Titular)



Carolina Rodrigues de Araújo. Dra. Ecologia e Recursos Naturais. EMBRAPA.
(Membro Titular)



Pedro Corrêa Damasceno Júnior. Dr. Genética e Melhoramento de Plantas.
UFRRJ.
(Membro Titular)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que contribuíram para a existência dele, principalmente meus pais e meu orientador Prof. Marco André.

“As coisas podem chegar até aqueles que esperam, mas são somente sobras deixadas por aqueles que lutam.” (Abraham Lincoln).

AGRADECIMENTOS

Absolutamente nada se faz sem ajuda. Durante esses cerca de 2 anos e 10 meses reaprendi duas valiosas lições que carregarei comigo e não mais esquecerei: nada é tão simples ao ponto de ignorarmos, tão pouco é complexo o suficiente para se tornar impossível e com auxílio e trabalho em grupo, tudo ocorre de maneira mais interessante, prática e prazerosa.

Aqui agradeço a cada membro do Laboratório de Plantas Aromáticas e Medicinais da UFRRJ: Elisabeth, Camila, Sandy, Ygor e a todos que estiveram juntos em algum momento dessa jornada. Lembrarei sempre a nossa convivência, trocas de aprendizados e auxílio como um exemplo para vida.

Um agradecimento muito especial a meu orientador Prof. Marco André. Você me ensinou muito mais do que imagina. Além da importância da ciência de base e formação de recursos humanos capacitados para a área, o senhor me ensinou o exemplo de profissional e pessoa correta e capacitada que não mede esforços na dedicação aos seus alunos e ao seu trabalho que devo seguir na minha vida e carreira

Agradeço a meus pais que não mediram esforços e sempre me apoiaram nos meus estudos, inclusive quando decidi estudar em outro estado e hoje posso reconhecer como é difícil essa distância por tanto tempo. Pai e mãe, os senhores são minha inspiração, raízes e exemplo de família cheia de amor que devo sempre perseguir.

Agradeço aos amigos que a Rural e Seropédica me trouxeram desde a graduação: Danniell, Rodrigo, Nathaly, Eduardo, Lana e Thiane. Vocês tornaram o caminho até aqui mais proveitoso de ser percorrido.

Agradeço a Universidade Rural do Rio de Janeiro que faz parte de um capítulo enorme e maravilhoso da minha vida para sempre.

Por fim, agradeço a todos que possibilitaram a existência deste trabalho!

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

RESUMO

TORRE, Rafael. **Estudo e avaliação da toxicidade dos óleos essenciais de *Schinus terebinthifolius* Raddi e *Lippia alba* [Mill] N.E.Br ex Britton & P. Wilson para a proteção de sementes contra *Callosobruchus maculatus* Fabricius, 1775.** 2022. 73p. Dissertação (Mestrado em Química, Agrobioquímica). Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

A contínua utilização de agrotóxicos sintéticos trouxe o surgimento de preocupações a respeito de seus efeitos residuais tanto no meio ambiente, quanto à saúde humana, além de aumento de populações resistentes de pragas agrícolas. Métodos alternativos são estudados como forma de mitigar essas consequências, e entre eles está a utilização de óleos essenciais como forma de controle de pragas. Esse estudo buscou verificar os efeitos por fumigação de 12 óleos essenciais de diferentes composições químicas advindos de genótipos de duas espécies de plantas: *Lippia alba* (UFRRJ ECB021/022 QT citral/limoneno, UFRRJ ECB037/029/016 QT citral, UFRRJ ECB003/008 QT carvona/limoneno e UFRRJ ECB028 QT linalol) e *Schinus terebinthifolius* (UFRRJ ARO011 QT α -pineno, UFRRJ ARO050 QT sabineno, UFRRJ ARO079 QT α -felandreno/ α -pineno, UFRRJ ARO025 QT β -pineno/ α -pineno, UFRRJ ARO032 QT δ -careno/ α -pineno, UFRRJ ARO094 QT limoneno, UFRRJ ARO078 QT α -felandreno/sabineno e UFRRJ ARO022 QT mirceno) contra o caruncho do feijão-caupi, *Callosobruchus maculatus*. Foram utilizadas concentrações na faixa entre 0,10 mg/mL de ar e 1,00 mg/mL de ar para avaliação de aspectos do ciclo de vida do inseto, como: mortalidade, postura de ovos, emergência de novos adultos e taxa de emergência. Além disso, eclosão larval e proteção da massa dos grãos de feijão foram avaliados em testes com os óleos dos genótipos de *S. terebinthifolius*: UFRRJ ARO032 QT δ -careno/ α -pineno e UFRRJ ARO094 QT limoneno e com todos os óleos de *L. alba*. Os resultados indicaram tendências de inibição do ciclo de vida em todos os óleos testados, sendo o óleo do genótipo UFRRJ ECB028 QT linalol o que obteve menor CL₅₀ (0,1017 mg/mL de ar). Os óleos de *L. alba* obtiveram melhor controle da reprodução de *C. maculatus* e melhora na proteção das sementes.

Palavras-chave: defensivo botânico, inseto-praga de grãos armazenados, feijão-caupi.

ABSTRACT

TORRE, Rafael. **Study and evaluation of the toxicity of essential oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi and *Lippia alba* [Mill] N.E.Br ex Britton & P. Wilson and bushy matgrass for seed protection against *Callosobruchus maculatus* Fabricius, 1775.** 2022. 73p. Dissertação (Mestrado em Química, Agrobioquímica). Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

The continuous use of synthetic pesticides has raised concerns about their residual effects on both the environment and human health, as well as an increase in agricultural pests resistance. Alternative methods are studied as a way of mitigating these consequences, and among them is the use of essential oils as a manner of controlling pests. This work aimed to assess the fumigation effects of 12 essential oils of different chemical compositions from genotypes of two plant species: *Lippia alba* (UFRRJ ECB021/022 QT citral/limonene, UFRRJ ECB037/029/016 QT citral, UFRRJ ECB003/008 QT carvone/limonene e UFRRJ ECB028 QT linalool) e *Schinus terebinthifolius* (UFRRJ ARO011 QT α -pinene, UFRRJ ARO050 QT sabinene, UFRRJ ARO079 QT α -phellandrene/ α -pinene, UFRRJ ARO025 QT β -pinene/ α -pinene, UFRRJ ARO032 QT δ -carene/ α -pinene, UFRRJ ARO094 QT limonene, UFRRJ ARO078 QT α -phellandrene/sabinene e UFRRJ ARO022 QT mircene) against the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. Concentrations in the range between 0.10 mg/mL of air and 1.00 mg/mL of air were used to evaluate aspects from insect reproductive cycle, such as: mortality, egg laying, emergence of new adults and emergence rate. Furthermore, larval hatching and bean grain mass preservation were assessed in assays with the oils of the *S. terebinthifolius* genotypes: UFRRJ ARO032 QT δ -carene/ α -pinene e UFRRJ ARO094 QT limonene and with all *L. alba* oils. The results indicated reproductive cycle inhibition occurs in all oils tested, with the UFRRJ ECB028 QT linalool oil having the lowest LC₅₀ (0.1017 mg/mL of air). *L. alba* oils achieved better control of *C. maculatus* reproduction and improved seed protection.

Keywords: botanical pesticide, stored seed pest, cowpea.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa-múndi com as rotas de dispersão de <i>C. maculatus</i>	3
Figura 2 - Sementes de feijão-caupi de coloração bege claro	3
Figura 3 - Adultos fêmea e macho de <i>C. maculatus</i>	6
Figura 4 - Tamanho de indivíduos adultos de <i>C. maculatus</i>	6
Figura 5 - Micrografia do órgão reprodutor masculino em <i>C. maculatus</i>	7
Figura 6 – Oviposição em superfície de sementes de feijão-caupi	8
Figura 7 – Ciclo de vida de <i>C. maculatus</i>	9
Figura 8 - Saco com tripla camada hermeticamente selado utilizado para armazenamento de produção agrícola	10
Figura 9 - Vias de formação simplificadas das principais substâncias presentes nos óleos essenciais	11
Figura 10 - Exemplos de monoterpenóides produzidos pela via metileritritol-4-fosfato e pela via do mevalonato.....	11
Figura 11 - Representação simplificada do sistema nervoso do inseto	16
Figura 12 - Agrupamento de genótipos de aroeira e erva-cidreira.....	19
Figura 13 - Linha do tempo para a coleta de insetos em diferentes estágios	21
Figura 14 – Obtenção dos dados para análise de imagem de <i>C. maculatus</i>	22
Figura 15 - Unidades experimentais com o experimento montado.....	24
Figura 16 - Massa, perímetro e área do inseto <i>C. maculatus</i> durante seu ciclo de vida.....	27
Figura 17 - Mortalidade de <i>C. maculatus</i> em função da concentração dos óleos essenciais de aroeira e erva-cidreira após 48 h.....	30
Figura 18 - Postura de ovos em função da concentração de óleos essenciais de aroeira e erva-cidreira	35
Figura 19 - Emergência de novos adultos em função da concentração dos óleos essenciais de aroeira e erva-cidreira.....	37
Figura 20 - Taxa de fertilidade (eclosão dos ovos) de <i>C. maculatus</i> em função da concentração de óleos essenciais de aroeira e erva-cidreira	38
Figura 21 - Taxa de emergência de <i>C. maculatus</i> em função da concentração de óleos essenciais de aroeira e erva-cidreira	40
Figura 22 – Perda de massa em função da concentração dos óleos essenciais de erva-cidreira e aroeira	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Países com maior produção de feijão-caupi no ano de 2019.....	4
Tabela 2 - Códigos dos genótipos utilizados com seu quimiótipo e concentrações testadas.	23
Tabela 3 – Parâmetros medidos de larguras proximal, mediana e distal e comprimento longitudinal do inseto nas fases de pupa e adulto (média aritmética \pm desvio padrão)..	28
Tabela 4 – Parâmetros das equações das curvas de ajuste e DL ₅₀ calculadas dos óleos essenciais sobre <i>C. maculatus</i>	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Origem e dispersão de <i>Callosobruchus maculatus</i>	2
2.2 Importância econômica de <i>Callosobruchus maculatus</i>	3
2.3 Morfologia e Anatomia de <i>Callosobruchus maculatus</i>	5
2.4 Ciclo de vida e reprodução de <i>Callosobruchus maculatus</i>	6
2.5 Métodos de controle de dano econômico de <i>Callosobruchus maculatus</i>	9
2.6 Atividade de óleos essenciais frente ao <i>Callosobruchus maculatus</i>	11
2.7 Metodologias de aplicação de óleos essenciais sobre <i>Callosobruchus maculatus</i>	13
2.8 Parâmetros do ciclo de vida de <i>Callosobruchus maculatus</i> avaliados em experimentos com óleos essenciais.....	14
2.9 Efeitos sobre o sistema nervoso e metabolismo de eliminação de xenobióticos de <i>Callosobruchus maculatus</i>	15
2.10 Mecanismos de resistência aos óleos essenciais em <i>Callosobruchus maculatus</i>	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Materiais.....	18
3.2 Manutenção da colônia de <i>C. maculatus</i>	20
3.3 Análise por imagem do desenvolvimento de <i>C. maculatus</i>	20
3.4 Ensaio por fumigação.....	22
3.4.1 Mortalidade.....	24
3.4.2 Postura de ovos.....	24
3.4.3 Emergência de novos adultos.....	24
3.4.4 Taxa de emergência.....	25
3.4.5 Taxa de fertilidade.....	25
3.4.6 Perda de massa.....	25
3.4.7 Análise estatística.....	26

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Análise de imagem de <i>Callosobruchus maculatus</i>	26
4.2 Mortalidade de <i>Callosobruchus maculatus</i> com óleos de aroeira e erva-cidreira	28
4.3 Oviposição de <i>Callosobruchus maculatus</i> com óleos de aroeira e erva-cidreira .	33
4.4 Emergência de <i>Callosobruchus maculatus</i> com óleos de aroeira e erva-cidreira	36
4.5 Taxas de emergência e fertilidade de <i>Callosobruchus maculatus</i> com óleos de aroeira e erva-cidreira	38
4.6 Perda de massa das sementes com óleos de aroeira e erva-cidreira.	41
5 Conclusão.....	42
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
7 ANEXOS	51
7.1 Anexo A: ANOVA e médias aritméticas (\pm desvio padrão) para mortalidade, postura, emergência de novos adultos e taxa de emergência.	51
7.2 Anexo B: ANOVA e médias aritméticas (\pm desvio padrão) para eclosão (%) e perda de massa (%).....	56
7.3 Anexo C: Composição dos óleos essenciais de frutos de genótipos de <i>S. terebinthifolius</i> testados.....	59
7.4 Anexo D: Composição dos óleos essenciais de folhas de genótipos de <i>L. alba</i> testados	60

1 INTRODUÇÃO

A revolução verde, no pós-guerra, possibilitou um significativo aumento na produção agrícola mundial. Sustentado, principalmente, por utilização intensa de fertilizantes, cultivares adaptadas à diferentes situações, mecanização do campo e agrotóxicos. E desde então, esses são os meios largamente utilizados na prática agrícola (NICOLOPOULOU-STAMATI *et al.*, 2016).

Ao longo desse período, substâncias como diclorodifeniltricloroetano (DDT), dicrótofos e Paraquat, importantes representantes de diferentes classes de agrotóxicos, no caso: organoclorados, organofosforados e compostos quaternários de amônio, respectivamente, são apenas alguns dos defensivos proibidos ou em processo de retirada em países de grande importância agrícola, tais como Brasil, EUA, Estados-membros da União Europeia e Índia. Isso se deve a preocupações crescentes a respeito de danos ambientais e à saúde humana em longo prazo, já que potencial cancerígeno e efeitos neurodegenerativos (DONLEY, 2019).

Atualmente, fosfatos metálicos, geradores de gás fosfina em contato com a umidade do ar, são as moléculas mais utilizadas na proteção de produção armazenada, tal como sementes. Fosfina (PH₃) é um gás tóxico não só as pragas de armazenamento, mas também aos mamíferos. A inalação desse gás produz efeitos imediatos como náuseas, problemas respiratórios e dores de cabeça. Assim como traz o risco ocupacional de distúrbios gastrointestinais e pulmonares. O valor médio máximo de exposição a fosfina para adultos em jornada de trabalho de 40 h semanais é de 0,42 mg/m³ na maioria dos países desenvolvidos (CABALLERO, 2003).

Métodos, como por exemplo, o uso de extratos botânicos e óleos essenciais de plantas aromáticas têm ganhado força como alternativas amigavelmente ecológicas e de baixo risco ocupacional. Além dessas vantagens, sua natureza complexa permite a diminuição da chance de rápido surgimento de populações resistentes dos insetos alvo.

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), também conhecido como feijão-fradinho, é uma importante *comoditie* brasileira, principalmente no semiárido nordestino, onde ocorre a maior parte de sua produção. No ano de 2014, a estimativa de produção ficou próxima das 500 mil toneladas (BASTOS, 2016). Porém, sua armazenagem para posterior venda requer cuidados.

Callosobruchus maculatus (Fabricius, 1775) (Coleóptera: Bruchidae) é a principal ameaça as sementes armazenadas de feijão-caupi. Sua alta taxa de sucesso reprodutivo e rápido desenvolvimento fazem com que uma infestação de seus insetos possa causar a perda de até 80% da produção em poucos meses, já que sua fase larval se alimenta do interior das sementes, diminuindo assim sua massa e sua qualidade nutricional, bem como aumentando as chances de colonizações do grão por fungos oportunistas.

Portanto, este trabalho buscou analisar efeitos no ciclo de vida de *C. maculatus* causados pela fumigação de óleos essenciais de folhas erva-cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P.Wilson) e frutos de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) de diferentes composições químicas. Assim, diferentes concentrações destes óleos foram testadas com o objetivo de conhecer suas variadas consequências sobre a mortalidade, postura, emergência dos insetos e o grau de proteção sobre a massa dos grãos infestados. Além disso, um método de medição de parâmetros de fases imaturas do inseto foi proposto para possíveis estudos posteriores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Origem e Dispersão de *Callosobruchus maculatus*

Diversidade, essa é uma palavra que caracteriza muito bem um aspecto de toda classe Insecta e sua maior ordem, Coleoptera, representante dos besouros e presente em praticamente todos os ambientes, com mais de 380.000 espécies descritas e cerca de 500 famílias e subfamília, compondo 30% de todo reino Animalia, percentual que a torna, a maior entre todos os organismos. O tamanho reduzido, assim como rápida e prolífica reprodução, elasticidade genética, mudanças na sinalização sexual de populações isoladas, e interação muitas vezes específicas com outros organismos favorecem pressões de diferenciação nos insetos (GULLAN; CRANSTON, 2017).

A zona tropical é um hotspot¹ importante para os insetos, incluindo os besouros; grande parte de sua diversidade se encontra nessa zona. O clima, o solo, a diversidade de outros seres vivos e, conseqüentemente, novidades evolutivas em maior quantidade, auxiliaram na variabilidade desses organismos. O Brasil, por possuir grande extensão territorial e se localizar, em grande medida, entre os trópicos, por exemplo, possui o maior número de espécies estimadas, com apenas três ordens não representadas por nenhuma espécie em território nacional: *Grylloblattariae*, *Raphidioptera* e *Mantophasmatodea*, que são ordens compostas por espécies que costumam ocorrer apenas em biomas restritos, como por exemplo a última citada que possui espécies conhecidas apenas em desertos na África subsaariana (RAFAEL *et al.*, 2012).

Callosobruchus maculatus, conhecido popularmente como caruncho do feijão-caupi, é atualmente uma espécie cosmopolita frequentemente encontrada, em maior quantidade, em regiões de clima quente que utiliza sementes de plantas da família *Fabaceae*, notadamente *Vigna unguiculata*, o feijão-caupi como local para desenvolvimento de seu ciclo de vida, podendo, porém, utilizar grãos de outras espécies como o feijão-azuki (*Vigna angularis*), o feijão mungu-verde (*Vigna radiata*) e grão-de-bico (*Cicer arietinum*) (BECK; BLUMER, 2014; SWAMY *et al.*, 2019).

Apesar de ser encontrado em diversas áreas subtropicais e tropicais do planeta, a origem desse caruncho, provavelmente, remonta a África Ocidental, com um crescimento populacional no continente por volta do início do Holoceno, a atual época geológica do período Quaternário. Nesse período iniciou-se com um aquecimento global que finalizou o último período glacial (KÉBÉ *et al.*, 2017).

Estudos biogeográficos e filogeográficos apoiam a ideia de que a dispersão da espécie ocorreu por mediação de processos humanos através da expansão do comércio global e introdução de seu principal hospedeiro, também originário da África, *V. unguiculata*, em outras localidades. Índícios demonstram uma correspondência na intensificação dessas rotas econômicas e o crescimento da população de *C. maculatus* (KÉBÉ *et al.*, 2017; TUDA *et al.*, 2014).

O segundo continente colonizado, logo após o africano, provavelmente foi o asiático, sendo que neste continente o processo de colonização e crescimento populacional ocorreu por volta de 2000 a 3000 anos atrás, uma estimativa que encontra apoio no surgimento das primeiras grandes civilizações (sociedades mesopotâmica e egípcia) e rotas comerciais de longa distância

¹ Palavra em inglês que descreve regiões com alto grau de espécies endêmicas sob risco de perda deste hábitat (MYERS *et al.*, 2000).

pelo Velho Mundo; assim como na introdução da cultura de feijão-caupi na atual Índia que ocorreu, aproximadamente, no mesmo período. O surgimento mais recente de populações nas Américas é apoiado pela similaridade de alguns trechos do DNA mitocondrial de indivíduos de *C. maculatus* desses diferentes continentes e, se este fato pode se relacionar com o início mais recente de uma globalização maior do comércio, se comparado àquela que ocorria no Velho Mundo. Na **Figura 1** é possível observar essa sequência proposta de dispersão da espécie *C. maculatus* pelo planeta (KÉBÉ *et al.*, 2017).

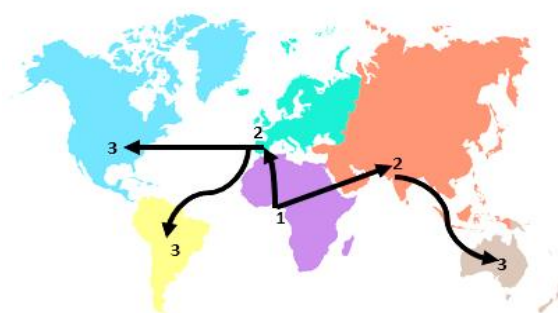


Figura 1 – Mapa-múndi com as rotas de dispersão de *C. maculatus* em preto e os números indicando a sequência de colonização. Perceba como a ordem coincide com a evolução do comércio mundial. As cores representam continentes diferentes. Adaptado de: KÉBÉ *et al.* (2017).

2.2 Importância Econômica de *Callosobruchus maculatus*

Como informado anteriormente, *C. maculatus* não possui o nome popular de caruncho do feijão-caupi sem qualquer motivo, este inseto é um inseto-praga para as sementes de *V. unguiculata* (**Figura 2**) atacando vagens danificadas no campo e, principalmente, o grão armazenado no silo (KPOVIESSI *et al.*, 2019).



Figura 2 – Sementes de feijão-caupi de coloração bege claro. Fonte: imagem capturada pelo autor.

O feijão-caupi é uma excelente fonte de aminoácidos essenciais, carboidratos e vitaminas, com baixa porcentagem de gordura vegetal em sua composição. Além disso, por ser uma planta adaptada a uma ampla faixa de temperatura para um bom desenvolvimento (18-34°C), faz dela uma cultura comercial de interesse alimentício. O cultivo se encontra, predominantemente, na África Ocidental, porém grandes produtores se encontram também na Ásia, América do Sul e Central, com algumas pequenas porções de área de plantio na Europa e sudoeste dos EUA (BASTOS, 2016).

Na **Tabela 1** pode-se observar a produção e rendimento dos maiores países produtores, a maioria se encontra no provável local de origem da planta na parte oeste da região de Sahel, na África. A produção mundial de quase 6 milhões de toneladas no ano de 2019 é subdimensionada, muito por conta de importantes produtores, como Brasil e Índia, não apresentarem os dados da produção separado dos dados de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) (FAOSTAT, 2019).

Tabela 1 – Países com maior produção de feijão-caupi no ano de 2019. Fonte: FAOSTAT (2019)

País	Produção (t)	Produtividade (kg/ha)
Nigéria	3.546.739	808,1
Níger	2.386.735	416,9
Burkina Faso	656.418	483,1
Quênia	222.394	917,9
Mali	215.436	474,2
Gana	202.662	1.357,4
Senegal	184.137	633,5
Camarões	176.924	788,0
Tanzânia	127.884	1.135,2
Mianmar	108.021	880,8

O Brasil não possui dados atualizados sobre sua produção, a estimativa mais atual data de 2014 na qual foi estimada a produção de 482.665 toneladas de feijão-caupi, sendo a maior parte da produção colhida na região do semiárido nordestino, tornando a espécie uma fundamental fonte de renda e emprego para famílias dessa região (BASTOS, 2016).

Como as fases imaturas de *C. maculatus* ocorrem dentro do grão, elas se alimentam de seu endosperma e embrião, causando perdas que podem chegar a mais de 80% do total da colheita em três meses, valor que pode superar facilmente US\$ 300 milhões anualmente, em termos econômicos. A entrada e o consumo pelo inseto, além de tornar o grão inviável para consumo humano e germinação, possibilita a abertura de uma janela para o ataque de fungos oportunistas capazes de produzir e contaminar as sementes com micotoxinas (KPOVIESSI *et al.*, 2019).

O crescimento exponencial de *C. maculatus* rapidamente sai do controle do produtor, caso este não possua técnicas adequadas de manejo de pragas na sua cultura. Colocando em

perspectiva das principais nações produtoras, notadamente países de IDH baixo, essas perdas econômicas se tornam maiores e mais impactantes. Maiores, pois normalmente o nível tecnológico e o armazenamento utilizados são antiquados devido ao custo mais alto de métodos modernos; e mais impactantes, pois essa perda econômica se reflete em populações já enfraquecidas socialmente. Para efeitos de comparação, no ano de 2019, Níger foi um dos países que mais produziu feijão-caupi e sua produtividade ficou em torno de 416 kg/ha, ao passo que países desenvolvidos como os EUA chegaram a ter produtividade superior a 2.400 kg/ha (FAOSTAT, 2019).

Visto a grande perda econômica e produtiva causada pela espécie *C. maculatus* durante o processo de armazenamento, cabe-se ressaltar a importância da preservação, da qual a falta decorre perdas, não somente de aspectos visuais e nutricionais dos grãos, como também de características fisiológicas demonstrativas da capacidade germinativa das sementes. A utilização da semente com boa capacidade germinativa pelo agricultor constitui a base de posteriores operações que levam à produtividade esperada (PEREIRA; BIANCHETTI, 1977).

Outras sementes relevantes também são alvo de *C. maculatus*, como por exemplo grãos-de-bico (*C. arietinum*), uma importante cultura com quase 15 milhões de toneladas produzidas anualmente, sendo a Índia o maior produtor mundial; a inviabilização das sementes tanto para consumo, quanto para plantio, pode chegar a 100% em 4 meses (FAOSTAT, 2019; SWAMY *et al.*, 2019). Em outras sementes do gênero *Vigna spp*, a redução da produção pode chegar a 50% em poucos meses (PUROHIT *et al.*, 2013).

2.3 Morfologia e Anatomia de *Callosobruchus maculatus*

O dano causado pelo inseto pode ser ocasionado, como dito anteriormente, tanto no campo, quanto no armazenamento. Porém, o ataque a lavoura ou ao depósito são feitos, geralmente, por morfotipos diferentes, isso porque *C. maculatus* possui duas formas: uma denominada ativa e a outra sedentária, sendo a diferença comportamental proeminente entre as duas o voo, o que faz com que a forma ativa seja mais encontrada em vagens ainda no campo, e a sedentária em silo (BECK; BLUMER, 2014; UTIDA, 1972).

Os dois morfotipos podem ser diferenciados por uma série de características, como por exemplo o contorno e coloração de seus corpos: a forma sedentária possui uma forma mais elipsóide ao emergir, com a cutícula escurecida visível e estende o final do abdômen (pigídio) além do contorno do élitro possuindo uma faixa branca dividindo ao meio as partes escurecidas, ao passo que a forma ativa exibe pubescência em mais partes do corpo, sendo sua cor definida pelas cores de seus pelos, e seu abdômen não se estende além da margem posterior do élitro, dificultando, inclusive, sua sexagem (BECK; BLUMER, 2014; UTIDA, 1972).

A diferença anatômica entre os sexos em *C. maculatus* possui detalhes que podem ser distinguidos visualmente sem a necessidade de lupa, como por exemplo, no morfotipo sedentário, o tamanho e coloração do pigídio, o qual é maior e mais escurecido com uma faixa branca central em fêmeas (**Figura 3 e 4**) (BECK; BLUMER, 2014).



Figura 3 - Adultos fêmea e macho de *C. maculatus* em perspectiva ventral (A). Adulto fêmea em perspectiva dorsal (B). Adultos macho e fêmea em perspectiva lateral (C). Adulto macho em perspectiva dorsal (D). Fonte: imagens capturadas pelo autor.

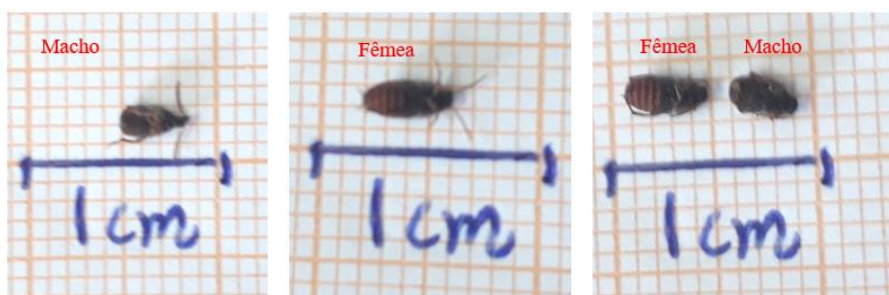


Figura 4 - Tamanho de indivíduos adultos de *C. maculatus* em comparação a escala de 1 cm. Fonte: imagem capturada pelo autor.

2.4 Ciclo de Vida e Reprodução de *Callosobruchus maculatus*

Ciclos são repetições de eventos que acontecem sempre em uma determinada ordem, portanto podemos compreender o ciclo de vida de *C. maculatus* iniciando por qualquer evento deste ciclo, como por exemplo a copula, ou seja, seu comportamento sexual.

Logo após emergirem, tendo em vista seu curto período de vida adulta, os indivíduos machos de *C. maculatus* já possuem comportamento de perseguição para copula com a fêmea, apesar de seus espermatóforos estarem completamente desenvolvidos apenas 24 horas após a emergência. As fêmeas, por sua vez, desde o primeiro até o quarto dia pós-emergência liberam crescentes quantidades de feromônios sexuais (SHU *et al.*, 1996).

Após a copula, as fêmeas costumam diminuir, durante algumas horas, a produção desses feromônios e, portanto, tornam-se menos disponíveis para um novo encontro em sequência, possivelmente por conta do órgão reprodutor masculino (edeago) possuir espinhos (**Figura 5**) que podem infringir danos ao trato reprodutivo feminino, até por isso é comum observar um comportamento de tentativa de término da cópula partindo das fêmeas através de “chutes” no parceiro sexual (RÖNN *et al.*, 2012; VAN LIESHOUT *et al.*, 2014). Portanto é comum que

fêmeas copulem mais de uma vez com diferentes machos e que machos copulem com mais de uma fêmea (SAVALLI *et al.*, 1999).



Figura 5 - Micrografia do órgão reprodutor masculino em *C. maculatus*. Fonte: RÖNN *et al.* (2007).

A fêmea fecundada é responsável por escolher a semente onde irá depositar os ovos sobre a sua superfície. Para essa tarefa, ela procura por sinais físicos e químicos que auxiliam na melhor alocação dos ovos, como por exemplo compostos orgânicos voláteis liberados pelo grão seco que podem atrair ou repelir os indivíduos, a textura da superfície do grão, possuindo uma preferência por superfícies lisas, o tamanho do grão e, possivelmente, feromônios deixados anteriormente por fêmeas da mesma espécie em locais onde já ocorreu postura, auxiliando na diminuição de super parasitismo nas sementes e na competição entre larvas (AHUCHAOGU *et al.*, 2021; COPE *et al.*, 2003). As fêmeas ovipositam, em média, de 60 a 80 ovos, sendo a maior quantidade posta já no primeiro dia após a emergência (CREDLAND *et al.*, 1989; LIMA *et al.*, 2004).

Os ovos são ovais ou fusiformes e, inicialmente, aparentam ser translúcidos, porém após a larva eclodir para dentro do grão a coloração se modifica para um branco pálido (**Figura 6**) devido aos dejetos da larva (BECK; BLUMER, 2014; SÁ *et al.*, 2014).

A larva leva em torno de 6 dias para completar sua embriogênese e penetrar na semente, sendo que a taxa de fertilidade, ou seja, larvas eclodidas por número de ovos postos, varia de acordo com a cultivar do grão de feijão caupi hospedeiro, porém sempre com números acima 80% de viabilidade (LIMA *et al.*, 2002). A sua coloração é branca e ela passa por uma série de instares até chegar a fase de pupa, o tempo para que isso ocorra é em média de 14 dias e seu crescimento é exponencial, dado que em cerca de 4 dias após sua entrada no grão, seu peso médio é de 1,8 mg e logo antes da formação da pupa, cerca de 14 dias após entrada na semente, seu peso médio ultrapassa a marca de 10 mg (SÁ *et al.*, 2014; GALLO, *et al.*, 2002).

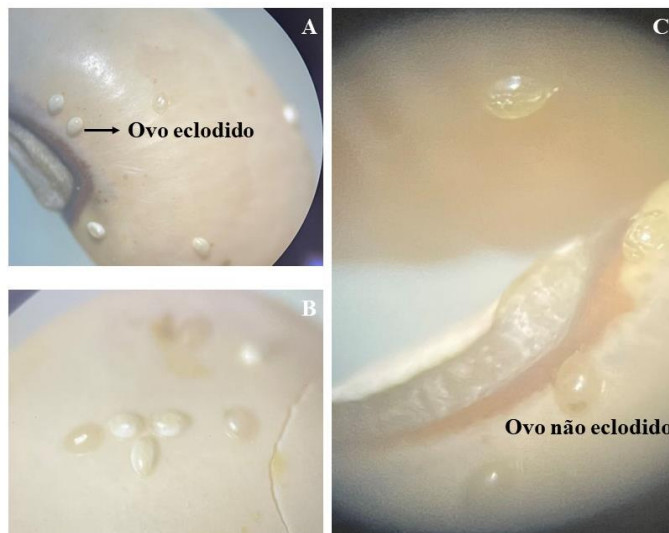


Figura 6 – Oviposição em superfície de sementes de feijão-caupi com destaque para o aspecto dos ovos eclodidos de coloração branco leitosa (A). Ovos eclodidos e não eclodidos próximos. Os ovos não eclodidos possuem uma maior transparência (B). Destaque para a aparência de ovos não eclodidos em superfície de feijão-caupi (C). Fonte: imagem capturada pelo autor.

Na fase de pupa, que dura em torno de 6 dias, ocorre a metamorfose entre as fases imaturas e a fase adulta. Possui comprimento, em média, de 3,87 mm e largura de 1,76 mm e coloração branca e se posiciona em um local estratégico, já próximo ao tegumento do grão que fica mais fino nessa parte, permitindo ao fim do período de pupa, ao inseto adulto emergir para fora do grão. O ciclo completo (da oviposição a emergência do inseto adulto) dura em torno de 25 a 30 dias dependendo da temperatura e umidade relativa do ambiente (BECK; BLUMER, 2014; SÁ *et al.*, 2014).

Há trabalhos e livros que informam que a proporção entre sexos seria de 1:1, porém existem outros estudos que mostram uma variação da proporção de acordo com a temperatura, sendo que em temperaturas maiores (cerca de 30°C) a proporção aumenta para machos, tornando a próxima de 1:1 e em temperaturas mais baixas (cerca de 20°C) a proporção de fêmeas se torna maior (STILLWELL *et al.*, 2007). Os adultos não necessitam de alimentação, no entanto podem alimentar-se se com água açucarada. Seu tempo médio de vida varia de uma a duas semanas (MAŁEK *et al.*, 2021). Caso tenha acesso à alimentação quando adulto, o tempo de vida aumenta consideravelmente para cerca de 30 dias (URSPRUNG *et al.*, 2009). Na **Figura 7** é possível observar um resumo desse ciclo, com destaque para as principais características de cada etapa.

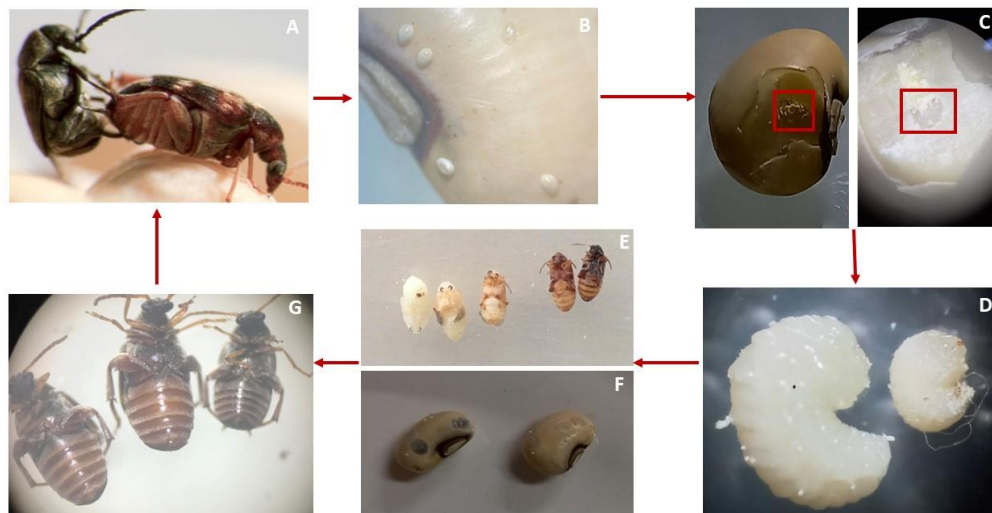


Figura 7 - Cópula entre adultos. O macho está à esquerda (A). Oviposição feita na superfície do grão (B). Larvas dentro do grão em destaque nos retângulos em vermelho (C). Larvas em diferentes instares retiradas de dentro dos grãos (D). Pupas em diferentes estágios, desde a formação inicial da pupa até formação do adulto (E). Janelas de emergência formadas quando se aproxima o momento de emergência do adulto (F). Adultos formados (G). Fonte: imagem capturada pelo autor.

2.5 Métodos de Controle de Dano Econômico de *Callosobruchus maculatus*

O elevado dano causado por *C. maculatus* aos grãos armazenados, principalmente, faz com que se busque diferentes soluções para o problema. Esses diferentes métodos possuem custos e benefícios associados, e com o passar do tempo, novas e melhores tecnologias são adicionadas como opções nesse vasto mercado.

Como método de controle químico, dois produtos da mesma classe são encontrados como registrados no sistema de consultas a defensivos agrícolas do ministério da agricultura brasileiro, o fosfeto de alumínio e o fosfeto de magnésio, ambos precursores da fosfina (AGROFIT).

A fosfina é um agente fumigante utilizado para desinfestação em sementes armazenadas desde os anos 1930, quando se tem os registros de suas primeiras aplicações na Alemanha. Atua, provavelmente, como agente redutor capaz de irromper sistemas biológicos redox e gerar espécies reativas de oxigênio em insetos, o que seria uma possível explicação do mecanismo de ação inseticida. Pode gerar populações resistentes, como já reportado na literatura, através tanto da menor taxa de respiração desenvolvida por esses insetos, quanto por um sítio de ligação menos sensível e um mecanismo de efluxo na membrana mais eficiente no quesito de exclusão desse gás (EPPO, 2012). Além disso, o gás é altamente prejudicial ao pulmão humano, sendo que como efeitos de curto-prazo podemos destacar: irritação respiratória, comprometimento das funções cardíacas e circulatórias e dores gastrointestinais (CDC, 2011).

Um tipo de controle muitas vezes mais barato que o controle químico, é o controle físico, o qual requer um certo cuidado de limpeza no momento da armazenagem dos grãos e vagens colhidas para que não ocorra uma infestação cruzada. Vários são os métodos que podem ser utilizados nessa categoria, entre eles estão sacos hermeticamente selados, os quais possuem uma tripla camada de fibras plásticas e sacos de fibra de juta (**Figura 8**), o qual pode ser reutilizado várias vezes sem perder a qualidade. Esses métodos físicos de barreira costumam

ser baratos e eficientes contra pragas de grãos armazenados, porém qualquer injúria que haja em sua extensão, costuma ser suficiente para diminuição de sua eficiência (KALPNA *et al.*, 2022). Outra forma física com bom custo-benefício é o uso de uma certa proporção de óleo vegetal para recobrir as sementes com uma camada extra que inibe tanto a oviposição, quanto a fixação do ovo no tegumento e ainda dificulta o rompimento do tegumento por parte da larva que está eclodindo em direção ao interior da semente.



Figura 8 - Saco com tripla camada hermeticamente selado utilizado para armazenamento de produção agrícola. Fonte: MANANDHAR *et al.* (2018).

Opções de variedades disponíveis criadas por programas de melhoramento genético que envolvem seleção e reprodução de indivíduos com características adequadas, tais como: maior espessura do grão ou presença de proteínas inibidoras do desenvolvimento larval podem se tornar uma escolha viável para o produtor. Infelizmente nem sempre é possível, um estudo de 2013 investigou 31 variedades de feijão-caupi e observou apenas diferentes tempos de desenvolvimento de larva a adulto para *C. maculatus* (ILEKE *et al.*, 2013).

Outra maneira de combate à infestação de *C. maculatus* é o controle biológico que pode ser realizado através da escolha, criação e liberação no ambiente de armazenamento de predador ou de microrganismo patogênico ao inseto, seja da sua fase adulta ou de fases imaturas. Um exemplo de fungo com potencial de utilização no controle em adultos de *C. maculatus* é o fungo *Trichoderma harzianum* em combinação com terra diatomácea ou caulinita, com os quais os autores observaram total mortalidade do inseto após 7 dias (ABDELGALEIL *et al.*, 2021). Um exemplo de predador que pode ser utilizado na armazenagem é o himenóptero *Uscana lariophaga* capaz de parasitar os ovos do caruncho, e que em ambiente controlado para estudo foi capaz de diminuir o dano em massa aos grãos de feijão-caupi em cerca de 36% (VAN HUIS *et al.*, 2002).

E por fim, e não menos importante, existe a possibilidade de controle botânico a *C. maculatus*. Controle este obtido através de óleos essenciais, extratos vegetais, emulsões e talcos contendo metabólitos secundários vegetais diversos e que podem ocasionar desde efeitos inibidores de fases imaturas até a mortalidade dos adultos. Exemplos de estudos não faltam e serão abordados no próximo tópico. Sua complexidade estrutural faz com que estes compostos possam atingir desde sítios em enzimas do sistema nervoso, passando por enzimas do metabolismo de eliminação de xenobióticos, enzimas de defesa contra espécies reativas de

oxigênio e proteínas que fazem parte da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria (REGNAULT-ROGER *et al.*, 2012).

2.6 Atividade de Óleos Essenciais Frente a *Callosobruchus maculatus*

Óleos essenciais são produtos obtidos a partir de matrizes de tecidos vegetais por métodos físicos preconizados pela norma técnica internacional ISO 9235:2021. Sua composição advém do metabolismo secundário ou especializado das plantas através de vias de síntese conhecidas (**Figura 9**): via do ácido chiquímico (fenilpropanóides), via do mevalonato (terpenos formados no citosol) e via do metileritritol-4-fosfato (terpenos formados em plastídeos) (DEWICK, 2002; ISO, 2021). Várias são as substâncias que formam esses grupos, os monoterpenóides relacionados a este trabalho estão representados na **Figura 10**.

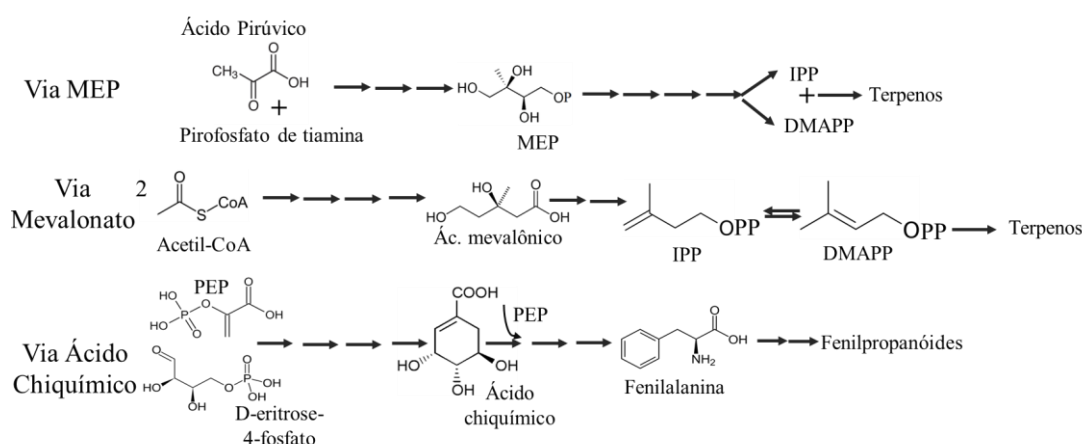


Figura 9 - Vias de formação simplificada das principais substâncias presentes nos óleos essenciais. Fonte: imagem adaptada de DEWICK (2002).

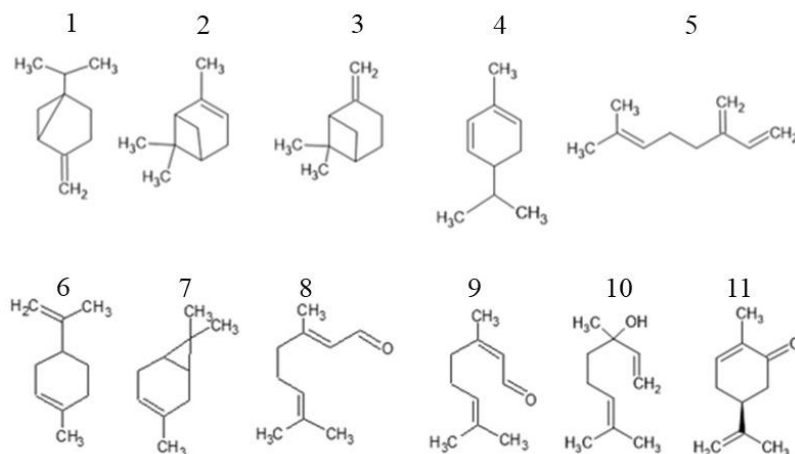


Figura 10 - Exemplos de monoterpenóides produzidos pela via metileritritol-4-fosfato e pela via do mevalonato relacionados às substâncias majoritárias encontradas nos óleos essenciais utilizados neste trabalho: sabineno (1); α-pineno (2); β-pineno (3); α-felandreno (4); mirceno (5); limoneno (6); δ-careno (7); geranial (8); neral (9); linalol (10) e carvona (11). Fonte: imagem produzida pelo autor.

Plantas e insetos fitófagos são “velhos conhecidos”, tanto é que o desenvolvimento de novidades evolutivas em um desencadeou respostas, também evolutivas, no outro, em um processo denominado de coevolução. Essas alterações nas plantas podem incluir cor de suas flores e folhas, composição de seu néctar e pólen, e liberação de voláteis provenientes do metabolismo secundário. Os objetivos dessas respostas evolutivas podem ser diversos: sinalização para polinização, repelente contra herbivoria, inseticida e atrator de predadores naturais. Por conta disso óleos essenciais, além de outros extratos vegetais podem possuir atividades biológicas agronomicamente interessantes contra insetos-praga (GULLAN; CRANSTON, 2017; REGNAULT-ROGER *et al.*, 2012).

Os constituintes dos óleos essenciais adentram o organismo do inseto através de absorção em sua cutícula, pelos espiráculos do sistema respiratório traqueal e através de sensilas localizadas por toda cutícula e, principalmente nas antenas e através do sistema digestório. Essa diversidade de modos de entrada dos constituintes faz com que seus efeitos possam se sentir tanto por contato direto entre o inseto e o óleo, seja com auxílio de veículos como solventes, talcos ou emulsões, e possam ser eficientes por fumigação, na qual o inseto é principalmente afetado pelas substâncias mais voláteis presentes no óleo.

Pelo seu rápido ciclo de vida, *C. maculatus* costuma ser um inseto muito utilizado como modelo de estudo laboratorial para novas formulações e produtos voltados para o agronegócio e, por esse motivo, pode-se estudar e verificar uma quantidade razoável de artigos com a proposta de estudo e prospecção de novos agentes controladores de sua população.

O contato direto com sementes revestidas por óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*) ou canela (*Cinnamomum zeylanicum*) ricos no fenilpropanóide eugenol foram estudados por JUMBO *et al.* (2018), nele os autores encontraram doses letais para eliminar 50% dos indivíduos (DL_{50}) iguais 78,2 $\mu\text{L}/\text{Kg}$ do grão e 131,0 $\mu\text{L}/\text{Kg}$ do grão, respectivamente, valores estes próximos dos encontrados para o controle positivo utilizado, a deltametrina cuja DL_{50} ficou em 83,7 $\mu\text{L}/\text{Kg}$ do grão. Além disso, foi reportado um efeito protetor sobre a semente, já que a massa do grão foi preservada em cerca de 50% e 80% nos tratamentos com os óleos de canela e cravo com a concentração calculada na DL_{50} , respectivamente. Isso não é incomum, já que outros estudos conduzidos com a própria substância isolada, em combinações sinérgicas e derivados foram positivos ao controlarem ou repelirem outros insetos como o gorgulho do milho (*Sitophilus zeamais*), gorgulho de cereais (*Rhyzopertha dominica*) e a pulga do gato (*Ctenocephalides felis felis*). (LAMBERT *et al.*, 2020; PRATES *et al.*, 2019)

Um outro exemplo de óleo essencial para controle do caruncho do feijão-caupi é o de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). Em estudo com a planta, KRZYZOWSKI *et al.* (2020), obtiveram um óleo com concentrações relativamente altas de cânfora, eucaliptol e α -pineno que são monoterpenos com alta pressão de vapor, a concentração letal por fumigação suficiente para matar 50% da população (CL_{50}) neste estudo foi de 15,69 $\mu\text{L}/\text{L}$ de ar e em fumigação de concentração equivalente a CL_{25} o autor encontrou alta repelência ao inseto. Os principais constituintes do óleo deste estudo isolados já demonstraram efeitos tóxicos e repelentes contra outros insetos como: besouro castanho (*Tribolium castaneum*) e *Rhyzopertha dominica* (AGGARWAL *et al.*, 2001; SUN *et al.*, 2019).

Além de, efetivamente, conseguir controlar populações de insetos em geral, os óleos essenciais podem ser utilizados como agentes sinérgicos, melhorando a ação de outros inseticida, pois contribuirá inibindo outras enzimas importantes para a sobrevivência da praga,

e desta forma também contribuirá, através de uma metodologia diferente, para a diminuição no uso de agrotóxicos (SUWANNAYOD *et al.*, 2019).

2.7 Metodologias de Aplicação de Óleos Essenciais Sobre *Callosobruchus maculatus*

Atualmente, existem diversos métodos de aplicação dos óleos essenciais sobre insetos-praga. As metodologias vão desde experimentos mais simples como aplicação tópica até técnicas complexas como nano emulsões encapsuladas do óleo essencial. Essa variedade de métodos busca objetivos distintos que vão desde um estudo preliminar da potência de ação do óleo estudado até aumento do tempo de prateleira de commodities agrícolas, passando por controle de pragas tanto no campo, quanto armazenadas.

Uma das metodologias mais utilizadas, é há por contato direto do óleo com o organismo alvo. Esta pode se dar na forma de uma aplicação tópica, geralmente no lado dorsal do tórax do inseto, porém pode ser encontrada também na forma de revestimento de grãos ou outro material de suporte por onde os insetos caminhem livremente, através da aplicação prévia de uma solução de óleo essencial sobre as sementes, e posterior evaporação do solvente. A aplicação tópica tem como principal objetivo observar a ação do óleo sobre aspectos biológicos dos insetos, como um estudo básico, no sentido de que é possível lançar inferências, propor estudos mais elaborados e investigar possíveis princípios ativos para elaboração de novos produtos a partir do mesmo. Já o estudo por contato com aplicação prévia do óleo sobre um material de suporte pode inferir aspectos como repelência, efeito residual do óleo sobre o inseto e sobre a proteção das sementes. Esta última forma de aplicação pode levar também a ingestão da substância bioativa por parte do inseto, principalmente se o produto agrícola servir como suporte (MATOS *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020).

Outro método de aplicação bastante utilizado é o de fumigação dos óleos essenciais com o objetivo de promover o estudo do efeito das substâncias voláteis presentes na composição sobre os insetos alvo. Esse método, geralmente, é utilizado no desenvolvimento de alternativas para o manejo de produtos agrícolas armazenados e em estudo contra insetos da família Culicidae, principalmente os que são vetores de patógenos. Nesta técnica, os insetos não entram diretamente em contato com todo o composto, mas apenas com suas substâncias mais voláteis. O composto, normalmente se encontra sobre um suporte, no qual os insetos são impedidos por meios físicos de caminhar sobre ele (NATTUDURAI *et al.*, 2016). Alguns estudos propõem outras formas de aplicação da técnica como, por exemplo, PRATES *et al.* (2019) que adaptaram uma coluna de difusão contendo arroz e o inseto *Sitophilus zeamais* sobre um frasco de Buchner contendo óleo essencial de cravo e da substância eugenol, através de uma válvula onde se poderia controlar a saída dos vapores das substâncias em direção aos insetos e matéria orgânica.

Devido à grande volatilidade e baixa solubilidade apresentada pelos óleos essenciais, nanoformulações são propostas para a aplicação desses produtos naturais para um ganho no efeito residual, na estabilidade física aumentando o tempo de vida útil do óleo essencial, e consequentemente proporcionando um maior intervalo entre as dedetizações. Um exemplo é o ganho de vida útil na prateleira. Em teste de nanoemulsões de óleo essencial de *Eucalyptus globulus* encapsuladas em goma arábica e Spam 80, YA-ALI *et al.* (2020) encontraram melhora na estabilização do produto e valores altos de toxicidade a *C. maculatus*.

2.8 Parâmetros do ciclo de vida de *Callosobruchus maculatus* avaliados em experimentos com óleos essenciais

Os vários artigos científicos encontrados na literatura envolvendo *C. maculatus* e produtos de origem natural investigam diversos parâmetros, como por exemplo: mortalidade, postura de ovos e emergência de novos adultos, sendo estes os mais comuns aspectos avaliados. Porém tantos outros podem ser medidos, tais quais: efeitos ovicida e larvicida, atraso no desenvolvimento dos indivíduos, repelência, proteção do grão, entre outros; demonstrando as inúmeras implicações que podem ser avaliadas. Coloca-se aqui alguns exemplos de possíveis parâmetros mensurados.

Em experimento com óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus staigeriana*, *Cymbopogon winterianus* e *Foeniculum vulgare*, GUSMÃO *et al.* (2013) verificaram, além de outros parâmetros, a repelência dos óleos essenciais sobre o caruncho do feijão-caupi e obtiveram como resultado que *Eucalyptus citriodora* e *Cymbopogon winterianus* possuem ação repelente por contato em concentrações por volta de 200 ppm, ao passo que o óleo de *Eucalyptus staigeriana* somente possui essa ação em concentrações acima de 550 ppm; os autores também observaram que o óleo de *Foeniculum vulgare* não apresentou ação repelente considerável.

TRIPATHI *et al.* (2001) buscaram, com o óleo essencial de *Anethum sowa*, avaliar o efeito ovicida em ovos do caruncho do feijão-caupi, e observar uma diminuição na oviposição em sementes de grão-de-bico tratadas com soluções do óleo essencial. Os autores obtiveram uma diminuição de mais de 50% na eclosão das larvas na concentração de 50 µL/mL, além disso, obteve outro resultado, diminuição na oviposição em 100% em grãos tratados com o óleo essencial em todas as concentrações testadas.

JUMBO *et al.* (2018) procuraram, em seu estudo, avaliar a proteção da massa dos grãos de feijão-caupi utilizados em experimentos com indivíduos de *C. maculatus* e óleos essenciais de canela e cravo. O resultado alcançado demonstrou uma proteção de cerca de 66% da massa dos grãos com o óleo essencial de cravo com concentração de, aproximadamente, 40 µL/Kg. No caso do óleo de canela o efeito foi um pouco menos protetor, com diminuição da perda em um pouco mais de 50% com aproximadamente 100 µL/Kg do óleo.

EKEH *et al.* (2013) testaram o extrato hexanólico do exocarpo da laranja, rico em monoterpenos no desenvolvimento de diversos estágios no ciclo de vida do caruncho do feijão-caupi (i.e maturação da larva, da pupa e emergência do inseto adulto), e observaram, como resultados, um aumento considerável de cerca de sete dias no desenvolvimento de cada estágio do inseto.

DUTRA *et al.* (2016) encontraram uma diminuição na emergência de novos adultos de *C. maculatus*, por revestimento da semente com os óleos essenciais de *Citrus sinensis* e *Citrus latifolia*. A diminuição encontrada, com relação a um controle negativo, foi de 64% a 1300 ppm de concentração de *Citrus sinensis* e mais de 80% a 1620 ppm de concentração de *Citrus latifolia*.

Esses são apenas alguns exemplos dos vários parâmetros que podem ser medidos e os são em diversos trabalhos científicos, além de parâmetros macroscópicos, relacionados a comportamento e fisiologia do inseto, pode-se verificar parâmetros microscópicos, como, por exemplo, variação de biomoléculas.

2.9 Efeitos Sobre o Sistema Nervoso e Metabolismo de Eliminação de Xenobióticos de *Callosobruchus maculatus*

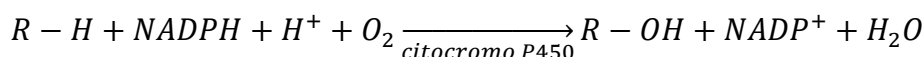
Para olhar com maior profundidade e compreender os mecanismos pelo qual os constituintes dos óleos atuam, precisa-se verificar as condições bioquímicas e fisiológicas no organismo dos insetos para então cruzar informações e levantar hipóteses sobre os motivos da toxicidade do óleo essencial.

Moléculas tóxicas naturais estão presentes em diferentes ecossistemas, tornando os seres vivos não adaptados vulneráveis. A consequência direta é a necessidade de proteção contra essas substâncias, e como resposta os organismos desenvolveram diversos mecanismos para eliminação desses compostos.

Toxinas lipofílicas precisam ser eliminadas rapidamente, e para que isso ocorra os insetos, assim como os demais seres, possuem um complexo mecanismo de detoxificação, o qual pode ser dividido em duas fases: primária que é caracterizada por enzimas catalisadoras de reações de oxirredução; e secundárias caracterizadas por enzimas capazes de catalisar a junção de compostos endógenos hidrofílicos a essas substâncias estranhas ao organismo (CUMMING *et al.*, 2008).

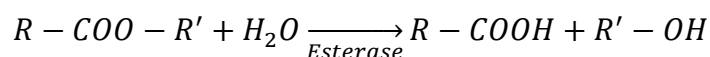
Esses processos resultam em modificações cruciais da substância exógena, aumentando sua polaridade, diminuindo sua toxicidade e facilitando sua excreção.

Na fase primária encontramos as enzimas catalisadoras de reações oxidativas dos xenobióticos, como os citocromos P450 monooxigenases. Essas enzimas realizam a oxidação de diversos grupos funcionais orgânicos graças a sua variedade isofórmica. Seu funcionamento é dependente de equivalentes redutores transportados pela subunidade associada no complexo, a NADPH-citocromo P450 redutase, originando a seguinte equação global:



Onde R-H é o substrato lipofílico e sofre a oxidação ao composto geral R-OH, através de um mecanismo que envolve, primeiramente, a redução do complexo enzima-substrato através dos elétrons advindos de NADPH e uma posterior oxidação desse complexo pelo gás oxigênio, ocorrendo, por fim, a liberação do produto.(CUMMING *et al.*, 2008). Em estudo o caruncho do feijão-caupi, AKAMI *et al.*, (2019) separaram duas populações e as criaram com sementes de feijão-caupi tratadas ou com óleo essencial de *Lippia adoensis* ou com o organofosforado diclorovós (DVPP) durante cinco gerações; e foi percebido que ao longo do tempo a mortalidade com o agrotóxico perdeu eficiência em mortalidade enquanto houve aumento da atividade de enzimas de detoxificação como citocromo P450, ao passo que na população tratada com o fitosubstâncias houve diminuição da atividade dessa mesma enzima à partir da terceira geração em diante.

Outro mecanismo de detoxificação de fase primária é a reação de hidrólise, catalisada por enzimas pertencentes a família das esterases que são hidrolases importantes na evolução de resistência metabólica nos insetos (MONTELLA *et al.*, 2012). Essas enzimas regulam reações de transformação de ésteres em moléculas com maior polaridade como álcoois e ácidos orgânicos, segundo a reação:



Em estudo realizado com óleo essencial de capim-limão, ALVES *et al.*, (2019) verificaram que, em ensaio por fumigação, fêmeas de *C. maculatus* tiveram uma redução significativa da atividade de β -esterases em concentração do óleo de 0,37 mg/mL. Estudos feitos com outras pragas de armazenamento também possuem resultados significativos, como por exemplo *S. zeamais* que ao ser tratado com óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* mostrou diminuição da atividade de carboxilesterases (CbE) em aproximadamente 70% na concentração de 11,97 mg/L com aplicação tópica (HUANG *et al.*, 2021).

Substâncias exógenas comumente sofrem uma segunda etapa de reação, a conjugação com um composto endógeno apolar, seguindo-se a excreção de um produto pouco tóxico. Essas reações podem ser classificadas em três tipos distintos: a primeira envolve a ativação da substância endógena, o segundo se caracteriza pela ativação da substância exógena, e o terceiro não necessita da formação de um intermediário. Moléculas endógenas comuns usadas nessas junções são: glutatona, fosfato e açúcares, por exemplo (CUMMING *et al.*, 2008).

O óleo essencial de canela (*Cinnamomum aromaticum*) em concentração de 15% (v/v) foi capaz de inibir em, aproximadamente, 50% a atividade de GST em larvas de *T. castaneum* e *C. maculatus* tratados em contato direto (SUMBA, 2016).

Outros alvos bioquímicos podem ser encontrados em enzimas cruciais para atividade motora e recepção de estímulos no ambiente, já que elas fazem parte do sistema nervoso do animal

Nesses animais, a informação ou estímulo ao ser captada por dendritos de diferentes neurônios, motores ou sensoriais, localizados por todo corpo do indivíduo é canalizado para um relativamente simples sistema nervoso central que consiste em gânglios segmentados pareados ao longo do tórax e abdômen, chamado cordão nervoso ventral, este, por sua vez, e ligado ao cérebro no lado dorsal dos invertebrados (**Figura 11**).

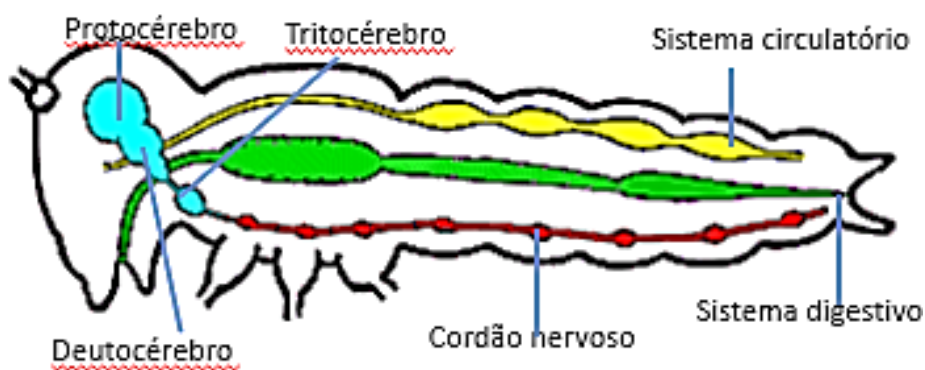


Figura 11 - Representação simplificada do sistema nervoso do inseto e sua posição relativa dentro do corpo do inseto através de um corte lateral. Fonte: imagem adaptada do departamento de entomologia geral da universidade do estado da Carolina do Norte, disponível em: <https://genent.cals.ncsu.edu/bug-bytes/nervous-system/>

Em comparação com os vertebrados o sistema nervoso do inseto é mais descentralizado, haja vista o controle de diferentes compartimentos pelos gânglios segmentados que lá estão presentes. Porém, assim como nos demais seres vivos que possuem células nervosas, a comunicação entre elas se dá através dos neurotransmissores químicos. Moléculas voláteis podem modular comportamentos de enzimas relacionados a neurotransmissores-chaves, como por exemplo a acetilcolina.

Acetilcolina é um neurotransmissor responsável pela transmissão da informação motora, e sua estrutura química é de um derivado éster acetilado da molécula orgânica colina. Produzida apenas em certos neurônios, essa molécula é liberada na fenda sináptica para transmissão de uma informação motora, para que isso ocorra existem receptores no neurônio receptor capaz de se ligar a acetilcolina. Esses receptores se classificam em dois tipos: nicotínicos e muscarínicos (TRIPATHI, 2008).

Os receptores nicotínicos são canais de íons dependentes de ligantes, capazes e transportar cátions de sódio, potássio e cálcio entre os lados internos externos da célula nervosa, auxiliando na produção do potencial de ação. Por outro lado, os receptores muscarínicos possuem um mecanismo mais complexo, com a presença de um sistema de segundo mensageiro (TRIPATHI, 2008).

Após ativado os receptores e passado a informação, a acetilcolina é hidrolisada ainda na fenda sináptica pela enzima acetilcolinesterase (AChE), essa enzima é alvo de inibição de diferentes compostos fitoquímicos. O óleo essencial de capim-limão, com alto teor de citral, em 0,37 mg/mL foi capaz de inibir em, aproximadamente, 30% a atividade dessa mesma enzima em *C. maculatus*. (ALVES *et al.*, 2019b). Outro óleo essencial testado e com resultado positivo para inibição da AChE no caruncho foi o óleo de laranja, rico em limoneno o óleo essencial obteve uma concentração inibitória em 50% da atividade da enzima (CI₅₀) igual a 8,12 µL/L (OBOH *et al.*, 2017).

Outra molécula neurotransmissora em invertebrados é a octopamina, que pode ser considerada a contraparte dos artrópodes da noradrenalina, possivelmente estando associado ao comportamento saudável do inseto através de sua ligação ou não a determinados receptores e pode possuir ligação com um sistema de aprendizagem (recompensas e punições associados a determinados estímulos) nesses indivíduos (UNOKI *et al.*, 2006). Para além da parte de aprendizagem o sistema octapaminérgico pode modular os seguintes comportamentos: oogênese, postura, agressividade e locomoção (LI *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2014; SCHÜTZLER *et al.*, 2019). Seus receptores podem ser divididos nos seguintes tipos: α -adrenérgico, β -adrenérgico, OAMB e receptores mistos de tiramina/octopamina. Suas características (funções múltiplas no inseto), levam a ser um bom candidato a alvo por moléculas de óleos essenciais. Algumas substâncias monoterpênóides como o eugenol e α -terpineol são capazes de bloquear receptores de octopamina (ENAN, 2001).

2.10 Mecanismos de Resistência aos Óleos Essenciais em *Callosobruchus maculatus*

Há tempos sabe-se que pragas desenvolvem resistência aos agrotóxicos, que atuam sobre enzimas-chave do metabolismo dos insetos. Além da problemática envolvida na resistência de pragas, os defensivos tradicionais atuam no desequilíbrio dos ecossistemas, eliminando insetos polinizadores ou predadores de outros insetos e do próprio inseto-alvo, podendo gerar uma posterior explosão da espécie que inicialmente se planejava exterminar, caso ela desenvolva defesas e se recupere mais rápido do que as outras (GULLAN; CRANSTON, 2017).

No entanto, a falta de planejamento na aplicação de produtos naturais também pode ocasionar danos ao meio ambiente. As plantas possuem mecanismos de defesa contra herbívoros e, por coevolução, os insetos desenvolveram estratégias para contornar estas barreiras, como: enzimas insensíveis a certos compostos das plantas como inibidores de proteases que são liberados após a sinalização de herbivoria pelo ácido jasmônico; substâncias inibidoras da capacidade de sinalização no organismo da planta hospedeira e seleção natural de

espécies com maior produção e atividade de enzimas do metabolismo de detoxificação, marcadamente citocromos P450 e GST. (FERRY *et al.*, 2004; MUSSER *et al.*, 2002)

As enzimas de detoxificação costumam indicar um importante marcador para verificação do aumento de resistência em insetos a metabólitos secundários de plantas e, conseqüentemente, aos produtos derivados destes. Em lagartas do gênero *Spodoptera spp.* da ordem Lepidoptera, como exemplo, foi verificado aumento na expressão de genes que codificam enzimas P450 monooxigenases logo após exposição de indivíduos, sabidamente resistentes, a xenobióticos, entre eles metabólitos secundários (AMEZIAN *et al.*, 2021).

Além das enzimas de detoxificação, outros mecanismos de resistência como a super expressão de proteínas transportadoras do tipo ABC, responsáveis pelo transporte de substâncias exógenas metabolizadas para excreção foi verificado em glândulas defensivas de *Chrysomela Populi*, pertencente a ordem dos besouros; os autores observaram uma super expressão de uma proteína transportadora do tipo ABC ATP-ligante *in vitro* (ERB *et al.*, 2016).

No caso de *C. maculatus* alguns poucos estudos têm buscado endereçar esta dúvida sobre desenvolvimento de resistência entre gerações. No estudo utilizando fumigação de óleo essencial de alecrim durante a fase larval do inseto, KRZYZOWSKI *et al.* (2021), indicaram uma diminuição no atraso da emergência de adulto após duas gerações de tratamento, bem como um aumento do oxigênio consumido no recipiente de incubação das larvas na segunda geração, o que pode significar um estresse metabólico que apenas ocorreu na primeira geração e não foi observado na prole subsequente.

Como ainda são poucos os estudos nessa área e, normalmente, envolvendo gerações pouco distantes, o real mecanismo que envolve essa relação de aumento de enzimas de detoxificação, novidades evolutivas nos insetos e a interação com os defensivos naturais de plantas é incerto. Porém, a existência de estudos sobre a comparação de sequências genômicas e transcriptômicas entre artrópodes próximos com dietas diferentes auxiliam no início desta exploração. Um exemplo são espécies de diferentes gêneros de besouros herbívoros, que possuem expansões de genes e transcritos relacionados a enzimas de detoxificação e digestão, além de possuírem um número absoluto maior de genes em relação a táxons próximos não herbívoros (GLOSS *et al.*, 2019).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

As sementes de *Vigna unguiculata* utilizadas tanto nos experimentos, quanto no cotidiano de manutenção das colônias de *Callosobruchus maculatus* são pertencentes à classe comercial Branca, subclasse Fradinho, cultivar BRS Itaim e foram compradas em supermercado local e esterilizados em freezer a -20°C por, pelo menos 24 h antes de sua utilização. Os insetos são provenientes de colônias mantidas no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, campus Fortaleza, e são mantidos pelo Laboratório de Plantas Aromáticas e Medicinais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro desde 2012. Os óleos essenciais de *Schinus terebinthifolius* utilizados foram os genótipos: UFRRJ ARO011 QT α -pineno, UFRRJ ARO050 QT sabineno, UFRRJ ARO079 QT α -felandreno/ α -pineno, UFRRJ ARO025 QT β -pineno/ α -pineno, UFRRJ ARO032 QT δ -careno/ α -pineno, UFRRJ ARO094 QT limoneno, UFRRJ ARO078 QT α -felandreno/sabineno e UFRRJ ARO022 QT mirceno. Os

óleos essenciais de *Lippia alba* utilizados foram os genótipos: UFRRJ-EBC-021/022 QT citral/limoneno, UFRRJ-EBC-037/029/016: citral, UFRRJ-EBC-003/008 QT carvona/limoneno e UFRRJ-EBC-028 QT linalol. Todos os óleos essenciais foram obtidos de genótipos da coleção de germoplasma do departamento de fitotecnia da UFRRJ e cada um dos óleos essenciais representou grupos de perfis químicos semelhantes, para serem utilizados nos ensaios biológicos (**Figura 12**).

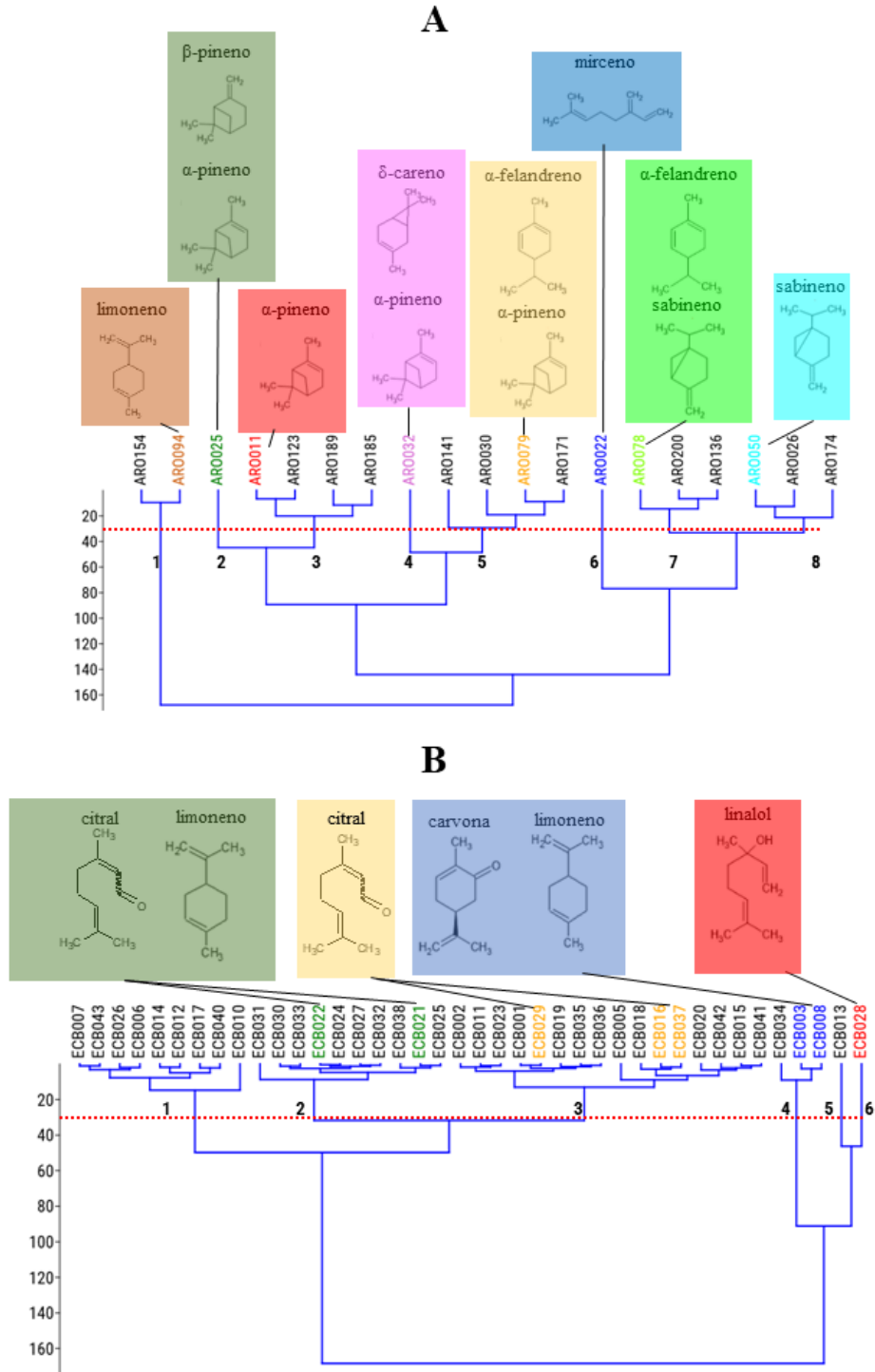


Figura 12 - Agrupamento de genótipos de aroeira (**A**). Agrupamento de genótipos de ervacideira (**B**). Os agrupamentos foram feitos por análise de multivariáveis baseadas na

dissimilaridade entre as composições químicas dos óleos essenciais de cada genótipo. Cada número representa um grupo químico diferente.

3.2 Manutenção da Colônia de *C. maculatus*

A manutenção e ampliação colônias de insetos foram feitas a cada dois dias, utilizando, aproximadamente, 60 g de feijão e 15 indivíduos adultos recém-emergidos (até 48 h de emergência) de *C. maculatus* (6 machos e 9 fêmeas) em potes de vidro cobertos em sua boca com malha de nylon, possibilitando as trocas gasosas. As datas em que os potes com feijão foram colonizados eram anotados. Os insetos foram deixados por 6 dias para copularem e as fêmeas ovipositarem. Após esse período, os insetos são retirados e a colônia armazenada para a emergência da prole. As colônias eram descartadas logo após a emergência de adultos em colônias mais recentes. As colônias foram mantidas em temperatura $28 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $65 \pm 10\%$ e fotoperíodo natural (12:12).

3.3 Análise por Imagem do Desenvolvimento de *C. maculatus*

A unidade experimental foi constituída por 60 g de feijão-caupi e 21 insetos (9 machos e 12 fêmeas) recém-emergidos com até dois dias vida adulta, adicionados em recipientes de vidro de aproximadamente 300 mL para realização da copula e postura de ovos (**Figura 14A**). Os insetos adultos foram deixados para cópula e postura de ovos durante 48 horas e, após esse período, foram retirados e descartados, os frascos de vidro contendo os grãos e os ovos foram então fechados com tela fina de nylon e armazenados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $65 \pm 10\%$. Foram utilizadas 5 unidades experimentais s neste ensaio.

A partir do 12º dia após iniciado o experimento até o surgimento de novos adultos, a cada dois dias, cinco indivíduos foram coletados de cada unidade experimental, totalizando 25 indivíduos por dia. No total foram 25 dias de experimentos (**Figura 13**), onde: do 12º ao 18º dia foram recolhidos indivíduos em estágio larval, não se distinguindo o ínstar larval em que este se encontrava; do 20º ao 22º dia foram recolhidos indivíduos em estágio de pupa e, no 25º dia, foram recolhidos cinco machos e 5 fêmeas adultos recém-emergidos (com até 48 h de emergência) de cada unidade experimental (50 indivíduos adultos no total (**Figura 14B**)).

O recolhimento dos insetos nas fases em que se encontravam dentro dos grãos se dava pela abertura mecânica e cuidadosa da semente com auxílio de materiais cortantes, tais como estiletes.



Figura 13 - Linha do tempo para a coleta de insetos em diferentes estágios. No 25º dia após o experimento ocorreu a emergência de novos adultos. Fonte: imagem feita pelo autor.

Os insetos, coletados ao longo dos dias, eram pesados em balança analítica Shimadzu AUY 220, colocados no freezer a cerca de -20°C por uma hora. Após esse período, as imagens dos indivíduos foram obtidas pelo scanner HP ScanJet G2410 e medidos no software livre ImageJ.

O procedimento de edição e ordem das funções utilizadas no ImageJ foram as seguintes: transformação da imagem de colorida para escalas de cinza em formato 8 bits, ajuste da imagem para pixels pretos e brancos com a função *threshold default* e ajuste da escala em centímetros com a função *Set scale* com a opção *Global* marcada.

Os parâmetros morfológicos analisados com o objetivo de estabelecimento de metodologia para a avaliação de óleos essenciais em todos os estágios de vida do inseto foram perímetro e área; nos estágios de pupa e adulto, medições também foram realizadas nas larguras proximal (definida como a largura medida na distância equivalente a $\frac{1}{4}$ do comprimento longitudinal medido a partir do início do segmento da cabeça em direção ao abdômen), mediana (definida como a largura medida na metade do comprimento longitudinal) e distal (definida como a largura equivalente a $\frac{1}{4}$ do comprimento longitudinal medido a partir do final do segmento do abdômen em direção à cabeça), e no comprimento longitudinal do corpo do inseto (definido como a distância medida desde o início do segmento da cabeça até o final do segmento do abdômen). As imagens dos insetos adultos foram digitalizadas pela sua face dorsal (**Figura 14C**).

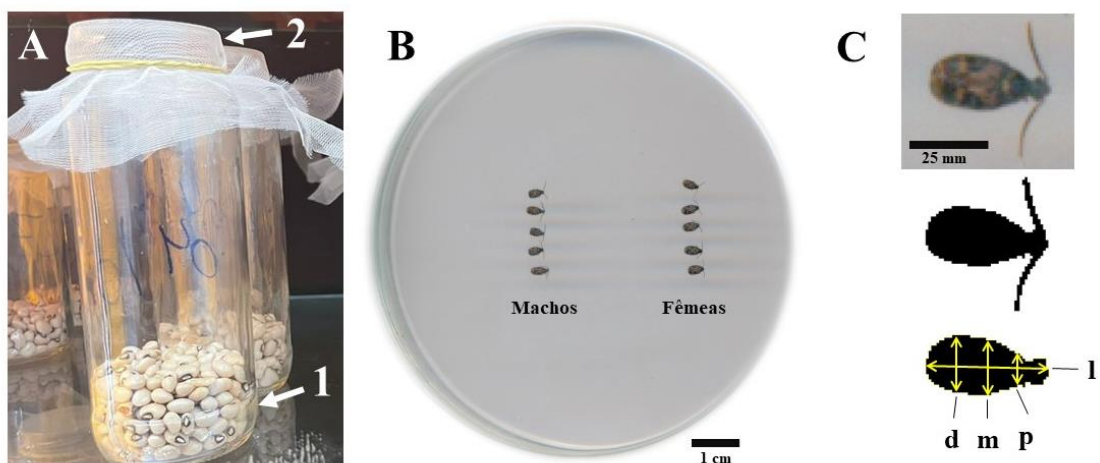


Figura 14 - Unidade experimental, frascos de vidro (300 mL), contendo feijão-caupi [1] insetos machos e fêmeas, fechados com tela de nylon [2] (A). Digitalização de amostras de insetos machos e fêmeas em presença de escala métrica (B). Análise de imagem para obtenção de parâmetros métricos, como perímetro, área, comprimento longitudinal (l), larguras: proximal (p), mediana (m) e distal (d), com auxílio do software ImageJ (C). Fonte: Imagens capturadas pelo autor.

3.4 Ensaio por Fumigação

A unidade experimental foi constituída por 30 grãos saudáveis de feijão-caupi (previamente esterilizados no freezer à -20°C por 24 h) e 10 insetos *C. maculatus* (cinco machos e cinco fêmeas) recém-emergidos com até dois dias vida adulta, adicionados em tubo Falcon de 50 mL, o qual foi fechado com tampa e vedado com filme de parafina na parte externa. No lado interno da tampa foi colado um disco de papel de filtro com 2 cm de diâmetro, contendo ou não óleo essencial. Foram testados 12 óleos essenciais, sendo 8 de diferentes quimiótipos extraídos de frutos secos da aroeira (*S. terebintifolius*) e 4 de diferentes quimiótipos extraídos das folhas de erva-cidreira (*L. alba*) (Tabela 2). Os experimentos foram realizados no Laboratório de plantas aromáticas e medicinais, localizado no departamento de Grandes Culturas da UFRRJ, campus Seropédica.

Tabela 2 - Códigos dos genótipos utilizados com seu quimiótipo e concentrações testadas.

Planta	Genótipo	Quimiótipo	Conc. (mg/mL de ar)
Aroeira	UFRRJ ARO050	sabineno	0,10; 0,25;
	UFRRJ ARO079	α -felandreno/ α -pineno	0,50; 0,75 e 1,0
	UFRRJ ARO011	α -pineno	
	UFRRJ ARO025	β -pineno/ α -pineno	
	UFRRJ ARO032	δ -careno/ α -pineno	
	UFRRJ ARO078	α -felandreno/ sabineno	0,10; 0,50 e 1,0
	UFRRJ ARO022	mirceno	
	UFRRJ ARO094	limoneno	0,10; 0,25; 0,50 e 0,75
Erva- cidreira	UFRRJ ECB021/ 022*	citral/limoneno	0,10; 0,25;
	UFRRJ ECB037/ 029/ 016*	Citral	0,35; 0,50 e
	UFRRJ ECB003/ 008*	carvona/ limoneno	0,75
	UFRRJ ECB028	Linalol	

*Os óleos destes códigos foram misturados em igual proporção em massa para os ensaios de fumigação.

Todas as concentrações produzidas com óleo essencial foram feitas pesando-se diretamente uma quantidade de óleo essencial sobre o papel de filtro anexado a tampa do tubo falcon em balança analítica Shimadzu AUY 220, com exceção da concentração de 0,10 mg/mL a qual uma quantidade apropriada de óleo essencial foi pesada e em sequência foi dissolvida em diclorometano 99% em volume adequado para se alcançar a concentração desejada, e esta solução foi vertida, também em volume previamente calculado, sobre o papel de filtro. Todos os tratamentos foram feitos com 6 repetições (n=6) e acompanhados de controle negativo, onde no papel de filtro foi vertido apenas diclorometano 99% em volume igual ao volume da solução colocado no papel de filtro para a concentração de 0,10 mg/mL de ar.

Em todos os experimentos realizados em dias diferentes se cronometrou o tempo de evaporação do solvente e este foi respeitado como o tempo necessário entre a impregnação da solução no papel de filtro e o fechamento dos tubos falcon para a concentração de 0,10 mg/mL de ar e para o controle negativo. A cronometragem do tempo se deu através da pesagem da quantidade do composto referente ao volume de 50 μ L e posterior acompanhamento de sua evaporação. Este tempo sempre ficou em torno de 2 minutos e 30 segundos. A **Figura 15** exibe unidades experimentais quando terminada sua montagem. As unidades experimentais, então, foram armazenadas ao abrigo da luz solar e em condições de temperatura de 28°C (\pm 2°C) e umidade relativa de 65 \pm 10% durante todo o experimento.



Figura 15 - Unidades experimentais com o experimento montado. Fonte: imagem capturada pelo autor.

3.4.1 Mortalidade

Após 48 horas de contato entre os vapores dos óleos essenciais e os insetos, as tampas com os papéis de filtro foram substituídas por telas de tecido de nylon que permitissem a troca gasosa da unidade experimental com o ambiente e os insetos foram retirados das unidades experimentais para contagem de mortalidade e posterior descarte desses indivíduos. Foram considerados mortos os insetos que após dois a três toques com pinça não se locomoveram. Depois da retirada, contagem e descarte de todos os indivíduos, as unidades experimentais retornavam ao local de armazenamento.

3.4.2 Postura de ovos

Entre 6 e 9 dias do início do experimento, as sementes foram retiradas das unidades experimentais para contagem de postura de ovos. Para todos os óleos essenciais de erva-cidreira e para os óleos essenciais de aroeira: UFRRJ ARO032 QT δ -careno/ α -pineno e UFRRJ ARO094 QT limoneno, a contagem foi feita exatamente aos 9 dias e levou em consideração se ocorreu ou não a eclosão larval para dentro do grão com base na diferença de coloração que o ovo apresenta entre essas duas situações.

Para a contagem de ovos, inicialmente, obteve-se a média de ovos colocados por semente, onde se contou uma parcela da população total das sementes. No caso dos óleos essenciais de aroeira (excetuando-se os óleos dos genótipos UFRRJ ARO032 QT δ -careno/ α -pineno e UFRRJ ARO094 QT limoneno), 10 sementes de cada unidade experimental foram verificadas e no caso dos óleos essenciais de erva-cidreira e os óleos essenciais restantes de aroeira, 15 sementes foram verificadas de cada unidade experimental. No caso destes últimos citados, a amostra de contagem foi ampliada para que houvesse maior precisão nos ensaios onde se verificou a eclosão larval com base na coloração distinta dos ovos. Depois da contagem de postura, as sementes foram devolvidas às suas respectivas unidades experimentais e armazenadas.

3.4.3 Emergência de novos adultos

Após, cerca de 20 dias após o experimento ter sido realizado, observou-se diariamente as unidades experimentais para se capturar o dia em que os primeiros insetos adultos

emergiriam das sementes. Neste momento e durante 9 dias subsequentes, os insetos emergidos foram contados, os diferenciando pelo sexo e os descartados logo em sequência. Após cada contagem as unidades experimentais voltavam a ser armazenadas.

3.4.4 Taxa de emergência

Com os valores totais (acumulado durante os 10 dias) de emergência de novos adultos e de postura de ovos pôde-se calcular a taxa de emergência, definida como uma razão do número total de adultos novos emergidos sobre o número total de ovos, multiplicado por 100.

3.4.5 Taxa de fertilidade

Para todos os óleos essenciais de erva-cidreira e os óleos essenciais de aroeira dos genótipos UFRRJ ARO032 QT δ -careno/ α -pineno e UFRRJ ARO094 QT limoneno, com os valores obtidos de postura de ovos e diferenciação destes ovos por eclosão ou não da larva para dentro do grão aos 9 dias de experimento pôde-se calcular a taxa de fertilidade, definida como uma razão do número de ovos onde houve eclosão larval para dentro do grão e o número total da postura, multiplicado por 100.

3.4.6 Perda de massa

As 30 sementes de cada unidade experimental foram pesadas em balança analítica Shimadzu AUY 220 no início e final dos respectivos experimentos de fumigação. No início, além das unidades experimentais, uma amostra de 30 sementes advindas do mesmo lote das sementes separadas para experimento foi pesada e deixada durante 48 horas em estufa Labtec LB 80-64 a 102°C. Após esse tempo a amostra foi, então, novamente pesada. No final do experimento, após serem pesadas, as sementes, por unidade experimental, foram colocadas na estufa para secagem nas mesmas condições que a amostra inicial, e após 2 dias foram pesadas novamente. O cálculo de perda de massa dos grãos se baseou no peso seco das sementes com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Perda de massa} = \frac{(Pf \text{ sementes secas})}{Pi \text{ sementes} * \left(\frac{Pf \text{ amostra}}{Pi \text{ amostra}}\right)} * 100$$

Onde: *Pf* sementes secas é o peso ao fim do experimento das sementes usadas nas unidades experimentais após secas em estufa; *Pi* sementes é o peso no início do experimento e *Pi* amostra e *Pf* amostra são, respectivamente, o peso da amostra de 30 grãos de mesmo lote, utilizada no início do experimento, antes da secagem e o peso desta mesma amostra após as 48 h de secagem.

Este parâmetro foi analisado para todos os experimentos com óleo essencial de erva-cidreira e para os óleos essenciais de aroeira com os genótipos UFRRJ ARO094 QT limoneno e UFRRJ ARO032 QT δ -careno/ α -pineno.

3.4.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram organizados e submetidos à análise de variância (one-way ANOVA) em delineamento inteiramente casualizado (DIC); e as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Os dados de mortalidade dos insetos foram submetidos a análise de regressão não-linear (modelos sigmóides simétricos e assimétricos) para cálculo da concentração letal para 50% da população (CL_{50}). Nos gráficos apresentados as médias representaram os símbolos e as barras o desvio padrão. As análises estatísticas e os gráficos foram realizados com auxílio do programa GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise de Imagem de *Callosobruchus maculatus*

A análise de dados morfo métricos e massa do inseto em diferentes fases de seu desenvolvimento revelou a tendência de aumento de tamanho e ganho de peso durante a fase larval, sendo o perímetro, a área e a massa máxima ao final desta fase quando o inseto está passando seu último ínstar larval e que isto acontece aproximadamente no 18º dia após a postura do ovo, quando o valor médio da massa chega em torno de 8 mg, 27 mm de perímetro e cerca de 10 mm² de área. Após essa fase, a tendência é o inseto perder massa e tamanho corporal, com uma rápida diminuição da área e da massa, enquanto o perímetro diminui, porém se estabiliza e volta a ter um leve aumento quando atingido o momento de emergência do adulto (**Figura 16**). Os valores médios mais altos e a diferença significativa que há entre macho e fêmea tanto na área corporal, quanto em medidas de comprimento longitudinal demonstram que a fêmea é ligeiramente maior (**Figura 16 e Tabela 3**).

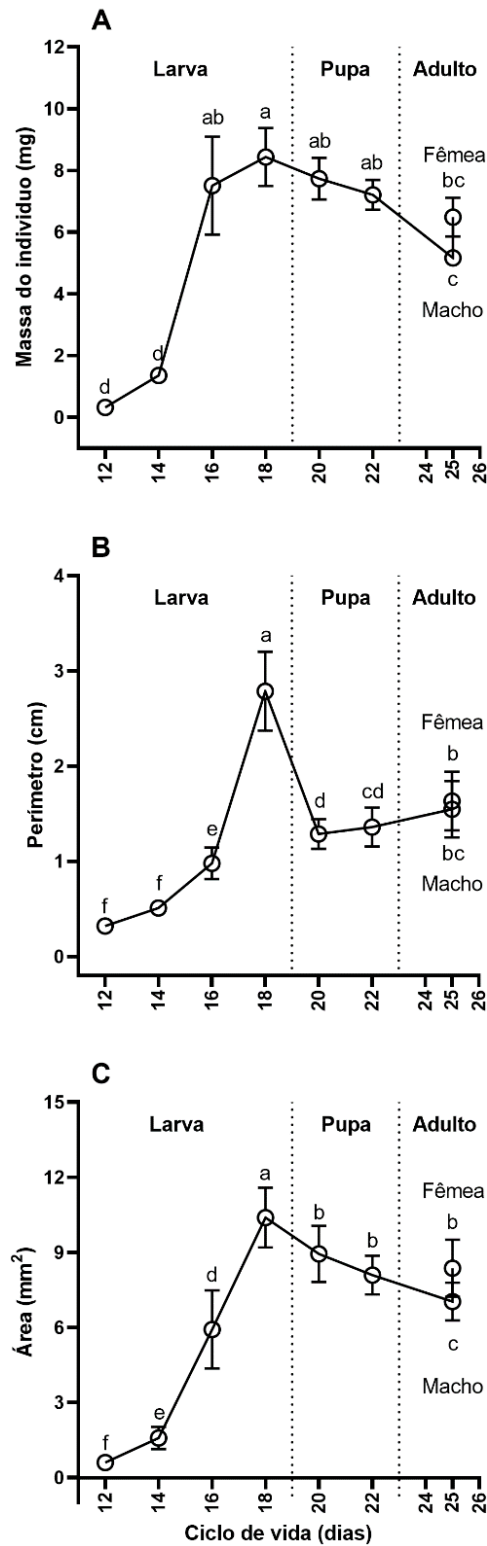


Figura 16 - Massa (A), perímetro (B) e área (C) do inseto *C. maculatus* durante seu ciclo de vida. Barras representam o desvio padrão em torno da média aritmética de cada tratamento. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os dias do ciclo (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabela 3 – Parâmetros medidos de larguras proximal, mediana e distal e comprimento longitudinal do inseto nas fases de pupa e adulto (média aritmética) Letras diferentes representam diferenças significativas entre os valores dentro da coluna (Tukey, $\alpha=0,05$).

Ciclo de vida	Largura proximal (mm)	Largura mediana (mm)	Largura distal (mm)	Comprimento Longitudinal (mm)
Pupa, 20 dias	1,72a	2,42a	1,73a	4,66a
Pupa, 22 dias	1,70a	2,16b	1,74a	4,65a
Adulto fêmea, 25 dias	1,09b	2,23b	1,60a	4,48a
Adulto macho, 25 dias	1,10b	2,11b	1,58a	3,88b
SQ (resíduo)	9,55 (7,39)	1,40 (5,24)	0,54 (4,82)	10,09 (12,14)
QM (resíduo)	3,18 (0,08)	0,47 (0,05)	0,18 (0,050)	3,36 (0,13)
F (DFn, DFd)	41,33 (3, 96)	8,58 (3, 96)	3,57 (3, 96)	26,58 (3, 96)
P	<0,0001	<0,0001	0,0169	<0,0001

O fato do inseto se alimentar apenas durante o período larval, segundo MAŁEK *et al.* (2021) e, ao restante da vida, apenas metabolizar a energia armazenada na forma de nutrientes consumidos no período de larva é indicado pela diminuição significativa da massa ao se comparar o último período larval e o adulto formado.

DEVI *et al.* (2014) encontraram valores semelhantes para o comprimento e largura mediana de pupa (em torno de 4 a 4,6 mm para o comprimento e em torno de 2,4 mm para a largura mediana) e adulto (em torno de 3.2 mm para o comprimento de machos e 3.7 mm para o comprimento de fêmeas) de *C. maculatus*, indicando a tendência de diminuição de medidas encontrados por este trabalho.

4.2 Mortalidade de *Callosobruchus maculatus* com Óleos de Aroeira e Erva-cidreira

Nos tratamentos com os óleos essenciais de *S. terebinthifolius* UFRRJ ARO094 QT limoneno e UFRRJ ARO022 QT mirceno e com o óleo de *L. alba* UFRRJ ECB003/008 QT carvona/limoneno a completa mortalidade não foi atingida na maior dose de óleo essencial testado, além disso os desvios padrões altos levaram a uma distribuição com valor de R^2 mais baixo (**Figura 17** e **Anexo A**). O genótipo de erva-cidreira UFRRJ-EBC-028 QT linalol apresentou o menor valor de CL_{50} , 0,1017 mg/mL de ar (**Tabela 4**). Os genótipos de erva-cidreira UFRRJ ECB021/022-QT citral/limoneno e UFRRJ ECB037/029/016 QT citral não apresentaram qualquer mortalidade.

Entre os experimentos com óleos de aroeira, o menor valor de DL₅₀ foi referente ao óleo essencial do genótipo UFRRJ ARO025 QT β-pineno/α-pineno com 0,287 mg/mL de ar. Por consequência do baixo R² não foi possível o cálculo de CL₅₀ para o óleo essencial de genótipo UFRRJ ARO022 QT mirceno (**Tabela 4**).

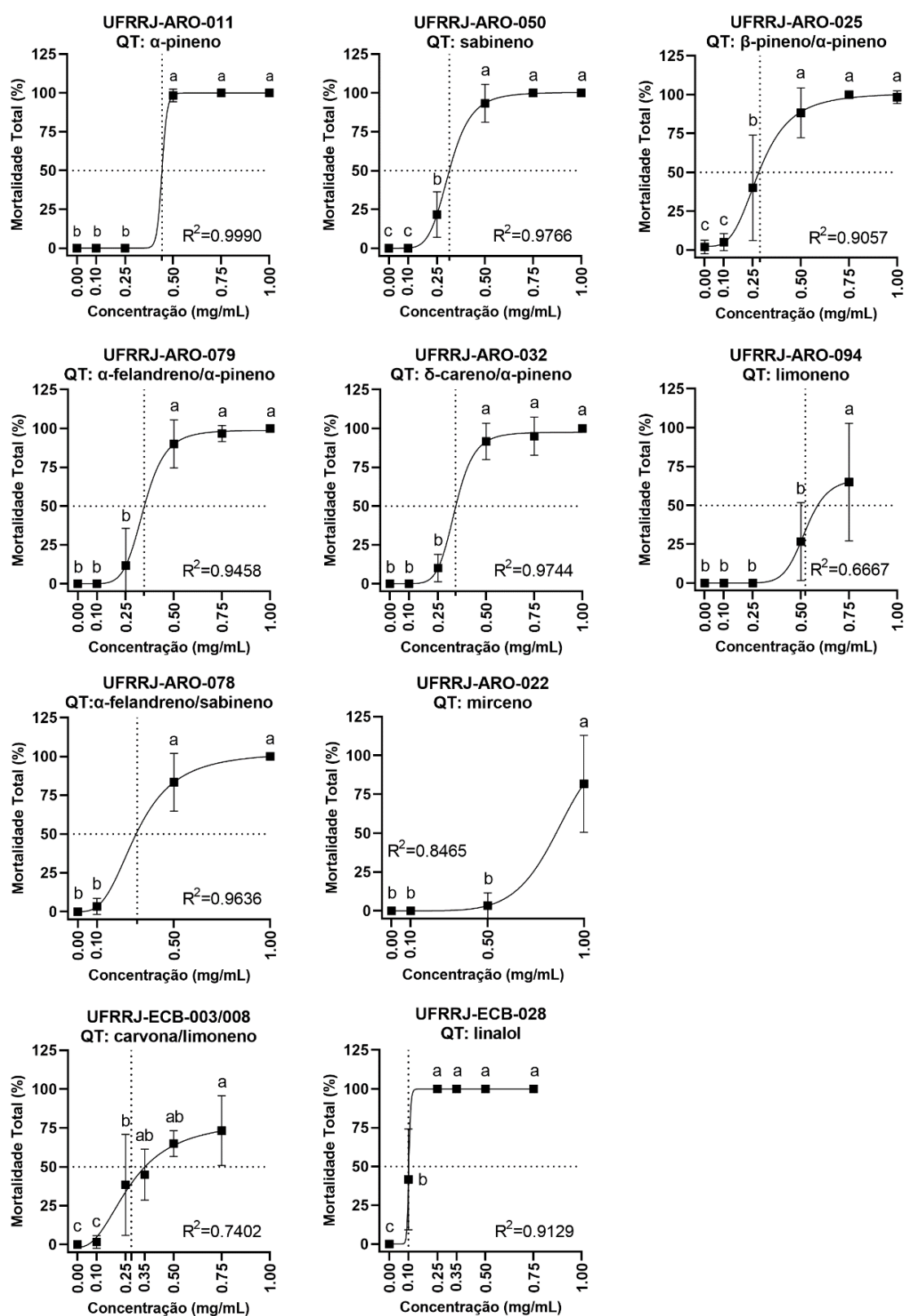


Figura 17 - Mortalidade de *C. maculatus* em função da concentração dos óleos essenciais de aroeira e erva-cidreira após 48 h. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as concentrações (Tukey; $\alpha = 0,05$). Barras representam o desvio padrão em torno da média aritmética de cada tratamento.

Tabela 4 – Parâmetros das equações das curvas de ajuste e CL₅₀ calculadas dos óleos essenciais sobre *C. maculatus*.

Genótipo	Curva	Equação	CL ₅₀ (mg/mL de ar)	R ²	GL	SQ
UFRRJ ARO011 QT α-pineno	Sigmóide	$Y = -1.718 \cdot 10^{-7} + (100.0 - (-1.718 \cdot 10^{-7})) / (1 + ((0.4423 / (50.00 / (100 - 50.00)))^{1/33.22}) / X)^{33.22}$	0.4423	0.999	31	83.33
UFRRJ ARO050 QT sabineno	Sigmóide	$Y = -0.08044 + (100.4 - (-0.08044)) / (1 + ((0.3148 / (50.00 / (100 - 50.00)))^{1/5.584}) / X)^{5.584}$	0.3148	0.9766	32	1818
UFRRJ ARO079 QT α-felandreno/α-pineno	Sigmóide	$Y = -0.03983 + (98.38 - (-0.03983)) / (1 + ((0.3454 / (50.00 / (100 - 50.00)))^{1/6.201}) / X)^{6.201}$	0.3454	0.9458	31	4238
UFRRJ ARO025 QT β-pineno/α-pineno	Sigmóide	$Y = 2.340 + (101.1 - 2.340) / (1 + ((0.2870 / (50.00 / (100 - 50.00)))^{1/3.518}) / X)^{3.518}$	0.2870	0.9057	30	6242
UFRRJ ARO032 QT δ-careno/α-pineno	Sigmóide	$Y = -0.02833 + (97.60 - (-0.02833)) / (1 + ((0.3402 / (50.00 / (100 - 50.00)))^{1/7.019}) / X)^{7.019}$	0.3402	0.9744	30	1893
UFRRJ ARO094 QT limoneno	Sigmóide	$Y = -0.02489 + (67.39 - (-0.02489)) / (1 + ((0.5235 / (50.00 / (100 - 50.00)))^{1/9.189}) / X)^{9.189}$	0.5235	0.6667	24	7433
UFRRJ ARO078 QT α-felandreno/sabineno	Sigmóide	$Y = -2.073 \cdot 10^{-15} + (102.9 - (-2.073 \cdot 10^{-15})) / (1 + ((0.3091 / (50.00 / (100 - 50.00)))^{1/3.011}) / X)^{3.011}$	0.3091	0.9636	20	1867
UFRRJ ARO022 QT mirceno	Não foi possível calcular a CL ₅₀ para o ensaio com este óleo essencial.					
UFRRJ ECB003/008 QT carvona/limoneno	Sigmóide	$Y = -1.768 + (80.23 - (-1.768)) / (1 + ((0.2800 / (50.00 / (100 - 50.00)))^{1/2.375}) / X)^{2.375}$	0.2800	0.7402	32	9954
UFRRJ ECB028 QT linalol	Sigmóide	$Y = 3.174 \cdot 10^{-15} + (100.0 - 3.174 \cdot 10^{-15}) / (1 + ((0.1017 / (50.00 / (100 - 50.00)))^{1/\text{hill slope (instável)}}) / X)^{\text{hill slope}}$	0.1017	0.9129	32	5283

Valores similares sobre a mortalidade para os genótipos de erva-cidreira testados UFRRJ ECB028 QT linalol, UFRRJ ECB021/022 QT citral/limoneno e UFRRJ ECB037/029/016 QT citral foram alcançados por ALVES *et al.* (2015) onde a testagem de diferentes óleos essenciais por fumigação sobre *C. maculatus* levou ao resultado de que o óleo essencial de capim-limão, (*Cymbopogon citratus*) com alto teor da mistura de isômeros citral, demonstrou a menor mortalidade na concentração de 0,4 µL/mL de ar (aproximadamente, 0,4 mg/mL de ar), não ocasionando a morte de nenhum indivíduo. Já com óleo essencial de alfavaca (*Ocimum basilicum*), com alto teor de eugenol e linalol, a autora observou maior mortalidade, ocasionando a morte de quase 90% dos indivíduos com a concentração de 0,2 µL/mL de ar (aproximadamente, 0,2 mg/mL).

Em experimento conduzido por BARBOSA *et al.* (2021) em grãos revestidos com substâncias isoladas, o monoterpeno limoneno obteve a maior CL_{50} = 2142 mg de substância/Kg de grãos, já a substância α -pineno obteve DL_{50} =69,9 mg de substância/Kg de grãos contra *C. maculatus*. Apesar das diferenças metodológicas de aplicação, a ordem de toxicidade encontrada pelos autores foi condizente com a ordem encontrada pelo presente estudo para os óleos de aroeira correspondentes aos genótipos UFRRJ ARO094 QT limoneno e UFRRJ ARO011 QT α -pineno.

DUTRA *et al.*, (2016) encontraram valores de toxicidade maiores com a fumigação de óleos essenciais de frutas cítricas que possuíam em sua composição, majoritariamente, as substâncias limoneno e mirceno. Porém, o único óleo com concentração razoável de β -pineno (aproximadamente 12% da composição total de óleo), de limão-taiti, foi o que obteve maior toxicidade, CL_{50} =10,02 µL/L de ar (aproximadamente, 0,0088 mg/mL de ar), o que também foi condizente com a ordem encontrada por este trabalho para os resultados de toxicidade com os genótipos UFRRJ ARO025 QT β -pineno/ α -pineno, UFRRJ ARO022 QT mirceno e UFRRJ ARO094 QT limoneno. CHAUBEY (2015) relatou CL_{50} =0,459 µL de α -pineno/mL de ar (aproximadamente, 0,400 mg/mL) por fumigação contra *Callosobruchus chinensis*, valor semelhante ao encontrado para o genótipo UFRRJ ARO011 QT α -pineno.

NATTUDURAI *et al.* (2016) verificaram que o óleo de *Atalantia monophylla*, rico em sabineno (20% da composição), resultou na mortalidade de 70% de *C. maculatus* na concentração 160 µL/L de ar (aproximadamente, 0,144 mg/mL), próximo do valor de CL_{50} dos óleos de aroeira testados que possuem o composto sabineno como majoritário (UFRRJ ARO050 QT sabineno e UFRRJ ARO078 QT α -felandreno/sabineno).

Já JAYARAM *et al.* (2022) relataram CL_{50} =0,92 e 3,56 µL/mL de ar (aproximadamente, 0,86 e 3,42 mg/mL, respectivamente) em exposição do caruncho ao óleo de hotelã (*Mentha spicata*) com alta concentração de carvona e ao isômero isolado, L-carvona. MBATA; PAYTON (2013) observaram mortalidade de 100% em concentração muito inferior, 16,7 µL/L de ar (aproximadamente, 0,016 mg/mL) do outro isômero, S-carvona.

Em alguns estudos, valores maiores de toxicidade por fumigação foram observados para óleo essencial dos frutos de aroeira contra *C. maculatus*, como por exemplo em OLIVEIRA *et al.* (2017) que obtiveram CL_{50} =38,30 µL/L de ar (aproximadamente, 0,03 mg/mL), porém não foi divulgada pelo autor a composição química do óleo. Apesar dos testes em oito quimiótipos diferentes de óleos de frutos de aroeira, outras quimiótipos de óleos essenciais de frutos de aroeira são encontradas. JERIBI *et al.* (2014) encontrou na composição como compostos majoritários, no óleo extraído do fruto, biciclogermacreno e germacreno B, sesquiterpenos não-majoritários nos óleos essenciais testados no presente estudo.

Poucas foram as informações encontradas especificamente sobre a aplicação de óleos de *L. alba* em *C. maculatus*. A que mais se adequou para uma discussão comparável foi o estudo já citado anteriormente realizado por ALVES *et al.* (2015) onde a fumigação de 0,4 µL/mL de ar (aproximadamente, 0,4 mg/mL) do óleo de erva-cidreira com quimiótipo citral ocasionou a morte de dois terços de adultos de *C. maculatus*. Investigações envolvendo a aplicação do produto sobre outros insetos foram realizadas. SHUKLA *et al.* (2011) encontraram mortalidade de 100% ao testar óleo de erva-cidreira sobre *C. chinensis*. PEIXOTO *et al.* (2015) verificaram que óleos essenciais de erva-cidreira com quimiótipo carvona e a substância carvona possuíam toxicidade maior aos insetos *S. zeamais* e *Tribolium castaneum*, do que óleos de *Lippia alba* com quimiótipo citral ou a mistura dos isômeros geranial e neral. Esses dados dão suporte a variação que é encontrada nos efeitos biológicos dos óleos essenciais de erva-cidreira de quimiótipos diferentes.

KÉÏTA *et al.* (2000) estudaram o efeito inseticida por fumigação sobre *C. maculatus* de cinco óleos: *Tagetes minuta*, *Hyptis suaveolens*, *Ocimum canum*, *Ocimum basilicum* e *Piper guineense*; seu resultado não poderia ser mais variado, o óleo com menor ação, *H. suaveolens*, obteve a morte, em média, de 10% da população adulta de insetos, ao passo que o de maior ação, *O. basilicum* obteve a morte de 99% dos insetos nas mesmas concentrações. O mesmo ocorreu em TITOUHI *et al.* (2017) para óleos de plantas do gênero *Artemisia spp* testados sobre o caruncho, onde o óleo de maior toxicidade foi cerca de sete vezes mais potente em relação ao de menor toxicidade. A ocorrência dessas modificações passa pela complexidade da composição dos óleos essenciais. Suas composições, influenciadas pelo genótipo e por fatores edafoclimáticos, são fundamentais para seu efeito.

Não apenas os componentes isolados têm atividade biológica, como também o conjunto dessas substâncias do óleo essencial possuem, muitas vezes, sinergismo, como demonstrado por vários estudos e entre eles está o de TAK; ISMAN (2017) que observaram aumento da mortalidade em aplicação tópica de misturas entre 1,8-cineol e cânfora em larvas da praga de plantações de repolho (*Trichoplusia ni*) se comparado aos compostos individuais. O estudo mostrou um aumento de penetração de cânfora conforme sua proporção na mistura se tornava menor. Já KUMRUNGSEE *et al.* (2014) mostraram que a combinação de pulegona com timol ou eucaliptol aumenta em até duas vezes a atividade tóxica contra a traça *Plutella xylostella*.

As metodologias de aplicação, qualidade dos óleos, idade do inseto adulto, tempo de exposição e genótipos das populações de pragas utilizadas mudam frequentemente. Não havendo padronização de todos os fatores, exceto qualidade do óleo, se torna uma missão árdua verificar se há um efeito interessante no óleo utilizado.

Esse trabalho, ao buscar estudar óleos advindos de duas espécies, porém com ampla diversidade química, se ancora em mais uma tentativa na busca de novas alternativas aos agrotóxicos utilizados em larga escala atualmente. As explicações para as diferenças obtidas entre os óleos deste estudo e os da literatura passam por metodologias específicas, como por exemplo: a testagem padronizada de populações diferentes de *C. maculatus*, visto sua distribuição global e diversidade genética e a identificação de substâncias dos óleos essenciais que mais contribuem para o efeito deles, seja em testagem isolada ou em combinações sistemáticas.

4.3 Oviposição de *Callosobruchus maculatus* com Óleos de Aroeira e Erva-cidreira

Foi possível observar acentuada redução na média de postura de ovos, com valores de inibição superiores ou próximos a 70%, quando os insetos foram expostos a 0,50 mg/mL de ar dos óleos essenciais dos acessos UFRRJ ARO025 QT β-pineno/α-pineno, UFRRJ-ARO-079-

QT: α -felandreno/ α -pineno, UFRRJ ARO094 QT limoneno, UFRRJ ARO078 QT α -felandreno/sabineno, UFRRJ ECB003/008 QT carvona/limoneno, ou quando expostos a 0,25 mg/mL de óleo essencial do acesso UFRRJ ARO050 QT sabineno. Entre os óleos essenciais testados destaca-se o acesso UFRRJ ECB028 QT linalol que promoveu a inibição de cerca de 70% na postura de ovos no tratamento com 0,10 mg/mL de ar. O menor efeito de inibição foi verificado para o óleo do acesso UFRRJ ECB021/022 QT citral/limoneno que obteve inibição significativa estatisticamente apenas na maior concentração testada: 0,75 mg/ml de ar (**Figura 18 e Anexo A**).

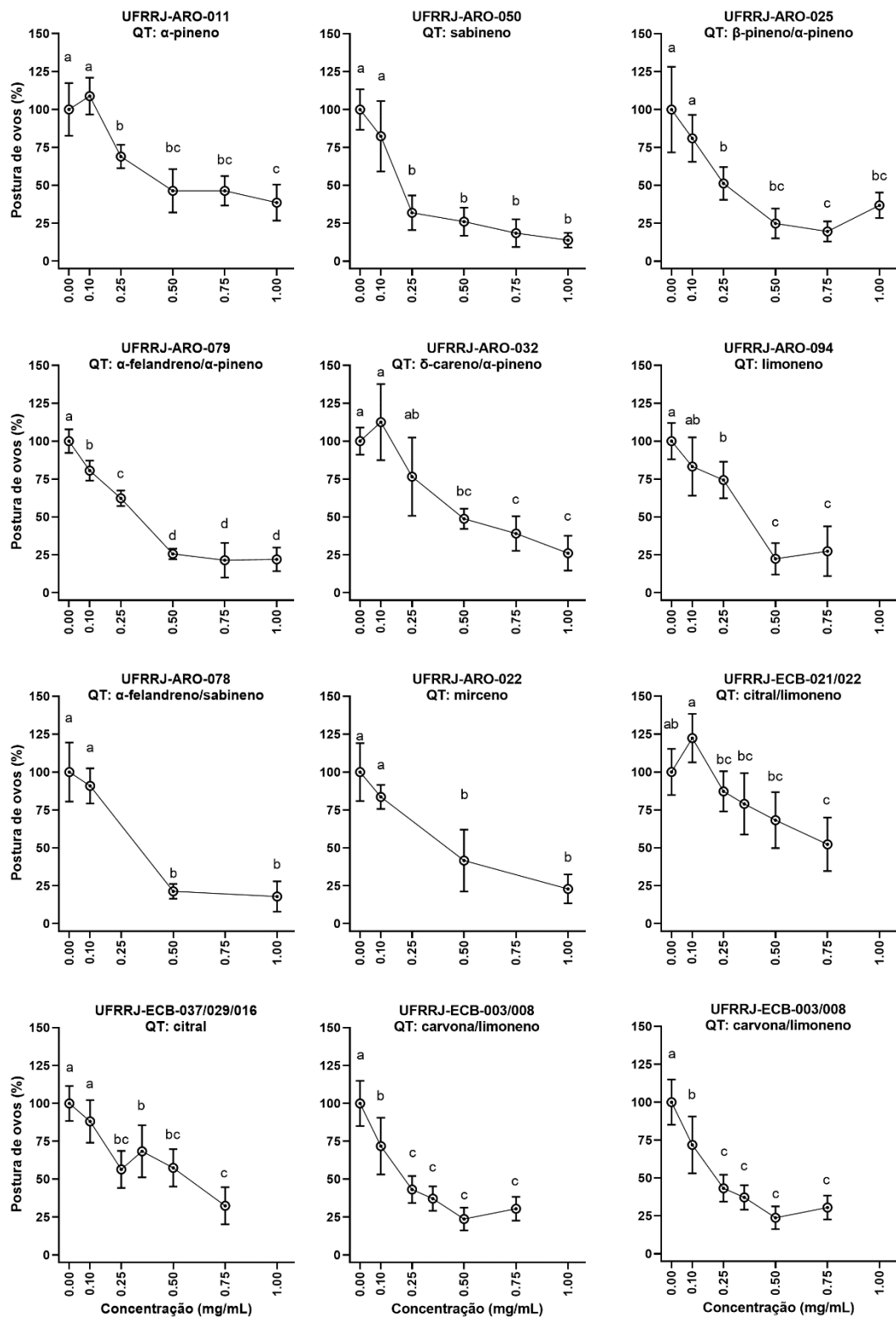


Figura 18 - Postura de ovos em função da concentração de óleos essenciais de aroeira e erva-cidreira. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as concentrações (Tukey; $\alpha = 0.05$). Barras representam o desvio padrão em torno da média de cada tratamento.

BARBOSA *et al.* (2021) encontraram que as substâncias α -pineno e limoneno diminuíram significativamente a postura em *C. maculatus* (inibição maior do que 50%) em

concentrações a partir de 132 e 2300 mg de substância/Kg de grãos, mostrando uma baixa ação do limoneno de forma isolada na inibição da postura de ovos. JAYARAM *et al.* (2022) observaram uma redução maior do que 90% na postura do caruncho com óleo essencial de *M. spicata*, rico em carvona, na concentração de 12 µL/mL (aproximadamente, 11 mg/mL). DAYARAM; KHAN (2016) utilizaram óleo essencial de coentro, rico em linalol, em teste de revestimento de grãos e percebeu uma redução próxima de 100% de postura no tratamento com 12,5 µL/mL (aproximadamente, 10,4 mg/mL). Os efeitos encontrados pelos dois últimos autores citados sobre a oviposição são menores que as consequências sobre a postura ocasionadas pelos óleos de *L. alba* dos genótipos UFRRJ ECB003/008 QT carvona/limoneno e UFRRJ ECB028 QT linalol, dado os valores de concentrações em que os resultados foram obtidos.

Alves *et al.* (2019) encontraram uma diminuição da oviposição de *C. maculatus* sob fumigação de óleo essencial de capim-limão, rico em citral, em cerca de 70% na concentração de 0,6 µL/mL de ar (aproximadamente, 0,5 mg/mL), próximo ao valor encontrado para o óleo de erva-cidreira do acesso UFRRJ ECB037/029/016 QT citral. Além disso, o mesmo trabalho avaliou e verificou que quando apenas machos foram tratados não houve diminuição de postura, e sim, apenas quando as fêmeas foram tratadas, além de verificar uma diminuição do conteúdo lipídico em fêmeas tratadas, sugerindo que há uma remobilização dos recursos energéticos para outras funções, tornando prejudicado o processo de oogênese. Uma constatação próxima nos óleos utilizados deve passar por estudo com metodologia similar.

O tempo que as fêmeas possuem para fazer a postura também deve ser investigado, já que os indivíduos, nos tratamentos com óleo essencial, se tornam menos capazes de copular ou ovipositar à medida que seu metabolismo se torna prejudicado. KÉÏTA *et al.* (2000) observou que a quantidade de ovos postos por fêmeas de *C. maculatus* aumentou menos com a passagem do tempo em grãos tratados com caulim aromatizado. DICK; CREDLAND (1984) perceberam uma postura decrescente, porém significativa em fêmeas do caruncho com até 6 dias de emergência. Um estudo sistemático deve considerar o tempo que as fêmeas tiveram para realizar a oviposição.

4.4 Emergência de *Callosobruchus maculatus* com Óleos de Aroeira e Erva-cidreira

De modo geral, o surgimento de uma nova geração de insetos adultos (emergência de novos adultos) foi inibido por todos os óleos essenciais testados (**Figura 19**). Os óleos de aroeira promoveram diminuição estatisticamente significativa na emergência de novos adultos a partir da concentração de 0,25 mg/mL de ar. Todos os óleos essenciais de aroeira testados em concentrações iguais ou superiores a 0,50 mg/mL de ar, inibiram em mais de 50% o surgimento de novos adultos (**Figura 19** e **Anexo A**). Os melhores resultados foram observados nos tratamentos com os óleos essenciais de erva-cidreira, que promoveram quase inibição total no surgimento de novos adultos a partir da concentração de 0,25 mg/mL de ar dos óleos essenciais UFRRJ ECB021/022 QT citral/limoneno e UFRRJ ECB037/029/016 QT citral. Destaque para os óleos essenciais UFRRJ ECB003/008 QT carvona/limoneno e UFRRJ ECB028 QT linalol que inibiram em 100% o surgimento de novos adultos a partir da concentração de 0,10mg/mL de ar (**Figura 19**).

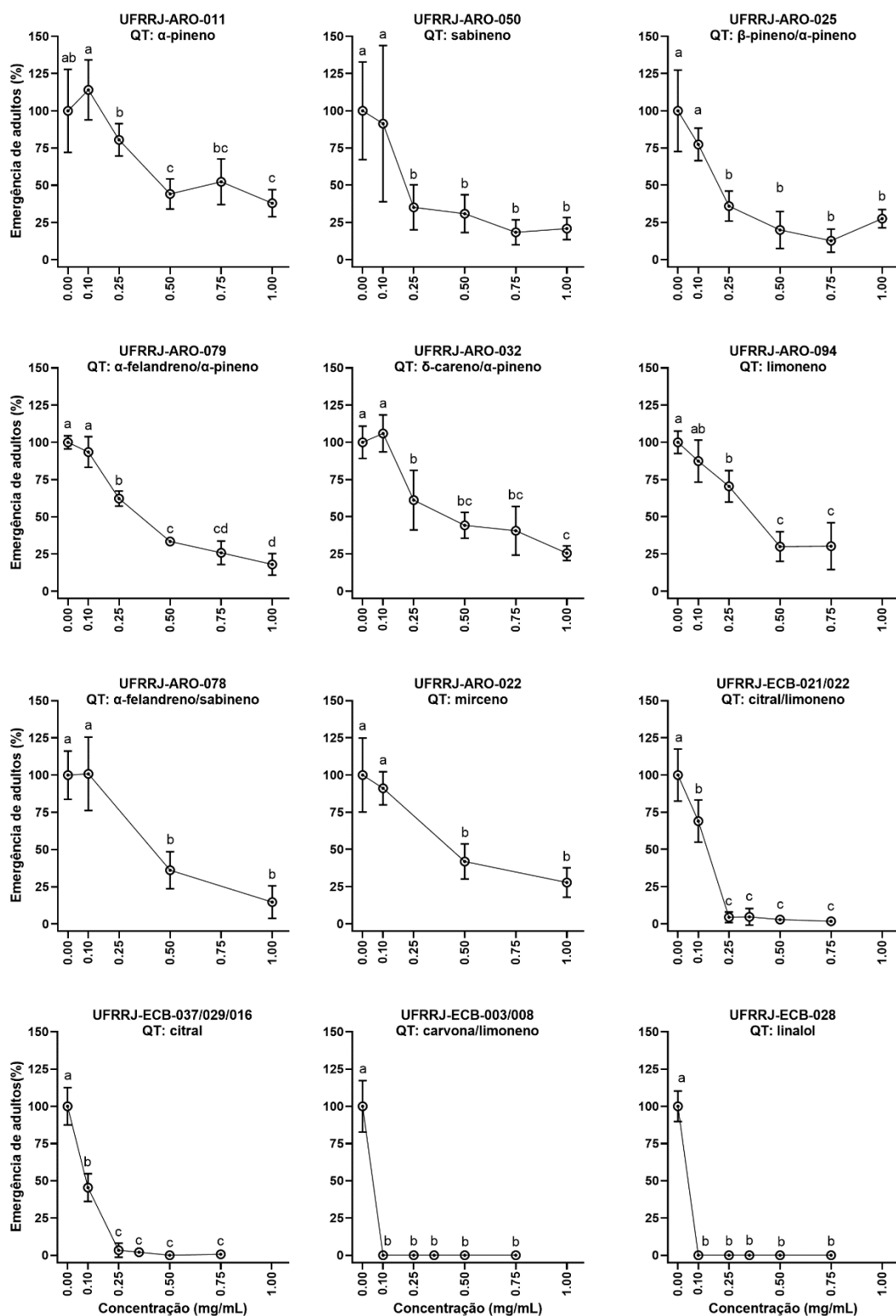


Figura 19 - Emergência de novos adultos em função da concentração dos óleos essenciais de aroeira e erva-cidreira. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as concentrações (Tukey; $\alpha = 0.05$). Barras representam o desvio padrão em torno da média de cada tratamento.

GUSMÃO *et al.* (2013) verificaram a inibição de mais da metade de novos adultos de carunchos em experimento com óleo essencial de funcho (*Foeniculum vulgare*), rico em

limoneno. DUTRA *et al.* (2016) encontraram uma redução de 66% de emergência ao tratar a geração parental de caruncho do feijão-caupi com óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*) com concentração de 1343 mg do óleo/Kg de feijão. Já ATAIDE *et al.* (2022) demonstraram o efeito de diminuição da emergência no gorgulho do milho (*S. zeamais*) em experimento de fumigação dos óleos de *Cymbopogon nardus*, *Corymbia citriodora* e *Cymbopogon martini*, ricos em citral, e certas combinações destes na geração parental do inseto.

4.5 Taxas de Emergência e Fertilidade de *Callosobruchus maculatus* com Óleos de Aroeira e Erva-cidreira

Não foi possível observar expressivo efeito dos óleos essenciais de aroeira sobre a taxa de fertilidade, ou seja, em termos gerais o número de ovos que eclodiram em razão da postura total de ovos permaneceu igual ao controle (**Figura 20 e Anexo B**). Por outro lado, os óleos essenciais UFRRJ ECB021/022 QT citral/limoneno e UFRRJ ECB037/029/016 QT citral inibiram drasticamente a fertilidade, ao inibir a eclosão de quase a todos os ovos a partir de 0,25 mg/mL de ar e a totalidade a partir de 0,10 mg/mL de ar quando expostos aos óleos essenciais de ECB-003/008 e ECB-28 (**Figura 20**).

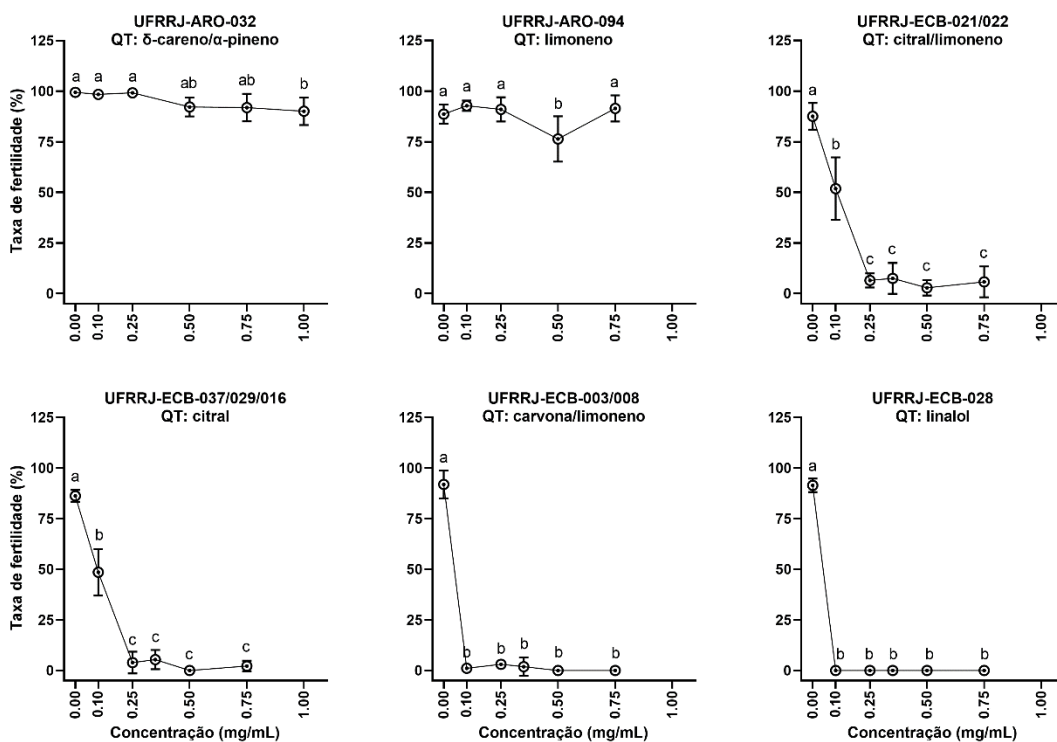


Figura 20 - Taxa de fertilidade (eclosão dos ovos) de *C. maculatus* em função da concentração de óleos essenciais de aroeira e erva-cidreira. Letras diferentes representam diferenças significativas (Tukey; $\alpha = 0.05$). Barras representam o desvio padrão em torno da média de cada tratamento.

Quanto a taxa de emergência, os resultados foram semelhantes aos observados para a taxa de fertilidade, com efeito inibidor desprezível para os óleos essenciais de aroeira, excetuando-se o óleo de genótipo UFRRJ ARO025 QT β -pineno/ α -pineno na concentração de 0,75 mg/mL, onde houve diminuição estatisticamente significativa. Quanto ao efeito dos óleos essenciais de erva-cidreira, houve resultados relevantes. Sendo que todos os genótipos de *L. alba* testados levaram a taxa à zero logo na concentração de 0,25 mg/mL (**Figura 21 e Anexo A**). Destaque para os insetos expostos a 0,10 mg/mL dos óleos essenciais UFRRJ ECB003/008 QT carvona/limoneno e UFRRJ ECB028 QT linalol que não apresentaram emergência (**Figura 21**).

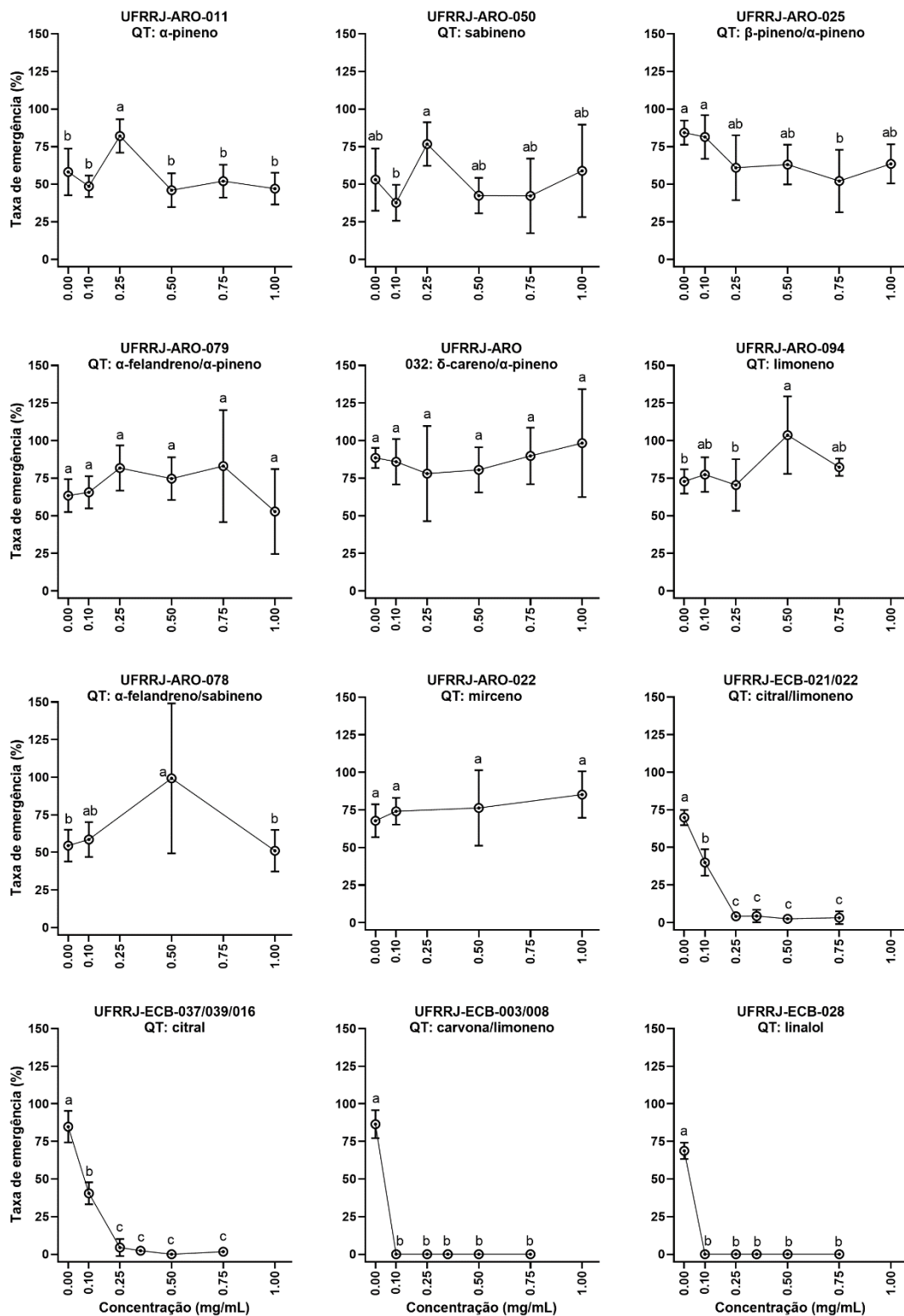


Figura 21 - Taxa de emergência de *C. maculatus* em função da concentração de óleos essenciais de aroeira e erva-cidreira. Letras diferentes representam diferenças significativas (Tukey; $\alpha = 0.05$). Barras representam o desvio padrão em torno da média de cada tratamento.

ALVES *et al.* (2015) encontraram um valor de inibição de postura inferior ao de inibição de emergência, indicando uma consequência da ação dos óleos sobre fases imaturas de *C. maculatus* com óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Ocimum gratissimum*, *Mentha arvensis* e *Lippia alba*.

MBATA; PAYTON (2013) observaram que o adulto e o embrião no ovo são as fases em que o inseto se encontra mais suscetível a ação das substâncias tóxicas. Dois monoterpênicos utilizados pelo autor, linalol e (S)-carvona, encontraram os valores mais altos de toxicidade justamente contra os indivíduos adultos e os ovos, os valores de DL₉₉ de ambos sobre os ovos ficou em torno de 16 µL/L (aproximadamente, 0,014 mg/mL para a substância linalol e 0,015 mg/mL para (S)-carvona).

Em vista dos resultados até aqui, as taxas são cruciais para se entender a diferença de emergência que houve entre os óleos essenciais das duas espécies. No caso dos genótipos de aroeira, os resultados indicam menor intensidade da ação dos óleos essenciais sobre os ovos desenvolvidos e pouca influência sobre fases imaturas em indivíduos de *C. maculatus*. O contrário se aplica aos óleos de erva-cidreira. Uma clara influência antes da eclosão da larva para o grão é observada. Para se dizer certamente onde e como ocorre a ação dos óleos de *L. alba*, experimentos desenhados com o objetivo de se testar o óleo apenas sobre a fêmea, apenas sobre o macho e apenas sobre os ovos pode dizer em qual fase ocorre a ação mais específica destas composições.

4.6 Perda de Massa das Sementes com Óleos de Aroeira e Erva-cidreira.

De modo geral, foi possível observar a diminuição na perda de massa de feijão sob efeito de diferentes concentrações dos óleos essenciais de aroeira e erva-cidreira (**Figura 22 e Anexo B**). Constatou-se a mesma tendência encontrada nos resultados de oviposição e emergência para os óleos essenciais de aroeira e nas taxas de fertilidade e emergência para os óleos essenciais de erva-cidreira. No caso dos óleos essenciais de aroeira podemos perceber uma proteção de quase 60% em concentração de 0,50 mg/mL de ar. Já nos olhos de erva-cidreira se percebeu proteção, praticamente, total a partir da concentração de 0,25 mg/mL de ar (**Figura 22**). Especial consideração aos genótipos UFRRJ ECB003/008 QT carvona/limoneno e UFRRJ EBC028 QT linalol com total proteção ao grão na menor concentração testada, 0,10 mg/mL de ar.

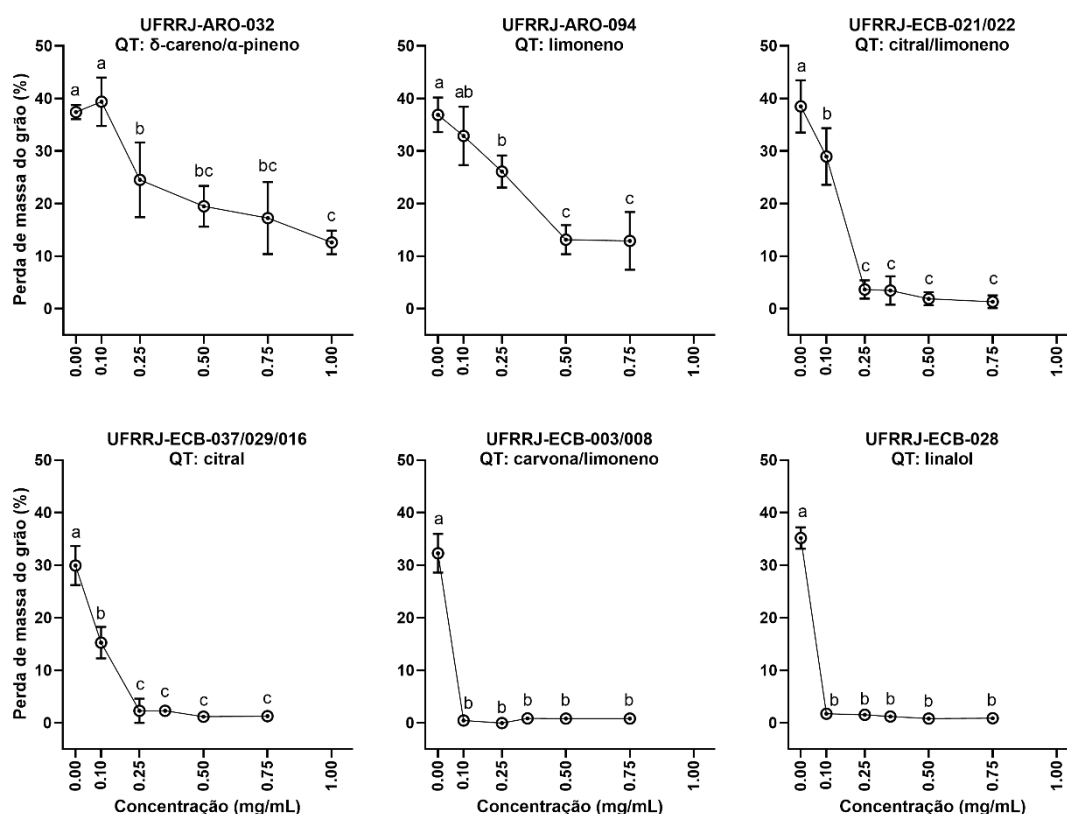


Figura 22 – Perda de massa em função da concentração dos óleos essenciais de erva-cidreira e aroeira. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as concentrações (Tukey; $\alpha = 0.05$). Barras representam o desvio padrão em torno da média de cada tratamento.

JUMBO *et al.* (2018) obtiveram diminuição da perda de massa dos grãos em ensaio com óleos essenciais de cravo e canela, ricos em eugenol, sobre *C. maculatus*. Porém os resultados foram bem diversos, com o óleo de cravo sendo quase quatro vezes mais potente do que o de canela. Já RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ *et al.* (2019) obtiveram redução de 75% nos danos em grãos tratados com óleo essencial de *Ocimum basilicum*, rico em citral, contra o caruncho do feijão comum (*Acanthoscelides obtectus*).

5 CONCLUSÃO

Como observado nos resultados dos ensaios, o óleo essencial do genótipo ARO025 QT β -/α-pineno obteve a menor CL_{50} entre os óleos de aroeira testados ($CL_{50}=0,2870$ mg/mL), ao passo que a menor CL_{50} encontrada foi a do óleo UFRRJ ECB028 QT linalol ($CL_{50}=0,1017$ mg/mL).

Os óleos essenciais de erva-cidreira deste trabalho protegeram totalmente o grão em concentrações iguais ou superiores a 0,25 mg/mL, sendo que os óleos de genótipos UFRRJ ECB028 QT linalol e UFRRJ ECB003/008 QT carvona/limoneno foram os mais eficientes com proteção completa da massa já na menor concentração testada (0,10 mg/mL). Estudos futuros podem ampliar a escala destes óleos, pois houve completa interrupção na reprodução do

caruncho. Os óleos de genótipos de erva-cidreira foram mais eficazes que os óleos de genótipos de aroeira no controle da população de *C. maculatus* e na proteção as sementes.

Estudos futuros podem incluir a análise de imagem pelo software ImageJ para observar efeitos do óleo essencial sobre fases imaturas do inseto através de parâmetros morfológicos de seu desenvolvimento, sendo que uma melhor definição das medidas é necessária.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELGALEIL, S. A. M. *et al.* Insecticidal efficacy of two inert dusts and *Trichoderma harzianum*, applied alone or in combination, against *Callosobruchus maculatus* and *Callosobruchus chinensis* on stored cowpea seeds. **Crop Protection**, v. 146, 1 ago. 2021.
- ACGARWAL, K. K. *et al.* Toxicity of 1,8-cineole towards three species of stored product coleopterans. **Insect Science and its Application**, v. 21, n. 2, p. 155–160, 2001.
- AHUCHAOGU, C. E.; OJIAKO, F. O. Host seed type and volatile compound abundance level mould host location and preference behaviours in *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Chrysomelidae). **Polish Journal of Entomology**, v. 90, n. 4, p. 152–163, 2021.
- AKAMI, M. *et al.* Comparative expression of two detoxification genes by *Callosobruchus maculatus* in response to dichlorvos and *Lippia adoensis* essential oil treatments. **Journal of Pest Science**, v. 92, p. 665–676, 2019.
- 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**, v. 119, p. 191–196, 2019.
- ALVES, M. S. *et al.* Composição e Toxicidade de Oleos Essenciais Testados por Fumigação Contra o *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) Praga do Feijão-Caupi Armazenado. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2387–2399, 1 nov. 2015.
- AMEZIAN, D.; NAUEN, R.; LE GOFF, G. Comparative analysis of the detoxification gene inventory of four major Spodoptera pest species in response to xenobiotics. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 138, 1 nov. 2021.
- ATAIDE, J. *et al.* Insecticidal activity and sublethal effects of essential oils on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and on *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Acta Biológica Paranaense**, v. 51, n. 83118, 23 fev. 2022.
- BARBOSA, D. R. E S. *et al.* Lethal and sublethal effects of chemical constituents from essential oils on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in cowpea stored grains. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 128, n. 6, p. 1575–1586, 19 out. 2021.
- BASTOS, E. A. **A cultura do feijão-caupi no Brasil**. 1ª ed. Teresina: EMBRAPA MEIO-NORTE, 2016. v. Único
- BECK, C. W.; BLUMER, L. S. A Handbook on Bean Beetles, *Callosobruchus maculatus*. **Caryologia**, n. September, 2014.
- CABALLERO, B. (ED.). **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. 2ª ed. [s.l.] Elsevier Science Ltd, 2003. v. 5
- CDC. **Phosphine: Lung Damaging Agent | NIOSH | CDC**. 2011. Disponível em: <https://www.cdc.gov/niosh/ershdb/emergencyresponsecard_29750035.html>. Acesso em: 12 jun. 2022

- CHAUBEY, M. Biological activities of terpenes against pulse beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). **Entomology and Applied Science Letters**, v. 2, n. 1, 2015.
- COPE, J. M.; FOX, C. W. Oviposition decisions in the seed beetle, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae): effects of seed size on superparasitism. **Journal of Stored Products Research**, v. 39, n. 4, p. 355–365, 1 jan. 2003.
- CREDLAND, P. F.; WRIGHT, A. W. Factors affecting female fecundity in the cowpea seed beetle, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 25, n. 3, p. 125–136, 1 jul. 1989.
- CUMMING, J. M. *et al.* Detoxification Mechanisms in Insects. **Encyclopedia of Entomology**, p. 1187–1201, 2008.
- DAYARAM, L.; KHAN, A. Repellent, Fumigant and Contact Toxicity of *Salvia Officinalis*, *Rosmarinus Officinalis* and *Coriandrum Sativum* Against *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (Coleoptera: Bruchidae). **International Journal of Tropical Agriculture**, v. 34, n. 4, p. 893–902, 2016.
- DEVI, M. B.; DEVI, N. V. Biology and morphometric measurement of cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* Fabr. (Coleoptera: Chrysomelidae) in green gram. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 2, n. 3, p. 74–76, 2014.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2^a Edição ed. Chichester: John Wiley & Sons, LTD, 2002. v. 0471496405
- DICK, K. M.; CREDLAND, P. F. Egg production and development of three strains of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 20, n. 4, p. 221–227, 1 out. 1984.
- DONLEY, N. The USA lags behind other agricultural nations in banning harmful pesticides. **Environmental Health**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 7 jun. 2019.
- 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**, v. 68, p. 25–32, 1 jul. 2016.
- EKEH, F. O. K. I. N. Effects of *Citrus sinensis* Peel Oil on the Oviposition and Development of Cowpea Beetle *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) in Some Legume Grains. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 45, n. 4, p. 967–974, 2013.
- ENAN, E. Insecticidal activity of essential oils: Octopaminergic sites of action. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 130, n. 3, p. 325–337, 2001.
- EPPO. Phosphine fumigation of stored products to control stored product insects in general. **EPPO Bulletin**, v. 42, n. 3, p. 498–500, dez. 2012.
- ERB, M.; ROBERT, C. A. M. Sequestration of plant secondary metabolites by insect herbivores: Molecular mechanisms and ecological consequences. **Current Opinion in Insect Science**, v. 14, p. 8–11, 1 abr. 2016.
- FAO. FAOSTAT, 2019. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acesso em: 25 nov. 2022.

- FERRY, N. *et al.* Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. **Current opinion in biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 155–161, abr. 2004.
- GALLO, D. *et al.* **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002.
- GLOSS, A. D.; ABBOT, P.; WHITEMAN, N. K. How interactions with plant chemicals shape insect genomes. **Current opinion in Insect Science**, v. 36, p. 149-156, dez. 2019.
- GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **Insetos - Fundamentos de entomologia**. 5^a ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2017. v. Unico
- GUSMÃO, N. M. S. *et al.* Contact and fumigant toxicity and repellency of *Eucalyptus citriodora* Hook., *Eucalyptus staigeriana* F., *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Foeniculum vulgare* Mill. essential oils in the management of *Callosobruchus maculatus* (FABR.) (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae). **Journal of Stored Products Research**, v. 54, p. 41–47, 1 jul. 2013.
- HUANG, X. *et al.* Isolation and insecticidal activity of essential oil from artemisia lavandulaefolia dc. Against plutella xylostella. **Toxins**, v. 13, n. 12, 1 dez. 2021.
- ILEKE, K. D.; ODEYEMI, O. O.; ASHAMO, M. O. Varietal resistance of some cowpea cultivars to cowpea bruchid, *Callosobruchus maculatus* (Fab.) [Coleoptera: Chrysomelidae] infestation. **FUTA Journal of Research in Sciences**, v. 2013, n. 1, p. 72–81, [s.d.].
- ISO. **ISO 9235:2021 - Aromatic natural raw materials.**, 2021. Disponível em: <<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:ed-3:v1:en>>. Acesso em: 12 jun. 2022
- JAYARAM, C. S. *et al.* Chemical Composition and Insecticidal Activities of Essential Oils against the Pulse Beetle. **Molecules**, v. 27, n. 2, p. 568, 17 jan. 2022.
- JERIBI, C. *et al.* Comparative Study of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of *Schinus terebinthifolius* RADDI Fruits and Leaves Essential Oils. **International Journal of Science and Research**, v. 3, n. 12, 2014.
- JUMBO, L. O. V. *et al.* Toxicity to, oviposition and population growth impairments of *Callosobruchus maculatus* exposed to clove and cinnamon essential oils. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, 1 nov. 2018.
- KALPNA; HAJAM, Y. A.; KUMAR, R. Management of stored grain pest with special reference to *Callosobruchus maculatus*, a major pest of cowpea: A review. **Heliyon**, v. 8, n. 1, p. e08703, 1 jan. 2022.
- KÉBÉ, K. *et al.* Global phylogeography of the insect pest *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchinae) relates to the history of its main host, *Vigna unguiculata*. **Journal of Biogeography**, v. 44, n. 11, p. 2515–2526, 1 nov. 2017.
- KÉÏTA, S. M. *et al.* Effect of various essential oils on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 36, n. 4, p. 355–364, 15 out. 2000.
- KPOVIESSI, AD. *et al.* Resistance of cowpea to Cowpea bruchid (*Callosobruchus maculatus* Fab.): Knowledge level on the genetic advances. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v. 11, n. 8, p. 185–195, 2019.
- KRISTEN WIRA WACANA SUMBA, U. Toxicological and Physiological Effects of Essential Oils against *Tribolium castaneum* and *Callosobrochus maculatus* Parakuat Dichoride to Soil

- Arthropod View project Kairomone attractant for controlling *Lyriomiza* sp in long beans View project Sri Ita Tarigan. **Article in Journal of Biopesticides**, 2016.
- KRZYŻOWSKI, M. *et al.* The Effect of *Rosmarinus officinalis* Essential Oil Fumigation on Biochemical, Behavioral, and Physiological Parameters of *Callosobruchus maculatus*. **Insects**, v. 11, n. 344, jun. 2020.
- KRZYŻOWSKI, M.; BARAN, B.; FRANCIKOWSKI, J. Intergenerational Transmission of Resistance of *Callosobruchus maculatus* to Essential Oil Treatment. **Molecules**, v. 15, n. 4541, 26 jul. 2021.
- KUMRUNGSEE, N. *et al.* Toxicity of essential oil compounds against diamondback moth, *Plutella xylostella*, and their impact on detoxification enzyme activities. **Journal of Pest Science**, v. 87, n. 4, p. 721–729, 5 jul. 2014.
- LAMBERT, M. M. *et al.* Activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and its main constituent eugenol in the inhibition of the development of *Ctenocephalides felis felis* and the control of adults. **Veterinary parasitology**, v. 282, 1 jun. 2020.
- LI, Y. *et al.* THE OCTOPAMINE RECEPTOR $oct\beta 2R$ IS ESSENTIAL FOR OVULATION AND FERTILIZATION IN THE FRUIT FLY *Drosophila melanogaster*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 168–178, 1 mar. 2015.
- LIMA, M. P. L. *et al.* Stability of the resistance of cowpea genotypes to *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) in successive generations. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 2, jun. 2002.
- LIMA, M. P. L. *et al.* Alternation of cowpea genotypes affects the biology of *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Bruchidae). **Scientia Agricola**, v. 61, n. 1, p. 27–31, 1 jan. 2004.
- LUO, J. *et al.* *Drosophila* Insulin-Producing Cells Are Differentially Modulated by Serotonin and Octopamine Receptors and Affect Social Behavior. 2014.
- MAŁEK, D. K.; CZARNOLESKI, M. Thermal Preferences of Cowpea Seed Beetles (*Callosobruchus maculatus*): Effects of Sex and Nuptial Gift Transfers. 2021.
- MANANDHAR, A.; MILINDI, P.; SHAH, A. An Overview of the Post-Harvest Grain Storage Practices of Smallholder Farmers in Developing Countries. **Agriculture**, v. 8, n. 4, 15 abr. 2018.
- MATOS, L. F. *et al.* Chemical composition and insecticidal effect of essential oils from *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllus* on *Callosobruchus maculatus* in cowpea. **Industrial Crops and Products**, v. 145, p. 112088, 1 mar. 2020.
- MBATA, G. N.; PAYTON, M. E. Effect of monoterpenoids on oviposition and mortality of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) under hermetic conditions. **Journal of Stored Products Research**, v. 53, p. 43–47, 1 abr. 2013.
- 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**, v. 107, n. 4, p. 437–449, jun. 2012.
- MUSSER, R. O. *et al.* Caterpillar saliva beats plant defences. **Nature** 2002 **416:6881**, v. 416, n. 6881, p. 599–600, 11 abr. 2002.

- MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 24 fev. 2000.
- NATTUDURAI, G. *et al.* Toxic effect of *Atalantia monophylla* essential oil on *Callosobruchus maculatus* and *Sitophilus oryzae*. **Environmental Science and Pollution Research** 2016 **24:2**, v. 24, n. 2, p. 1619–1629, 27 out. 2016.
- NICOLOPOULOU-STAMATI, P. *et al.* Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. **Frontiers in Public Health**, v. 4, n. 148, p. 8, 2016.
- OBOH, G. *et al.* Insecticidal activity of essential oil from orange peels (*Citrus sinensis*) against *Tribolium confusum*, *Callosobruchus maculatus* and *Sitophilus oryzae* and its inhibitory effects on acetylcholinesterase and Na⁺/K⁺-ATPase activities. 2017.
- OLIVEIRA, J. V. DE *et al.* Fumigation and repellency of essential oils against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in cowpea. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 1, p. 10–17, 1 jan. 2017.
- PEIXOTO, M. G. *et al.* Toxicity and repellency of essential oils of *Lippia alba* chemotypes and their major monoterpenes against stored grain insects. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 31–36, 1 set. 2015.
- PEREIRA, L. A. G.; BIANCHETTI, A. Fatores que afetam a viabilidade das sementes. Londrina. **EMBRAPA-CNPSO**. 1977. Boletim técnico n. 2.
- PRATES, L. H. F. *et al.* Eugenol diffusion coefficient and its potential to control *Sitophilus zeamais* in rice. **Scientific Reports**, 2019.
- PUROHIT, P.; JAYAS, D. S.; CHELLADURAI, V.; YADAV, B. K. Microwave treatment of mung bean (*Vigna radiata*) for reducing the cooking time. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 29, n. 4, p. 547-555, 2013.
- RAFAEL, J. A. *et al.* **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. 1ª ed. [s.l.] Holos Editora, 2012. v. Único
- REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J. T. Essential oils in insect control: Low-risk products in a high-stakes world. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 405–424, 2012.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, Á. *et al.* Insecticidal Properties of *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon winterianus* against *Acanthoscelides obtectus*, Insect Pest of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*, L.). **Insects**, v. 10, n. 5, p. 151, 25 maio 2019.
- RÖNN, J.; KATVALA, M.; ARNQVIST, G. Coevolution between harmful male genitalia and female resistance in seed beetles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 26, p. 10921–10925, 26 jun. 2007.
- RÖNN, J. L.; HOTZY, C. Do longer genital spines in male seed beetles function as better anchors during mating? **Animal Behaviour**, v. 83, n. 1, p. 75–79, jan. 2012.
- SÁ, L. F. R. 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**, v. 60, n. 1, p. 50–57, jan. 2014.

- SAVALLI, U. M.; FOX, C. W. The effect of male size, age, and mating behavior on sexual selection in the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. **Ethology Ecology and Evolution**, v. 11, n. 1, p. 49–60, 1 jan. 1999.
- SCHÜTZLER, N. *et al.* Tyramine action on motoneuron excitability and adaptable tyramine/octopamine ratios adjust *Drosophila* locomotion to nutritional state. 2019.
- SHU, S. *et al.* Sex pheromone production in *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae): Electroantennographic and behavioral responses. **Journal of Stored Products Research**, v. 32, n. 1, p. 21–30, 1996.
- SHUKLA, R. *et al.* Efficacy of essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown and *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet and their major constituents on mortality, oviposition and feeding behaviour of pulse beetle, *Callosobruchus chinensis* L. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 12, p. 2277–2283, 1 set. 2011.
- STILLWELL, R. C.; FOX, C. W. Environmental effects on sexual size dimorphism of a seed-feeding beetle. **POPULATION ECOLOGY**, v. 153, p. 273–280, 2007.
- SUN, J. *et al.* Investigation of Pesticidal Effects of *Peucedanum terebinthinaceum* Essential Oil on Three Stored-Product Insects. **Month-Month**, p. 1307–6167, 2019.
- SUWANNAYOD, S. *et al.* Synergistic Toxicity of Plant Essential Oils Combined with Pyrethroid Insecticides against Blow Flies and the House Fly. **Insects**, v. 10, n. 6, p. 178, 2019.
- SWAMY, S. V. S. G; WESLEY, B. J; KAMAKSHI, J. Relative susceptibility of chickpea varieties to pulse bruchid, *Callosobruchus maculatus* (F.). **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 7, n. 3, p. 442-446, 2019.
- TAK, J. H.; ISMAN, M. B. Penetration-enhancement underlies synergy of plant essential oil terpenoids as insecticides in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 9 fev. 2017.
- TITOUHI, F. *et al.* Protective effects of three *Artemisia* essential oils against *Callosobruchus maculatus* and *Bruchus rufimanus* (Coleoptera: Chrysomelidae) and the extended side-effects on their natural enemies. **Journal of Stored Products Research**, v. 72, p. 11–20, 1 maio 2017.
- TRIPATHI, A. K. *et al.* Insecticidal and Ovicidal Activity of the Essential Oil of *Anethum sowa* Kurz against *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 21, n. 1, p. 61–66, 2001.
- TRIPATHI, K. D. **Essentials of Medical Pharmacology**. 6^a ed. Nova Delhi: Jaypee Brothers Medical Pub, 2008. v. Único
- TUDA, M. *et al.* Global Genetic Differentiation in a Cosmopolitan Pest of Stored Beans: Effects of Geography, Host-Plant Usage and Anthropogenic Factors. **PLOS ONE**, v. 9, n. 9, p. e106268, 2014.
- UNOKI, S.; MATSUMOTO, Y.; MIZUNAMI, M. Roles of octopaminergic and dopaminergic neurons in mediating reward and punishment signals in insect visual learning. **The European journal of neuroscience**, v. 24, n. 7, p. 2031–2038, out. 2006.

- URSPRUNG, C.; DEN HOLLANDER, M.; GWYNNE, D. T. Female seed beetles, *Callosobruchus maculatus*, remate for male-supplied water rather than ejaculate nutrition. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 63, n. 6, p. 781–788, abr. 2009.
- UTIDA, S. Density dependent polymorphism in the adult of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera, Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 8, n. 2, p. 111–125, 1 jun. 1972.
- VAN HUIS, A. *et al.* Impact of the egg parasitoid *Uscana lariophaga* and the larval-pupal parasitoid *Dinarmus basalis* on *Callosobruchus maculatus* populations and cowpea losses. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 104, n. 2–3, p. 289–297, 2002.
- VAN LIESHOUT, E.; MCNAMARA, K. B.; SIMMONS, L. W. Why Do Female *Callosobruchus maculatus* Kick Their Mates? **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95747, 21 abr. 2014.
- WANG, H. Y. *et al.* Insecticidal and repellent efficacy of the essential oil from *Lobularia maritima* and trans-3-pentenitrile against insect pests of stored grains Insecticidal and repellent efficacy of the essential oil from *Lobularia maritima* and trans-3-pentenitrile against insect pests of stored grains. **International Journal of Food Properties**, v. 23, n. 1, p. 1125–1135, 2020.
- YA-ALI, P.; YARAHMADI, F.; MEHRNIA, M. A. Efficacies of Two Nano-Formulations of Tasmanian Blue Gum Essential Oil to Control *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Economic Entomology**, v. 113, n. 3, p. 1555–1562, 6 jun. 2020.

7 ANEXOS

7.1 Anexo A: ANOVA e Médias Aritméticas para mortalidade, postura, emergência de novos adultos e taxa de emergência. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos na mesma coluna (Tukey; $\alpha=0,05$).

Concentração (mg/mL)	Mortalidade (%)	Oviposição (%)	Emergência (%)	Taxa de emergência (%)
----- UFRRJ ARO011 QT α -pineno -----				
0,00	0,00b	100,0a	100,0ab	58,13b
0,10	0,00b	108,8a	114,0a	48,50b
0,25	0,00b	68,31b	80,51b	81,98a
0,50	98,33a	46,29bc	44,14c	45,92b
0,75	100,0a	46,23bc	52,30bc	51,98b
1,00	100,0a	38,51c	38,01c	46,96b
SQ (resíduo)	86471 (83,33)	27029 (4709)	29567 (8522)	4944 (5189)
QM (resíduo)	17294 (2,874)	5406 (162,4)	5913 (293,9)	988,9 (148,3)
F (DFn, DFd)	6018 (5, 29)	33,29 (5, 29)	20,12 (5, 29)	6,669 (5, 35)
<i>P</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0002
----- UFRRJ ARO050 QT sabineno -----				
0,00	0,00c	100,0a	100,0a	52,98ab
0,10	0,00c	82,38a	91,40a	37,61b
0,25	21,67b	31,84b	35,08b	76,65a
0,50	93,33a	26,05b	30,83b	42,31ab
0,75	100,0a	18,39b	18,28b	42,16ab
1,00	100,0a	13,79b	20,79b	58,78ab
SQ (resíduo)	75858 (1818)	39810 (5213)	39967 (21733)	6320 (15029)
QM (resíduo)	15172 (60,56)	7962 (173,8)	7993 (724,4)	1264 (417,2)
F (DFn, DFd)	250,5 (5, 30)	45,82 (5, 30)	11,03 (5, 30)	3,030 (5, 36)
<i>P</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0220

Continuação – Anexo A

----- UFRRJ ARO079 QT α -felandreno/ α -pineno -----				
0,00	0,00b	100,0a	100,0a	63,41a
0,10	0,00b	80,48b	93,50a	65,60a
0,25	11,67b	62,25c	62,25b	81,70a
0,50	90,00a	25,52d	33,39c	74,64a
0,75	96,67a	21,37d	25,79cd	82,98a
1,00	100,0a	21,96d	18,02d	52,81a
SQ (resíduo)	73938 (4238)	33733 (1620)	35992 (1260)	4334 (14869)
QM (resíduo)	14788 (145,4)	6747 (55,87)	7198 (43,46)	866,7(424,8)
F (DFn, DFd)	101,7 (5, 29)	120,8 (5, 29)	165,6 (5, 29)	2,040 (5, 35)
<i>P</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0969
----- UFRRJ ARO025 QT β -pineno/ α -pineno -----				
0,00	2,00c	100,a	100,0a	84,23a
0,10	5,00c	80,97a	77,40a	81,38a
0,25	40,00b	51,25b	35,89b	60,88ab
0,50	88,33a	24,85bc	19,85b	62,99ab
0,75	100,0a	19,51c	12,62b	52,09b
1,00	98,33a	36,73bc	27,45b	63,45ab
SQ (resíduo)	60015 (6242)	28669 (5955)	33750 (5289)	5894 (7429)
QM (resíduo)	12003 (221,3)	5734 (212,7)	6750 (188,9)	1179 (218,5)
F (DFn, DFd)	54,24 (5, 28)	26,96 (5, 28)	35,73 (5, 28)	5,394 (5, 34)
<i>P</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0009

Continuação – Anexo A

----- UFRRJ ARO032 QT δ -careno/ α -pineno -----				
0,00	0,00b	100,0a	100,0a	88,48a
0,10	0,00b	112,50a	105,90a	85,85a
0,25	10,00b	76,54ab	61,14b	78,05a
0,50	91,67a	48,69bc	44,15bc	80,53a
0,75	95,00a	39,03c	40,55bc	89,80a
1,00	100,0a	26,05c	25,45c	98,33a
SQ (resíduo)	72155 (1833)	33496 (8246)	30117 (5069)	1429 (14387)
QM (resíduo)	14431 (65,48)	6699 (294,5)	6023 (181)	285,8 (513,8)
<i>F</i> (DFn, DFd)	220,4 (5, 28)	22,75 (5, 28)	33,27 (5, 28)	0,5563 (5, 28)
<i>P</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,7323
----- UFRRJ ARO094 QT limoneno -----				
0,00	0,00b	100,0a	100,0a	72,81b
0,10	0,00b	83,20ab	87,4ab	77,40ab
0,25	0,00b	74,31b	70,41b	70,46b
0,50	26,67b	22,33c	29,86c	103,60a
0,75	65,00a	27,27c	30,21c	82,30ab
SQ (resíduo)	14867 (74433)	26439 (4660)	22760 (3093)	4220 (5895)
QM (resíduo)	3717 (323,2)	6610 (202,6)	5690 (134,5)	1055 (256,3)
<i>F</i> (DFn, DFd)	11,5 (4, 23)	32,62 (4, 23)	42,32 (4, 23)	4,116 (4, 23)
<i>P</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0117
----- UFRRJ ARO078 QT α -felandreno/sabineno -----				
0,00	0,00b	100,0a	100,0a	54,47b
0,10	3,33b	90,94a	100,8a	58,56ab
0,50	83,33a	21,25b	36,08b	99,28a
1,00	100,0a	17,82b	14,71b	51,00b
SQ (resíduo)	49467 (1867)	34879 (3212)	35122 (5757)	8894 (14449)
QM (resíduo)	16489 (93,33)	11626 (160,6)	11707 (287,9)	2965 (760,5)
<i>F</i> (DFn, DFd)	176,70 (3, 20)	72,39 (3, 20)	40,67 (3,20)	3,898 (3, 20)
<i>P</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0251

Continuação – Anexo A

----- UFRRJ ARO022 QT mirceno -----				
0,00	0,00b	100,0a	100,0a	67,78a
0,10	0,00b	83,61a	91,10a	74,11a
0,50	3,33b	41,62b	41,84b	76,37a
1,00	81,67a	22,90b	27,73b	85,26a
SQ (resíduo)	28775 (5217)	22645 (4617)	22285 (4785)	938,9 (5270)
QM (resíduo)	9592 (274,6)	7548 (243)	7428 (251,9)	313,0 (277,4)
F (DFn, DFd)	34,93 (3, 19)	31,07 (3, 19)	29,49 (3, 19)	1,128 (3, 19)
<i>P</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,3626
----- UFRRJ ECB021/022 QT citral/limoneno -----				
0,00	4,00a	100,0ab	100,0a	69,82a
0,10	5,00a	122,4a	69,02b	39,94b
0,25	0,00a	75,18bc	4,37c	,4,16c
0,35	1,67a	78,92bc	4,73c	4,28c
0,50	0,00a	68,23bc	2,79c	2,51c
0,75	0,00a	52,28c	1,70c	3,16c
SQ (resíduo)	143,8 (553,3)	18169 (12556)	50573 (2496)	21302 (732,0)
QM (resíduo)	28,76 (19,08)	3634 (433)	10115 (86,08)	4260 (25,24)
F (DFn, DFd)	1,507 (5, 29)	8,39 (5, 29)	117,5 (5, 29)	168,8 (5, 29)
<i>P</i>	0,2182	<0,0001	<0,0001	<0,0001
----- UFRRJ ECB037/029/016 QT citral -----				
0,00	0,00a	100,0a	100,0a	84,76a
0,10	0,00a	95,92a	45,39b	40,50b
0,25	1,67a	56,38bc	3,33c	4,40c
0,35	0,00a	68,37b	1,97c	2,29c
0,50	0,00a	57,40bc	0,00c	0,00c
0,75	0,00a	32,40c	0,61c	1,62c
SQ (resíduo)	13,89 (83,33)	19903 (7012)	49564 (1351)	35269(1032)
QM (resíduo)	2,778 (2,778)	3981 (233,7)	9913 (45,04)	7054 (34,39)
F (DFn, DFd)	1 (5, 30)	17,03 (5, 30)	220,1 (5,30)	205,1 (5, 30)
<i>P</i>	0,4346	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Continuação – Anexo A

----- UFRRJ ECB003/008 QT carvona/limoneno -----				
0,00	0,00c	100,0a	100,0a	86,43a
0,10	1,67c	71,82b	0,00b	0,00b
0,25	38,33b	43,14c	0,00b	0,00b
0,35	45,00ab	37,16c	0,00b	0,00b
0,50	65,00ab	23,69c	0,00b	0,00b
0,75	73,33a	30,42c	0,00b	0,00b
SQ (resíduo)	28722 (9600)	25542 (4188)	50002 (1485)	37346 (435,0)
QM (resíduo)	5744 (320)	5108 (139,6)	10000 (202)	7469 (14,50)
F (DFn, DFd)	17,95 (5, 30)	36,59 (5, 30)	202 (5, 30)	515,1 (5, 30)
<i>P</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
----- UFRRJ ECB028 QT linalol -----				
0,00	0,00c	100,0a	100,0a	68,75a
0,10	41,67b	29,96b	0,00b	0,00b
0,25	100,0a	33,12b	0,00b	0,00b
0,35	100,0a	32,49b	0,00b	0,00b
0,50	100,0a	33,12b	0,00b	0,00b
0,75	100,0a	38,61b	0,00b	0,00b
SQ (resíduo)	55347 (5283)	22377 (2063)	50000 (517,9)	23634 (152,4)
QM (resíduo)	11069 (176,1)	4475 (68,78)	10000 (17,26)	4727 (5,079)
F (DFn, DFd)	62,85 (5, 30)	65,07 (5, 30)	579,3 (5, 30)	930,7 (5, 30)
<i>P</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Letras diferentes dentro de uma coluna para cada ensaio com óleo essencial representam diferenças significativas (Tukey, $\alpha=0,05$). SQ representa a soma dos quadrados; QM, o quadrado médio; DFn e DFd, os graus de liberdade entre e dentro dos tratamentos, respectivamente.

7.2 Anexo B: ANOVA e médias aritméticas (\pm desvio padrão) para eclosão (%) e perda de massa (%). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos na mesma coluna (Tukey; $\alpha=0,05$).

Concentração (mg/mL)	Taxa de fertilidade (%)	Perda de massa (%)
----- UFRRJ ARO032 QT δ -careno/ α -pineno -----		
0,00	99,48a	37,43a
0,10	98,47a	39,38a
0,25	99,22a	24,52b
0,50	92,21ab	19,48bc
0,75	91,92ab	17,24bc
1,00	90,14b	12,62c
SQ (resíduo)	499,1 (538,7)	3325 (698,5)
QM (resíduo)	99,83 (19,24)	665 (24,95)
<i>F</i> (DFn, DFd)	5,19 (5, 28)	26,66 (5, 28)
<i>P</i>	0,0017	<0,0001
----- UFRRJ ARO094 QT limoneno -----		
0,00	88,66a	36,90a
0,10	92,74a	32,89ab
0,25	91,01a	26,10b
0,50	76,38b	13,15c
0,75	91,46a	12,90c
SQ (resíduo)	1049 (1081)	2516 (374)
QM (resíduo)	262,2 (46,99)	629,1 (17)
<i>F</i> (DFn, DFd)	5,58 (4, 23)	37,01 (4, 23)
<i>P</i>	0,0027	<0,0001

Continuação – Anexo B

---- UFRRJ ECB021/022 QT citral/limoneno ----		
0,00	87,54a	38,52a
0,10	51,83b	28,97b
0,25	6,47c	3,68c
0,35	7,46c	3,49c
0,50	2,79c	1,88c
0,75	5,77c	1,32c
SQ (resíduo)	32954 (2096)	7391 (312,9)
QM (resíduo)	6591 (72,27)	1478 (10,79)
<i>F</i> (DFn, DFd)	91,2 (5, 29)	137 (5, 29)
<i>P</i>	<0,0001	<0,0001
----- UFRRJ ECB037/029/016 QT citral -----		
0,00	86,25a	29,94a
0,10	48,50b	15,27b
0,25	3,89c	2,31c
0,35	5,42c	2,32c
0,50	0,00c	1,20c
0,75	2,19c	1,31c
SQ(resíduo)	37655 (1000)	4118 (143,6)
QM (resíduo)	7531 (33,33)	823,6 (4,878)
<i>F</i> (DFn, DFd)	225,9 (5, 30)	168,8 (5, 30)
<i>P</i>	<0,0001	<0,0001

Continuação – Anexo B

----- UFRRJ ECB003/008 QT carvona/limoneno -----		
0,00	91,90a	32,27a
0,10	1,07b	0,46b
0,25	3,02b	0,01b
0,35	1,85b	0,89b
0,50	0,00b	0,85b
0,75	0,00b	0,84b
SQ (resíduo)	41178 (367)	5017 (77,93)
QM (resíduo)	8236 (12,23)	1003 (2,598)
<i>F</i> (DFn, DFd)	673,2 (5, 30)	386,3 (5, 30)
<i>P</i>	<0,0001	<0,0001
----- UFRRJ ECB028 QT linalol -----		
0,00	91,48a	35,17a
0,10	0,00b	1,77b
0,25	0,00b	1,56b
0,35	0,00b	1,22b
0,50	0,00b	0,84b
0,75	0,00b	0,91b
SQ (resíduo)	41841 (55,93)	5751 (23,45)
QM (resíduo)	8368 (1,864)	1150 (0,7818)
<i>F</i> (DFn, DFd)	4489 (5, 30)	1471 (5, 30)
<i>P</i>	<0,0001	<0,0001

Letras diferentes dentro de uma coluna para cada ensaio com óleo essencial representam diferenças significativas (Tukey, $\alpha=0,05$). SQ representa a soma dos quadrados; QM, o quadrado médio; DF_n e DF_d, os graus de liberdade entre e dentro dos tratamentos, respectivamente.

7.3 Anexo C: Composição dos óleos essenciais de frutos de genótipos de *S. terebinthifolius* testados.

Substância	UFRRJ ARO011	UFRRJ ARO025	UFRRJ ARO022	UFRRJ ARO079	UFRRJ ARO032	UFRRJ ARO050	UFRRJ ARO094	UFRRJ ARO078
mirreno	0,91	0,35	66,15	1,61	1,62	2,20	0,98	2,14
α -pineno	48,46	28,82	0,90	19,41	24,46	7,36	4,64	11,33
limoneno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	62,68	0,00
β -pineno	10,64	47,50	0,52	0,47	0,53	0,55	0,13	0,65
sabineno	1,92	0,00	0,14	0,28	0,41	37,16	0,50	21,13
δ -3-careno	0,10	0,00	0,00	0,05	34,76	0,00	0,00	0,00
α -felandreno	1,00	0,37	0,63	31,37	0,00	8,80	9,46	22,14
silvestreno	4,15	4,42	1,87	15,68	14,10	10,41	0,00	9,17
germacreno D	6,87	5,19	17,58	5,63	7,11	2,80	13,86	5,09
p-cimeno	0,38	0,25	0,00	7,77	3,68	4,59	0,00	3,50
4-terpineol	1,07	0,59	0,08	0,08	0,07	7,82	0,11	2,62
β -cariofileno	4,96	1,95	6,21	4,39	3,22	2,39	0,52	2,40
elemol	6,62	0,03	0,52	1,87	0,00	0,53	0,19	4,37
acetato de elemol	0,00	0,04	0,00	3,37	0,00	0,00	0,24	0,19
γ -terpineno	0,48	0,20	0,00	0,00	0,00	3,37	0,00	1,30
óxido de cariofileno	0,44	0,67	0,55	0,84	0,67	1,11	0,36	0,73
γ -eudesmol	3,99	0,26	0,30	0,10	0,21	0,15	0,59	2,23
α -zingibereno	0,34	0,79	0,00	0,37	0,91	0,43	0,10	1,02
α -terpineno	0,26	0,11	0,00	0,09	0,00	1,89	0,00	0,75
Total	92,59	91,54	95,44	93,36	91,75	91,56	94,37	90,78

7.4 Anexo D: Composição dos óleos essenciais de folhas de genótipos de *L. alba* testados.

Substâncias	UFRRJ ECB016	UFRRJ ECB021	UFRRJ ECB022	UFRRJ ECB029	UFRRJ ECB037	UFRRJ ECB003	UFRRJ ECB008	UFRRJ ECB028
linalol	1,15	1,27	0,86	1,11	1,44	1,79	1,74	63,07
carvona	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	59,16	56,60	0,00
β -cariofileno	4,32	0,32	0,34	3,58	3,45	0,00	0,36	3,74
limoneno	0,21	7,57	6,71	0,15	0,35	23,10	20,69	0,00
óxido de cariofileno	6,03	0,00	0,00	7,12	4,71	0,00	0,00	0,00
mircene	2,92	0,27	0,23	2,16	4,29	0,44	0,39	0,33
p-cimeno	0,39	2,40	2,01	0,30	0,57	0,00	0,00	0,00
γ -terpineno	0,08	2,72	2,38	0,04	0,20	0,00	0,20	0,00
eucaliptol	0,00	0,00	0,00	0,09	0,21	0,00	0,00	6,21
mirtanal	0,63	0,00	0,00	0,71	0,47	0,00	0,00	0,00
germacreno D	1,20	2,93	3,03	0,15	1,50	4,12	4,65	4,50
α -humuleno	0,47	0,18	0,19	0,55	0,46	0,00	0,18	0,86
elemol	0,00	3,23	3,09	0,00	0,00	3,92	4,67	0,00
pinocarvone	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18
cis-p-1(7),8-dien-2-ol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,63
geranil acetato	0,00	0,09	0,12	0,20	0,34	0,00	0,63	0,00
sabineno	0,16	0,48	0,40	0,22	0,33	1,66	1,56	0,89
germacreno B	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,79
cis-hidrato de sabineno	0,00	0,00	0,24	0,16	0,00	0,80	0,74	0,00
(E)- β -ocimeno	0,76	0,30	0,32	0,53	0,86	0,53	0,51	0,89
geranial	44,29	42,38	43,39	45,53	43,09	0,00	0,41	1,40
neral	30,35	29,63	29,56	32,14	29,79	0,00	0,00	1,02
Total	92,97	93,77	92,85	94,74	92,05	95,53	93,33	89,53

