

UFRRJ

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

Aspectos fisiológicos, bioquímicos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) e controle botânico com óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.)

Camila da Silva Barbosa Pereira
2023



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

Aspectos fisiológicos, bioquímicos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) e controle botânico com óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.)

CAMILA DA SILVA BARBOSA PEREIRA

Sob a Orientação do(a) Professor(a)
Marco Andre Alves de Souza

Co-orientação do Professor
Emerson Guedes Pontes

e Co-orientação do Professor
André Marques dos Santos

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

Seropédica, RJ
Dezembro de 2023

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

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

P436a Pereira, Camila da Silva Barbosa, 1997 Aspectos fisiológicos, bioquímicos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) e controle botânico com óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.) / Camila da Silva Barbosa Pereira. - Seropédica, 2023.
87 f.: il.

Orientador: Marco Andre Alves de Souza.
Coorientador: André Marques dos Santos.
Coorientador: Emerson Guedes Pontes.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química, 2023.

1. atividade biológica. 2. bioquímica dos insetos.
3. cascudinho. 4. capim limão. I. Alves de Souza, Marco Andre , 1975-, orient. II. Marques dos Santos, André, 1977-, coorient. III. Guedes Pontes, Emerson, , coorient. IV Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Química. V. Título.

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

CAMILA DA SILVA BARBOSA PEREIRA

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 15/12/2023

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

Daniela Cosentino Gomes Dr^a. UFRRJ

Flavio José da Silva Dantas Dr. UERJ



TERMO Nº 253/2023 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)
(Nº do Documento: 1445)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 19/12/2023 00:41)
DANIELA COSENTINO GOMES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DBQ (11.39.00.24)
Matricula: ###455#0

(Assinado digitalmente em 18/12/2023 15:59)
MARCO ANDRE ALVES DE SOUZA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DBQ (11.39.00.24)
Matricula: ###822#3

(Assinado digitalmente em 06/02/2024 16:18)
FLAVIO JOSE DA SILVA DANTAS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.127-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: 1445, ano: 2023, tipo: TERMO, data de emissão: 18/12/2023 e o código de verificação: 5fe050f564

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, pois sem Ele seria impossível chegar até aqui. A Ele toda honra, toda glória e todo louvor.

“Tudo o que fizerem, façam de todo o coração, como para o Senhor, e não para os homens, sabendo que receberão do Senhor a recompensa da herança. É a Cristo, o Senhor, que vocês estão servindo...Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos. ”

Bíblia Sagrada, Col. 3:23-24 e Prov. 16:3.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me dado forças, apoio e sustento nos dias mais difíceis, para enfrentar todas as adversidades.

Também gostaria de agradecer a minha família, meu esposo Igor, minha mãe Adriana e meu pai Reginaldo, por todo carinho, amor, apoio e compaixão, além da paciência que tiveram comigo. Aos meus sogros e cunhados, Laudicea e Sérgio Paulo, Raiane e Juan, por orarem por mim e me auxiliarem na jornada.

Obrigada aos meus melhores amigos por sempre estarem comigo, me auxiliando na escrita, se preocupando comigo e me ajudando em algumas coisas da pesquisa. Lucas e Bahigi Júlia. A minha amiga e companheira da Zootecnia, Izadora, mesmo longe estar presente na minha vida acadêmica.

Meus amigos da carona Pedro, Ruan, Beatriz e Raíssa, por sempre terem as melhores conversas voltando da rotina do laboratório.

Meus amigos da igreja Dayana e Dalvan, eu agradeço de mais pelo suporte e pelas orações e por todo incentivo a minha caminhada espiritual. Ao meu Pastor, José Gomes que sempre se alegrou com as minhas conquistas.

Obrigada aos amigos do Laboratório de Plantas Aromáticas e Medicinais, Rafael, Eduardo, Elisabeth, Sandy, Brenda, Ygor, Durval, Diego Paixão, Rosana, Ana Clara Noaves, Ana Clara Ramos, Karine, Igor, Diego Henrique e a todos que fizeram passagem por lá, vocês são muito importantes para mim e fizeram comigo este trabalho acontecer.

Agradeço também ao Erinaldo, Maria Eduarda e a todos que fazem parte do laboratório de nutrição de plantas do Departamento de Solos, por sempre me auxiliarem no tempo em que estive trabalhando lá, e por me darem as melhores soluções quando algo dava errado.

E um agradecimento em especial ao professor, amigo, mestre e orientador Marco André Alves de Souza que sempre me apoiou e me orientou a dar o meu melhor. Ao meu co-orientador André Marques dos Santos, que me acompanhou desde a iniciação científica e foi quem abriu as portas e minha mente para eu fazer o mestrado.

Agradeço também ao programa de pós-graduação em química (PPGQ) pelos 2 anos de investimentos em mim e por ter me dado a oportunidade de cursar o meu mestrado.

Por fim, gratidão a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por sempre abrir as portas ao conhecimento e me formar uma profissional em Zootecnia e agora uma mestra em Química e a Capes, por todo suporte financeiro por esse tempo de estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior-Brasil (CAPES)- código de financiamento 001.

RESUMO

PEREIRA, Camila da Silva Barbosa. **Aspectos fisiológicos, bioquímicos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) e controle botânico com óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.)**. 2023. 87p. Dissertação (Mestrado em Química, Agrobioquímica). Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

O *Alphitobius diaperinus* (cascudinho) é um inseto-praga oportunista amplamente disperso pelo mundo (cosmopolita), encontrado principalmente em granjas avícolas onde proliferam em consequência das condições favoráveis, como calor, umidade e disponibilidade de alimento (ração das aves). As aves deixam de se alimentar da ração balanceada fornecida pelo produtor e passam a ingerir as larvas dos insetos, podendo ocasionar úlceras em seu sistema digestório. Além de serem precursores de diversas doenças, como a salmonelose, o vírus da influenza A e algumas gastroenterites. Para o seu controle é realizado o uso indiscriminado de agrotóxicos, podendo causar problemas para a saúde humana, resistência dos insetos e problemas ambientais. Neste contexto, o presente estudo buscou conhecer alguns dos aspectos biológicos do *A. diaperinus* e o efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim limão) sobre as etapas do ciclo reprodutivo e do metabolismo do inseto. Com esta finalidade, foram realizados ensaios biológicos visando observar o desenvolvimento do cascudinho em condições normais e sob efeito do óleo essencial nos estágios de larva, pupa e adulto. Foram utilizadas análises gravimétricas, de imagens e de perfil metabólico a fim de verificar aspectos da biologia, fisiologia e do metabolismo do inseto. Após as análises do ciclo reprodutivo do inseto, as pupas fêmeas apresentaram comprimento maior do que os machos, quando adultos obtiveram comprimento que variaram entre 0,55 a 0,70 cm, não havendo diferença entre os sexos. Para as fases larvais seu peso aumentava com seu crescimento, na última fase larval (L6) seu peso não diferiu das pupas e dos adultos. Com isso, foi avaliado também a exposição do cascudinho ao óleo essencial de capim limão por fumigação foi observado que a toxicidade é maior sobre a fase adulta com $CL_{50\%}$ de 0,23 mg/cm³ de ar. As fases L3 e L6 apresentaram $CL_{50\%}$ de 1,25 e 1,8 mg/cm³ de ar, respectivamente. Constatou-se também que após 48 horas de exposição aos óleos essenciais nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg/cm³ de ar, metade dos insetos adultos estavam mortos. Por sua vez, metade da população de larvas (L3) estavam mortas após exposição por 72 horas na dose de 5,0 mg/cm³ de ar e metade de larvas (L6) após 48 horas. Não foram constatados efeitos do óleo essencial de capim limão sobre o ciclo reprodutivo do inseto quando incorporado a alimentação ou pulverizado sobre a caixa de criação. Na avaliação do perfil metabólico de insetos nas fases adulta e larval (L3 e L6) foi possível verificar metabólitos como açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos entre outros. No grupo controle, observou-se redução dos aminoácidos e nos insetos expostos ao óleo essencial, observou-se aumento dos aminoácidos, do glicerol e variação nas concentrações dos açúcares. Com base nos estudos realizados, conclui-se que o óleo essencial de capim limão possui efeito tóxico nos insetos em concentrações muito altas, inviabilizando sua utilização com um método alternativo para o controle dos insetos.

Palavras-chave: atividade biológica, bioquímica de insetos, cascudinho, capim limão.

ABSTRACT

PEREIRA, Camila da Silva Barbosa. **Physiological and biochemical aspects of *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) and botanical control with lemongrass essential oil (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.)**. 2023. 87p. Dissertation (Master in chemistry, Agrobiochemistry). Institute of Chemistry, Department of Organic Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Alphitobius diaperinus (mealworm) is an opportunistic insect pest widely dispersed around the world (cosmopolitan), found mainly on poultry farms where they proliferate as a result of favorable conditions, such as heat, humidity and availability of food (bird feed). The birds stop eating the balanced feed provided by the producer and start ingesting insect larvae, which can cause ulcers in their digestive system. In addition to being precursors of several diseases, such as salmonellosis, the influenza A virus and some gastroenteritis. To control it, the indiscriminate use of pesticides is carried out, which can cause problems for human health, insect resistance and environmental problems. In this context, the present study sought to understand some of the biological aspects of *A. diaperinus* and the effect of *Cymbopogon citratus* (lemon grass) essential oil on the stages of the insect's reproductive cycle and metabolism. For this purpose, biological tests were carried out to observe the development of the mealworm under normal conditions and under the effect of essential oil in the larva, pupa and adult stages. Gravimetric, image and metabolic profile analyzes were used to verify aspects of the insect's biology, physiology and metabolism. After analyzing the insect's reproductive cycle, the female pupae were longer than the males. When adults, their lengths varied between 0.55 and 0.70 cm, with no difference between the sexes. For the larval stages, its weight increased with its growth, in the last larval stage (L6) its weight did not differ from that of pupae and adults. With this, the exposure of mealworms to lemongrass essential oil through fumigation was also evaluated. It was observed that the toxicity is greater in the adult phase with LC50% of 0.23 mg/cm³ of air. Phases L3 and L6 presented LC50% of 1.25 and 1.8 mg/cm³ of air, respectively. It was also found that after 48 hours of exposure to essential oils at concentrations of 1.0 and 2.0 mg/cm³ of air, half of the adult insects were dead. In turn, half of the larvae population (L3) were dead after exposure for 72 hours at a dose of 5.0 mg/cm³ of air and half of the larvae (L6) after 48 hours. There were no effects of lemongrass essential oil on the insect's reproductive cycle when incorporated into food or sprayed on the breeding box. When evaluating the metabolic profile of insects in the adult and larval stages (L3 and L6), it was possible to verify metabolites such as sugars, organic acids, amino acids, among others. In the control group, a reduction in amino acids was observed and in insects exposed to the essential oil, an increase in amino acids, glycerol and variation in sugar concentrations were observed. Based on the studies carried out, it is concluded that lemongrass essential oil has a toxic effect on insects in very high concentrations, making its use unfeasible as an alternative method for controlling insects.

Keywords: biological activity, insect biochemistry, mealworms, lemongrass.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Anatomia do *A. diaperinus* (adaptado de ABALLAY *et al.*, 2016).....20
- Figura 2.** Aspectos morfológicos externos de pupa macho e pupa fêmea, na vista lateral e vista dorsal. Em (a) (fêmea) pode ser visto os pigópodes proeminente e em (b) (macho) não há pigópodes (adaptado de ESQUIVEL; CRIPPEN; WARD, 2011).....20
- Figura 3.** Aspectos morfológicos externos do inseto adulto de *A. diaperinus* na vista ventral, mostrando o 8º esternito abdominal. Em (a) (fêmea) pode ser visto que é arredondado em (b) (macho) é dividido em dois picos (adaptado de ARENA; DEFAGÓ, 2020).....21
- Figura 4.** Setor de avicultura da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, com galinhas da raça New Hampshire, destinadas a pesquisa científica. Fonte: acervo pessoal (2023).....22
- Figura 5.** Ciclo de vida do *A. diaperinus* e seu desenvolvimento. Fonte: acervo pessoal (2023)..
.....22
- Figura 6.** Desenvolvimento da pupa até o inseto adulto com sua completa queratinização do exoesqueleto. São necessários 5 dias para passar de pupa a adulto, seguido de mais 1 dia para mudança de uma coloração para outra. Fonte: acervo pessoal (2023).....23
- Figura 7.** Mercado mundial de carne de frango, colocação mundial dos maiores produtores. Total 2020: 99.063 e 2021: 99.901. (adaptado de Associação Brasileira de proteína animal (ABPA), 2022).....24
- Figura 8.** Infestação de cascudinho em cama de frango. Fonte: (TESTA *et al.*, 2018).....26
- Figura 9.** Estrutura química dos pesticidas da classe dos piretróides (a) Mostra o pesticida deltametrina e (b) mostra o pesticida permetrina. Fonte: (NASCIMENTO; MELNYK, 2016).
.....27
- Figura 10.** As três fases do metabolismo de xenobióticos. Fase 0 representa o momento da absorção dos xenobióticos pelas células. Fase I representa a alteração das toxinas por enzimas das classes monoxigenases e carboxilesterase (CCE). Fase II representa a formação do produto conjugado pela enzima glutationa-S-transferase (GST). Fase III representa o transporte dos produtos da fase II por transportadores do tipo ABC, que utiliza a energia gerada pela hidrólise do ATP. Fonte: acervo pessoal (2023)..... **Erro! Indicador não definido.**30
- Figura 11.** Capim limão (*C. citratus*). Fonte: acervo pessoal (2023)31
- Figura 12.** O óleo essencial de capim limão é constituído principalmente por citral que é uma mistura dos isômeros neral (a) e geranial (b) (adaptado de Silva *et al.* 2022b).....32

Figura 13. Ilustração mostrando o mecanismo de ação do composto majoritário (citrál) do óleo essencial de capim limão, de acordo com (CAMARGO <i>et al.</i> , 2011; PLATA-RUEDA <i>et al.</i> , 2020b)	33
Figura 14. Armário modificado para uma câmara de crescimento visando a incubação das colônias de insetos em condições de temperatura e umidade controlados. (a) Armário modificado, (b) Umidificador e ventilador aquecedor que mantém a temperatura e a umidade ideal, (c) Controlador de temperatura e (d) Caixa onde os insetos ficam.....	37
Figura 15. Experimento de fumigação com óleo essencial de capim limão. (a) Pesagem da concentração do tratamento com óleo essencial. (b) Unidades experimentais prontas e vedadas com Parafilm. Fonte: acervo pessoal (2023).....	39
Figura 16. Experimento de incorporação e pulverização com óleo essencial de capim limão (a) Incorporação da solução com óleo essencial ou Butox na ração (b) Frasco âmbar para fazer a pulverização das soluções. Fonte: acervo pessoal (2023).....	40
Figura 17. Experimento de pulverização e incorporação. Fonte: acervo pessoal (2023).	41
Figura 18. Insetos adultos digitalizados pelo Scanner HP ScanJet G2410 . Fonte: acervo pessoal (2023).	41
Figura 19. Experimento do perfil metabólico dos insetos. Em (a) o aparelho que faz a homogeneização das amostras, em (b) pellet formado após a centrifugação das amostras e em (c) amostras derivatizadas que vão para as análises por CG-EM. Fonte: acervo pessoal (2023).	44
Figura 20. Análise de regressão linear com base no comprimento (a), área (b) e perímetro (c) de larvas de <i>A. diaperinus</i> em função do número de dias de desenvolvimento. Barras representam o desvio padrão em torno da média aritmética (n=20).....	46
Figura 21. Descrição dos dados por box-plot com base no comprimento (a), área (b) e perímetro (c) de pupas de insetos machos e fêmeas de <i>A. diaperinus</i> . Letras diferentes indicam que o resultado é significativamente diferente, com base no teste de médias (Tukey; $\alpha = 0,05$, n=10).....	47
Figura 22. Descrição dos dados por box-plot com base no comprimento (a), área (b) e perímetro (c) de insetos adultos machos e fêmeas de <i>A. diaperinus</i> . Letras diferentes indicam que o resultado é significativamente diferente, com base no teste de médias (Tukey; $\alpha = 0,05$, n=10).	47

Figura 23. Massa (g) dos insetos <i>A. diaperinus</i> em diferentes estágios do ciclo biológico (Tukey; $\alpha = 0,05$). Barras representam o desvio padrão em torno da média aritmética (n=20)	48
Figura 24. Variação na concentração de metabólitos a partir da fração polar do extrato bruto de <i>A. diaperinus</i> . Linha vermelha pontilhada representa variação de concentração igual a zero entre os estágios do ciclo biológico. A diferença de concentração entre os estágios larvais L3-L6 (a), L6-pupa (b) e pupa-adulto (c), se positivo indica maior concentração em L3, L6 e pupa e se negativo indica maior concentração em L6, pupa e adulto, respectivamente em (a), (b) e (c).	50
Figura 25. Análise multivariada com base na concentração de metabólitos a partir da fração polar do extrato bruto de amostras de <i>A. diaperinus</i> . Mapa de Calor a partir da análise hierárquica (UPGMA e distância Euclidiana) das amostras nos estágios larvais (L3 e L6), pupa (PU) e adulto (AD) em função da correlação entre as substâncias presentes nas amostras (a). Gráfico-biplot representando a análise de componentes principais (PCA) letras azuis representam a dispersão das amostras (scores) e as letras verdes a contribuição das substâncias para a dispersão (loadings).....	52
Figura 26. Concentração de metabólitos a partir da fração polar do extrato bruto de amostras de <i>A. diaperinus</i> nos estágios larvais (L3 e L6), pupa (PU) e adultos (AD). Barras representam o desvio padrão (n=5). Letras diferentes indicam que o resultado é significativo com base ao teste de médias (Tukey; $\alpha = 0,05$).....	53
Figura 27. Mortalidade dos insetos no estágio larval L3, L6 e adultos em diferentes doses do óleo essencial de capim limão. Porcentagem da mortalidade em função das concentrações de L3 (a); porcentagem da mortalidade em função das concentrações de L6 (b); porcentagem da mortalidade em função das concentrações de adulto (c) análise estatística elaborada no programa GraphPad Prism 9, tukey; $\alpha = 0,05$ e $p < 0,0001$	55
Figura 28. Mortalidade dos insetos em diferentes tempos de exposição ao óleo essencial de capim limão. Porcentagem da mortalidade dos insetos no estágio larval L3 em função do tempo do experimento nas maiores doses testadas (a); porcentagem da mortalidade dos insetos no estágio larval L6 em função do tempo do experimento nas maiores doses testadas (b); porcentagem da mortalidade dos insetos adultos em função do tempo do experimento nas maiores doses testadas (c) (Tukey; $\alpha = 0,05$ e $p < 0,0001$). Barras representam o desvio padrão em torno da média aritmética de cada tratamento.	55

Figura 29. Variação na concentração de metabolitos a partir da fração polar do extrato bruto de *A. diaperinus*, expostos (tratamento) ou não (controle) ao efeito fumigante de voláteis do óleo essencial de capim limão. Linha vermelha pontilhada representa variação de concentração igual a zero entre o controle e o tratamento em cada estágio do ciclo biológico L3 (a), L6 (b) e adulto (c). A diferença de concentração entre controle e o tratamento se positivo indica maior concentração no controle se negativo indica maior concentração no tratamento.....**60**

Figura 30. Análise multivariada com base na concentração de metabólitos a partir da fração polar do extrato bruto de amostras de *A. diaperinus* submetidos (tratamento) ou não (controle) ao óleo essencial de capim limão. Mapa de calor a partir da análise hierárquica (UPGMA e distância Euclidiana) das amostras nos estágios larvais (L3 e L6) e adulto (AD) em função da correlação entre as substâncias presentes nas amostras (a). Gráfico-biplot representando a análise de componentes principais (PCA) letras azuis representam a dispersão das amostras (scores) e as letras verdes a contribuição das substâncias para a dispersão (loadings) (b).....**61**

Figura 31. Número de insetos adultos mortos expostos a diferentes concentrações do óleo essencial de capim limão por diferentes tempos (a). Número de insetos adultos mortos, valores médios consolidados para as concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 mg/cm³ de ar (b). Barras representam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$ e $p<0,0001$) em torno da média aritmética em cada tempo (n=45).....**62**

Figura 32. Variação na concentração de metabolitos a partir da fração polar do extrato bruto de *A. diaperinus* adultos expostos (tratamento) ou não (controle) ao efeito fumigante de voláteis do óleo essencial de capim limão por diferentes tempos. Linha vermelha pontilhada representa variação de concentração igual a zero entre o controle e o tratamento nos tempos 3 (a), 6 (b), 12 (c), 24 (d) e 48 h (e). A diferença de concentração entre controle e o tratamento, se positivo, indica maior concentração no controle, se negativo, indica maior concentração no tratamento.**64**

Figura 33. Análise multivariada com base na concentração de metabolitos a partir da fração polar do extrato bruto de amostras de *A. diaperinus* submetidos (tratamento - T) ou não (controle - C) ao óleo essencial de capim limão por diferentes tempos de exposição (3, 6, 12, 24 e 48 h). Mapa de calor a partir da análise hierárquica (UPGMA e distância Euclidiana) das amostras de insetos em função da correlação entre as substâncias presentes nas amostras (a). Gráfico-biplot representando a análise de componentes principais (PCA) letras azuis representam a dispersão das amostras (scores) e as letras verdes a contribuição das substâncias para a dispersão (loadings).....**65**

Figura 34. Concentração de metabólitos em função do tempo de exposição ao óleo essencial de capim limão (3, 6, 12, 24 e 48 horas). Barras representam o intervalo de confiança (tukey; $\alpha=0,05$ e $p<0,0001$) em torno da média aritmética em cada tempo.....**66**

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Dados da literatura mostrando o efeito de óleo essencial de <i>C. citratus</i> sozinho ou misturado sobre diferentes insetos.....	32
Tabela 2. Dados da literatura mostrando as funções dos principais metabólitos no organismo dos insetos.....	35
Tabela 3. Ciclo biológico do cascudinho (<i>A. diaperinus</i>).....	45
Tabela 4. Parâmetros das equações das curvas de ajuste e $CL_{50\%}$ calculadas do óleo essencial de capim limão sob diferentes fases reprodutivas do <i>A. diaperinus</i>	56

LISTA DE ABREVIACÕES

AChE – Acetilcolinesterase
ATP – Adenosina Trifosfato
CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada a Espectometria de Massas
CCE – Carboxilesterases
GABA – Ácido gaba-aminobutírico
DIC - Delineamento Interiramente Casualizado
GST – Glutathione-S-transferases
LBBMA – Laboratório de Bioquímica e Biologia molecular de Artrópodes da UFRRJ
LabPAM - Laboratório de Plantas aromáticas e medicinais da UFRRJ
LNMP – Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas da UFRRJ
MSTFA - N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida
NIST – *National Institute of Standards and Technology*
PCA- Análise de Componentes Principais
PIB – Produto interno bruto
PPGQ – Programa de Pós-Graduação em Química
TPT - Trifenilestanho
UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UTTD – Ultra Turrax Tube Drive

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	19
3. REVISÃO	19
3.1 Inseto praga: cascudinho.....	19
3.1.1 Descrição morfoanatômica	19
3.1.2 Origem e distribuição.....	21
3.1.3 Ciclo de vida e reprodução	22
3.2 Importância econômica do cascudinho e seu impacto na produção animal	23
3.3 Controle químico tradicional do cascudinho	26
3.4 Impacto negativo do uso indiscriminado dos agroquímicos.....	28
3.5 Uso dos defensivos botânicos no controle de insetos-praga.....	28
3.6 Metabolismo de xenobióticos em insetos	29
3.7 Óleo essencial de capim limão.....	30
3.7.1 Mecanismo de ação inseticida	32
3.8. Aspectos metabólicos dos insetos.....	34
3.9 Análise do perfil metabólico para estudo do metabolismo de inseto.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Material e local	35
4.2 Manutenção da colônia de <i>A. diaperinus</i>	36
4.3 Experimento 1: Avaliação de aspectos biológicos e perfil metabólico de <i>A. diaperinus</i> nas condições do Laboratório de Plantas Aromáticas e Medicinais.	37
4.4 Experimento 2: Avaliação da toxicidade do óleo essencial de capim limão sobre <i>A. diaperinus</i> utilizando o método fumigação.....	38
4.5 Experimento 3: Avaliação da toxicidade do óleo essencial de capim limão incorporado a ração ou pulverizado sobre a caixa de criação de <i>A. diaperinus</i>	39

4.6 Experimento 4: Avaliação do perfil metabólico de <i>A. diaperinus</i> expostos ao óleo essencial de capim limão por fumigação em concentração de subletalidade.....	42
4.7 Análise de perfil metabólico por CG-EM.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
5.1. Experimento 1: Avaliação de aspectos biológicos e perfil metabólico de <i>A. diaperinus</i> nas condições do Laboratório de Plantas Aromáticas e Medicinais.	45
5.2 Experimento 2: Avaliação da toxicidade do óleo essencial de capim limão sobre <i>A. diaperinus</i> utilizando o método fumigação.....	54
5.3 Experimento 3: Avaliação da toxicidade do óleo essencial de capim limão incorporado a ração ou pulverizado sobre a caixa de criação de <i>A diaperinus</i>	57
5.4. Experimento 4: Avaliação do perfil metabólico de <i>A. diaperinus</i> sob efeito do óleo essencial de capim limão por fumigação	58
6. CONCLUSÕES	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
8. ANEXOS	80

1. INTRODUÇÃO

O cascudinho é um inseto pertencente da ordem Coleoptera, e seu nome científico é *A. diaperinus* (SILVA *et al.*, 2005). É um inseto cosmopolita, e no Brasil pode ser encontrado nas granjas aviárias, onde o piso é revestido por serragem ou maravalha (UEMURA *et al.*, 2008). Esses insetos são veículos de patógenos e podem causar doenças como por exemplo a salmonelose e influenza A., além de ocasionar problemas na conversão alimentar, visto que os frangos os ingerem (HICKMANN *et al.*, 2018a; SUBEKTI; CAHYANINGRUM, 2020).

O setor de avicultura de corte no Brasil mostra-se promissor para o agronegócio ao passar dos anos e, como consequência desse avanço, pode-se observar a geração de empregos e renda no país (RODRIGUES *et al.*, 2022), desta forma mostra-se a importância de ter métodos de controle que sejam eficazes. O principal método para o combate desse inseto praga é o químico, com a utilização de inseticidas sintéticos piretróides, como a deltametrina e a cipermetrina.

Porém, o uso destes agrotóxicos traz alguns danos, pois há riscos de poluição química ambiental e à saúde humana, além de haver resistência dos insetos aos inseticidas químicos (LEÃO *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2009a). Pesticidas como os organofosforados e os carbamatos são associados a depressão devido sua ação inibitória em atividades cerebrais (NASCIMENTO *et al.*, 2021). A exposição aos agrotóxicos pode ser letal. Pessoas expostas têm mais chances de ter problema neurológico quando comparado com pessoas que não foram expostas (MURAKAMI *et al.*, 2017).

Tendo em vista os problemas ocasionados pelo uso indiscriminado dos agrotóxicos e a fim de obter um método agroecológico, o óleo essencial de capim limão pode ser utilizado como alternativa a inseticidas sintéticos (MOUSTAFA *et al.*, 2021).

Diante deste panorama, a espécie *C. citratus* (D.C.) Stapf (Poaceae), popularmente conhecida por capim limão, capim-cidreira e capim-santo, tem sua origem na Índia, e suas folhas possuem células oleíferas onde são armazenadas as substâncias voláteis, que após a extração darão origem ao óleo essencial de capim limão (BORGES *et al.*, 2019). O óleo essencial de capim limão possui várias propriedades, como acaricidas (ZHU *et al.*, 2023), fungicidas e inseticidas (DAS *et al.*, 2021).

Portanto, este trabalho buscou analisar o ciclo reprodutivo e o perfil metabólico do *A. diaperinus*, além de analisar os efeitos causados pela fumigação do óleo essencial de capim limão. Assim, diferentes concentrações deste óleo foram testadas com o objetivo de conhecer suas consequências sobre a mortalidade, emergência de novos insetos, dimensões dos insetos

e os aspectos metabólicos. A fim de explorar o uso do óleo essencial de capim limão como um potencial inseticida, sendo uma alternativa para os produtos químicos, além de descobrir possíveis alvos bioquímicos em que os óleos alteram no metabolismo dos insetos.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo buscou estudar o ciclo biológico do cascudinho (*A. diaperinus*) e investigar o efeito do óleo essencial de capim-limão (*C. citratus*) sobre alguns estágios do ciclo reprodutivo do cascudinho e sobre aspectos do metabolismo.

Os objetivos específicos foram:

- (i) Estudar o ciclo reprodutivo do *A. diaperinus* e suas condições de criação;
- (ii) Investigar os efeitos do óleo essencial de *C. citratus* sobre o metabolismo do *A. diaperinus* através do estudo do perfil metabólico;

3. REVISÃO

3.1 Inseto praga: cascudinho

3.1.1 Descrição morfoanatômica

O cascudinho é um inseto pertencente da ordem Coleoptera, e seu nome científico é *A. diaperinus* (SILVA *et al.*, 2005). Estudos de (ABALLAY *et al.*, 2016) identificaram 29 espécies de coleóptera a partir de suas características que estavam em materiais em decomposição, dentre esses identificaram o cascudinho através do formato oval de seu corpo, a cor castanho-escuro e brilhante e seu tamanho relativamente pequeno, cerca de 5,9 a 7,4 mm de comprimento e 2,5 a 3,3 mm de largura. A parte anatômica do inseto adulto visto dorsalmente (Figura 1) é dividida em cabeça, tórax e abdômen, onde na cabeça contém olhos, antenas e peças bucais, no tórax contém o pronoto e o abdômen engloba dois élitros e asas. Em relação ao inseto em estágio larval, a mesma divisão é observada, entretanto o abdômen é composto por pernas, espinhas e segmentos (SOARES; WEBER; SCUSEEL, 2018).

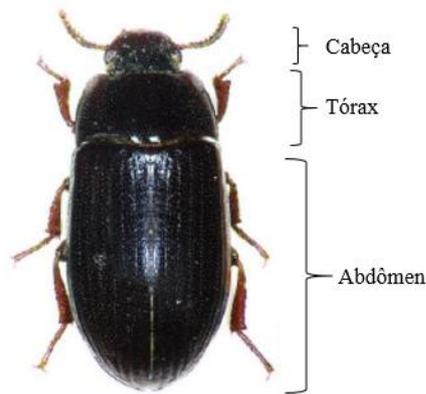


Figura 1. Anatomia do *A. diaperinus* (adaptado de ABALLAY *et al.*, 2016).

No que tange o dimorfismo sexual, é possível observar os contrastes nos apêndices abdominais das pupas (HASSEMER *et al.*, 2016). Outra diferenciação pode ser notada na porção final da região ventral, onde nas pupas fêmeas, apresentam urogônfos e pigópodes proeminentes (Figura 2 - a) e os machos apresentam urogônfos porém não há pigópodes proeminentes (Figura 2 - b) (CHERNAKI; ALMEIDA, 2001).

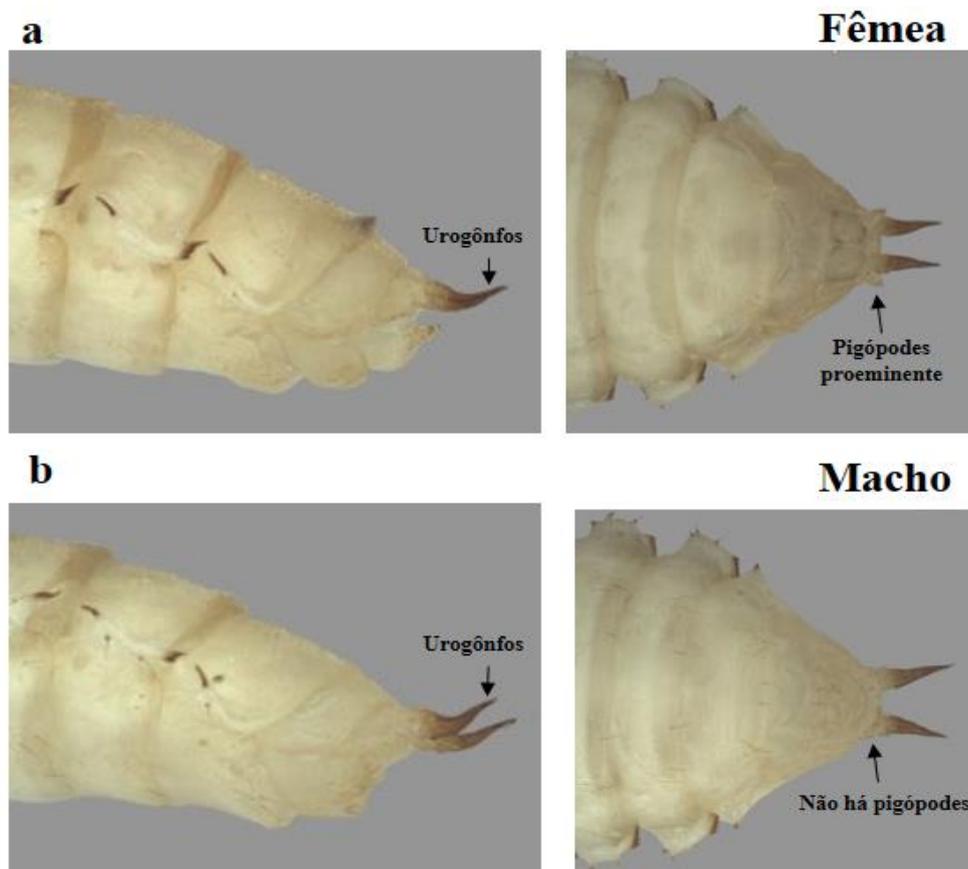


Figura 2. Aspectos morfológicos externos de pupa macho e pupa fêmea, na vista lateral e vista dorsal. Em (a) (fêmea) pode ser visto os pigópodes proeminentes e em (b) (macho) não há pigópodes (adaptado de ESQUIVEL; CRIPPEN; WARD, 2011).

O método mais utilizado para sexagem dos insetos é através das pupas, por ser mais fácil a visualização. Entretanto, as larvas empupam de forma oculta seja na maravalha ou em frestas, tornando-se difícil a obtenção dos animais. Desta forma há a possibilidade da sexagem ser feita quando adulto, observando-se a porção final da região ventral, precisamente no 8º esternito abdominal, sendo arredondado nas fêmeas (Figura 3 - a) e com dois picos nos machos (Figura 3 - b) (ARENA; DEFAGÓ, 2020).

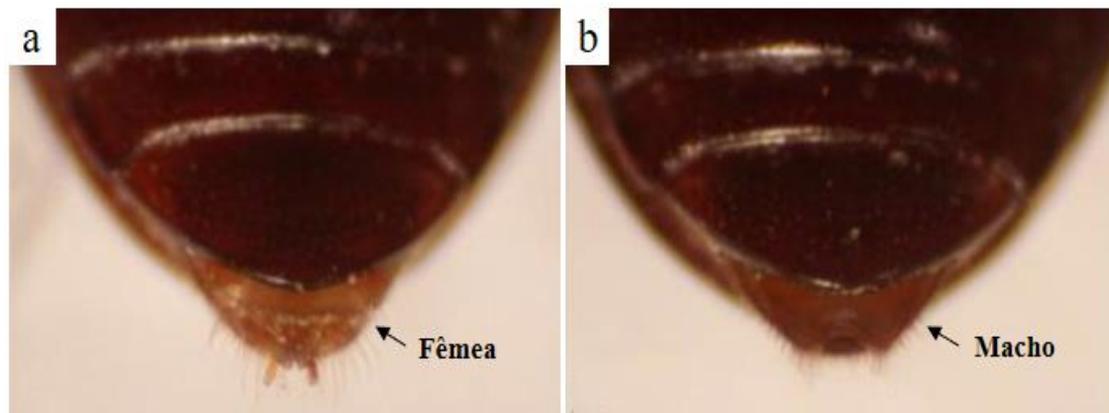


Figura 3. Aspectos morfológicos externos do inseto adulto de *A. diaperinus* na vista ventral, mostrando o 8º esternito abdominal. Em (a) (fêmea) pode ser visto que é arredondado em (b) (macho) é dividido em dois picos (adaptado de ARENA; DEFAGÓ, 2020).

3.1.2 Origem e distribuição

A. diaperinus (Panzer) tem sua origem da África Ocidental, entretanto através de alimentos infectados e com o uso de sistemas intensivo, foi inserido em outros países, onde encontrou no ambiente avícola as condições necessárias para o seu crescimento (FOGAÇA *et al.*, 2017). É considerada uma espécie cosmopolita, ou seja, são encontrados em praticamente todos os lugares, sendo, principalmente, relacionados a grãos de armazenamento (GIRALDO; FLORES, 2016). Apresenta grande diversidade no Peru (SMITH *et al.*, 2015), e no Brasil, sua distribuição é diversa, onde pode ser encontrado nas grandes granjas aviárias (Figura 4) (UEMURA *et al.*, 2008).



Figura 4. Setor de avicultura da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, com galinhas da raça New Hampshire, destinadas a pesquisa científica. Fonte: acervo pessoal (2023)

3.1.3 Ciclo de vida e reprodução

Seu ciclo biológico completo é de 55 dias, sendo dividido em 4 partes: ovos, larvas, pupas e adultos; em média são 8 a 12 estágios larvais (Figura 5) (MENDES; POVALUK, 2017). Considerado um desenvolvimento rápido, com fêmeas apresentando boa taxa de reprodução (KUREČKA *et al.*, 2021). SALLET (2013, p.34) cita que o ciclo no total dura 61 dias, condições de 27°C e 80% de umidade relativa. O desenvolvimento é extremamente dependente da faixa de temperatura ideal de 27°C a 33°C, podendo haver variações até 31°C.

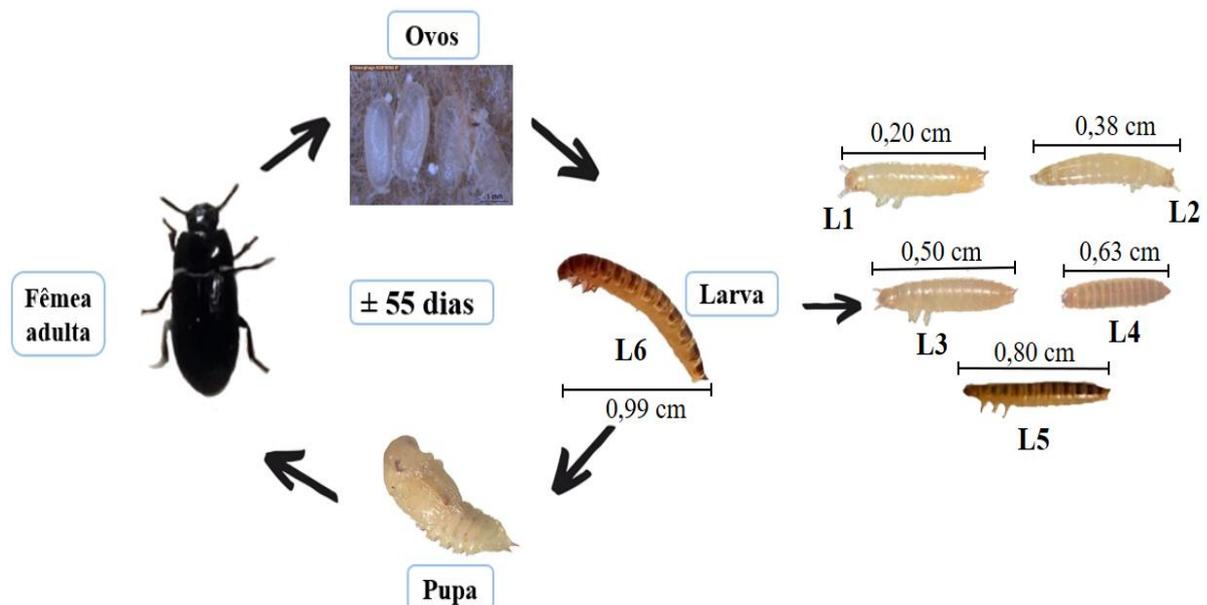


Figura 5. Ciclo de vida do *A. diaperinus* e seu desenvolvimento. Fonte: acervo pessoal (2023)

Os ovos desse inseto apresentam coloração esbranquiçada, são esféricos e de difícil visualização, devido seu tamanho e localização de postura (SALLET, 2013). A partir deles, eclodem larvas minúsculas no estágio inicial, que também são esbranquiçadas assim que eclodem, e ao passar do tempo de seu desenvolvimento vão escurecendo e crescendo, até chegar em seu último estágio larval (podendo chegar a 11 instares larvais), a duração de todo ciclo reprodutivo é extremamente dependente da temperatura (ARTHUR, 2018; SALLET, 2013).

A partir do último instar larval ocorre a empupação, onde as pupas apresentam coloração esbranquiçada a leve amarelada. Nesse estágio, é possível ver o dimorfismo sexual na região ventral e, em seguida, emergem os adultos com coloração branca. Eles apresentam uma diferença na queratinização do exoesqueleto do inseto adulto ao inseto recém metamorfoseado (Figura 6). No final do seu ciclo, quando os adultos já atingiram a maturação sexual, sua reprodução em média 20 dias após a emergência (BJØRGE *et al.*, 2018; ARTHUR, 2018).

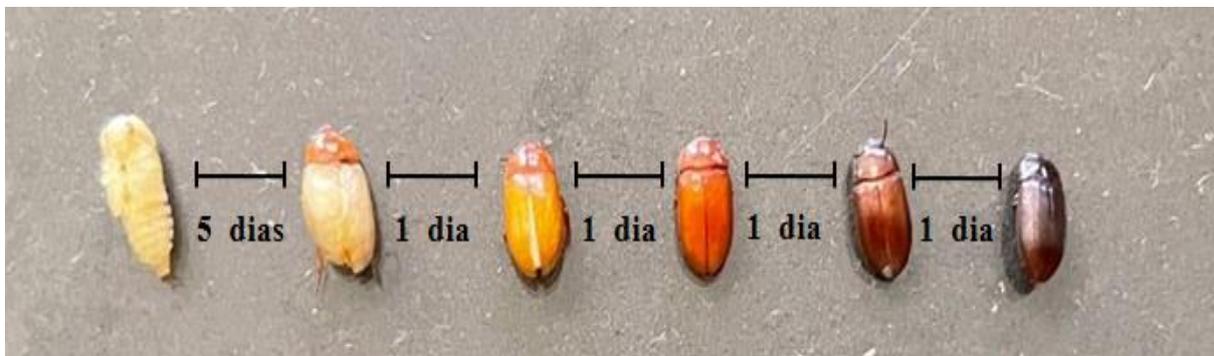


Figura 6. Desenvolvimento da pupa até o inseto adulto com sua completa queratinização do exoesqueleto. São necessários 5 dias para passar de pupa a adulto, seguido de mais 1 dia para mudança de uma coloração para outra. Fonte: acervo pessoal (2023).

Os cascudinhos são resistentes a diversas condições extremas, como por exemplo, a temperatura, onde sobrevivem de maneira que não há prejuízos a seu ciclo de vida, em diversas variações climáticas. De acordo com GAZONI *et al.*, (2012) esses insetos são sensíveis a temperaturas extremas (abaixo de -10°C e acima de 45°C), ocasionando sua mortalidade. Há necessidade de controlar as condições ambientais para se fazer um ciclo biológico em laboratório, onde se tem a importância para futuros estudos experimentais.

3.2 Importância econômica do cascudinho e seu impacto na produção animal

Ao longo dos anos, o setor de avicultura de corte no Brasil tem mostrado bastante promissor para o agronegócio, como consequência desse avanço, pode-se observar a geração de empregos e renda no país (RODRIGUES *et al.*, 2022). De acordo com Associação Brasileira de Proteína Animal, o Brasil é atualmente o terceiro maior produtor de carne de frango do mundo (Figura 7), e há previsões de que o setor irá crescer ainda mais. A evolução no setor de avicultura de corte tem se mostrado expressiva nos últimos tempos, e como consequência, tem se destacado nesse segmento, por seu desempenho e benefícios na produção de carne avícola (CIELO; JUNIOR; RIBEIRO, 2017).



Figura 7. Mercado mundial de carne de frango, colocação mundial dos maiores produtores. Total 2020: 99.063 e 2021: 99.901. (adaptado de Associação Brasileira de proteína animal (ABPA), 2022).

Outro dado importante é que o Brasil é o segundo maior exportador de carne de frango, entretanto várias questões interferem para que a produção da carne seja feita de maneira correta e com qualidade no produto final. Essas questões estão diretamente associadas com a ambientação do local da criação dos frangos e o seu manejo adequado, para que se tenha um bom retorno econômico na produção e na comercialização (BASTOS; FREITAS, 2019).

No que tange a exportação de carne de frango, dados preliminares de 2022 mostram que o Brasil lidera, e presume que aumente cerca de 9% para 2022, ao todo com exportações de 4,6 de toneladas, sendo o principal destino dessa carne a China (ESTADOS UNIDOS, 2022). Esse setor é considerado fundamental economicamente e socialmente, onde sua contribuição na economia é enorme, pois é um dos segmentos responsáveis por parte do Produto Interno Bruto (PIB) do Brasil (SOUZA *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2019). Todas as regiões do país seguem a linha de produção de frango de corte, entretanto, a região Sul tem a maior concentração da produção nacional, em específico o estado do Paraná onde a infraestrutura das cooperativas para o abate e processamento são bem consistentes (FAVRO *et al.*, 2021).

Contudo, há inúmeros elementos que contribuem para a perda de produtividade e os principais atributos da carne de frango, o que acarreta um déficit financeiro excedente (SILVA *et al.*, 2022). Os frangos ingerem tanto fases larvais quanto adultos do *A. diaperinus*, trazendo problemas na conversão alimentar e no crescimento dos animais da granja, e isso acarreta a um baixo ganho no peso e perdas econômicas ao produtor, se tornando assim um risco a economia (WOJCIEHOVSKI; PEDRASSANI; MARIO FEDALTO, 2015; HICKMANN *et al.*, 2018a). O sistema de criação das aves de corte é propício para a propagação dos besouros, afinal, a condição do ambiente controlado para as aves induz a reprodução e o crescimento dos insetos (WOLF *et al.*, 2014; ROCHA; PRIMIERI, 2021).

Uma peculiaridade do cascudinho é o hábito alimentar, os quais alimentam-se de fezes, restos em decomposição, rações das aves, fungos, entre outros. (REIS *et al.*, 2020). De acordo com MITUNIEWICZ e DZIK (2020), o cascudinho alimenta-se de frestas de piso e de paredes diminuindo a proteção térmica nas instalações. Outro grande prejuízo desse inseto, é na questão sanitária, pois são condutores de diversos patógenos que também são transmitidos pela mosca doméstica como algumas bactérias (*Salmonella spp.*) fungos (*Aspergillus spp.*) e vírus (Influenza A) (SUBEKTI e CAHYANINGRUM, 2020).

A cama de aviário também serve como abrigo para o cascudinho (Figura 8), e com o aumento na produção avícola, o volume de resíduos gerados pela cama também aumenta, visto que são utilizadas para compostagem e, por conseguinte, o espalhamento de patógenos e insetos (MOTTIN *et al.*, 2015).



Figura 8. Infestação de casculinho em cama de frango. Fonte: (TESTA *et al.*, 2018)

Estudos de (DONOSO; PAREDES; RETAMAL, 2020) caracterizaram sorotipos de *Salmonella* em granjas industriais, a salmonelose é considerada uma zoonose e em certos casos estão presentes nas larvas e nos adultos do inseto. No geral, os efeitos das várias doenças relacionadas ao setor avícola, ocasiona a morte dos animais, a queda no fortalecimento da execução da cultura e necessidade de controle sanitário. Tudo isso gera repercussão negativa na economia de uma granja (AMARAL; MARTINS; OTUTUMI, 2017).

3.3 Controle químico tradicional do casculinho

O casculinho prolifera de maneira muito rápida no sistema de criação aviária, pois a cada novo lote de galinhas aumenta a propagação desses insetos. A principal alternativa no manejo para amenizar essa proliferação é o uso de inseticidas químicos aplicados de forma superficial na cama aviária (SANTOS *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2016). Os defensivos químicos mais utilizados são os neonicotinóides ou piretróides (ciflutina, permetrina) e os organofosforados (tetraclorvinfos) (RENAULT e COLINET, 2021).

No Brasil, os inseticidas piretróides e organofosforados são registrados para a utilização em aviários (OLIVEIRA *et al.*, 2016; HICKMANN *et al.*, 2018b). Fosfeto de alumínio (inorgânico precursor de fosfina), fosfeto de magnésio e fosfina (inorgânico) são ingredientes ativos descritos no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2023) para o controle do *Tenebrio molitor*, que é da mesma família do casculinho (BJØRGE *et al.*, 2018). A variação de produtos químicos que sejam eficientes no controle do casculinho, são muito

limitadas. O problema da permetrina (Figura 9 - b) é que só pode ser utilizada na ausência das aves, quando se faz a limpeza da instalação (LYONS *et al.*, 2017). Com isso, há dificuldade no emprego dessas estratégias, porque pode ocasionar envenenamento nas aves, ou seja, a aplicação deve ser feita no vazio sanitário (FOGAÇA *et al.*, 2017).

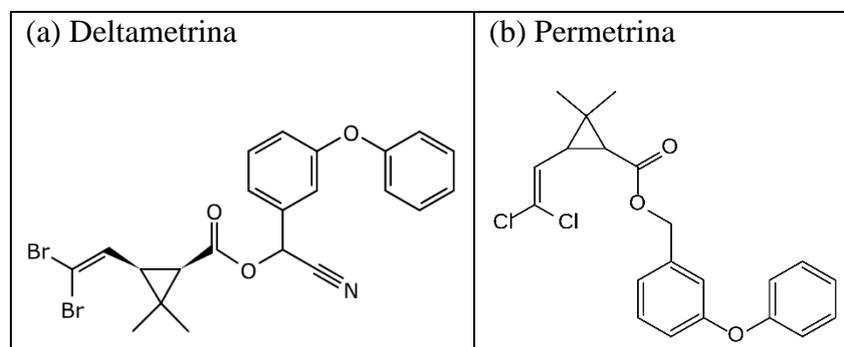


Figura 9. Estrutura química dos pesticidas da classe dos piretróides. (a) Mostra o pesticida deltametrina e (b) mostra o pesticida permetrina. Fonte: (NASCIMENTO; MELNYK, 2016)

A deltametrina (Figura 9 - a) é chamada de inseticida piretróide do tipo II, e alguns desses compostos contêm o grupo α -ciano-fenoxibenzila, com modo de ação no sistema nervoso central, possuindo um efeito sobre os canais de sódio dos neurônios, atuando no seu fechamento e abertura e, como resultado, estende-se o tempo de entrada de íons Na^+ (sódio) para dentro das células (MONTANHA; PIMPÃO, 2012; SANTOS; AREAS; REYES, 2007)

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é um neurotransmissor fundamental para inibição no sistema nervoso central e ocasiona uma grande excitação das células neurais. Outra ação dos piretróides é o bloqueio dos receptores gabaérgicos e os canais de cloreto (Cl^-), ocasionando em dificuldade da passagem dos íons de cloreto pela membrana, interrompendo a inibição sináptica. (PEREIRA e MOURA, 2021).

Estudos de (TOMBERLIN; RICHMAN; MYERS, 2008) relatam que há uma possibilidade de criar um esquema de rotação de inseticidas, pois há pouca diversidade deles, entretanto há algumas fórmulas que vêm sendo empregadas no Texas, como spinosad e bifentrina, que apresentam sucesso no manejo desses insetos. O spinosad é um conjunto de substâncias químicas, a partir de dois produtos do metabolismo do fungo *Sacharopolyspora spinosa*, que apresenta eficácia quando é aplicado diretamente no adulto e também no meio em que se reproduz (SOUZA *et al.*, 2020).

3.4 Impacto negativo do uso indiscriminado dos agroquímicos

Agrotóxicos são definidos pelo Ministério do Meio Ambiente como produtos e agentes de processos físicos, químicos e biológicos, destinados para utilização em diversos setores, para o armazenamento de produtos agrícolas, nas pastagens, nos ambientes urbanos e rurais, com o objetivo de isentar a ação prejudicial dos seres que são nocivos, assim como os compostos e produtos para desfolhantes, inibidores de crescimentos, entre outros (BRASIL, 2002). Os produtores utilizam esses pesticidas, a fim de aumentar a produtividade das culturas, entretanto não é avaliado a efetividade, a quantidade e o momento adequado para seu uso, colocando em perigo a saúde dos produtores (DE-ASSIS *et al.*, 2021).

O uso dos agroquímicos trazem muitos problemas, pois há riscos de poluição química ambiental e à saúde humana, especificadamente pelo seu contato (LEÃO *et al.*, 2018). Os produtores rurais são os mais prejudicados à exposição desses produtos químicos, com os quais eles têm contato direto nas lavouras e após a aplicação, quando o alimento chega para o consumidor final. (GOVONI *et al.*, 2019).

De acordo com (OLIVEIRA *et al.*, 2018c), é de suma importância fiscalizar e controlar a venda dos defensivos agrícolas, devido a sua característica tóxica para os humanos e meio ambiente. Dessa forma, a fiscalização feita por órgãos federais é essencial para o controle desse emprego indiscriminado. O uso de defensivos agrícolas ocasiona alguns problemas para o bem-estar humano são vinculadas ao seu uso, como problemas respiratórios, imunológicos, neurológicos e até mesmo má formação fetal (FRANÇA *et al.*, 2017). O fator mais preocupante é a utilização da mistura dos pesticidas, visto que pode ser mais perigoso do que o uso individual (PINTO *et al.*, 2020).

3.5 Uso dos defensivos botânicos no controle de insetos-praga

Defensivos botânicos apresentam atividade direta sobre os insetos, com alta seletividade e baixa persistência no local, sendo mais efetivo do que os pesticidas sintéticos, pois a aplicação desses defensivos será em menor quantidade (BRAGA SILVA *et al.*, 2019). A utilização de extratos vegetais é considerada um método alternativo, e favorece os pequenos agricultores, porque são de fácil aplicação, mais baratos, não causam prejuízos ao meio ambiente (SILVA *et al.*, 2020). Plantas de maneira geral apresentam muitos compostos orgânicos que podem auxiliar na redução de infestação de insetos, entretanto, é necessário

haver alguns estudos para entender o mecanismo de ação dessas substâncias presentes nos vegetais (JUNIOR; DOS SANTOS; SOARES, 2020; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Estudos feitos por CASTRO & FREITAS (2018) concluíram que o extrato vegetal de noni (*Morinda citrifolia*) é uma boa alternativa para o controle de pragas, se mostrando eficiente no controle de *Sitophilus zeamais*, que é um inseto praga do milho, assim como extrato supercrítico de *Melia azedarach* (Meliaceae) (TEIXEIRA *et al.*, 2019). Extratos de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart. Coville) a uma concentração de 10%, foi efetivo na mortalidade de 100% de ninfas de cochonilha de escama *Diaspis echinocacti* (DANTAS *et al.*, 2019).

O uso de extratos aquosos de nim, eucalipto e fumo não obtiveram sucesso para o controle de adultos do cascudinho (FERREIRA *et al.*, 2018). Estudos de SUBEKTI; CAHYANINGRUM; MAULANA (2022) mostraram que apenas extratos de casca de canela (*Cinnamomum aromaticum*), a uma concentração de 10%, foram efetivos para o controle de larvas do cascudinho. Entretanto, para os insetos adultos, o que se mostrou efetivo foram os extratos de sementes de noz-moscada (*Myristica fragrans*) na mesma concentração. Extratos de timbó (*Lonchocarpus negrensis* Benth., Fabaceae) e caldo de fumo possuem eficiência e rapidez no controle de lagartas de *Tuta absoluta* (DORACENZI; BENTO; MARQUES, 2021).

3.6 Metabolismo de xenobióticos em insetos

A metabolização de xenobióticos está relacionada a enzimas de desintoxicação, que são induzidas pela presença desses compostos xenobióticos (DESPRÉS; DAVID; GALLET, 2007). Esses eventos acontecem no lúmen intestinal dos insetos, através de enzimas (monoxigenases, esterases, hidrolases, transferases) que possuem atividade de hidrólise ou alteração das substâncias xenobióticas, favorecendo assim sua saída do organismo e diminuindo sua nocividade (ALMEIDA, 2018). Esse desempenho enzimático por adaptação, em que danifica os xenobióticos, pode ser considerado também como um mecanismo de defesa da classe insecta (FERNANDES; PARREIRA; ALVES, 2021).

Estudos feitos por YANG *et al.*, (2005) mostraram que a atividade de monoxigenases, enzimas relacionadas ao metabolismo de resistência, foram aumentadas na espécie *Helicoverpa armigera* resistentes a piretróides. A superexpressão e indução de enzimas citocromo P450 (P450s), que são codificadas pela superfamília do gene CYP, também é um processometabólico

associado à desintoxicação por xenobióticos, como por exemplo, os agrotóxicos (HEIDELFISCHER; VOGEL, 2015; LU; SONG; ZENG, 2021). As enzimas P450s são muito importantes no desempenho da resistência dos insetos a inseticidas (NAUEN; ZIMMER; VONTAS,2021).

Dependendo do xenobiótico que entrou no organismo, as vias de eliminação podem funcionar de forma simultânea ou individual (AMEZIAN; NAUEN; LE GOFF, 2021). O metabolismo de xenobióticos pode ser dividido em três fases (Figura 10). Na fase I atuam principalmente as enzimas monoxigenases associadas ao citocromo P450s e carboxilesterases (CCE), que alteram estruturalmente as toxinas. Na fase II, a principal enzima é a Glutathione-S-transferases (GST), que é responsável pela conjugação dos produtos formados na fase 1, para assim serem solubilizados e transportados. No entanto, existem outras enzimas que atuam nessa fase (AMEZIAN; NAUEN; LE GOFF, 2021; BERENBAUM; JOHNSON, 2015a). Por fim, na fase III, quem atua são os transportadores ABC que irão transportar para fora da célula os produtos conjugados pela fase II (BERENBAUM; JOHNSON, 2015b).

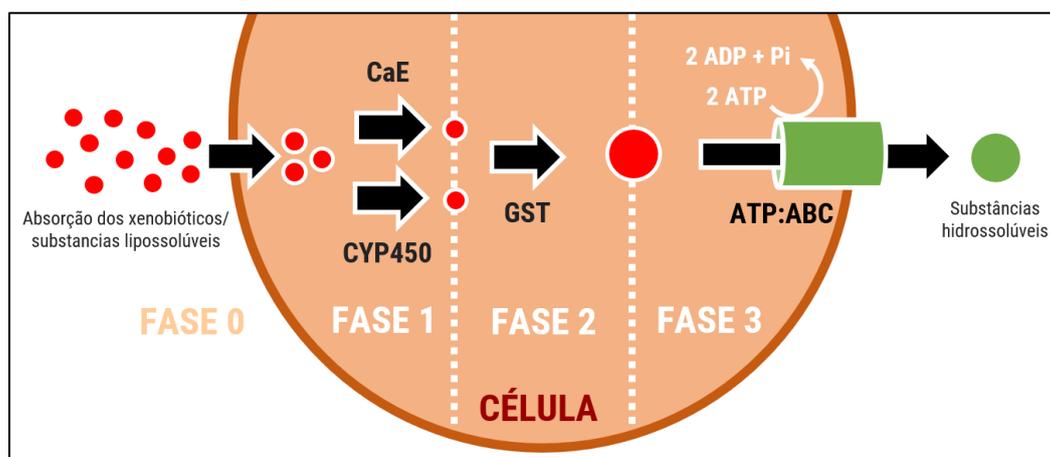


Figura 90. As três fases do metabolismo de xenobióticos. Fase 0 representa o momento da absorção dos xenobióticos pelas células. Fase I representa a alteração das toxinas por enzimas das classes monoxigenases (citocromo P450, CYP450) e carboxilesterase (CaE). Fase II representa a formação do produto conjugado pela enzima glutathione-S-transferase (GST). Fase III representa o transporte dos produtos da fase II por transportadores do tipo ABC (ATP:ABC) que utiliza a energia gerada pela hidrólise do ATP. Fonte: acervo pessoal (2023)

3.7 Óleo essencial de capim limão

Os óleos essenciais são produtos obtidos de matéria prima vegetal por hidrodestilação, destilação a vapor ou destilação seca, e no caso de frutas cítricas, por processo mecânico sem

a utilização de temperaturas altas (MELO *et al.*, 2021; RUBIOLO *et al.*, 2010). A espécie *C. citratus* (D.C.) Stapf (Poaceae), popularmente conhecida por capim limão, capim-cidreira e capim-santo (Figura 11), tem sua origem na Índia e suas folhas possuem células oleíferas onde são armazenadas as substâncias voláteis, que após a extração darão origem ao óleo essencial de capim limão (BORGES *et al.*, 2019).

O capim limão prefere regiões de clima tropical, principalmente com temperatura e umidade altas. Diversas utilidades são descritas para o capim limão e seu óleo essencial rico em citral (neral + geranial), entre eles como planta medicinal e para o controle de insetos-praga, (OLIVEIRA; SANTOS, 2021). O óleo essencial de capim limão é extraído da parte aérea, e apresenta várias funcionalidades para a indústria de cosméticos, aromática e medicinal, também apresentam propriedades anticancerígenas, antimicrobiana e antifúngica (AZEVEDO *et al.*, 2016). Os óleos essenciais de capim limão apresentam como composto majoritário o citral (Figura 12), onde o rendimento do óleo varia de 1,02 a 1,24% (AZEVEDO *et al.*, 2016; BORGES *et al.*, 2019; SABOIA *et al.*, 2022). Apresentam diversas atividades biológicas, como inseticidas (Tabela 1), fungicidas e bactericidas.



Figura 11. Capim limão (*C. citratus*). Fonte: acervo pessoal (2023).

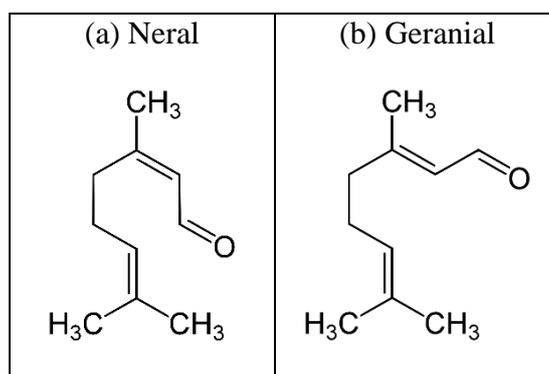


Figura 10. O óleo essencial de capim limão é constituído principalmente por citral, que é uma mistura dos isômeros neral (a) e geranial (b) (adaptado de Silva *et al.* 2022b)

Tabela 1. Dados da literatura mostrando o efeito de óleo essencial de *C. citratus* sozinho ou misturado sobre diferentes insetos.

Efeito do óleo essencial	Inseto	Fonte
Repelência	<i>Sitophilus granarius</i> (gorgulho do celeiro)	(PLATA-RUEDA <i>et al.</i> , 2020)
Repelência	<i>Culiseta incidens</i> (mosquito)	(PEACH <i>et al.</i> , 2019)
Repelência	<i>Rhipicephalus microplus</i> (carrapato bovino)	(HOGENBOM <i>et al.</i> , 2021)
Repelência	<i>Podisus nigrispinus</i> (percevejo soldado)	(BRÜGGER <i>et al.</i> , 2019)
Inseticida	<i>Sitophilus zeamais</i> (gorgulho do milho)	(RADÜNZ <i>et al.</i> , 2024; SILVA; FARIAS, 2020).
Inseticida	<i>Agrotis ipsilon</i> (lagarta rosca)	MOUSTAFA <i>et al.</i> , (2021)
Inseticida	<i>T. castaneum</i> (besouro castanho)	(AHMAD <i>et al.</i> , 2019)
Inseticida	<i>Spodoptera frugiperda</i> (lagarta do cartucho)	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2018a)

3.7.1 Mecanismo de ação inseticida

A maioria dos compostos presentes no óleo essencial de capim limão são nocivos para os insetos devido a sua propriedade de penetração no organismo desses animais, por meio do contato direto no tecido, ou pela respiração (Figura 13) (PLATA-RUEDA *et al.*, 2020a). Os monoterpenos, por exemplo, são inibidores competitivos da acetilcolinesterase (AChE) que é uma enzima importante para a neurotransmissão sináptica (DAS *et al.*, 2021).

De acordo com TAK; JOVEL; ISMAN (2017), essa toxicidade, quando se trata de alguns insetos, pode ser devido a penetração do óleo na camada cuticular ou por outro modo de

ação. O óleo essencial de capim limão também se mostrou eficaz no controle de outro coleóptera, o *Callosobruchus maculatus*, alterando seu conteúdo metabólico (ALVES *et al.*, 2019a).

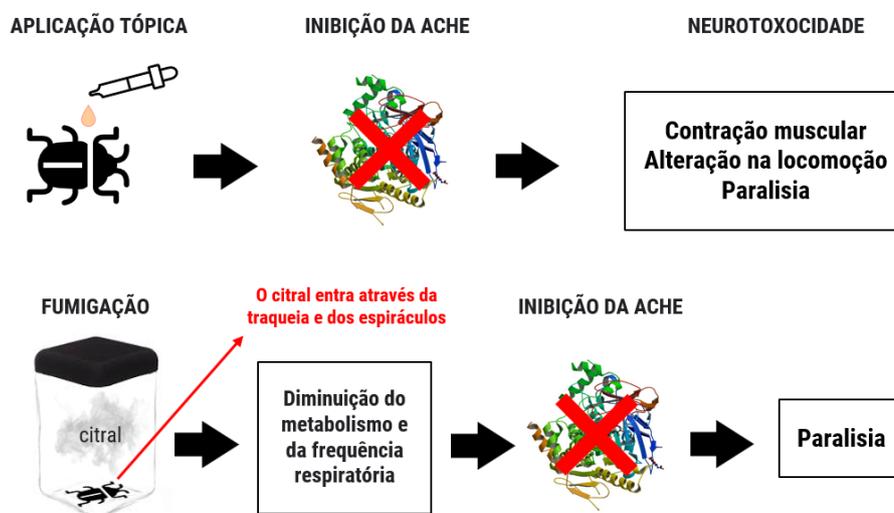


Figura 113. Ilustração mostrando o mecanismo de ação do composto majoritário (citral) do óleo essencial de capim limão, de acordo com (CAMARGO *et al.*, 2011; PLATA-RUEDA *et al.*, 2020b)

Por mais que o mecanismo de ação do citral, que é o componente majoritário do óleo de *C. citratus*, não seja totalmente elucidado, sabe-se que sua ação é a inibição da enzima acetilcolinesterase, AChE (KEANE; RYAN, 1999). Extratos etanólicos de folha de *C. citratus*, ocasionaram um efeito neurotóxico em *Drosophila melanogaster*, o que acarretou a mortalidade desses insetos e a inibição da atividade da enzima AChE (JOHNSON *et al.*, 2021). Entretanto, o metabolismo do citral e sua toxicidade pode ser encurtada pela rápida oxidação do citral em contrapartida da inibição lenta do citocromo P450s, ou até mesmo a participação de outras vias metabólicas (TAK; ISMAN, 2016). Estudos de ALVES *et al.*, (2019) relataram que a exposição por fumigação ao óleo capim limão, gerou diminuição na atividade de AChE de fêmeas e machos do *C. maculatus*.

Segundo VOLPATO *et al.*, (2018) o óleo essencial de capim limão apresentou baixa ação inseticida e larvicida sobre *A. diaperinus*. No entanto, estudos realizados por VELUSAMY (2020) não encontraram resultados satisfatórios com o uso do óleo essencial de eucalipto e de capim limão, concluindo-se que esses óleos não são eficazes para o controle do

inseto praga. O óleo essencial de capim limão com os óleos essenciais de *Melaleuca leucadendr* e *Mentha piperita* mataram todos os insetos *A. diaperinus* (SUBEKTI; CAHYANINGRUM, 2020).

Os óleos essenciais apresentam uma grande desvantagem devido a sua volatilidade, e isso interfere no tempo de proteção, tendo em vista que serão feitas repetidas aplicações (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2015).

3.8. Aspectos metabólicos dos insetos

De maneira geral, os insetos necessitam de demandas energéticas para o seu desenvolvimento incluindo a metamorfose, para o voo e para a reprodução. Não foram encontrados dados na literatura sobre o metabolismo do *A. diaperinus*, entretanto pode ser feito uma comparação do metabolismo desse inseto com outros, pois sua alimentação consiste em alto teor de proteínas.

De acordo com TEULIER *et al.*, (2016) insetos que voam utilizam do metabolismo dos lipídios para essa atividade, já os insetos hematófagos utilizam o metabolismo da prolina. A prolina e a alalina são os aminoácidos que fazem parte do ciclo bioquímico que fornecem poder redutor para serem utilizados nas vias metabólicas (MOLLAEI *et al.*, 2013). Na célula do músculo do voo a prolina entra através da membrana e sofre uma desidrogenação se transformando em glutamato, e esse processo gera poder redutor para ser utilizado na cadeia transportadora de elétrons, após essa desidrogenação, o glutamato sofre uma transaminação se tornando em α -cetoglutarato que é um dos precursores do ciclo do ácido cítrico, que tem a função de gerar poder redutor para o metabolismo (TEULIER *et al.*, 2016).

A trealose tem papel fundamental no organismo dos insetos, não só como fonte de energia, mas também como proteção a estresse oxidativo ou provindos de fatores abióticos, além de ser sintetizada no corpo gorduroso (HUANG *et al.*, 2021; YU *et al.*, 2021). De acordo com SHEN *et al.*, (2017), a hemolinfa contém cerca de 80 a 90% de trealose.

De maneira geral existem diversos metabólitos que regulam o organismo dos insetos, seja em situação de estresse ou em situações normais (Tabela 2).

Tabela 2. Dados da literatura mostrando as funções dos principais metabólitos no organismo dos insetos.

Metabólitos	Função	Fonte
Trealose	Fornecer energia e proteção contra estresses.	(HUANG <i>et al.</i> , 2021; SHEN <i>et al.</i> , 2017; YU <i>et al.</i> , 2021)
Prolina	Sua síntese gera poder redutor para as vias metabólicas.	(MOLLAEI <i>et al.</i> , 2013; TEULIER <i>et al.</i> , 2016)
Alanina	Sua síntese gera poder redutor para as vias metabólicas. Proteção contra estresse	(MOLLAEI <i>et al.</i> , 2013)
Ácido úrico/urato	Proteção contra estresse oxidativo, em alguns insetos sua excreção contribui para a regulação de ácido base na hemolinfa.	(WEIHRAUCH; O'DONNELL, 2021a)
Ureia	Resíduo nitrogenado para excreção.	(WEIHRAUCH; O'DONNELL, 2021a)
Tirosina	Escurecimento, endurecimento ou esclerotização do exoesqueleto.	(ARAKANE <i>et al.</i> , 2016)

3.9 Análise do perfil metabólico para estudo do metabolismo de inseto

A utilização de algumas análises, como por exemplo perfil vitamínico, perfil de aminoácidos e perfil de ácidos graxos são de suma importância para insetos que são voltados para a alimentação humana, para a identificação dos seus valores nutricionais (ATOWA *et al.*, 2021). Pesquisas sobre a composição e modificação dos metabólitos dos organismos podem ser feitas através do uso da análise do perfil metabólico (DING *et al.*, 2009). Nesse sentido, algumas técnicas podem ser empregadas, tais como a utilização da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, a cromatografia líquida acoplada ao massas e a ressonância magnética nuclear (RMN) (EMWAS *et al.*, 2019).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material e local

Os insetos foram cedidos pelo Laboratório de bioquímica e biologia molecular de artrópodes (LBBMA), que tem o Dr. Emerson Pontes como responsável. As colônias foram estabelecidas no Laboratório de plantas aromáticas e medicinais (LabPAM), que se localiza na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), sob a coordenação do professor Dr. Marco André Alves de Souza. A maravalha para a manutenção das colônias é obtida comercialmente em loja agropecuária. A ração de frango de corte é fornecida pelo Centro de Criação Avícola da UFRRJ (cedido pela Dr^a Cristina Amorim Ribeiro de Lima e Dr^o Túlio

Leite). O óleo essencial de capim limão foi obtido comercialmente (Via Aroma Indústria de Aromatizadores de Ambientes LTDA) e a composição fornecida pela empresa (anexo 1). O reagente para o experimento com insetos foi o Tween 80 da Vetec, para o controle positivo de inseticidas, foi utilizado o butox, adquirido também em loja agropecuária. Para os testes de perfil metabólico, os reagentes utilizados foram: o metanol; o ribitol; o clorofórmio; a piridina e o MSTFA, para os processos de homogeneização, extração e derivatização. Esses experimentos foram realizados no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas (LNMP). Os experimentos com atividade inseticida e fúngica foram realizados no LABPAM, e os testes de perfil metabólico foram realizados no LNMP no Instituto de Agronomia da UFRRJ.

4.2 Manutenção da colônia de *A. diaperinus*

A manutenção e criação de novas colônias de *A. diaperinus* foi realizada duas vezes por semana. Novas colônias foram iniciadas com 80 insetos adultos não sexados, e adicionados em caixas plásticas (31 x 21 x 10 cm de comprimento, largura e altura, respectivamente) contendo 50 g de ração para frango de corte, maravalha esterilizada, papelão úmido e frasco com água, por um período de quatro dias, visando a cópula para a obtenção de novos insetos. O papelão úmido e o frasco com água têm o objetivo de garantir a umidade da caixa. As tampas das caixas plásticas possuem uma abertura protegida com uma tela para as trocas gasosas e proteção contra outros insetos. As caixas (Figura 14 – d) contendo as colônias foram armazenadas/incubadas em uma câmara adaptada a partir de um armário equipado (Figura 14 – a) com um controlador de temperatura, aquecedor e umidificador (Figura 14 – b e c), que permitiu o controle de temperatura e umidade $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $63\% \pm 10\%$, respectivamente.



Figura 14. Armário modificado para uma câmara de crescimento visando a incubação das colônias de insetos em condições de temperatura e umidade controlados. (a) Armário modificado, (b) Umidificador e ventilador aquecedor que mantém a temperatura e a umidade ideal, (c) Controlador de temperatura e (d) Caixa onde os insetos ficam.

4.3 Experimento 1: Avaliação de aspectos biológicos e perfil metabólico de *A. diaperinus* nas condições do Laboratório de Plantas Aromáticas e Medicinais.

Amostras aleatórias de insetos retirados das caixas de reprodução da colônia de *A. diaperinus* foram transferidas para placa de petri, 10 insetos nas fases de larva de L1 a L6 (em triplicata), pupas sexadas e insetos adultos sexados. As placas foram digitalizadas (Scanner HP ScanJet G2410) utilizando uma escala como referência. As imagens foram processadas no software Image J 1.53K USA. Para padronizar as medidas foi utilizada a função "set scale" e preenchida de acordo com a escala. Após a padronização, medidas como comprimento, perímetro e área foram obtidas através das funções "straight", "wand (tracing) tool" e "measure". As medidas obtidas eram comparadas com os resultados de (SILVA *et al.*, 2005). Esses insetos também foram utilizados para as análises do perfil metabólico.

4.4 Experimento 2: Avaliação da toxicidade do óleo essencial de capim limão sobre *A. diaperinus* utilizando o método fumigação

Em resumo, o método por fumigação proposto consistiu em avaliar o efeito das substâncias voláteis do óleo essencial sobre o inseto, em um frasco fechado, previamente descrito por ARENA *et al.*, (2020) com algumas modificações. A volatilização se dá a partir de uma massa de óleo essencial conhecida e depositada em um papel de filtro colado na tampa do frasco, de volume conhecido e que entra em equilíbrio com a atmosfera no interior do frasco. Foi avaliado o efeito tóxico dos óleos essenciais por fumigação sobre os estágios larvais L3 e L6 e sobre a fase adulta, em ensaios independentes. A unidade experimental foi composta por 10 insetos não sexados, em um frasco (100 mL) forrado com papel filtro umedecido com água destilada e na tampa um disco de papel filtro contendo os tratamentos: 1) controle negativo, sem adição de óleo essencial ou solvente ao papel filtro; 2) controle positivo, com adição da droga de referência deltametrina na concentração final de 0,25 mg/cm³ e 3) diferentes massas do óleo essencial de capim limão, conferindo as concentrações de 0,1; 0,5; 1,0 e 5,0 mg/cm³ (Figura 15 – a) nos ensaios com os estágios larvais e 0,1, 0,5, 0,10, 0,50, 1,0 e 2,0 mg/cm³ de ar no ensaio com os insetos adultos. Após o preparo dos tratamentos, os recipientes foram imediatamente fechados e armazenados à temperatura 28°C ± 2°C e umidade de 63% ± 10%. A mortalidade foi contabilizada após 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas de exposição aos tratamentos. O critério de mortalidade utilizado foi a avaliação de paralisia total dos insetos, sob o toque durante 10 segundos. Cada tratamento foi composto por 5 unidades experimentais (Figura 15 – b). Os dados obtidos através da contagem da mortalidade acumulativa foram inseridos no software GraphPad Prism 9, para realizar os cálculos estatísticos e gerar seus respectivos gráficos.

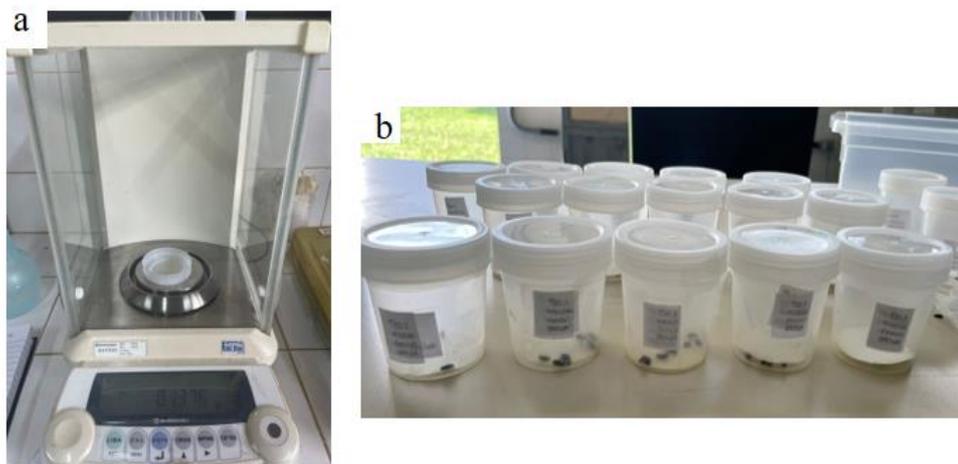


Figura 15. Experimento de fumigação com óleo essencial de capim limão. (a) Pesagem da concentração do tratamento com óleo essencial. (b) Unidades experimentais prontas e vedadas com Parafilm. Fonte: acervo pessoal (2023).

4.5 Experimento 3: Avaliação da toxicidade do óleo essencial de capim limão incorporado a ração ou pulverizado sobre a caixa de criação de *A. diaperinus*

— Preparo das soluções de trabalho.

Uma solução de trabalho contendo óleo essencial de capim limão a 10% (v/v) foi preparada da seguinte forma: 3 μL de Tween 80 foi adicionado em 3 mL de óleo essencial, em seguida, esta solução foi gotejada lentamente a um volume de água destilada em agitação constante, por dez minutos, ao final o volume da solução foi aferido para 30 mL com água destilada. Em seguida, a amostra foi homogeneizada por mais cinco minutos e armazenada. Para efeito de controle positivo uma solução foi preparada contendo deltametrina que é o princípio ativo utilizado comercialmente para controle do cascudinho. A solução foi preparada da seguinte forma: 10 μL de Tween 80 foram adicionados a 125 μL de Butox que é a solução comercial com 500 mg/mL de deltametrina. Em seguida, a mistura foi adicionada por gotejamento até 100 mL de água destilada, conferindo a concentração de 0,625 mg/mL (0,0625%, m/v) de deltametrina na solução. A mistura foi homogeneizada e armazenada. Para efeito do controle negativo foi preparado uma solução contendo 10 μL de Tween 80 misturado a água destilada até o volume final de 100 mL.

— Incorporação dos tratamentos na ração.

Foram utilizados dois métodos para aplicação do tratamento. O primeiro método, consistiu na incorporação da solução de trabalho contendo o óleo essencial em uma massa de

ração a qual foi adicionada a caixa de criação do inseto. Com esta finalidade, 10 mL da solução de trabalho foi incorporado a 90 g ração e homogeneizado com o auxílio de um mixer (Figura 16 – a) durante 2 minutos, conferindo a mistura a concentração de 1% (m/m) de óleo essencial de capim limão. Em seguida, a mistura foi dividida em três amostras de 30 g, para compor as repetições (três repetições para cada tratamento). Para o controle positivo e controle negativo, 10 mL de cada solução controle foram incorporados, em separado, a 90 g de ração seguindo o mesmo procedimento do tratamento com óleo essencial, que conferiu ao controle positivo a concentração de 0,069 % (m/m) de deltametrina na mistura com a ração e ao controle negativo, sem óleo essencial, apenas um ponto de observação para descontar um possível efeito do tween.

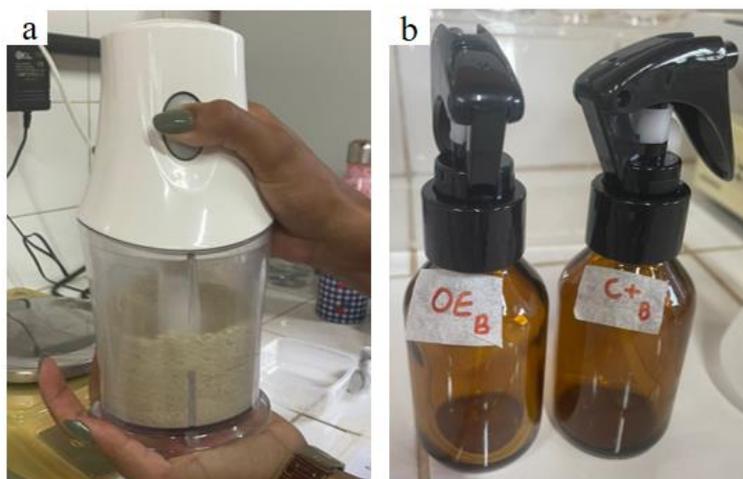


Figura 16. Experimento de incorporação e pulverização com óleo essencial de capim limão. (a) Incorporação da solução com óleo essencial ou Butox na ração. (b) Frasco âmbar para fazer a pulverização das soluções. Fonte: acervo pessoal (2023).

— Pulverização dos tratamentos sobre os substratos na caixa de criação.

O método de pulverização foi previamente descrito por SOUZA; FAVERO; CONTE, (2010) com modificações, a pulverização do óleo essencial foi feita a partir da amostra de trabalho diluída, sobre a caixa de criação dos insetos. Com esta finalidade, a solução de trabalho foi diluída em dez vezes e a amostra resultante em um volume de 10 mL foi aplicado a caixa de criação dos insetos, após 15 e 30 dias a mesma pulverização foi feita. Para a pulverização do controle positivo e controle negativo, foram utilizados 10 mL da solução de controle positivo e colocados em frasco âmbar e em seguidas pulverizados em cada caixa (21,5 x 14,5 x 7,5 cm), totalizando três repetições de cada tratamento, sendo repetidos ao mesmo tempo a pulverização (Figura 16 – b) do tratamento com óleo essencial, e ao controle negativo, sem

óleo e sem deltametrina. Todas as caixas (Figura 17) com seus tratamentos foram colocadas em um armário de ferro com ventilador aquecedor e umidificador. Esse experimento foi acompanhado durante 3 meses e foram avaliados os tamanhos e pesos dos insetos ao longo do seu ciclo de desenvolvimento.



Figura 17. Experimento de pulverização e incorporação. Fonte: acervo pessoal (2023).

— Procedimento para análise de variáveis

Foram colocados em placa de petri 10 insetos nos estágios de larvas L3, larvas L6, pupas sexadas e adultos sexados (Figura 18), essas placas foram digitalizadas (Scanner HP ScanJet G2410) utilizando uma escala de 10 cm e as imagens foram processadas no software Image J 1.53K USA.



Figura 18. Insetos adultos digitalizados pelo Scanner. Fonte: acervo pessoal (2023).

4.6 Experimento 4: Avaliação do perfil metabólico de *A. diaperinus* expostos ao óleo essencial de capim limão por fumigação em concentração de subletalidade

Um primeiro ensaio foi realizado para avaliar o efeito tóxico dos óleos essenciais por fumigação sobre o estágio larval (L3 e L6) e adultos, independentemente. A unidade experimental foi composta por 10 insetos não sexados em um frasco (100 mL) forrado com papel filtro umedecido com água destilada e na tampa um disco de papel filtro contendo os tratamentos, foram realizadas 5 repetições para cada tratamento: 1) controle negativo, sem adição de óleo essencial ao papel filtro; 2) massas do óleo essencial de capim limão na concentração igual a $CL_{50\%}$, ou seja, nas concentrações de 1,24, 1,75 e 0,23 mg/cm³ de ar, respectivamente, para os estágios larvais L3 e L6 e o de adulto. Após o preparo dos tratamentos, os recipientes foram imediatamente fechados e armazenados à temperatura $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade de $63\% \pm 10\%$. Insetos mortos foram descartados, considerando a paralisia total ao toque durante 10 segundos. Em seguida, os insetos que sobreviveram foram coletados e pesados (em média 100 mg de insetos) para análise do perfil metabólico.

Um segundo ensaio foi realizado, porém, apenas com insetos de cascudinho adulto expostos ao óleo essencial de capim limão nos tempos de 3, 6, 12, 24 e 48h na concentração de 0,23 mg/cm³ (igual a $CL_{50\%}$). A unidade experimental foi composta por 10 insetos não sexados em um frasco (100 mL) forrado com papel filtro umedecido com água destilada e na tampa um disco de papel filtro contendo o tratamento. O controle negativo consistiu em unidades experimentais sem adição de óleo essencial ao papel filtro. Em cada tempo determinado foi realizada a abertura da unidade experimental, os insetos mortos foram descartados, considerando a paralisia total ao toque durante 10 segundos e os insetos que sobreviveram foram coletados e pesados (em média 100 mg de insetos) para análise do perfil metabólico (foi feita uma repetição para cada hora do experimento). Uma amostra composta por insetos foi separada antes de iniciado o experimento, como controle do tempo zero, e incluída na análise do perfil metabólico.

4.7 Análise de perfil metabólico por CG-EM

— Extração.

O protocolo para a análise do perfil metabólico adotado neste trabalho foi modificado a partir do trabalho de (LISEC *et al.*, 2006). Uma amostra de insetos com massa conhecida, entre 100 e 200 mg, foram homogeneizados em 4 mL de metanol + 180 μL da solução de ribitol 0,8 mg/mL em um Ultra Turrax Tube Drive (UTTD) (Figura 19 – a) por 10 min. Em seguida,

foram transferidos 1400 μL da amostra para um tubo de 2 mL, e o processo de extração iniciado em um Thermomixer programado para 70°C, 950 rpm por 15 min. Depois, a amostra foi submetida a centrifugação a 11000 rcf por 10 min. O sobrenadante foi transferido para tubos de 4 mL e adicionados a + 750 μL de clorofórmio + 1250 μL de água destilada, nesta ordem, seguido de agitação por 30 s e centrifugação a 11000 rcf por 5 min (Figura 19 – b). Em seguida, 1000 μL do sobrenadante (fração polar) foram transferidos para um novo tubo de 2 mL e, em um concentrador a vácuo (Speed Vac, modelo: Concentrator plus), a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C), a amostra foi reduzida a um fino pellet seco livre de água por um tempo que variou entre 3 e 4 horas. Por fim, os tubos foram fechados, protegidos de umidade e armazenados no freezer -80°C.

— Derivatização.

As amostras retiradas do freezer -80°C foram submetidas ao concentrador a vácuo durante 30 min antes do protocolo para a derivatização. Em uma capela de exaustão, foi adicionado ao tubo 40 μL de solução de metoxiamina em pridina (10 mg/mL), em seguida os tubos foram fechados e transferidos para o Thermomixer programado para 37°C, 950 rpm por 2 horas. Depois, adicionou-se a amostra + 70 μL de MSTFA e o Thermomixer programado para 37°C, 950 rpm por mais 30 min. Por fim, 100 μL das amostras foram transferidas para inserts de 150 μL em vials apropriados para a análise por CG-EM (Figura 19 – c).

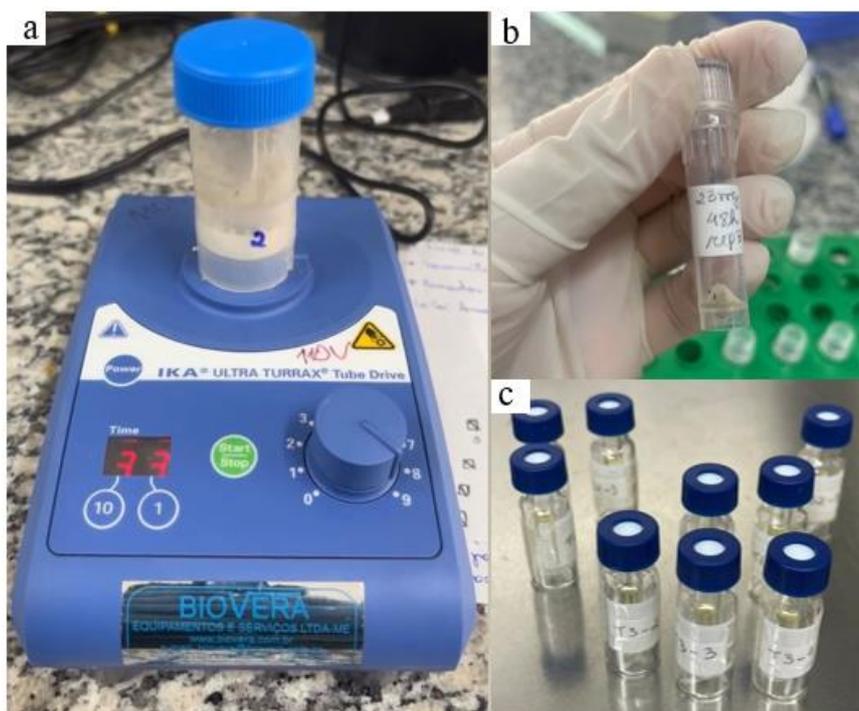


Figura 19. Experimento do perfil metabólico dos insetos. Em (a) o aparelho que faz a homogeneização das amostras, em (b) pellet formado após a centrifugação das amostras e em (c) amostras derivatizadas que vão para as análises por CG-EM. Fonte: acervo pessoal (2023).

— Análise CG-EM.

Foi utilizado um cromatógrafo gasoso 5890 Series II (Hewlett-Packard, USA) acoplado ao espectrômetro de massa QP-2010 Plus (Shimadzu, JPN) com um injetor no modo “split” para separar as substâncias que fazem parte do perfil metabólico dos extratos brutos. As temperaturas do injetor e da interface foram de 220 e 310 °C, respectivamente. O espectro de massa foi obtido em um detector que operou com intervalo de massa entre 40 e 600 m/z. A coluna utilizada foi similar a HP5 e o gás utilizado foi o nitrogênio.

A identificação dos constituintes das substâncias foi realizada com base na comparação dos espectros de massa das substâncias de interesse com aquelas dos bancos de dados do equipamento (NIST, 2008) e da literatura (HALKET *et al.*, 2010).

— Análise estatística

Os dados apresentados foram organizados e submetidos à análise de variância (one-way ANOVA) em delineamento inteiramente casualizado (DIC). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$) com $p<0,0001$. Os dados do ciclo reprodutivo dos insetos foram submetidos a análise de regressão linear simples e para os dados dos testes

de mortalidade foram feitas as análises de regressão não linear (modelo sigmoide assimétrico) para cálculo da concentração letal para 50% da população ($CL_{50\%}$). Nos gráficos apresentados as médias representam os símbolos, as barras, o desvio padrão e as letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos. As análises estatísticas e os gráficos foram construídos com auxílio do programa GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O inseto praga *A. diaperinus* foi incluído como uma nova proposta de modelo biológico, para ser utilizado em ensaios que visem avaliar o potencial de extratos vegetais, óleos essenciais e outros produtos naturais como defensivo botânico. Por isso, foi necessário estudar previamente as condições de criação e manutenção da colônia, que seria utilizada nos testes biológicos. Neste sentido, consideramos importante avaliar aspectos da biologia, fisiologia e aspectos bioquímicos.

5.1. Experimento 1: Avaliação de aspectos biológicos e perfil metabólico de *A. diaperinus* nas condições do Laboratório de Plantas Aromáticas e Medicinais.

— Estudo de alguns aspectos do ciclo reprodutivo

Na tabela 3 pode ser observado etapas do ciclo biológico do cascudinho, com suas fases reprodutivas, nas condições experimentais propostas e aplicadas no Laboratório de Plantas Aromáticas e Medicinais (LabPAM), que foram: temperatura média de 29°C; e umidade relativa média de 63%. O ciclo total durou 54 dias e foram divididos em pré oviposição ou período de cópula, ovos, larvas, pupa e adultos.

Tabela 3. Ciclo biológico do cascudinho (*A. diaperinus*).

Fases Reprodutivas	Período de cada fase (dias)
Pré-oviposição	4
Ovos	4
Larvas	36
Pupa	4 a 5
Adultos	5
Total	54

Também foram feitas análises morfométricas em todo ciclo de desenvolvimento do inseto. O comprimento de larva apresentou o coeficiente de determinação com $R^2 = 0,9985$. Portanto, essa foi a variável que melhor descreveu o crescimento da larva em função dos seus estágios larvais. O período larval teve duração de 36 dias no total, porém foram divididos em 6 estágios larvais, de L1 até L6. Os comprimentos das larvas variaram de 0,1 a 1 cm, dependendo do seu estágio larval (Figura 20).

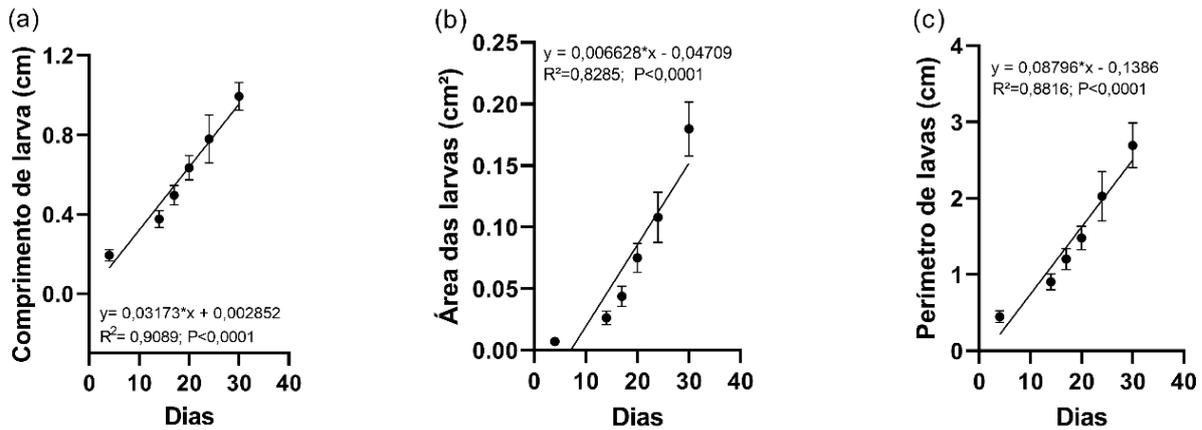


Figura 20 Análise de regressão linear com base no comprimento (a), área (b) e perímetro (c) de larvas de *A. diaperinus* em função do número de dias de desenvolvimento. Barras representam o desvio padrão em torno da média aritmética ($n=20$).

Após o período larval, foram realizadas medidas de comprimento, perímetro e área de pupas e adultos fêmeas e machos. As médias de pupa foram de 0,620 e 0,678 cm, 1,557 e 1,718 cm, 0,112 e 0,132 cm², respectivamente, para comprimento, perímetro e área de machos e fêmeas. A análise estatística demonstrou que não há diferença significativa para nenhuma das variáveis observadas no estágio de pupa entre os sexos (Figura 21).

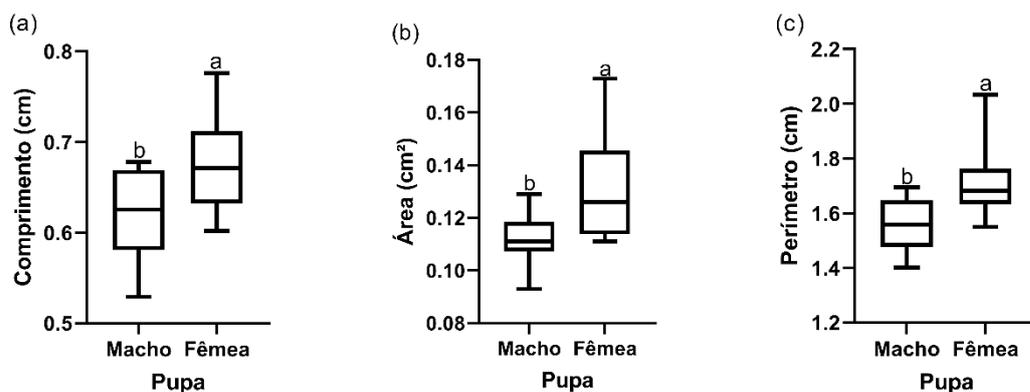


Figura 21. Descrição dos dados por box-plot com base no comprimento (a), perímetro (b) e área (c) de pupas de insetos machos e fêmeas de *A. diaperinus*. (Tukey; $\alpha = 0,05$, $p < 0,0001$).

A média de comprimento, perímetro e área dos insetos machos e fêmeas adultos foram de 0,608 e 0,646 cm, 1,742 e 1,751 cm, 0,148 e 0,156 cm², respectivamente. Entretanto, ao contrário das pupas, a análise estatística comprovou que machos e fêmeas adultos não diferiram em todas as variáveis analisadas (Figura 22).

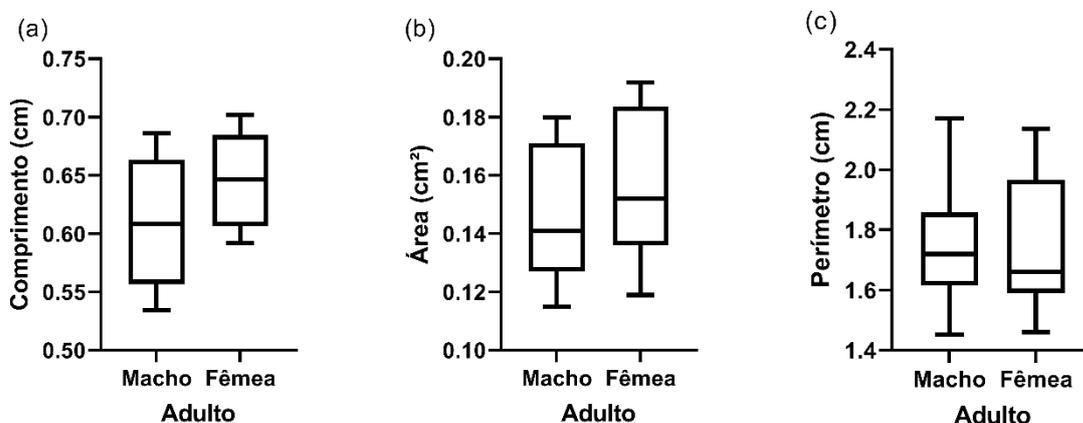


Figura 22. Descrição dos dados por box-plot com base no comprimento (a), área (b) e perímetro (c) de insetos adultos machos e fêmeas de *A. diaperinus*. Letras diferentes indicam que o resultado é significativamente diferente, com base no teste de médias (Tukey; $\alpha = 0,05$, $n=10$).

Outra variável analisada, diz respeito a massa dos insetos em cada um dos estágios biológicos observados. Os valores médios de massa foram de 0,4; 6,3; 17,3; 40,2; 78,9; 133,0; 123,8 e 134,4 mg, respectivamente, para L1, L2, L3, L4, L5, L6, pupa e adultos. Foi possível observar ganho de massa de L1 até L6. Todavia os estágios L1 a L3 não apresentaram

diferenças significativas de massa e entre L6, pupa e adultos, também não foi observado diferença, ou seja, não houve ganho de massa (Figura 23).

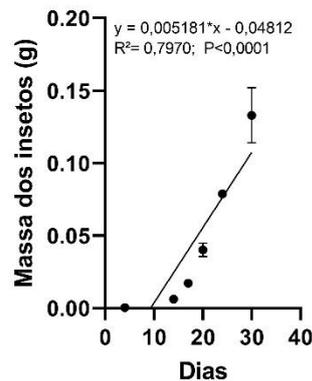


Figura 23. Massa (g) dos insetos *A. diaperinus* em diferentes estágios do ciclo biológico (Tukey; $\alpha = 0,05$). Barras representam o desvio padrão em torno da média aritmética (n=20)

O uso da análise de imagem pode auxiliar no controle de pragas, devido ao seu custo-benefício, com o objetivo de trazer prevenção e soluções para serem utilizadas nas indústrias agrícolas. Essa técnica é chamada de controle especializado, e seu uso tem se tornado grande prioridade mundial (WANG *et al.*, 2021). De acordo com SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI (2012) o software ImageJ é o precursor do estudo científico de imagens, em que a computação científica é de grande valia para a área biológica. O programa em questão foi desenvolvido por Wayne Rasband, no National Institute of Health (NIH), nos Estados Unidos. Essa ferramenta também pode ser empregada para avaliar a eficiência dos pesticidas organofosforados (NOUANTHAVONG *et al.*, 2016).

De acordo com BROOKS *et al.* (2016), o melhoramento de um plug-in do aplicativo ImageJ feito pelos autores, facilitou a compreensão do movimento larval de *Drosophila melanogaster*. Uma outra abordagem é a aplicação para medir os insetos de uma forma não invasiva, com o objetivo de saber a idade dos animais e o seu tamanho, não necessitando de tanto manuseio, o que é uma vantagem, pois fideliza os dados obtidos (BOURNE *et al.*, 2019). GENTILE; BONELLI; RIVA (2021) utilizaram o aplicativo ImageJ para analisar eletronicamente as características das populações diferentes dos insetos, onde através do programa puderam ver a envergadura do inseto, a fim de descobrir se havia alguma variação intraespecífica entre a população.

SALLET (2013) e SILVA *et al.*, (2005) encontraram resultados semelhantes às do presente estudo, cujo ciclo biológico completo durou 55 dias. As pupas fêmeas apresentaram

comprimento maior do que as pupas machos e os adultos apresentaram comprimento variando de 0,55 a 0,7 cm (ARTHUR, 2018).

SAMMARCO; HINKLE; CROSSLEY (2023) encontraram dimensões parecidas com as do presente trabalho, os adultos apresentaram entre 0,58 e 0,63 cm de comprimento e as pupas de 0,6 a 0,8 cm de comprimento. Os mesmos autores relataram comprimento das larvas de 1,1 cm, muito próximos dos encontrados no presente trabalho, porém, com o número de instares diferentes, pois variaram de 8 a 11 estágios larvais.

— **Análise do perfil metabólico das fases larvais (L3 e L6), pupa e adultos.**

Sabe-se que o corpo gorduroso dos insetos é a parte mais importante desse animal, e está associado a diversas atividades metabólicas, principalmente a lipídica, essencial para atender as necessidades de fome, reprodução e crescimento desses organismos (TOPRAK; MUSSELMAN, 2021 ;ARRESE; SOULAGES, 2010).

Como não existe relato na literatura descrevendo o perfil metabólico do cascudinho, em especial de substâncias como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, foi proposto a análise do perfil metabólico utilizando a cromatografia em fase gasosa acoplado a espectrometria de massa (CG-EM) como técnica investigativa abrangente. Isso permitiu conhecer, nas condições experimentais aplicadas, os parâmetros metabólicos inclusive para acompanhar as mudanças sob efeito de diferentes variáveis e destacar possíveis alvos metabólicos.

A análise permitiu a detecção de muitos picos, de possíveis substâncias do metabolismo do inseto, entretanto foi possível identificar parte relevante desses picos, dos quais foram selecionadas 35 de interesse ao estudo (anexo 2). Foi possível identificar 16 aminoácidos proteicos mais a β -alanina e a oxoprolina, quatro intermediários do ciclo do ácido cítrico mais o ácido glucônico, açúcares como a glicose e a trealose, os poliálcoois glicerol e glicerol-3-fosfato, compostos nitrogenados como ureia e ácido úrico, entre outros (Figura 24).

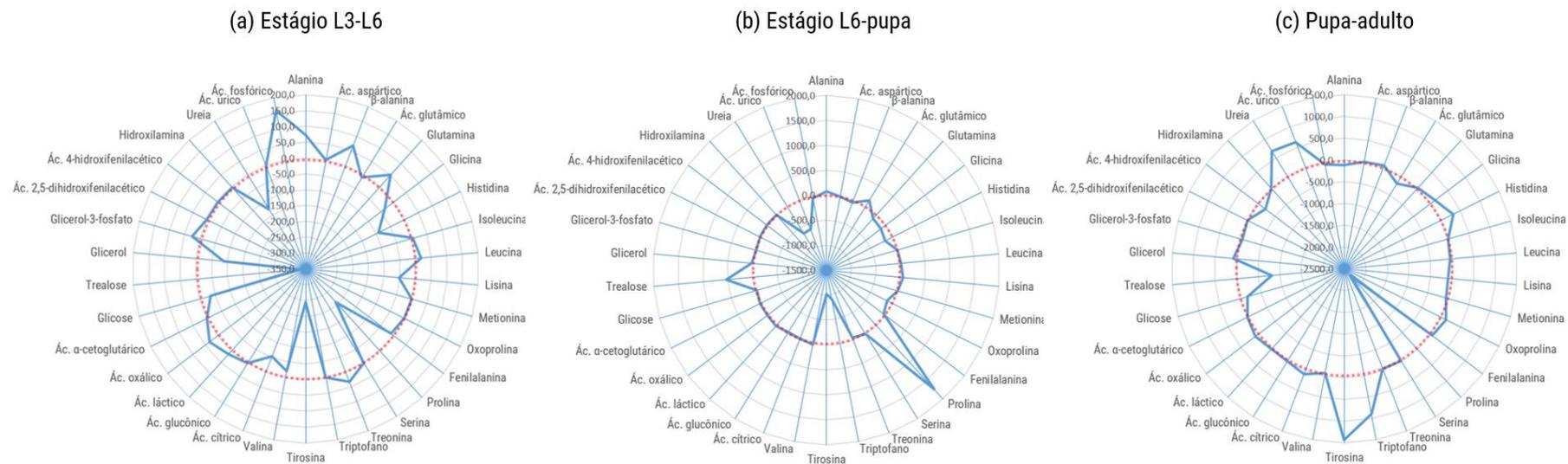


Figura 24. Variação na concentração de metabólitos a partir da fração polar do extrato bruto de *A. diaperinus*. Linha vermelha pontilhada representa variação de concentração igual a zero entre os estágios do ciclo biológico. A diferença de concentração entre os estágios larvais L3-L6 (a), L6-pupa (b) e pupa-adulto (c), se positivo indica maior concentração em L3, L6 e Pupa e se negativo indica maior concentração em L6, pupa e adulto, respectivamente em (a), (b) e (c).

Importante frisar que a fração polar das amostras de pupa, insetos adultos e os estágios larvais (L3 e L6), possuem o perfil químico distinto. A análise de agrupamentos hierárquicos comprovou a formação de três grupos semelhantes, sendo que os estágios larvais L3 e L6 formaram um único grupo. A maior distância entre os grupos se deu entre pupa e os estágios larvais (figura 25 - a). A análise de componentes principais ratifica os resultados, considerando a dispersão de três grupos principalmente ao longo da componente 1, que explica 88% da variância observada (Figura 25 - b). As análises gráficas apresentadas, por heatmap e biplot-PCA, demonstraram que a pupa apresenta maiores teores de ureia, ácido úrico, tirosina e triptofano; adultos, maior concentração de trealose e prolina, que configuraram amostras distintas dos estágios larvais.

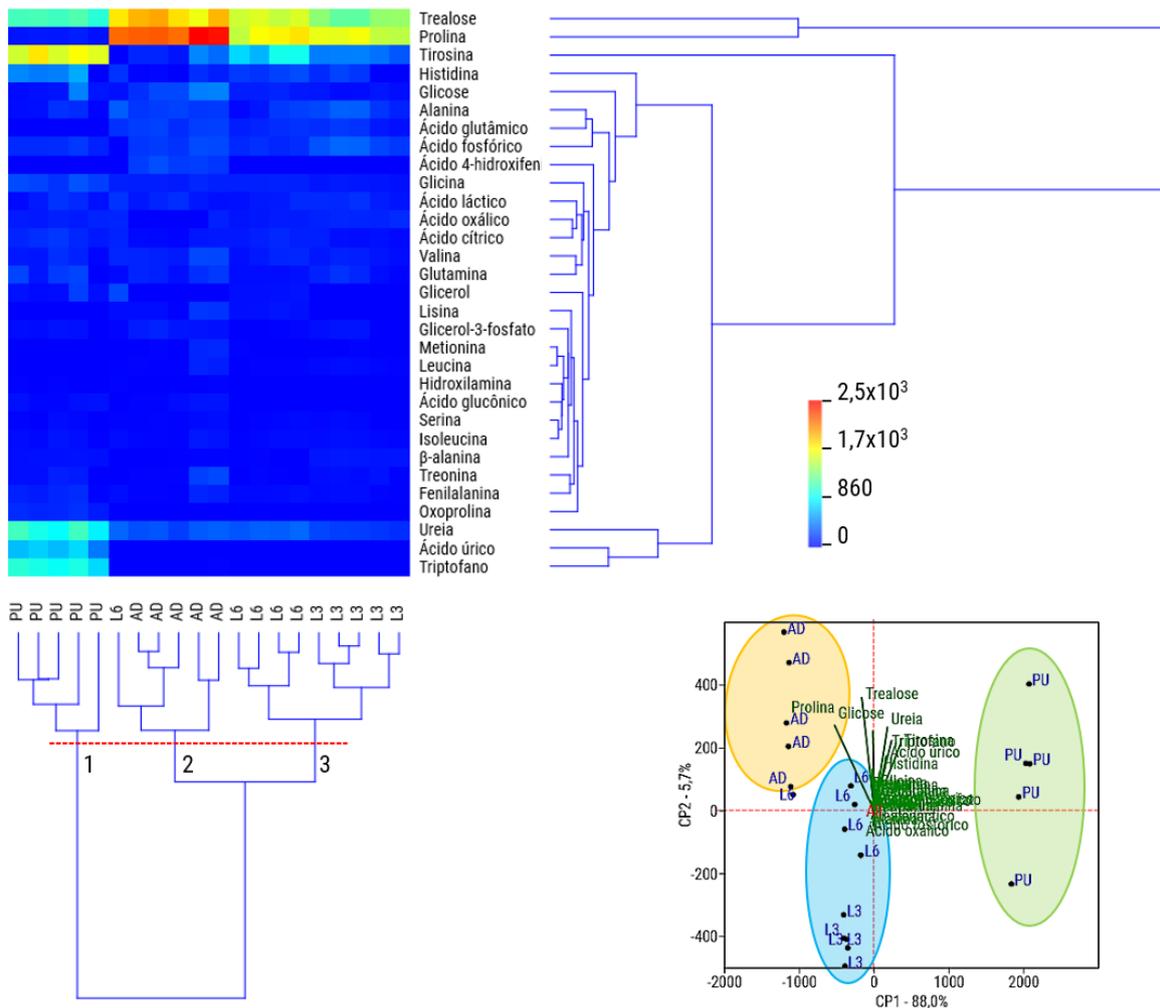


Figura 25. Análise multivariada com base na concentração de metabólitos a partir da fração polar do extrato bruto de amostras de *A. diaperinus*. Mapa de calor a partir da análise hierárquica (UPGMA e distância Euclidiana) das amostras nos estágios larvais (L3 e L6), pupa (PU) e adulto (AD) em função da correlação entre as substâncias presentes nas amostras (a). Gráfico-biplot representando a análise de componentes principais (PCA) letras azuis representam a dispersão das amostras (scores) e as letras verdes a contribuição das substâncias para a dispersão (loadings).

A diferença de concentração de cada metabolito entre os estágios do ciclo biológico, apontam para transformações bioquímicas importantes em cada etapa do desenvolvimento do inseto. Por exemplo, pode-se observar maior concentração de trealose no estágio L6 do que em L3, e maior concentração de prolina nas pupas do que em L6 e adulto. As concentrações de histidina e tirosina apresentam um comportamento crescente até o estágio pupal e depois

reduzem drasticamente na fase adulta. A concentração de ácido úrico e ureia aumentam na pupa e depois voltam a reduzir na forma adulta (Figura 26).

É necessário contextualizar o momento de cada estágio biológico. Durante as fases larvais o inseto se alimenta e a principal fonte disponível é o amido e as proteínas disponibilizados pela ração (basicamente milho). Este é um período de demanda energética principalmente para o crescimento do inseto, que ficou comprovado pelo ganho de massa e crescimento em comprimento. Por outro lado, na fase de pupa o inseto está sofrendo grandes transformações morfológicas que demandam recursos energéticos e estruturas de carbono orgânico e, neste momento, o inseto não se alimenta. Na fase adulta, o alimento está disponível, não há crescimento nem ganho de massa, entretanto há uma demanda grande e constante de energia para a reprodução.

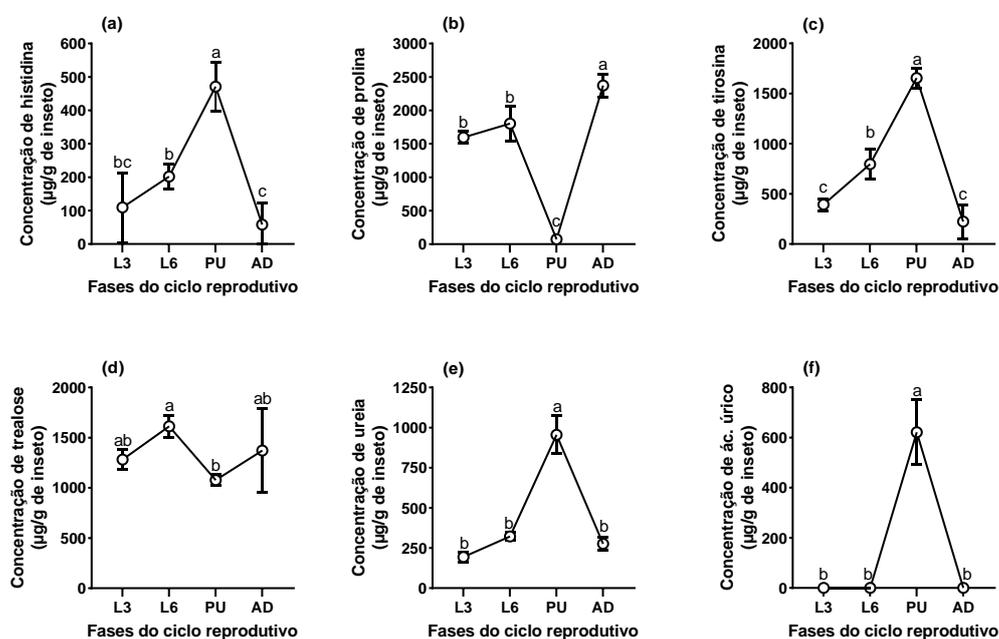


Figura 26. Concentração de metabolitos a partir da fração polar do extrato bruto de amostras de *A. diaperinus* nos estágios larvais (L3 e L6), pupa (PU) e adulto (AD). Barras representam o desvio padrão (n=5). Letras diferentes indicam que o resultado é significativo com base no teste de médias (Tukey; $\alpha = 0,05$).

. Os aminoácidos prolina e alanina são intermediários de um ciclo bioquímico que fornece energia e poder redutor no corpo gorduroso (MOLLAEI *et al.*, 2013), que justifica a

redução no estágio pupal quando não se alimentam. Assim como o aumento nos níveis de ácido úrico e ureia, produtos de excreção, são evidências da mobilização de aminoácidos.

Segundo BIANCHINI (2015), o aumento de ureia quando associado aos níveis inalterados de proteínas pode indicar o período de transformação quando ocorre a metamorfose de pupa à adulto. Também foi observado por WEIHRAUCH; O'DONNELL (2021) aumento de ácido úrico nas pupas nos insetos da ordem Lepidoptera que na fase adulta não são observados, semelhante ao observado com o cascudinho neste trabalho, onde o ácido úrico só está presente na pupa.

Os insetos de maneira geral possuem altos níveis de aminoácidos em sua composição (JUSTINO; CUNHA; LEITE JÚNIOR, 2022) e, neste estudo não foi diferente, a classe de metabólito mais abundante foi a de aminoácidos. De acordo (LI; JIANG; WANG, 2022) a histidina é importante no período de transição de pupa para adulto nas borboletas. Segundo (ARAKANE *et al.*, 2016) a tirosina é o principal precursor relacionado ao escurecimento, endurecimento ou esclerotização do exoesqueleto de insetos, inclusive, é uma evidência para os níveis baixos de tirosina encontrados nesse estudo na fase adulta, indicando que está sendo metabolizada no processo de esclerotização.

A trealose tem um papel importante no desenvolvimento e crescimento dos insetos, sobretudo nas atividades fisiológicas deles (QIN *et al.*, 2021). A principal via biossintética da trealose nos insetos é a TPS/TPP (trealose- 6-fosfato sintase/trealose-6-fosfato fosfatase), mas existem 6 tipos de vias biossintéticas (TANG *et al.*, 2010). Está presente na hemolinfa dos insetos em todos os estágios de desenvolvimento (ZHAO *et al.*, 2016). Pode-se observar que os níveis de trealose em todos os estágios do ciclo reprodutivo do cascudinho quase não se alteraram.

5.2 Experimento 2: Avaliação da toxicidade do óleo essencial de capim limão sobre *A. diaperinus* utilizando o método fumigação

Para avaliar o efeito das substâncias voláteis do óleo essencial de capim limão sobre o cascudinho, foi proposto um modelo de experimento no qual as larvas nos estágios L3 e L6 e os adultos fossem expostos aos voláteis por diferentes tempos. Assim, foi possível avaliar a mortalidade e calcular a CL_{50%} em função da concentração e do tempo de exposição aos voláteis.

Os estágios larvais L3 e L6 foram pouco impactados pelos tratamentos com óleos essenciais, pois, na maior concentração testada (5 mg/cm³ de ar) foram observados valores médios de 57 e 70% de mortalidade após 72 horas de exposição, respectivamente (Figura 27 -

a e b). Enquanto para os insetos adultos a mortalidade foi de 100% na concentração maior (Figura 27 - c). A concentração letal para 50% da população ($CL_{50\%}$) de L3, L6 e adultos expostas por 72 horas ao óleo essencial de capim limão foi de 1,25; 1,75 e 0,23 mg/cm^3 de ar, respectivamente. Portanto, ficou demonstrado que o efeito foi muito mais tóxico sobre os insetos adultos.

Com o objetivo de se estabelecer um parâmetro de comparação, foi avaliado a mortalidade do inseticida comercial deltametrina (controle +) na concentração de 0,25 mg/cm^3 . Os resultados apontaram mortalidade de 58, 43 e 82% nos estágios L3, L6 e adultos, respectivamente. O inseticida comercial se mostrou mais eficiente para controlar o cascudinho, entretanto é importante destacar que os efeitos não foram muito diferentes da forma adulta do inseto, quando tratados com o óleo essencial de capim limão.

Quanto ao efeito do tempo de exposição sobre a mortalidade das larvas e adultos (Figura 28 a-c), foram selecionadas as doses de 1,0 e 5,0 mg/cm^3 de ar e 0,5; 1,0 e 2,0 mg/cm^3 de ar, respectivamente, para apresentar os resultados. Foi possível constatar uma correlação linear positiva entre o tempo de exposição e a mortalidade, sendo que quanto maior a concentração o efeito tóxico observado foi mais acentuado. O tempo necessário para atingir 50% de mortalidade nos adultos foi de 12, 24 e 48 horas nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/cm^3 de ar, respectivamente.

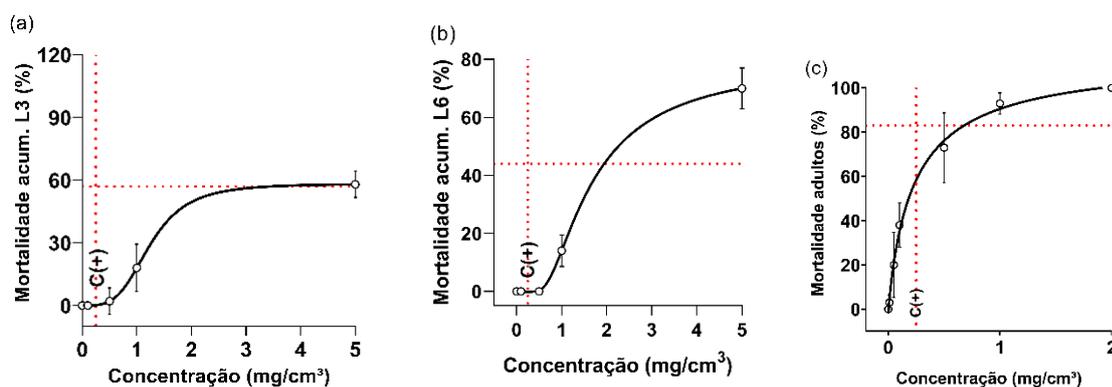


Figura 27. Mortalidade dos insetos no estágio larval L3, L6 e adultos em diferentes doses do óleo essencial de capim limão. Porcentagem da mortalidade em função das concentrações de L3 (a); porcentagem da mortalidade em função das concentrações de L6 (b); porcentagem da mortalidade em função das concentrações de adulto (c) análise estatística elaborada no programa GraphPad Prism 9, tukey; $\alpha = 0,05$ e $p < 0,0001$.

Tabela 4. Parâmetros das equações das curvas de ajuste e CL_{50%} calculadas do óleo essencial de capim limão sob diferentes fases reprodutivas do *A. diaperinus*.

Fases reprodutivas	Equação	CL _{50%} (mg/cm ³)	R ²	P valor
L3	$Y = -0,002902 + (58,37 - (-0,002902)) / (1 + (X)^{3,650})$	1,248	0,9294	<0,0001
L6	$Y = -0,1211 + ((79,63 - (-0,1211)) / (1 + (2^{1/(1,574e+014)} X)^{1,616}))^{1,574e+014}$	1,754	0,9829	<0,0001
Adultos	$Y = -1,283 + (114,7 - (-1,283)) / (1 + (0,2343/X)^{0,9198})$	0,2343	0,9061	<0,0001

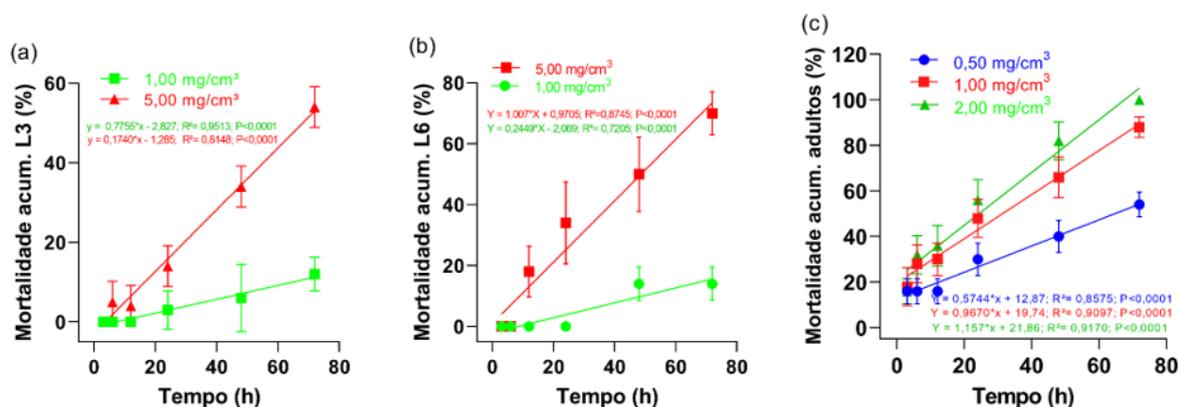


Figura 28. Mortalidade dos insetos em diferentes tempos de exposição ao óleo essencial de capim limão. Porcentagem da mortalidade dos insetos no estágio larval L3 em função do tempo do experimento nas maiores doses testadas (a); porcentagem da mortalidade dos insetos no estágio larval L6 em função do tempo do experimento nas maiores doses testadas (b); porcentagem da mortalidade dos insetos adultos em função do tempo do experimento nas maiores doses testadas (c) (Tukey; $\alpha = 0,05$ e $p < 0,0001$). Barras representam o desvio padrão em torno da média aritmética de cada tratamento.

Muitos trabalhos avaliaram o efeito do óleo essencial de capim limão contra insetos pragas. O método, a concentração e o tempo de exposição são fatores que variam, por isso, os resultados são muito diferentes. Além disso, as colônias de uma mesma espécie de insetos são diferentes, assim como, os óleos essenciais de uma mesma espécie divergem quimicamente por vários fatores. Mesmo assim, abaixo serão apresentados resultados de alguns autores que divergem ou se assemelham do presente trabalho.

VELUSAMY (2020b) avaliou o efeito do óleo essencial de capim limão contra larvas do *A. diaperinus* após 48 h de exposição e relatou baixa mortalidade, quanto aos insetos adultos o autor não observou mortalidade. VOLPATO *et al.*, (2018) não encontraram efeitos larvicida e inseticida de diferentes óleos essenciais testados, demonstrando a resistência do cascudinho

aos óleos essenciais de Capim limão (*C. citratus*), Cedro (*Cedrus atlantica*), Gengibre (*Zingiber officinale*), Gerânio (*Pelargonium graveolens*), Junípero (*Juniperus communis*), Palmarosa (*Cymbopogon martinii*), Tomilho (*Thymus vulgaris*) e Vetiver (*Vetiveria zizanioides*).

SUBEKTI; CAHYANINGRUM, (2020) obtiveram 100% de mortalidade após 96h de exposição do inseto ao óleo essencial de capim limão a uma concentração de 50%, neste caso por contato. WANG *et al.*, (2014) utilizando o mesmo de fumigação, testaram outros (*Citrus limonum* (Sapindales: Rutaceae), *Litsea cubeba* (Laurales: Lauraceae), *Cinnamomum cassia* e *Allium sativum* L. (Asparagales: Alliaceae)) óleos contra inseto adulto do cascudinho, na concentração máxima de 32 µL/L com exposição de 96 h e não obtiveram 100% da mortalidade. ARENA *et al.*, (2020) avaliaram o efeito inseticida por fumigação e verificaram que os óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* e *Origanum vulgare* provocaram baixa letalidade (CL₅₀ de 300 µL/L de ar) e *Aloysia polystachya* maior letalidade (CL₅₀ de 27,25 µL/L de ar).

Vários trabalhos apontaram o óleo essencial de capim limão com atividade inseticida, por exemplo, frente a *Trichoplusia ni* (TAK; JOVEL; ISMAN, 2016), *C. maculatus* (ALVES *et al.*, 2019a; GUERRA *et al.*, 2019), *S. zeamais*, (ROSA DA SILVA; MENEGAZ DE FARIAS, 2020; RADÜNZ *et al.*, 2024), *S. frugiperda* (OLIVEIRA *et al.*, 2018a), *Anticarsia gemmatalis* (VICENÇO; SILVESTRE; PAULETTI; 2023), *T. castaneum* (CABALLERO-GALLARDO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2012), *Musca domestica* L. (RANI; PONNUDURAI; HARIKRISHNAN, 2019), *Tuta absoluta* (NGONGANG *et al.*, 2022) e *Ulomoides dermestoides* (PLATA-RUEDA *et al.*, 2020b).

Esses resultados justificam os relatos de DEVI *et al.*, (2020) que destacaram o potencial para a utilização do óleo essencial de capim limão por fumigação como uma alternativa para o controle do *T. castaneum*, praga de grãos armazenados. Entretanto esta máxima não deve ser extrapolada para outros insetos, pois os dados observados no presente trabalho, assim como os resultados apresentados anteriormente por outros autores, demonstraram que o cascudinho, principalmente na forma larval é bastante resistente ao uso de óleos essenciais como defensivo.

5.3 Experimento 3: Avaliação da toxicidade do óleo essencial de capim limão incorporado a ração ou pulverizado sobre a caixa de criação de *A. diaperinus*

Considerando que nos experimentos anteriores foi observado algum efeito tóxico aos insetos que inclusive levaram a mortalidade, principalmente na forma adulta, foi proposto este ensaio visando aproximar o tratamento com a realidade das granjas. Primeiramente pensamos

em incorporar os óleos essenciais (10% v/v) à ração. Depois, em pulverizar o óleo essencial (10% v/v) sobre os substratos da caixa, que seria o equivalente a cama de aviário.

Entretanto, nenhuma das duas formas mostrou resultado. Após observar a caixa dos insetos (unidade experimental) durante 60 dias, nas duas condições (incorporação à ração ou pulverização sobre a caixa), não foi observada a alteração na morfologia dos insetos, massa, mortalidade ou ciclo reprodutivo, após os tratamentos com óleo essencial e o inseticida comercial também. Logo, não foi observada atividade biológica do óleo essencial de capim limão na incorporação do alimento e nem na pulverização da colônia.

Os motivos para este resultado provavelmente apontam para a volatilidade dos princípios ativos do óleo essencial (baixo efeito residual com a caixa ventilada - aberta), resistência do inseto após a exposição aos princípios ativos (do óleo essencial e deltametrina), exposição a concentrações baixas do óleo essencial e deltametrina.

5.4. Experimento 4: Avaliação do perfil metabólico de *A. diaperinus* sob efeito do óleo essencial de capim limão por fumigação

— Perfil metabólico do cascudinho nos estágios L3, L6 e adulto sob efeito do óleo essencial de capim limão

A análise por CG-EM permitiu a detecção de vários picos, entretanto, entre os identificados, foram selecionados 34 de interesse ao estudo (anexo 3). Foi possível identificar 17 aminoácidos proteicos mais a β -alanina e a oxoprolina, cinco ácidos orgânicos, dentre eles quatro são intermediários do ciclo do ácido cítrico, açúcares como a glicose e trealose, os poliálcoois glicerol e glicerol-3-fosfato, compostos nitrogenados como ureia e ácido úrico, entre outros (Figura 30 a e b).

O estágio larval L3 quando exposto ao óleo essencial de capim limão apresentou maior concentração de prolina e glicerol e redução nas concentrações trealose (Figura 29 - a). No estágio larval L6 dos insetos expostos ao óleo essencial de capim limão, a redução na concentração de trealose foi semelhante a L3, entretanto, verificou-se além de maior concentração de prolina, outros aminoácidos também apresentaram maior concentração se comparado ao controle, como glutamina, histidina, lisina e tirosina (Figura 29 - b). Quanto aos insetos adultos expostos ao óleo essencial de capim limão, foi possível observar redução na concentração de trealose, glicose, alanina, treonina, valina, ácido 4-hidroxifenilacético e ureia, e maior concentração de prolina, oxoprolina, oxalato e ácido 2,5-hidroxifenilacético (Figura 29 - c).

KIRAN *et al.*, (2017) estudaram o efeito do óleo essencial de olíbano sobre a atividade enzimática dos insetos *Callosobruchus chinensis* e *C. Maculatus*, e constataram que houve aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio celular. Outro estudo relatou a importância do conhecimento do perfil metabólico de *Bombyx mori* sob a exposição de trifenilestano (TPT), que é um reagente orgânico, com baixa solubilização e utilização ampla na agricultura, considerado então um possível poluente para o meio ambiente (CHEN *et al.*, 2022).

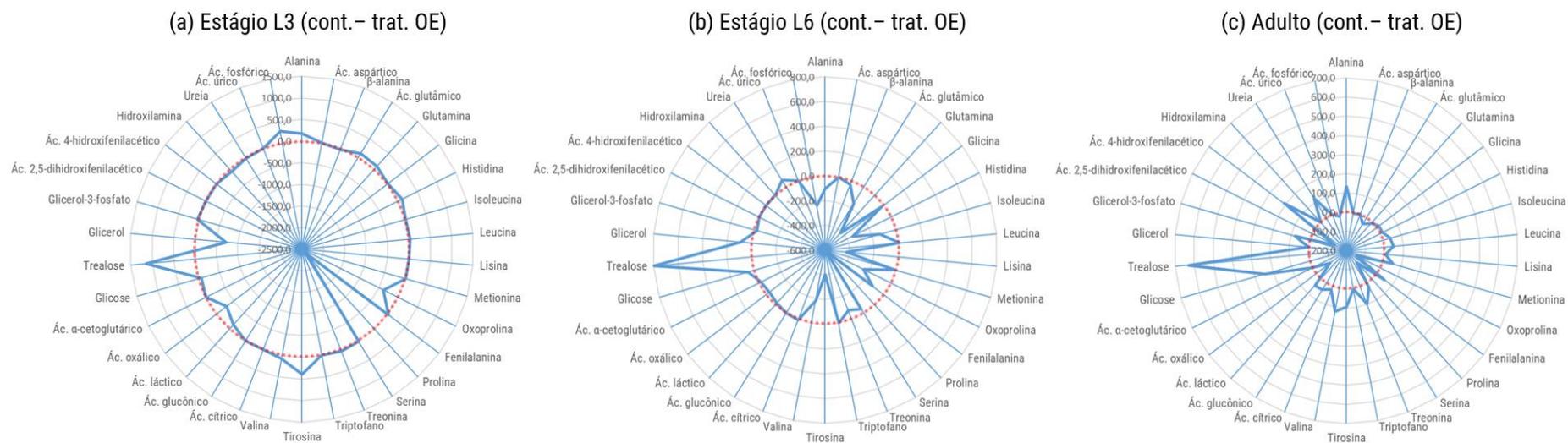


Figura 29. Variação na concentração de metabolitos a partir da fração polar do extrato bruto de *A. diaperinus*, expostos (tratamento) ou não (controle) ao efeito fumigante de voláteis do óleo essencial de capim limão. Linha vermelha pontilhada representa variação de concentração igual a zero entre o controle e o tratamento em cada estágio do ciclo biológico L3 (a), L6 (b) e adulto (c). A diferença de concentração entre controle e o tratamento se positivo indica maior concentração no controle se negativo indica maior concentração no tratamento.

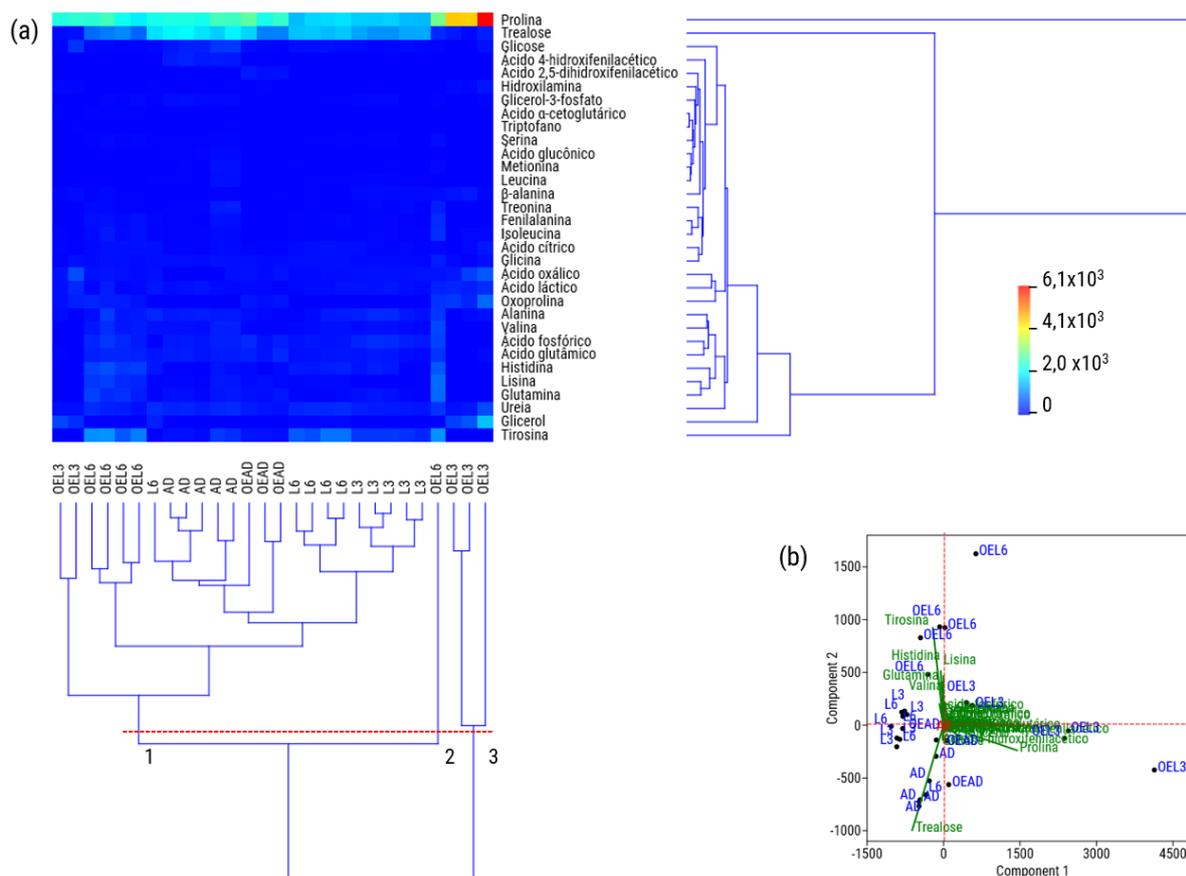


Figura 30. Análise multivariada com base na concentração de metabólitos a partir da fração polar do extrato bruto de amostras de *A. diaperinus* submetidos (tratamento) ou não (controle) ao óleo essencial de capim limão. Mapa de calor a partir da análise hierárquica (UPGMA e distância Euclidiana) das amostras nos estágios larvais (L3 e L6) e adulto (AD) em função da correlação entre as substâncias presentes nas amostras (a). Gráfico-biplot representando a análise de componentes principais (PCA) letras azuis representam a dispersão das amostras (scores) e as letras verdes a contribuição das substâncias para a dispersão (loadings) (b).

Não foi possível observar com clareza a formação de grupos distintos que diferenciassse as amostras dos insetos exposto aos óleos essenciais daqueles do controle. Foi necessário realizar uma investigação em separado para cada substância e os resultados apontaram diferença significativa na concentração de várias substâncias que pode ser observado marcado com um asterisco (*) ao lado do nome da substância. A descrição completa pode ser observada nos anexos (anexo 3).

— **Perfil metabólico do cascudinho adulto exposto ao do óleo essencial de capim limão por diferentes tempos.**

Nos experimentos anteriores, em especial aqueles que avaliaram a concentração letal do óleo essencial de capim limão por fumigação (item 4.2), observou-se que os óleos essenciais foram tóxicos aos estágios larvais e adulto, sendo neste último o efeito mais pronunciado. Destaca-se um resultado muito interessante (Figura 31), que aponta para a possibilidade de existirem mecanismo bioquímicos que conferem resistência ao cascudinho.

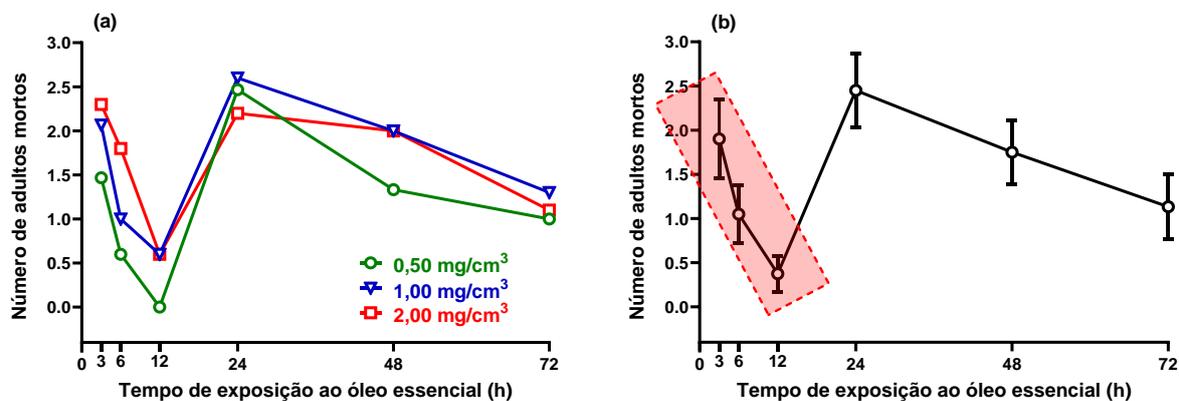


Figura 31. Número de insetos adultos mortos expostos a diferentes concentrações do óleo essencial de capim limão por diferentes tempos (a). Número de insetos adultos mortos, valores médios consolidados para as concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 mg/cm³ de ar (b). Barras representam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$ e $p<0,0001$) em torno da média aritmética em cada tempo ($n=45$).

A contagem de insetos adultos mortos em cada intervalo de tempo de exposição aos óleos essenciais, nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 mg/cm³ de ar, decresceu até a 12 hora de exposição e depois voltou a crescer (Figura 31 - a). Duas hipóteses independentes concorrem para explicar esse fenômeno observado. Primeiro, morreram os insetos mais susceptíveis ao efeito tóxico do óleo essencial. Segundo, se algum mecanismo de defesa, provavelmente bioquímico, atuou para tamponar e conferir resistência aos efeitos tóxicos do óleo essencial. De fato, o que se pode afirmar é que houve uma redução significativa no número de insetos mortos nas três maiores concentrações testadas (Figura 31 - b).

Neste sentido, foi conduzido um ensaio para avaliar o impacto do óleo essencial sobre o metabolismo, com a intenção de destacar, a partir da análise do perfil metabólico (anexo 4), possíveis alvos bioquímicos, porém, apenas com insetos adulto expostos ao óleo essencial de

capim limão nos tempos de 3, 6, 12, 24 e 48h na concentração de 0,23 mg/cm³ de ar (concentração de subletalidade, igual a CL_{50%}).

Pode-se observar que na 3^a, 6^a e 12^a hora de exposição os níveis de trealose estão aumentados nos insetos expostos ao óleo essencial e que após 24 horas de exposição os níveis de trealose são maiores no controle (Figura 32 a-c). Outra substância que merece destaque é a prolina que na 3^a hora está maior no controle, na 6^a hora maior no tratamento com óleo essencial e que na 12^a hora volta a estar em maior concentração no controle (Figura 32 a-b). Também foi possível observar o aumento na concentração de alguns aminoácidos nos tempos de 24 e 48 horas de exposição ao óleo essencial, como prolina, valina, isoleucina, oxoprolina, glutamina, lisina (Figura 32 d-e)

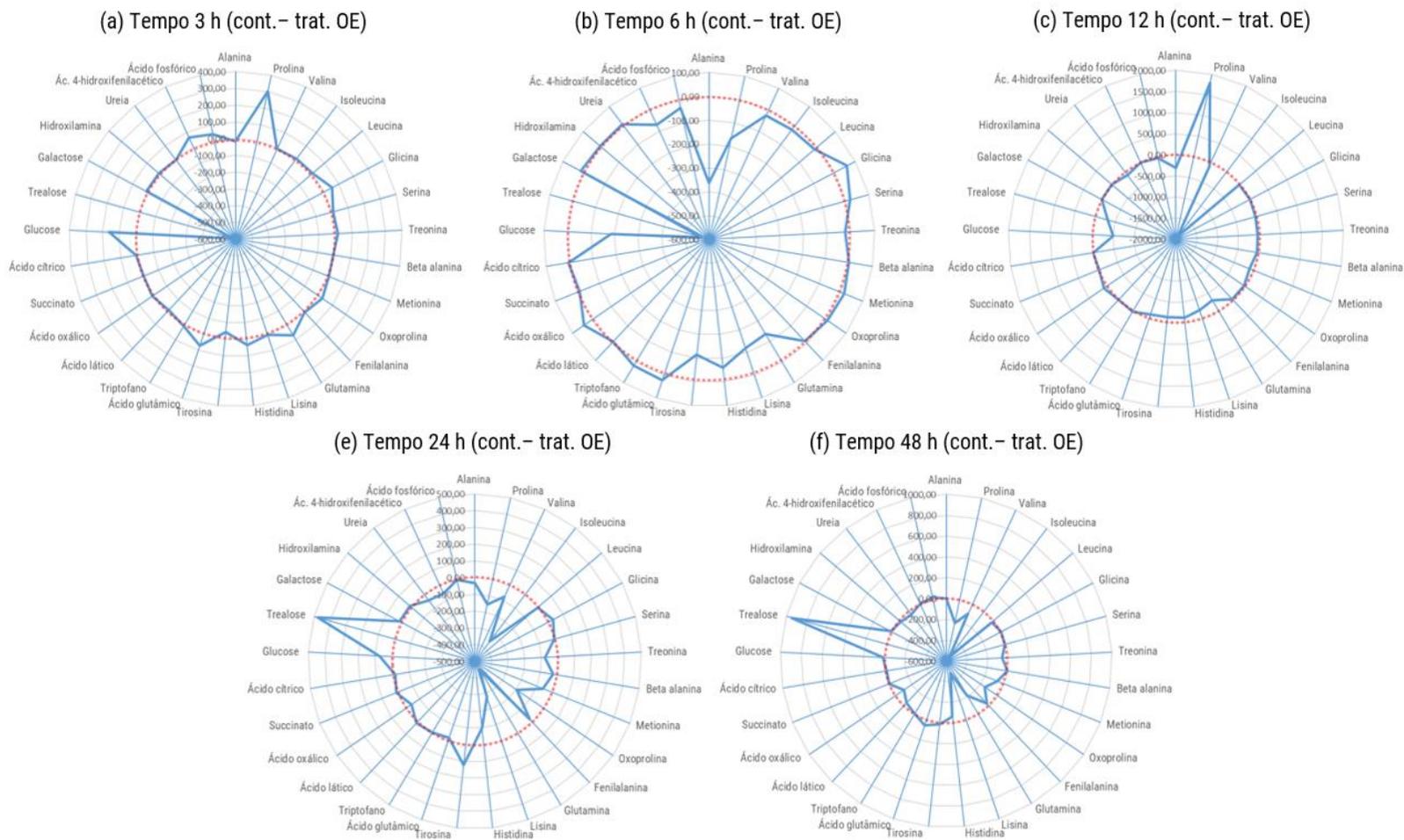


Figura 32. Variação na concentração de metabólitos a partir da fração polar do extrato bruto de *A. diaperinus* adultos expostos (tratamento) ou não (controle) ao efeito fumigante de voláteis do óleo essencial de capim limão por diferentes tempos. Linha vermelha pontilhada representa variação de concentração igual a zero entre o controle e o tratamento nos tempos 3 (a), 6 (b), 12 (c), 24 (d) e 48 h (e). A diferença de concentração entre controle e o tratamento, se positivo, indica maior concentração no controle, se negativo, indica maior concentração no tratamento.

A análise de agrupamentos hierárquicos comprovou a formação de dois grupos distintos que distinguem as amostras dos insetos expostos ao óleo essencial até a 6ª hora de exposição do outro grupo a partir da 24 hora de exposição ao óleo essencial (Figura 33 - a). A análise de componentes principais também comprova o resultado, apontando a dispersão de dois grupos ao longo da componente 1, com 81% da variância observada (Figura 33 - b). As análises gráficas apresentadas, por heatmap e biplot-PCA, demonstraram que no grupo 1 há maior concentração de isoleucina e no grupo dois maior concentração de prolina. Contudo, ficou confuso distinguir com clareza o efeito do óleo essencial. Neste caso, somente o tratamento com óleo essencial na 48ª hora de exposição se destacou dos demais (Figura 34).

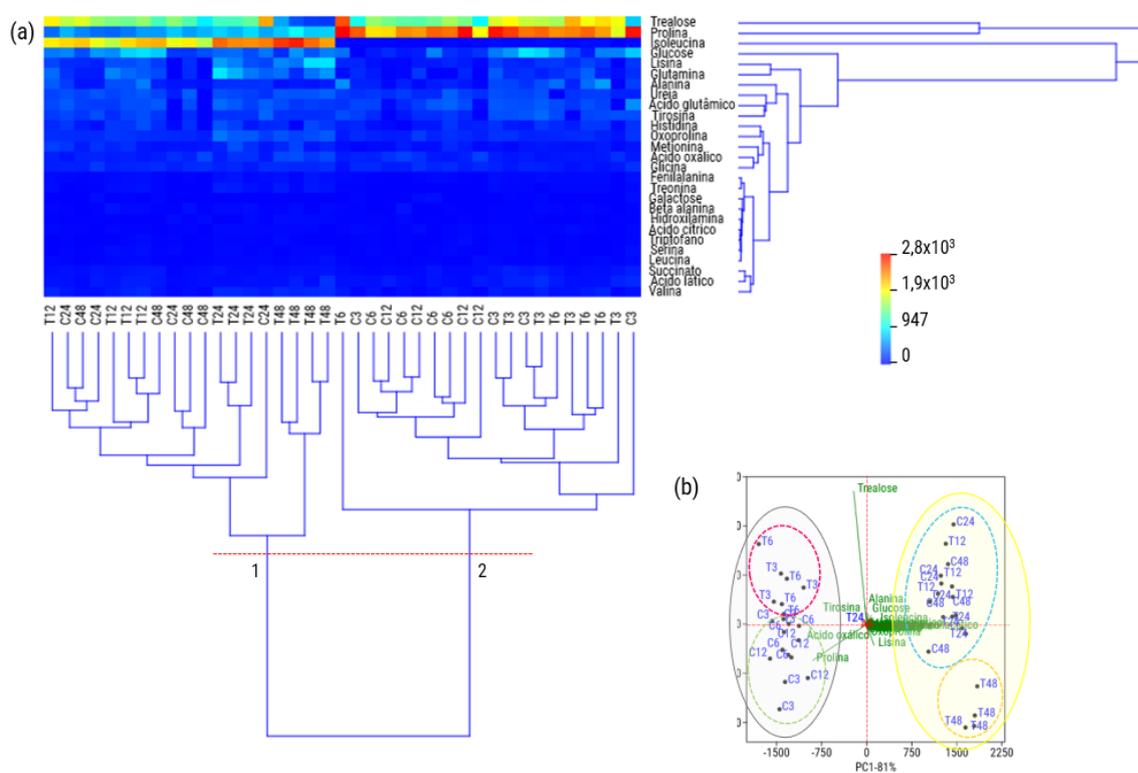


Figura 33. Análise multivariada com base na concentração de metabolitos a partir da fração polar do extrato bruto de amostras de *A. diaperinus* submetidos (tratamento - T) ou não (controle - C) ao óleo essencial de capim limão por diferentes tempos de exposição (3, 6, 12, 24 e 48 h). Mapa de calor a partir da análise hierárquica (UPGMA e distância Euclidiana) das amostras de insetos em função da correlação entre as substâncias presentes nas amostras (a). Gráfico-biplot representando a análise de componentes principais (PCA) letras azuis representam a dispersão das amostras (scores) e as letras verdes a contribuição das substâncias para a dispersão (loadings).

Observando especificamente os metabólitos, ficou demonstrado que na 6^a e 12^a hora os insetos expostos aos óleos essenciais apresentaram maiores concentrações de alanina (Figura 34 - a). A partir da 6^a hora de exposição ao óleo essencial os níveis de valina, glutamina e lisina cresceram e se destacaram em relação ao tratamento controle e o de oxoprolina a partir de 24 horas de exposição (Figura 34 b-e). Destaca-se, entre os resultados o aumento na concentração de trealose, principalmente na 3^a e 6^a horas de exposição ao óleo essencial, com variação de 45 e 39% superior a concentração do controle, respectivamente.

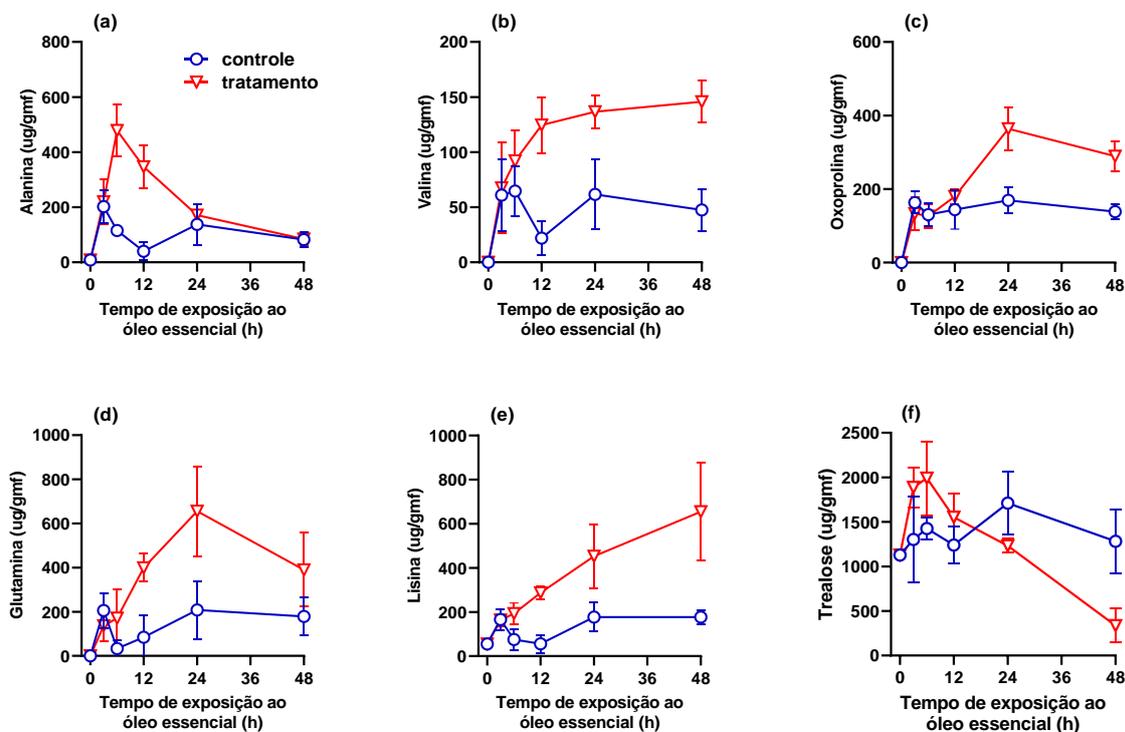


Figura 34. Concentração de metabólitos em função do tempo de exposição ao óleo essencial de capim limão (3, 6, 12, 24 e 48 horas). Barras representam o intervalo de confiança (tukey; $\alpha=0,05$ e $p<0,0001$) em torno da média aritmética em cada tempo.

Os resultados observados são evidências de que fontes energéticas são mobilizadas, primeiramente, de fontes de glicogênio levando ao aumento de trealose nas primeiras horas de exposição ao óleo essencial e, em segundo, na mobilização de proteínas de reserva, principalmente a partir da 12^a hora de exposição ao óleo essencial, para disponibilizar aminoácidos que atuam em vias de síntese de ATP, comum no metabolismo de insetos. Essas observações, necessitam de maiores comprovações, mas reforçam a hipótese de que a

resistência inicial de insetos adultos às primeiras horas de exposição ao óleo essencial de capim limão pode estar atrelado a este aumento na disponibilidade de trealose.

Diferentes trabalhos apontam que prolina pode ser encontrada em abundância na hemolinfa dos insetos e que possuem a função de participar no metabolismo como fonte de energia para a produção de ATP (GADE; AUERSWALD, 2002; TEULIER *et al.*, 2016). Segundo (FAHMY *et al.*, 2004) a alanina também atua como fonte de energia para a síntese de ATP, e de acordo com (RAND *et al.*, 2015), a isoleucina também tem papel muito importante no metabolismo energético dos insetos, pois sua degradação pode reabastecer os intermediários do ciclo do ácido cítrico, além disso, os autores relataram que abelhas que sofreram estresses por inseticida, tiveram o catabolismo da isoleucina aumentado.

Segundo TAMANG; KALRA; PARKASH (2017), para manter seu metabolismo ativo, os insetos alteram os níveis de açúcares e de alguns aminoácidos, principalmente o da prolina criando um mecanismo de resistência nos insetos. Nos resultados obtidos a partir do tempo de exposição, pode-se observar que os níveis de trealose diminuem conforme aumenta o tempo de exposição ao óleo. Resultados semelhantes ao presente estudo também mostraram queda nos níveis dos açúcares das larvas de Coleoptera: Elateridae quando foram submetidas a estresse hídrico (TORRES, 2003).

Foi encontrado também o aminoácido oxoprolina, que está associado a metamorfose dos insetos e também constituinte do colágeno animal (BENDER, 2012). CUI *et al.*, (2019) estudaram o perfil metabólico do *Callosobruchus chinensis* (L.) sobre condições de estresse e encontraram resultados diferentes com os do presente estudo, onde os níveis de aminoácidos foram diminuídos.

O metabólito aromático, ácido 4-hidroxifenilacético apresentou redução da sua concentração nos insetos adultos submetidos ao óleo essencial, contudo não há muitos estudos que relacionem sua função nos insetos. Estudos mostram que é um metabólito que pode ser degradado para gerar o succinato e assim produzir energia (LI *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2021).

GAO *et al.*, (2022) observaram que teve redução das concentrações de glutamina nas larvas de *S. frugiperda* quando foram submetidas ao estresse ocasionado pelo pesticida spinetoram, e isso indica uma redução na produção de energia. Os autores também observaram que os níveis de glutamato aumentaram com esse estresse oxidativo e que alterações de aminoácidos como a lisina e a glutamina trazem malefícios aos centros nervosos dos insetos.

O maior tempo de exposição ao óleo essencial resultou a um aumento dos aminoácidos encontrados no extrato bruto do inseto, se destacando a lisina. Estudos de GAO *et al.*, (2022)

também observaram acúmulo da lisina em larvas de *S. frugiperda* quando foram submetidas ao estresse, como consequência ocasionou a contração dos músculos do inseto fazendo com que os mesmos gastassem mais energia, provocando um esgotamento energético. Os mesmos autores indicam que as diferenças nas concentrações de aminoácidos foi o ponto chave para a causa da morte das larvas de *S. frugiperda* expostas ao estresse.

6. CONCLUSÕES

1. As condições estabelecidas no laboratório para manutenção da colônia de *A. diaperinus* foram adequadas com um ciclo reprodutivo médio de 54 dias.
2. A análise por imagens digitalizadas, em especial quanto ao comprimento de *A. diaperinus*, foi adequado para avaliação dos estágios de desenvolvimento do inseto. Existe uma correlação positiva linear entre o comprimento das larvas e a idade das larvas.
3. Análise de perfil metabólico demonstrou que insetos adultos *A. diaperinus* possuem maior concentração de prolina e trealose, enquanto as pupas possuem maior concentração de tirosina, ureia, ácido úrico e triptofano.
4. O óleo essencial de capim limão possui baixa toxicidade sobre os estágios larvais de *A. diaperinus* e toxicidade mediana para a forma adulta. O tempo de exposição aos voláteis do óleo essencial de capim limão é um fator determinante para a toxicidade.
5. A exposição ao óleo essencial de capim limão promove, principalmente, aumento na concentração de prolina e redução de trealose nos estágios larvais, de pupas e adultos de *A. diaperinus*, entre outras alterações.
6. O tempo de exposição do adulto de *A. diaperinus* ao óleo essencial de capim limão promoveu aumento gradativo de valina, oxoprolina, glutamina e lisina e redução de trealose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALLAY, F. H. *et al.* An Illustrated Key to, and Diagnoses of the Species of Tenebrionidae (Coleoptera) Associated with Decaying Carcasses in Argentina. **Annales Zoologici**, v. 66, n. 4, p. 703–726, 1 dez. 2016.

ALMEIDA, Luís Gustavo de. Metabolização de xenobióticos e produção de bioinseticidas por bactérias associadas a insetos. 2018. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018. doi:10.11606/T.11.2018.tde-11102018-102026. Acesso em: 2024-02-01.

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, 1 maio 2019a.

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, 1 maio 2019b.

AMARAL, P. F. G. P.; MARTINS, L. DE A.; OTUTUMI, L. K. BIOSSEGURIDADE NA CRIAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE. **Enciclopédia Bioesfera**, v. 10, n. 18, p. 664, 2017.

AMEZIAN D, NAUEN R, LE GOFF G. Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification genes in insects - An overview. **Pestic Biochem Physiol.** 2021 May;174:104822. doi: 10.1016/j.pestbp.2021.104822. Epub 2021 Mar 8. PMID: 33838715.

ARAKANE, Y. *et al.* Tyrosine metabolism for insect cuticle pigmentation and sclerotization. Em: **Extracellular Composite Matrices in Arthropods**. Springer International Publishing, 2016. p. 165–220.

ARENA, J. S. *et al.* Insecticidal and antibacterial effects of some essential oils against the poultry pest *Alphitobius diaperinus* and its associated microorganisms. **Journal of Pest Science**, v. 93, n. 1, p. 403–414, 1 jan. 2020.

ARENA, J. S.; DEFAGÓ, M. T. A novel method for sexing live adult *Alphitobius diaperinus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 168, n. 5, p. 416–419, 1 maio 2020.

ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 207–225, 1 jan. 2010.

ARTHUR, PAULA B. Determinação das doses letais e esterilizantes para as fases do ciclo de vida do *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae). 2018. 77 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP, São Paulo. DOI: 10.11606/T.85.2018.tde-18052018-154428. Disponível em: <http://repositorio.ipen.br/handle/123456789/29568>. Acesso em: 01 fev. 2024.

ATOWA, C. O. *et al.* Nutritional values of *Zonocerus variegatus*, *Macrotermes bellicosus* and *Cirina forda* insects: Mineral composition, fatty acids and amino acid profiles. **Scientific African**, v. 12, 1 jul. 2021.

AZEVEDO, I. L. *et al.* Eficácia in vitro do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus* steud. wats.) frente a bactérias entéricas de origem avícola. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 10, n. 1, p. 25–31, 2016.

BASTOS, N. S.; FREITAS, E. S. DE. Fatores que influenciam no rendimento da carcaça em frangos de corte. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária FAG**, v. 1, n. 1, 2019.

BENDER, D. A. The Aromatic Amino Acids: Phenylalanine, Tyrosine and Tryptophan. Em: **Amino Acid Metabolism**. 3^a ed., 2012. p. 323–376.

BERENBAUM, M. R.; JOHNSON, R. M. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. **Current Opinion in Insect Science**, v. 10, p. 51–58, 16 maio 2015a.

BERENBAUM, M. R.; JOHNSON, R. M. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. **Current Opinion in Insect Science**, v. 10, p. 51–58, 16 maio 2015b.

BIANCHINI, Lucas Feijó. Sistema de defesa antioxidante na larva do quironomídeo *Tanytarsus minutipalpus*: adaptação às condições ambientais extremas do Lago Magadi (Quênia, África). 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, 2015. Disponível em: <http://repositorio.furg.br/handle/1/8217>. Acesso em 01/02/2024.

BJØRGE, J. D. *et al.* Role of temperature on growth and metabolic rate in the tenebrionid beetles *Alphitobius diaperinus* and *Tenebrio molitor*. **Journal of Insect Physiology**, v. 107, p. 89–96, 1 maio 2018.

BORGES, F. F. *et al.* Efeito da secagem sobre o rendimento de óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C. Stapf). **Gl. Sci Technol**, v. 12, n. 03, p. 01–19, 2019.

BRAGA SILVA, S. *et al.* Uso de extratos naturais no controle de insetos, com ênfase em moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae). **Biológico**, v. 81, n. 1, p. 1–30, 2019.

CABALLERO-GALLARDO, K.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. E. Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia origanoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. **Journal of Stored Products Research**, v. 50, p. 62–65, jul. 2012.

CAMARGO, R. DA S. *et al.* Morfologia interna. Em: **Insetos de Importância Econômica: guia ilustrado para identificação de famílias**. FEPAF ed. 2011, p. 24–30.

CASTRO, G. D. S.; FREITAS, A. D. G. DE. Utilização dos Extratos Botânicos de Noni (*Morinda citrifolia*), e Bt (*Bacillus thuringiensis*) Sobre o Gorgulho (Coleoptera: Curculionidae) em Condições Experimentais. **UNICIÊNCIAS**, v. 22, n. 2, p. 81–84, 30 dez. 2018.

CHATTOPADHYAY, P. *et al.* Essential oil based polymeric patch development and evaluating its repellent activity against mosquitoes. **Acta Tropica**, v. 147, p. 45–53, 1 jul. 2015.

CHERNAKI, A. M.; ALMEIDA, L. M. Morfologia dos estágios imaturos e do adulto de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera, Tenebrionidae). **Revta bras. Zool.**, v. 18 (2), p. 351–363, 2001.

CIELO, I. D.; JUNIOR, W. F. R.; RIBEIRO, M. C. P. Análise dos contratos de integração no sistema agroindustrial do frango de corte na mesorregião oeste paranaense sob a ótica da nova economia institucional RESUMO. **Revista Tecnologia e Sociedade**, v. 13, p. 177–191, 2017.

CUI, S. F. *et al.* Effects of hypoxia/hypercapnia on the metabolism of *Callosobruchus chinensis* (L.) larvae. **Journal of Stored Products Research**, v. 83, p. 322–330, 1 set. 2019.

DANTAS, P. C. *et al.* Avaliação de extratos botânicos no controle da cochonilha de escama *Diaspis echinocacti* (brouché, 1833) (Hemiptera: Diaspididae). **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 3, p. 2012–2017, 2019.

DAS, S. *et al.* Insecticidal and fungicidal efficacy of essential oils and nanoencapsulation approaches for the development of next generation ecofriendly green preservatives for management of stored food commodities: an overview. **International Journal of Pest Management**, 2021.

DE-ASSIS, M. P. *et al.* Problemas de saúde identificados em trabalhadores rurais expostos ocupacionalmente a agrotóxicos. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho**, v. 18, n. 3, p. 352–363, 2021.

DESPRÉS, L.; DAVID, J. P.; GALLET, C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 22, n. 6, p. 298–307, jun. 2007.

DEVI, M. A. *et al.* Toxicity, repellency and chemical composition of essential oils from *Cymbopogon* species against red flour beetle *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 15, n. 2, p. 181–191, 1 jun. 2020.

DING, J. *et al.* Development of extractive electrospray ionization ion trap mass spectrometry for in vivo breath analysis. **Analyst**, v. 134, n. 10, p. 2040–2050, 2009.

DONOSO, A.; PAREDES, N.; RETAMAL, P. Detection of antimicrobial resistant salmonella enterica strains in larval and adult forms of lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus*) from industrial poultry farms. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, 9 out. 2020.

DORACENZI, E. L.; BENTO, F. DE M. M.; MARQUES, R. N. Efeito de inseticidas botânicos sobre a mortalidade de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em plantas de tomateiro. **Entomology Beginners**, v. 2, p. e005, 30 abr. 2021.

EMWAS, A. H. *et al.* Nmr spectroscopy for metabolomics research. **Metabolites**. MDPI AG, 1 jul. 2019.

ESQUIVEL, J. F.; CRIPPEN, T. L.; WARD, L. A. Improved Visualization of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)-Part I: Morphological Features for Sex Determination of Multiple Stadia. **Psyche (London)**, v. 2012, 2011.

FAHMY, A. S. *et al.* Esterase and lipase in camel tick *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae) during embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, v. 137, n. 2, p. 159–168, 2004.

FAVRO, J. *et al.* Exportações de carne de frango. **Revista de política agrícola**, n. 3, 2021.

FERNANDES, J. M. G.; PARREIRA, A. G.; ALVES, S. N. Microbiota intestinal de culicidae e a relação com a resistência a inseticidas: uma revisão. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 12, n. 4, p. 598–604, 8 fev. 2021.

FERREIRA, A. G. *et al.* Uso de extratos aquosos (nim, eucalipto e fumo) no controle do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*). **Agrarian Academy**, v. 5, n. 9, p. 437–443, 31 jul. 2018.

FOGAÇA, I. *et al.* Álcool para controle de cascudinho em cama de frangos de corte. **Archivos de Zootecnia**, v. 66, n. 256, p. 509–514, 15 out. 2017.

FRANÇA, D. M. V. R. *et al.* Adverse effects of pesticides on central auditory functions in tobacco growers. **International Journal of Audiology**, v. 56, n. 4, p. 233–241, 3 abr. 2017.

GADE, G.; AUERSWALD, L. A. Beetles' choice-proline for energy output: control by AKHs. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 132, p. 117–129, 2002.

GAO, Z. *et al.* Transcriptome and metabolome analysis reveals the importance of amino-acid metabolism in *Spodoptera frugiperda* exposed to spinetoram. **Insects**, v. 13, n. 9, 1 set. 2022.

GAZONI, F. L. *et al.* Avaliação da resistência do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) a diferentes temperaturas. **Arq. Inst. Biol**, n. 1, p. 69–74, 2012.

GIRALDO, A. E.; FLORES, G. E. Peruvian Tenebrionidae: A Review of Present Knowledge and Biodiversity. **Annales Zoologici**, v. 66, n. 4, p. 499–513, 2016.

GOVONI, B. *et al.* Análise da exposição direta e indireta à compostos agroquímicos: biomonitoramento da saúde humana. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 9, p. 15668–15674, 2019.

GUERRA, A. M. N. DE M. *et al.* Teste de repelência de óleos essenciais sobre *Callosobruchus maculatus*. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 9, n. 3, p. 110–117, 24 nov. 2019.

HALKET, J. *et al.* Development of high throughput approaches to optimise the nutritional value of crops and crop-based foods. Em: **DEVELONUTRI BOOK**, v. 1, p. 1–235, 2010.

HASSEMER, M. J. *et al.* Revisiting the male-produced aggregation pheromone of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera, Tenebrionidae): identification of a six-component pheromone from a Brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 6809–6818, 14 set. 2016.

HEIDEL-FISCHER, H. M.; VOGEL, H. Molecular mechanisms of insect adaptation to plant secondary compounds. **Current Opinion in Insect Science**, v. 8, p. 8–14, 1 abr. 2015.

HICKMANN, F. *et al.* Susceptibility of the Lesser Mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), from Broiler Farms of Southern Brazil to Insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 111, n. 2, p. 980–985, 2 abr. 2018a.

HICKMANN, F. *et al.* Susceptibility of the Lesser Mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), from Broiler Farms of Southern Brazil to Insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 111, n. 2, p. 980–985, 2 abr. 2018b.

HUANG, Q. *et al.* Characterization of trehalose metabolic genes and corresponding enzymatic activities during diapause of *Sitodiplosis mosellana*. **Journal of Insect Physiology**, v. 135, p. 104324, nov. 2021.

JOHNSON, T. O. *et al.* Biochemical evaluation and molecular docking assessment of *Cymbopogon citratus* as a natural source of acetylcholine esterase (AChE)- targeting insecticides. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 28, 1 dez. 2021.

JUNIOR, C. F. DOS S.; DOS SANTOS, M.; SOARES, J. B. C. A evolução do controle de insetos. **Revista Agronomia Brasileira**, v. 4, n. 1, 2020.

JUSTINO, H. DE F. M.; CUNHA, J. S.; LEITE JÚNIOR, B. R. DE C. Insetos comestíveis como fonte de proteínas emergentes: revisão. **Conjecturas**, v. 22, n. 15, p. 884–895, 17 nov. 2022.

KEANE, S.; RYAN, M. F. Purification, characterisation, and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, *Galleria mellonella* (L.). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, p. 1097–1104, 1999.

KUREČKA, M. *et al.* Larvae and pupae of *Alphitobius diaperinus* as promising protein alternatives. **European Food Research and Technology**, v. 247, n. 10, p. 2527–2532, 1 out. 2021.

LEÃO, R. S. *et al.* Public health assessment of agrochemicals exposure: An experience with family farming in the northwest of Rio de Janeiro. **Sustentabilidade em Debate**, v. 9, n. 1, p. 81–94, 1 abr. 2018.

LI, M. J.; JIANG, G. F.; WANG, W. Metabolite changes in orange dead leaf butterfly kallima inachus during ontogeny and diapause. **Metabolites**, v. 12, n. 9, 1 set. 2022.

LISEC, J. *et al.* Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 387–396, jun. 2006.

LI, Y. *et al.* Proteomics analysis of aromatic catabolic pathways in thermophilic *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 4, p. 1201–1210, 2 fev. 2012.

LU, K.; SONG, Y.; ZENG, R. The role of cytochrome P450-mediated detoxification in insect adaptation to xenobiotics. **Current Opinion in Insect Science**, v. 43, p. 103–107, 1 fev. 2021.

LYONS, B. N. *et al.* Susceptibility of *Alphitobius diaperinus* in Texas to permethrin- and β -cyfluthrin-treated surfaces. **Pest Management Science**, v. 73, n. 3, p. 562–567, 1 mar. 2017.

MELO, A. M. *et al.* Extração, identificação e estudo do potencial antimicrobiano do óleo essencial de pimenta-preta (*Piper nigrum* L.), biomonitorado por *Artemia salina* Leach. **HOLOS**, v. 37, n. 1, 2021.

MENDES, L. R.; POVALUK, M. Ciclo e controle do *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera, Tenebrionidae) no município de Quitandinha, pr. **Saúde Meio Ambient.**, v. 6, n. 1, p. 107–122, 2017.

MITUNIEWICZ, T.; DZIK, S. Characteristics of lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Medycyna Weterynaryjna**, v. 76, n. 3, p. 145-149, 2020.

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

MONTANHA, F. P.; PIMPÃO, C. T. Efeitos toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em peixes - Revisão. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, n. 18, 2012.

MOTTIN, M. C. *et al.* Interferência do manejo da cama de aviário na liberação de nitrogênio para o solo. **Journal of Agronomic Sciences**, v. 4, n. 2, p. 158–171, 2015.

NASCIMENTO, L.; MELNYK, A. A química dos pesticidas no meio ambiente e na saúde. **Artigo Revista Mangaio Acadêmico**, v. 1, n. 1, 2016.

NAUEN, R.; ZIMMER, C. T.; VONTAS, J. Heterologous expression of insect P450 enzymes that metabolize xenobiotics. **Current Opinion in Insect Science**, v. 43, p. 78–84, 1 fev. 2021.

NGONGANG, M. D. T. *et al.* Chemical constituents of essential oils from *Thymus vulgaris* and *Cymbopogon citratus* and their insecticidal potential against the tomato borer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 42, n. 1, p. 31–43, 1 fev. 2022.

OLIVEIRA, C. C. A. DE; SANTOS, J. S. Compostos ativos de capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*): uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, 19 set. 2021.

OLIVEIRA, D. G. P. *et al.* Laboratory and field evaluation of a cypermethrin-based insecticide for the control of *Alphitobius diaperinus* panzer (Coleoptera: Tenebrionidae) and its in-vitro effects on *beauveria bassiana* bals. vuill. (hypocreales: Cordycipitaceae). **Revista Brasileira de Ciencia Avicola**, v. 18, n. 3, p. 371–380, 1 jul. 2016.

OLIVEIRA, E. R. *et al.* Toxicity of *Cymbopogon flexuosus* essential oil and citral for *Spodoptera frugiperda*. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 42, n. 4, p. 408–419, 1 jul. 2018a.

OLIVEIRA, J. L. DOS S. *et al.* Usos, efeitos e potencial tóxico dos agrotóxicos na qualidade do solo. **Agrarian Academy**, v. 5, n. 9, 31 jul. 2018b.

PEACH, D. A. H. *et al.* Lemongrass and cinnamon bark: plant essential oil blend as a spatial repellent for mosquitoes in a field setting. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 5, p. 1346–1352, 1 set. 2019.

PEREIRA, M.; MOURA, C. J. M. DE. Entendendo alguns mecanismos de resistência a inseticidas tendo como exemplo o pulgão-verde *Myzus persicae* (SULZER, 1776) (Hemiptera: Aphididae). **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 6813–6839, 2021.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **J. Biotec. Biodivers.**, v. 3, n. 4, p. 146–152, 2012.

PINTO, B. G. S. *et al.* Occupational exposure to pesticides: genetic danger to farmworkers and manufacturing workers – a meta-analytical review. **Science of the Total Environment**, v. 748, 15 dez. 2020.

PLATA-RUEDA, A. *et al.* Acute toxicity and sublethal effects of lemongrass essential oil and their components against the granary weevil, *Sitophilus granarius*. **Insects**, v. 11, n. 6, p. 1–13, 1 jun. 2020a.

PLATA-RUEDA, A. *et al.* Insecticidal and repellent activities of *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil and its terpenoids (citral and geranyl acetate) against *Ulomoides dermestoides*. **Crop Protection**, v. 137, 1 nov. 2020b.

QIN, J. *et al.* Molecular characterization and gene expression of trehalase in the bumblebee, *Bombus lantschouensis* (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 68, n. 4, 2021.

RADÜNZ, A. L. *et al.* Insecticidal and repellent activity of native and exotic lemongrass on Maize weevil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, 2024.

RANI, N.; PONNUDURAI, G.; HARIKRISHNAN, T. J. In vitro insecticidal activities of essential oil of Lemon grass against house fly: *Musca domestica* L. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 7, n. 1, p. 206–209, 2019.

REIS, T. L. *et al.* Aluminossilicatos na alimentação de aves: revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e380985562, 9 jul. 2020.

RENAULT, D.; COLINET, H. Differences in the susceptibility to commercial insecticides among populations of the lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* collected from poultry houses in France. **Insects**, v. 12, n. 4, 1 abr. 2021.

ROCHA, E. R.; PRIMIERI, C. Triturado de *Alphitobius diaperinus* contra cascudinhos de aviário. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária FAG**, v. 4, n. 1, 2021.

RODRIGUES, A. L. DE B. *et al.* Cascudinho e frangos de corte: parâmetros hematológicos e bioquímicos. **RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar**, v. 3, n. 6, 17 jun. 2022.

ROSA DA SILVA, M.; MENEGAZ DE FARIAS, P. O óleo essencial de Pimenta racemosa é eficiente inseticida para controle de *Sitophilus spp.* (Coleoptera: Curculionidae) em grãos armazenados. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 26, n. 1, p. 7–17, 15 jan. 2020.

RUBIOLO, P. *et al.* Essential oils and volatiles: Sample preparation and analysis. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 282–290, 2010.

SABOIA, C. DA S. *et al.* Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato bruto do capim limão (*Cymbopogon citratus*). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, 2022.

SALLET, L. A. P. **Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae)**. 2013. 109 f. Tese (Doutorado em Biologia molecular) - Universidade de Brasília, Brasília. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/handle/10482/15085>. Acesso em: 01/02/2024.

SAMMARCO, B. C.; HINKLE, N. C.; CROSSLEY, M. S. Biology and management of lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) in broiler houses. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 14, n. 1, 2023.

SANTOS, J. C. *et al.* Eficiência da aplicação de inseticida químico no solo para o controle de *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae) em aviário de frango de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 3, p. 417–425, set. 2009.

SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides - uma visão geral. **Alim.Nutr.**, v. 18, n. 3, p. 339–349, 2007.

SHEN, Q.-D. *et al.* Excess trehalose and glucose affects chitin metabolism in brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 20, n. 2, p. 449–455, jun. 2017.

SILVA, A. S. *et al.* Ciclo biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratório. Biological cycle of the beetle *Alphitobius diaperinus* in laboratory. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 2, p. 177–181, 2005.

SILVA, E. S. *et al.* Cascudinho e frangos de corte: influência no desempenho ponderal. **RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar**, v. 3, n. 6, p. e361508, 18 jun. 2022.

SILVA, J. P. *et al.* Inseticidas botânicos no controle de formigas. **DESAFIOS - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 7, n. 4, p. 163–171, 7 mar. 2020.

SMITH, A. D. *et al.* Beetles (Coleoptera) of Peru: A Survey of the Families. Tenebrionidae. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 88, n. 2, p. 221–228, 2015.

SOARES, C. E. S.; WEBER, A.; SCUSEEL, V. M. Stereo and scanning electron microscopy characteristics of poultry breeding beetle (*Alphitobius diaperinus*) - a filamentous toxigenic fungi carrier. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 30, n. 2, p. 150–156, 1 fev. 2018.

SOUZA, L. M. *et al.* Eficácia in vitro do spinosad contra *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Ars Veterinaria**, v. 36, n. 4, p. 242, 23 dez. 2020.

SOUZA, S. V. *et al.* Sustentabilidade social na produção de frango de corte em sistema dark house: um estudo multi caso. **IGepec**, v. 23, n. 2, p. 84–101, 2019.

SOUZA, S. V. *et al.* Critical success factors in the production of broilers from the perception of the integrated producer of the region of Grande Dourados/MS. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 59, n. 3, p. 1–25, 2021.

SOUZA, T. F.; FAVERO, S.; CONTE, C. DE O. Bioatividade de óleos essenciais de espécies de eucalipto para o controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepdoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 5, n. 2, p. 157–164, 2010.

SUBEKTI, N.; CAHYANINGRUM, S. H. Insecticidal activity of some plant essential oil extracts against *Alphitobius diaperinus* pest causing Avian influenza. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1567, 3 jul. 2020.

SUBEKTI, N.; CAHYANINGRUM, S. H.; MAULANA, S. Effective Control of *Alphitobius diaperinus* Using Natural Bioinsecticides. **Journal of Tropical Life Science**, v. 12, n. 3, p. 289–297, 2022.

TAK, J. H.; ISMAN, M. B. Metabolism of citral, the major constituent of lemongrass oil, in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and effects of enzyme inhibitors on toxicity and metabolism. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 133, p. 20–25, 1 out. 2016.

TAK, J.-H.; JOVEL, E.; ISMAN, M. B. Contact, fumigant, and cytotoxic activities of thyme and lemongrass essential oils against larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Journal of Pest Science**, v. 89, n. 1, p. 183–193, 12 mar. 2016.

TAK, J. H.; JOVEL, E.; ISMAN, M. B. Effects of rosemary, thyme and lemongrass oils and their major constituents on detoxifying enzyme activity and insecticidal activity in *Trichoplusia ni*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 140, p. 9–16, 1 ago. 2017.

TAMANG, A. M.; KALRA, B.; PARKASH, R. Cold and desiccation stress induced changes in the accumulation and utilization of proline and trehalose in seasonal populations of *Drosophila immigrans*. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v. 203, p. 304–313, 1 jan. 2017.

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

TEIXEIRA, C. M. *et al.* Efeitos do extrato supercrítico de *Melia azedarach* (Meliaceae) no controle de *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera, Curculionidae). **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 18, n. 2, p. 274–280, 2019.

TESTA, M. *et al.* O uso de produtos alternativos no controle do cascudinho é eficaz? SB Rural, ed. 206, 2018 Disponível em: <www.journalsulbrasil.com.br>. Acesso em: 01/02/2024.

TEULIER, L. *et al.* Proline as a fuel for insect flight: Enhancing carbohydrate oxidation in hymenopterans. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 283, n. 1834, 13 jul. 2016.

TOMBERLIN, J. K.; RICHMAN, D.; MYERS, H. M. Susceptibility of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) from Broiler Facilities in Texas to Four Insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 101, n. 2, p. 480–483, abr. 2008.

TOPRAK, U.; MUSSELMAN, L. P. From cellular biochemistry to systems physiology: New insights into insect lipid metabolism. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 133, 1 jun. 2021.

TORRES, Moacir Aluisio. Papel da trealose no metabolismo de larvas de *Pyrearinus termitilluminas* (Coleoptera: Elateridae) sob estresse hídrico. 2003. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003. doi:10.11606/D.46.2003.tde-28112008-150514. Acesso em: 2024-02-01.

UEMURA, D. H. *et al.* Distribuição e dinâmica populacional do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) em aviários de frango de corte. **Arq. Inst. Biol.**, v. 75, n. 4, p. 429–435, 2008.

VELUSAMY, R. Evaluation of effect of essential oils (eucalyptus and lemon grass) against the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 8, n. 4, p. 1592–1595, 2020a.

VELUSAMY, R. Evaluation of effect of essential oils (eucalyptus and lemon grass) against the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 8, n. 4, p. 1592–1595, 2020b.

VICENÇO, C. B.; SILVESTRE, W. P.; PAULETTI, G. F. Insecticidal activity of lemongrass essential oil and its major compounds on velvet caterpillar. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 29, n. 1, p. 1–15, 9 fev. 2023.

VOLPATO, A. *et al.* Avaliação in vitro dos efeitos inseticida e larvicida de oito óleos essenciais sobre o cascudinho aviário (*Alphitobius diaperinus*). **Archives of Veterinary Science**, v. 23, n. 2, p. 84–90, 2018.

WANG, X. *et al.* Fumigant, contact, and repellent activities of essential oils against the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. **Journal of Insect Science**, v. 14, n. 75, 2014.

WEIHRAUCH, D.; O'DONNELL, M. J. Mechanisms of nitrogen excretion in insects. **Current Opinion in Insect Science**, v. 47, p. 25–30, out. 2021a.

WEIHRAUCH, D.; O'DONNELL, M. J. Mechanisms of nitrogen excretion in insects. **Current Opinion in Insect Science**, v. 47, p. 25–30, 1 out. 2021b.

WOJCIEHOVSKI, P.; PEDRASSANI, D.; MARIO FEDALTO, L. Terra de diatomáceas para controle do *Alphitobius diaperinus* em granjas de frango de corte. **Saúde Meio Ambient.**, v. 4, n. 1, p. 66–78, 2015.

WOLF, J. *et al.* Métodos físicos e cal hidratada para manejo do cascudinho dos aviários. **Ciência Rural**, v. 44, n. 1, p. 161–166, 2014.

WU, W. *et al.* Gc/tof-ms-based metabolomics reveals altered metabolic profiles in wood-feeding termite *Coptotermes formosanus shiraki* digesting the weed *Micrantha kunth*. **Insects**, v. 12, n. 10, 1 out. 2021.

YANG, E. *et al.* Relative contribution of detoxifying enzymes to pyrethroid resistance in a resistant strain of *Helicoverpa armigera*. **J. Appl. Entomol.**, v. 129, p. 521–525, 2005.

YU, H. *et al.* Inhibition of trehalase affects the trehalose and chitin metabolism pathways in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Insect Science**, v. 28, n. 3, p. 718–734, 22 jun. 2021.

ZHAO, L. *et al.* Functional characterization of three trehalase genes regulating the chitin metabolism pathway in rice brown planthopper using RNA interference. **Scientific Reports**, v. 6, 22 jun. 2016.

8. ANEXOS

Anexo 1. Constituintes químicos do óleo essencial de capim limão.

Pico	IR _{calc}	Composto	Área (%)
1	1214	Limoneno	2,7
2	1239	Z- β -ocimeno	0,2
3	1250	E- β -ocimeno	0,2
4	1305	α -terpinoleno	0,8
5	1317	6-metil-5-hepten-2-ona	0,8
6	1441	Óxido de limoneno	0,1
7	1447	Citronelal	0,2
8	1468	Hidrato de cis-sabineno	0,2
9	1515	Cânfora	0,3
10	1526	α -gurjuneno	0,8
11	1542	β -elemeno	0,3
12	1546	Linalool	2,3
13	1575	Mircenol	0,2
14	1647	Neral	33,7
15	1654	Formiato de nerila	0,1
15	1658	β -farneseno	0,1
17	1666	α -humuleno	0,3
18	1699	Geranial	42,6
19	1711	α -terpineol	0,8
20	1713	Borneol	0,3
21	1730	α -farneseno	2,8
22	1745	γ -cardineno	0,1
23	1775	Nerol	0,1
24	1824	Geraniol	8,1
25	2253	α -cardinol	0,2
		outros	1,6

Anexo 2. Concentração de metabolito ($\mu\text{g/g}$ massa fresca de insetos) no extrato bruto fração polar de insetos de *A. diaperinus* em diferentes estágios de desenvolvimento.

Metabólitos	L3 <i>dp</i>	L6 <i>dp</i>	PU <i>dp</i>	AD <i>dp</i>
Alanina	233 89	160 115	81 67	194 16
Aspartato	0 0	0 0	0 0	0 0
β -alanina	72 6	5 7	52 6	6 7
Glutamato	128 59	139 30	0 0	198 29
Glutamina	92 63	41 8	145 103	123 54
Glicina	71 11	105 3	229 42	103 15
Histidina	109 105	202 37	377 220	58 66
Isoleucina	34 14	29 14	36 22	39 30
Leucina	27 12	8 5	0 0	49 54
Lisina	0 0	52 12	0 0	89 79
Metionina	3 7	2 5	0 0	54 67
Oxoprolina	0 0	0 0	129 28	0 0
Fenilalanina	27 15	37 9	95 53	50 57
Prolina	1595 88	1803 262	74 17	2372 169
Serina	16 16	15 11	16 17	24 13
Treonina	38 19	5 8	56 41	99 118
Triptofano	0 0	0 0	901 102	3 6
Tirosina	393 61	637 380	1654 101	224 169
Valina	81 28	101 35	89 50	157 75
Ác. cítrico	53 29	106 20	134 39	44 30
Ác. glucônico	0 0	0 0	40 19	40 26
Ác. láctico	120 38	106 47	94 58	96 42
Ác. oxálico	124 12	90 22	96 15	22 48
Ác. α -cetoglutárico	0 0	0 0	0 0	0 0

Continuação - Anexo 2

Glicose	55 19	90 24	133 171	302 124
Trealose	1283 95	1614 109	1078 52	1888 146
Glicerol	0 0	89 86	78 77	0 0
Glicerol-3-fosfato	35 33	10 10	38 24	79 26
Ác. 2,5-diidroxifenilacético	0 0	0 0	0 0	0 0
Ác. 4-hidroxifenilacético	0 0	0 0	0 0	209 33
Hidroxilamina	0 0	2 5	4 6	3 6
Ureia	194 30	322 26	955 117	276 43
Ác. úrico	0 0	0 0	621 129	0 0
Ác. fosfórico	274 67	114 65	144 29	207 38
Total Aminoácido	2921 557	3343 416	3933 682	3843 964
Total ác. orgânico	296 46	302 79	364 74	201 70
Total açúcar	1337 109	1704 89	1211 203	2190 143
Total poliálcoois	35 33	99 92	117 88	79 26
Total ác. aromático	0 0	0 0	0 0	209 33
Total c. nitrogenados	194 30	325 29	1581 228	279 46

Concentração relativa à área dos picos dos cromatogramas (CG-EM) normalizados com referência no padrão interno de ribitol. Média de n=4 ± desvio padrão (dp). L3 e L6 – estagios larvais de 3º e 6º instares, respectivamente. PU – pupa. AD – adulto.

Anexo 3. Concentração de metabolito ($\mu\text{g/g}$ massa fresca de insetos) no extrato bruto fração polar de insetos de *A. diaperinus* em diferentes estágios de desenvolvimento expostos ou não ao óleo essencial de capim limão.

Metabólitos	L3 DP	OEL3 DP	L6 DP	OEL6 DP	AD DP	OEAD DP
Alanina *	233 89	57 56	160 115	266 170	194 16	61 25
Aspartato	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	4 7
β -alanina	72 6	102 69	5 7	40 29	6 7	4 7
Glutamato *	128 59	22 33	139 30	298 65	198 29	236 88
Glutamina *	92 63	0 0	41 8	457 230	123 54	130 46
Glicina	71 11	59 46	105 3	126 58	103 15	90 23
Histidina	109 105	0 0	202 37	553 103	58 66	47 40
Isoleucina	34 14	26 27	29 14	165 122	39 30	0 0
Leucina	27 12	0 0	8 5	0 0	49 54	0 0
Lisina *	0 0	0 0	52 12	478 229	89 79	81 26
Metionina	3 7	0 0	2 5	10 23	54 67	0 0
Oxoprolina	0 0	381 278	0 0	251 103	0 0	140 32
Fenilalanina	27 15	0 0	37 9	154 109	50 57	0 0
Prolina *	1595 88	3960 1617	1803 262	2396 405	2372 169	2490 289
Serina	16 16	0 0	15 11	54 26	24 13	0 0
Treonina	38 19	0 0	5 8	82 90	99 118	0 0
Triptofano	0 0	4 9	0 0	0 0	3 6	0 0
Tirosina	393 61	0 0	637 380	1041 206	224 169	131 30
Valina	81 28	0 0	101 35	288 168	157 75	35 9
Ác. cítrico	53 29	58 72	106 20	97 34	44 30	26 4
Ác. glucônico	0 0	0 0	0 0	0 0	40 26	0 0
Ác. láctico	120 38	258 92	106 47	123 108	96 42	51 30
Ác. oxálico	124 12	425 259	90 22	126 28	22 48	114 33

Continuação - Anexo 3

Ác. α -cetoglutárico	0 0	3 6	0 0	20 13	0 0	0 0
Glicose	55 19	113 170	90 24	42 17	302 124	57 33
Trealose *	1283 95	137 81	1614 109	815 304	1888 146	1258 394
Glicerol	0 0	722 472	89 86	0 0	0 0	0 0
Glicerol-3-fosfato	35 33	8 17	10 10	33 19	79 26	0 0
Ác. 2,5-diidroxifenilacético	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	136 48
Ác. 4-hidroxifenilacético	0 0	0 0	0 0	0 0	209 33	0 0
Hidroxilamina	0 0	74 49	2 5	1 3	3 6	5 8
Ureia	194 30	218 214	322 26	258 110	276 43	154 50
Ác. úrico	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
Ác. fosfórico	274 67	0 0	114 65	349 123	207 38	225 96
Total Aminoácido	2921 557	4611 1950	3343 416	6658 1906	3843 964	3449 462
Total ác. orgânico	296 46	744 374	302 79	366 117	201 70	191 40
Total açúcar	1337 109	251 192	1704 89	857 311	2190 143	1314 420
Total poliálcoois	35 33	730 488	99 92	33 19	79 26	0 0
Total ác. aromático	0 0	0 0	0 0	0 0	209 33	136 48
Total c. nitrogenados	194 30	292 261	325 29	259 108	279 46	159 50

Anexo 4. Concentração de metabólito ($\mu\text{g/g}$ massa fresca de insetos) no extrato bruto fração polar de insetos adultos de *A. diaperinus* sob exposição ou não ao óleo essencial de capim limão por diferentes tempos.

Metabolitos	T0	C3	dp	T3	dp	C6	dp	T6	dp	C12	dp	T12	dp	C24	dp	T24	dp	C48	dp	T48	dp
Alanina	9	202	61	220	83	116	15	479	93	40	32	347	79	138	74	171	7	83	27	84	23
Prolina	1488	2609	183	2306	362	2301	214	2468	263	2247	408	454	94	610	147	762	67	585	72	812	109
Valina	0	61	32	67	41	65	23	92	28	22	16	125	25	62	32	137	15	48	19	146	19
Isoleucina	0	29	15	25	21	21	7	41	8	17	5	1941	215	2012	259	2362	81	1965	252	2513	214
Leucina	15	23	12	16	6	8	7	22	8	19	19	32	4	16	7	20	12	7	8	34	19
Glicina	61	143	25	88	25	135	22	75	16	132	35	123	15	147	46	117	25	148	23	150	13
Serina	11	29	18	21	9	19	8	0	0	8	6	42	8	22	7	28	12	11	5	26	2
Treonina	0	27	12	13	15	0	0	23	5	0	0	51	10	11	14	88	27	9	12	68	31
Beta alanina	9	14	2	20	9	21	32	22	5	0	0	38	18	11	3	35	6	25	25	27	10
Metionina	0	52	27	51	26	84	53	70	21	52	32	154	64	133	69	193	86	72	19	144	74
Oxoprolina	0	163	30	133	44	130	30	127	34	144	53	180	20	169	35	364	59	139	19	290	40
Fenilalanina	0	38	15	36	7	22	11	34	4	6	7	43	8	30	10	52	22	18	5	51	24
Glutamina	0	205	79	137	72	33	38	171	131	85	99	399	63	208	132	655	204	179	85	390	167
Lisina	55	166	48	163	27	75	47	193	48	56	41	287	30	177	65	453	146	177	33	655	221
Histidina	4	144	49	108	67	108	78	167	46	83	40	210	57	107	77	207	115	145	43	208	55
Tirosina	6	280	37	323	53	151	54	266	15	79	87	226	54	302	58	178	2	182	21	172	6
Glutamato	7	349	122	279	76	270	94	248	45	143	127	263	38	300	69	318	81	280	48	228	35
Triptofano	44	21	3	15	6	18	5	0	0	15	19	15	19	18	4	22	3	6	7	14	19
Ácido láctico	21	101	45	118	47	55	13	65	17	67	37	87	24	58	25	49	10	51	22	96	63
Ácido oxálico	149	105	15	101	51	130	71	89	7	179	49	105	17	114	44	155	45	151	73	256	38
Succinato	46	76	36	81	38	39	26	50	13	37	7	68	18	54	26	47	19	54	22	59	13

Continuação – Anexo 4

Ácido cítrico	12	27	10	20	14	21	4	18	4	24	15	21	6	16	6	33	5	8	10	24	3
Glucose	131	690	216	529	219	206	186	391	206	144	35	651	193	426	158	355	65	384	256	372	170
Trealose	1129	1304	487	1887	221	1426	125	1991	413	1240	211	1552	267	1711	353	1232	79	1282	363	336	191
Galactose	0	20	20	12	14	14	28	0	0	10	19	4	8	11	22	0	0	7	15	0	0
Hidroxilamina	15	15	2	7	8	12	10	8	9	7	8	4	7	18	14	9	16	14	12	38	6
Ureia	49	210	75	217	78	228	84	221	1	180	38	276	34	223	96	266	30	279	59	320	25
Ác. 4-hidroxifenilacético	126	257	47	188	90	181	25	252	46	171	72	167	40	172	52	224	10	194	40	190	41
Ácido fosfórico	204	279	49	237	97	233	28	269	22	243	62	276	19	255	57	255	10	276	37	249	15
Total aminoácidos	1709	4551	613	3787	942	3543	470	4510	213	3157	852	4920	471	4255	931	6168	702	3850	728	5983	219
Total de ác. orgânico	229	309	59	320	73	239	61	222	28	308	75	280	28	237	39	284	28	265	68	428	88
Total açúcares	1261	1857	648	2428	66	1646	217	2382	438	1394	187	2208	206	2149	410	1587	22	1673	426	707	137
Total comp. nitrogenados	64	225	75	224	75	239	80	232	8	186	44	279	31	241	85	277	17	287	63	358	21
Total ác. aromáticos	126	256	47	187	90	181	25	252	46	202	43	167	40	172	52	224	10	193	40	190	41

Concentração relativa à área dos picos dos cromatogramas (CG-EM) normalizados com referência no padrão interno de ribitol. Média de n=4 ± desvio padrão (dp). T0 – tempo zero, sem óleo essencial. T – tratamento, com óleo essencial. C – controle, sem óleo essencial. Tempo de exposição ao óleo essencial (3, 6, 12, 24 e 48 horas)

Anexo 5. Figura ilustrativa para a melhor compreensão da interpretação do gráfico radar.

