

AILYN DE OLIVEIRA VILELA

**ISOTIOCIANATO DE ALILO COMO FUMIGANTE NO CONTROLE DO
CARUNCHO DE FEIJÃO-CAUPI**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Lêda Rita D'Antonino Faroni

Coorientadores: Adalberto Hipólito de Sousa
Fernanda Fernandes Heleno
Paulo Roberto Cecon

VIÇOSA – MINAS GERAIS

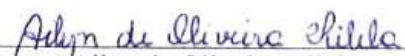
2019


AILYN DE OLIVEIRA VILELA

**ISOTIOCIANATO DE ALILO COMO FUMIGANTE NO CONTROLE DO
CARUNCHO DE FEIJÃO-CAUPI**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2019.


Ailyn de Oliveira Vilela
Autora


Lêda Rita D'Antonino Faroni
Orientadora

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

V699i Vilela, Ailyn de Oliveira, 1994-
2019 Isotiocianato de alilo como fumigante no controle do
caruncho do feijão-caupi / Ailyn de Oliveira Vilela. – Viçosa,
MG, 2019.
80 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Lêda Rita D'Antonino Faroni.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Feijão - Doenças e pragas - Controle. 2. *Callosobruchus maculatus*. 3. *Vigna unguiculata*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia Agrícola. Programa de Pós-Grauação em Engenharia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 635.6529

*Aos meus avós paternos Adélia Vilela de Souza e Gersílio Paula de Souza (in memoriam) e
avós maternos Nelzéria Ferreira de Oliveira e Nelci de Oliveira Sobrinho (in memoriam),
DEDICO.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maria Antônia Ferreira Oliveira Souza e Samuel Vilela de Souza, pelo incentivo, confiança e apoio dedicados a mim em todas as escolhas feitas durante a minha vida.

Ao meu afilhado Arthur Emanuel Vilela, por tornar o meu mundo mais bonito e divertido, mesmo que por uma chamada de vídeo.

Ao meu namorado Vinícius Lopes Nogueira, pelo amor, incentivo e carinho. Por me apoiar e compreender os momentos ausentes e por se fazer presente mesmo na distância.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Engenharia Agrícola (DEA) pela oportunidade da realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pelo apoio financeiro.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Lêda Rita D'Antonino Faroni pela oportunidade, incentivo, dedicação, exemplo e contribuições.

Aos meus coorientadores Prof. Dr. Adalberto Hipólito de Souza, Dr^ª. Fernanda Fernandes Heleno e Dr. Paulo Roberto Cecon, pelo conhecimento transmitido, dicas e ajuda.

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz por colaborar com o projeto disponibilizando tempo, recursos, equipamentos e conhecimento.

À Dr^ª. Alessandra Aparecida Zinato Rodrigues Teixeira pela disposição em ajudar no desenvolvimento do trabalho, pela prontidão em ajudar, conhecimento, convivência e amizade.

Aos colegas da Área de Armazenamento, pelos conhecimentos adquiridos juntos e pelos momentos de descontração, em especial à Jessica Lino Gomes pela parceria e amizade que vou levar para sempre, e claro, pela enorme contribuição na execução deste trabalho – BORA TIME!. Aos técnicos, José Geraldo e Edson, pela amizade, apoio e disponibilidade em ajudar.

Aos amigos que fiz em Viçosa, pelo companheirismo e amizade essenciais para suportar os dias difíceis. À Ana Paula e Cristiane por se fazerem minha família ao dividirmos o mesmo teto e compartilharmos o almoço de domingo. Ao Hiago, Juliana e Monique pela recepção e amizade na minha chegada à Viçosa. Sem vocês o caminho teria sido mais árduo.

Ao Studio Viver Bem Pilates, onde não tive somente professoras, e sim ótimas amigas. Minha eterna gratidão à fisioterapeuta Rayanna Mota, pela amizade, carinho e cuidado, por ter duas mãos e entre elas um coração!

E por fim, aos meus amigos e familiares, que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho, e que sempre me presentearam com companheirismo e palavras de incentivo.

MUITO OBRIGADA!

*“Eu sinto muito, me perdoe,
eu te amo, sou grata.”
(Ho’oponopono)*

RESUMO

VILELA, Ailyn de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Isotiocianato de alilo como fumigante para controle do caruncho de feijão-caupi.** Orientador: Lêda Rita D'Antonino Faroni. Coorientadores: Adalberto Hipólito de Sousa, Fernanda Fernandes Heleno e Paulo Roberto Cecon.

O feijão-caupi está sujeito a perdas quantitativas e qualitativas durante o armazenamento devido ao ataque do inseto-praga *Callosobruchus maculatus*. Para seu controle, os óleos essenciais têm sido reconhecidos como uma alternativa eficiente e segura. Além de apresentar toxicidade, o óleo essencial para ser introduzido comercialmente deve apresentar efeitos subletais que impeça o desenvolvimento da população de insetos, preservar a qualidade do produto e apresentar baixa persistência, garantindo a segurança alimentar. Desta forma, o presente estudo objetivou introduzir um método ecologicamente seguro e que apresenta segurança alimentar para o manejo do caruncho do feijão-caupi. O isotiocianato de alilo (AITC) foi testado quanto à sua toxicidade, efeitos sobre a oviposição, desenvolvimento populacional e taxa respiratória de *C. maculatus* e seus efeitos sobre as propriedades físicas do feijão-caupi. Além disso, foi desenvolvido e validado um método simples e eficaz para extração e quantificação dos resíduos de AITC em feijão-caupi. A toxicidade do AITC foi determinada por meio de bioensaios de concentrações letais (CLs), aplicando-se concentrações de AITC entre 5 a 13 mL m⁻³ de feijão-caupi. O desenvolvimento populacional foi avaliado por meio da oviposição, progênie e emergência diária e acumulada da população exposta às concentrações subletais (CL₁, CL₁₀, CL₃₀ e CL₅₀). Também em função das concentrações subletais, avaliou-se a taxa respiratória dos insetos, a taxa instantânea de crescimento populacional e seu efeito na qualidade do feijão-caupi após 40 dias de infestação. O método de microextração em fase sólida em *headspace* (HS-SPME) e análise por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/FID) para avaliar o resíduo de AITC em feijão-caupi foi otimizado para avaliar a influência dos fatores temperatura e tempo de extração, e foi validado conforme parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), exatidão e precisão. As CL₅₀ e CL₉₅ para os adultos de *C. maculatus* foram de 9,41 e 17,85 mL m⁻³, respectivamente. O emprego das concentrações subletais do AITC ocasionou redução da taxa respiratória de *C. maculatus*, e das taxas de oviposição e emergência de adultos, e preveniu a perda de massa dos grãos de feijão-caupi. O tratamento com a CL₁₀ (5,71 mL m⁻³) diminuiu a reprodução de *C. maculatus* e o grau de infestação dos grãos de feijão-caupi depois de 40 dias de armazenamento, e conseqüentemente, foi eficaz para a preservação das propriedades físicas dos grãos neste

período. O LOD e LOQ do método validado para quantificação de AITC foi de 0,01 e 0,03 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. O método alcançou um alto nível de seletividade, onde o coeficiente de determinação (r^2) encontrado para o AITC foi superior a 0,99, na faixa de concentração utilizada. A taxa de recuperação relativa variou de 108,2 a 114,8%, com coeficiente de variação inter-dias inferior a 9%. A avaliação da persistência do AITC em feijão-caupi por meio do método validado mostrou que em 36 h após o início da fumigação, não foi detectado a presença de resíduos de AITC nos grãos. Os resultados mostraram que o composto é potencialmente adequado para o controle de *C. maculatus*, evitando o seu desenvolvimento em ambiente de armazenagem e contribuindo para a manutenção da qualidade dos grãos de feijão-caupi. Comprovou-se, também, que, depois de 36 h, os grãos fumigados com AITC não apresentavam resíduos, demonstrando segurança do composto como fumigante.

Palavras-chave: *Callosobruchus maculatus*. *Vigna unguiculata*. AITC. HS-SPME.

ABSTRACT

VILELA, Ailyn de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Allyl isothiocyanate as a fumigant to control the cowpea weevil**. Adviser: Lêda Rita D'Antonino Faroni. Co-advisers: Adalberto Hipólito de Sousa, Fernanda Fernandes Heleno and Paulo Roberto Cecon.

The cowpea bean is subject to quantitative and qualitative losses during storage due to attacks of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus*. Aiming to control such pests, essential oils have been recognized as an efficient and safe option. Besides presenting toxicity, in order to be commercially introduced, the essential oils must exhibit sublethal effects that hinder the development of insect population, maintain product quality, and demonstrate low persistence ensuring food safety. Thus, the present study aimed to introduce an eco-friendly method for the managing the cowpea weevil. The allyl isothiocyanate (AITC) was tested for its toxicity, effects on oviposition, population development and respiratory rate of *C. maculatus* and its effects on the physical properties of the cowpea beans. In addition, a simple and effective method for extracting and quantifying AITC residues in cowpea beans was developed and validated. The toxicity of AITC was determined through bioassays of lethal concentration (CLs), applying AITC concentrations between 5 to 13 mL m⁻³ of cowpea beans. Population development was assessed through oviposition, progeny, and daily and cumulative emergence of the population exposed to sublethal concentrations (CL₁, CL₁₀, CL₃₀, and LC₅₀). Also, as a function of sublethal concentrations, the respiratory rate of insects, the instantaneous rate of population growth and its effect on the cowpea bean's quality after 40 days of infestation were evaluated. The headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and flame ionization detector gas chromatography (CG/FID) method used to evaluate AITC residue in cowpea beans was optimized to evaluate the influence of factors such as temperature and extraction time, and was validated according to parameters of selectivity, linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), accuracy and precision. LC₅₀ and LC₉₅ for adults of *C. maculatus* were 9.41 and 17.85 mL m⁻³, respectively. The use of sublethal concentrations of AITC resulted in reduced respiratory rate, oviposition and emergence of adults of *C. maculatus* and also prevented the loss of dry mass of cowpea beans. The treatment using LC₁₀ (5.71 mL m⁻³) reduced reproduction of *C. maculatus* and the degree of infestation in the cowpea beans after 40 days of storage, and consequently, it was effective in preserving the physical properties of the beans during that period. The LOD and LOQ of the validated method for AITC quantification were 0.01 and 0.03 µg kg⁻¹, respectively. The method reached a high level of

selectivity, where the determination coefficient (r^2) found for the AITC was above 0.99 in the concentration range used. The relative recovery rate ranged from 108.2 to 114.8%, with an inter-day coefficient of variation of less than 9%. The persistence of AITC in cowpea bean samples was evaluated, where 36 h after the compound fumigation residue was not detected in the grains. The results showed that the compound is potentially suitable for the control of *C. maculatus*, preventing its development in storage environment and contributing to the maintenance of cowpea bean's grain quality. It was also proved, that after 36 h, the beans fumigated with AITC did not show presence of residue, demonstrating its safety as a fumigant.

Keywords: *Callosobruchus maculatus*. *Vigna unguiculata*. AITC. HS-SPME.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
REFERÊNCIAS	16
<i>Capítulo 1 - EFEITOS TÓXICOS E FISIOLÓGICOS DO ISOTIOCIANATO DE ALILO SOBRE O CARUNCHO DO FEIJÃO-CAUPI</i>	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1 População de insetos	23
2.2 Bioensaios de toxicidade	23
2.3 Efeitos subletais do isotiocianato de alilo sobre a taxa de oviposição, progênie e taxa de desenvolvimento populacional de <i>Callosobruchus maculatus</i>	24
2.4 Perda de massa seca do feijão-caupi	25
2.5 Taxa respiratória de <i>Callosobruchus maculatus</i>	25
2.6 Análises estatísticas	26
3 RESULTADOS	26
3.1 Toxicidade.....	26
3.2 Efeitos subletais sobre a taxa de oviposição, progênie e desenvolvimento populacional de <i>Callosobruchus maculatus</i>	28
3.3 Perda de massa seca do feijão-caupi	31
3.4 Taxa respiratória	32
4 CONCLUSÃO.....	33
5 REFERÊNCIAS	34
<i>Capítulo 2 - ATIVIDADE FUMIGANTE DE ISOTIOCIANATO DE ALILO NA REPRODUÇÃO DE <i>Callosobruchus maculatus</i> E SEU EFEITO NAS PROPRIEDADES FÍSICAS DO FEIJÃO-CAUPI</i>	39
1 INTRODUÇÃO	41
2 MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1 Efeitos subletais sobre a taxa instantânea de crescimento populacional (r_i).....	43
2.2 Análises de qualidade do feijão-caupi.....	44
2.3 Análises estatísticas.....	45
3 RESULTADOS	45
3.1 Taxa instantânea de crescimento populacional (r_i)	45

3.2 Propriedades físicas dos grãos tratados com isotiocianato de alilo.....	46
4 CONCLUSÃO.....	50
5 REFERÊNCIAS	51
 <i>Capítulo 3 - MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM HEADSPACE: VALIDAÇÃO DE MÉTODO E ANÁLISE DA PERSISTÊNCIA DO ISOTIOCIANATO DE ALILO EM FEIJÃO-CAUPI</i>	
1 INTRODUÇÃO	57
2 MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1 Reagentes, soluções e matéria-prima	58
2.2 Análise cromatográfica.....	59
2.3 Microextração em fase sólida com <i>headspace</i> (HS-SPME).....	59
2.4 Otimização da fortificação da amostra de feijão-caupi.....	60
2.5 Otimização do método de microextração em fase sólida em <i>headspace</i> para amostras de feijão-caupi.....	61
2.5.1 Avaliação univariada dos tipos de fibras.....	61
2.5.2 Avaliação multivariada de tempo e temperatura de extração	61
2.6 Validação do método otimizado.....	62
2.7 Aplicação do método de microextração em fase sólida em <i>headspace</i> associado à análise por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama para avaliação de persistência de resíduo do isotiocianato de alilo em feijão-caupi.....	63
2.8 Análises estatísticas.....	64
3 RESULTADOS	64
3.1 Análise cromatográfica.....	64
3.2 Otimização da fortificação das amostras de feijão-caupi.....	65
3.3 Otimização do método de microextração em fase sólida em <i>headspace</i> para amostras de feijão-caupi.....	67
3.3.1 Avaliação da fibra.....	67
3.3.2 Avaliação multivariada de tempo e temperatura de extração	69
3.4 Validação do método otimizado.....	70
3.4.1 Seletividade do método.....	70
3.4.2 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	71
3.4.3 Linearidade de resposta do método	72
3.4.4 Exatidão e precisão intermediária.....	73

3.5 Persistência do resíduo de isotiocianato de alilo em feijão-caupi.....	74
4 CONCLUSÃO.....	75
5 REFERÊNCIAS	76
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80

INTRODUÇÃO GERAL

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], conhecido popularmente como feijão-de-corda ou fradinho, está entre as cinco leguminosas mais cultivadas no cinturão tropical, devido à sua versatilidade no cultivo e à sua tolerância à seca e às temperaturas elevadas (DUKE, 1990; BEZERRA et al., 2010). Além disso, é um alimento rico em proteínas, minerais e vitaminas e com cozimento rápido, impactando positivamente nas dietas diárias da população das regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia, Europa e Américas (DESHPANDE et al., 2011). Para preservar o valor nutricional do feijão-caupi e garantir a viabilidade para o consumo humano e para um novo cultivo, os grãos devem ser armazenados em local apropriado após a colheita. No entanto, durante o período de armazenamento, o feijão-caupi apresenta perdas quantitativas e qualitativas devido ao ataque de insetos-praga (SILVA & COSTA, 2016). Nas regiões tropicais, as perdas por infestação de insetos podem alcançar até 30% (WEAVER & PETROFF, 2005).

O *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Chrysomelidae) é o inseto-praga mais comum no feijão-caupi, podendo ocorrer tanto no campo quanto no armazenamento, o que agrava os danos causados por ele, uma vez que podem completar seu ciclo de vida sem ter que retornar ao campo (JUMBO et al, 2014; MELO et al, 2014). Seu ciclo de vida consiste em quatro estágios de desenvolvimento, ovo, larva, pupa e adulto. O besouro adulto pode chegar até 3 mm de comprimento (MELO et al., 2010), e viver por até 14 dias. As larvas são responsáveis pelos danos causados aos grãos (SAAD & ABDELGALEIL, 2018), uma vez que se alimentam e se desenvolvem em seu interior, e os adultos, por sua vez, não se alimentam e são responsáveis apenas pela reprodução (BECK & BLUMER, 2014). As fêmeas de *C. maculatus* depositam seus ovos na superfície dos grãos de feijão-caupi. Depois da eclosão as larvas penetram nos grãos, transformam-se em pupas e, ao emergirem, os adultos rompem os grãos e iniciam um novo ciclo biológico (OLIVEIRA et al., 2014).

O controle de insetos-praga de produtos armazenados é feito principalmente por meio da fumigação com fosfina (MAPA, 2019). No entanto, seu uso intensivo e práticas inadequadas de aplicação levaram ao desenvolvimento de populações resistentes (PIMENTEL et al., 2010), à problemas ambientais e efeitos adversos em organismos não-alvo (KUMAR et al., 2012). Assim, tem havido um esforço para encontrar produtos naturais oriundos de plantas que possam ser usados como biopesticidas, sendo ferramentas alternativas seguras e ecológicas (AKTAR et al., 2009; HU et al., 2017). Óleos essenciais e seus constituintes majoritários estão ganhando importância para o desenvolvimento de pesticidas (ISMAN, 2017).

Os vegetais da família Brassicaceae, como brócolis, rabanete e mostarda, são conhecidos por produzir altas concentrações de isotiociantos (ITCs). Estes compostos são naturalmente formados após a hidrólise dos glucosinolatos e atuam como um mecanismo de defesa das plantas contra insetos, herbívoros e microrganismos que causam doenças (DHINGRA et al., 2004; ZHANG, 2010). Dentre os glucosinolatos existentes, a sinigrina encontrada na mostarda marrom (*Brassica juncea* L.) e na mostarda preta (*B. nigra* L.), quando hidrolisada pela enzima mirosinase após o dano tecidual, é convertida em isotiocianato de alilo (AITC) (KAWAKISHI & NAMIKI, 1969; ZHAO et al., 2007). Desta forma, a obtenção natural do AITC se dá pela hidrodestilação de tecidos vegetais macerados.

O rendimento de AITC nos vegetais pode variar significativamente devido à presença da proteína *epithiospecifier* que promove a formação de epitionitrila ao custo do AITC (RUNGAPAMESTRY et al., 2006), além do nível de glucosinolatos, que é influenciado por fatores bióticos e abióticos, como a espécie, o estágio de desenvolvimento, a parte da planta e as condições ambientais e práticas agrônômicas do cultivo (HOPKINS et al., 2009; JAHGANGIR et al., 2009; YADAV & RANA, 2018). Essa variação dificulta a padronização na qualidade e composição desses biopesticidas, tornando-se a diferença principal entre a sua produção e a fabricação de defensivos sintéticos (MIRESMAILLI & ISMAN, 2014; WALIA et al., 2017). No caso do AITC a sua vantagem em relação a essa preocupação é que o mesmo pode ser produzido sinteticamente por meio da reação química do cloreto de alilo com o tiocianato de potássio (ROMANOWKI & KLENK, 2005).

O AITC é um composto volátil e a densidade do vapor produzido é 3,4 vezes maior que a do ar. Sua pequena molécula pode penetrar em alimentos armazenados por meio da fumigação, apresentando potencial atividade inseticida no controle das fases imaturas de *C. maculatus* que se desenvolvem dentro dos grãos. Assim, é possível considerar também os efeitos subletais deste composto, que podem resultar na manutenção da qualidade dos grãos armazenados devido à redução da vitabilidade, fecundidade e capacidade de se alimentar da espécie. Além da capacidade de controlar o desenvolvimento da espécie em estudo, um bioinseticida deve apresentar segurança à saúde humana e ao meio ambiente e baixa persistência (SAAD & ABDELGALEIL, 2018), para, a partir destes estudos, a aplicação comercial ser considerada (SALUNKE et al., 2005).

Para a verificação de resíduo dos pesticidas, a cromatografia gasosa (GC) associada à técnica de microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME) vem sendo empregada extensivamente na extração de resíduos de pesticidas em matrizes ambientais e de alimentos (CHAI et al., 2008; MENEZES FILHO et al., 2010; ABDULRA'UF & TAN, 2015; LI et al.,

2018) permitindo a separação, identificação e quantificação desses compostos. A SPME se destaca por não causar danos ao meio ambiente (WARDENCKI et al., 2007), por não empregar solvente orgânico e por ser uma técnica simples, rápida e de baixo custo. O método HS-SPME consiste em uma fibra de sílica fundida, revestida com uma fase estacionária polimérica introduzida em uma amostra de gás, e envolve dois processos: o particionamento dos analitos entre o revestimento e a amostra e a dessorção térmica dos analitos em cromatógrafo gasoso (ZHAO et al., 2007).

O objetivo deste estudo foi analisar o potencial inseticida, associado aos efeitos subletais, do isotiocianato de alilo no manejo do *Callosobruchus maculatus*, além de monitorar a sua persistência em feijão-caupi.

REFERÊNCIAS

- ABDULRA'UF, L. B.; TAN, G. H. Chemometric approach to the optimization of HS-SPME/GC-MS for the determination of multiclass pesticide residues in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v.177, p.267-273, 2015.
- AKTAR, M.W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary Toxicology**, v.2, p.1-12, 2009.
- BECK, C. W.; BLUMER, L. S. A handbook on bean beetles, *Callosobruchus maculatus*. **National Science Foundation**, 2014.
- BEZERRA, A. K. P.; LACERDA, C. F. de; HERNANDEZ, F. F. F.; DA SILVA, F. B.; GHEYI, H. R. Rotação cultural feijão caupi/milho utilizando-se águas de salinidades diferentes. **Ciência Rural**, v.40, n.5, p.1075-1082, 2010.
- CHAI, M.; TAN, G.; LAL, A. Optimization of headspace solid-phase microextraction for the determination of pesticides residues in vegetables and fruits. **Analytical Sciences**, v.24, p.273-276, 2008.
- DESHPANDE, V. K.; MAKANUR, B.; DESHPANDE, S. K.; ADIGER, S.; SALIMATH, P. M. Quantitative and qualitative losses caused by *Callosobruchus maculatus* in cowpea during seed storage. **Plant Archives**, v.11, n.2, p.723-731, 2011.
- DHINGRA, O. D.; COSTA, M. L.; SILVA JR, G. J.; MIZUBUTI, E. S. Essential oil of mustard to control *Rhizoctonia solani* causing seedling damping off and seedling blight in nursery. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.6, p.683-686, 2004.
- DUKE, J. A. Introduction to food legumes. In SINGH, S. R. Insect pests of tropical food legumes. **John Wiley & Sons**, Chichester, p.1-42, 1990.
- HOPKINS, R. J.; VAN DAM, N. M.; VAN LOON, J. J. A. Role of glucosinolates in insect plant relationships and multitrophic interactions. **Annual Review Entomology**, v.54, p.57-83, 2009.
- HU, W.; ZHANG, N.; CHEN, H.; ZHONG, B.; YANG, A.; KUANG, F.; OUYANG, Z.; CHUN, J. Fumigant activity of sweet orange essential oil fractions against red imported fire ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Economic Entomology**, v.110, p.1556-156, 2017.
- ISMAN, M. B. Bridging the gap: moving botanical insecticides from the laboratory to the farm. **Industrial Crops and Products**, v.110, p.10-14, 2017.
- JAHGANGIR, M. J.; KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Health-affecting compounds in Brassicaceae. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.8, p.31-34, 2009.

JUMBO, L. O. V.; FARONI, L. R. A.; OLIVEIRA, E. E.; PIMENTEL, M. A.; SILVA, G. N. Potential use of clove and cinnamon essential oils to control the bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* Say, in small storage units. **Industrial Crops and Products**, v.56, p.27-34, 2014.

KAWAKISHI, S.; NAMIKI, M. Decomposition of allyl isothiocyanate in aqueous solution. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.33, n.3, p.452-459, 1969.

KUMAR, N.; PATHERA, A. K.; SAINI, P.; KUMAR, M. Harmful effects of pesticides on human health. **Annals of Agri-Bio Research**, v.17, n.2, p.125-127, 2012.

LI, J.; ZHANG, Z.; SUN, M.; ZHANG, B.; FAN, C. Use of a headspace solid-phase microextraction-based methodology followed by gas chromatography–tandem mass spectrometry for pesticide multiresidue determination in teas. **Chromatographia**, v.81, n.5, p.809-821, 2018.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Agrofit – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acessado em: 10 mar. 2019.

MELO, R. D. A.; FORTI, V. A.; CICERO, S. M.; NOVEMBRE, A. D.; MELO, P. C. T. Use of x-ray to evaluate damage caused by weevils in cowpea seeds. **Horticultura Brasileira**, v.28, n.4, p.472-476, 2010.

MELO, B. A.; MOLINA-RUGAMA, A. J.; LEITE, D. T.; GODOY, M. S. de; ARAUJO, E. L. de. Bioatividade de pós de espécies vegetais sobre a reprodução de *Callosobruchus maculatus* (Fabr. 1775) (Coleoptera: Bruchidae). **Bioscience Journal**, v.30, n.3, 2014.

MENEZES FILHO, A.; SANTOS, F. N. dos; PEREIRA, P. A. de P. Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC-MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. **Talanta**, v.81, n.1-2, p.346-354, 2010.

MIRESMAILLI, S.; ISMAN, M. B. Botanical insecticides inspired by plant–herbivore chemical interactions. **Trends in Plant Science**, v.19, n.1, p.29-35, 2014.

OLIVEIRA, G. B.; KUNZ, D.; PERES, T. V.; LEAL, R. B.; UCHÔA, A. F.; SAMUELS, R. I.; MACEDO, M. L. R.; CARLINI, C. R.; RIBEIRO, A. F.; GRANGEIRO, T. B.; TERRA, W. R.; XAVIER-FILHO, J.; SILVA, C. P. Variant vicilinc from a resistant *Vigna unguiculata* lineage (IT81D-1053) accumulate inside *Callosobruchus maculatus* larval midgut epithelium. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.168, p.45-52, 2014.

PIMENTEL, M. A.; FARONI, L. R. A.; DA SILVA, F. H.; BATISTA, M. D.; GUEDES, R. N. Spread of phosphine resistance among Brazilian populations of three species of stored product insects. **Neotropical Entomology**, v.39, n.1, p.101-107, 2010.

ROMANOWSKI, F.; KLENK, H. Thiocyanates and isothiocyanates, organic. In: DEGUSSA, A.G. Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. **Wiley-VCH**, Weinheim, Germany, p.749-759, 2005.

RUNGAPAMESTRY, V.; DUNCAN, A. J.; FULLER, Z.; RATCLIFFE, B. Changes in glucosinolate concentrations, myrosinase activity, and production of metabolites of glucosinolates in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cooked for different durations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.7628-7634, 2006.

SAAD, M. M. G.; ABDELGALEIL, S. A. M. Effectiveness of monoterpenes and phenylpropenes on *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae) in stored wheat. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v.21, n.4, p.1153-1158, 2018.

SALUNKE, B. K.; KOTKAR, H. M.; MENDKI, P. S.; UPASANI, S. M.; MAHESHWARI, V. L. Efficacy of flavonoids in controlling *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae), a post-harvest pest of grain legumes. **Crop Protection**, v.24, n.10, p.888-893, 2005.

SILVA, T. T.; COSTA, F. M. Survey of insects that attack stored bean grains *Vigna unguiculata* (L.) and *Phaseolus vulgaris* L. in Porto Velho, Rondônia, Brazil. **EntomoBrasilis**, v.9, n.2, p.124-128, 2016.

WALIA, S.; SAHA, S.; TRIPATHI, V.; & SHARMA, K. K. Phytochemical biopesticides: some recent developments. **Phytochemistry Reviews**, v.16, n.5, p.989-1007, 2017.

WARDENCKI, W.; CURYLO, J.; NAMIESNIK, J. Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.70, n.2, p.275-288, 2007.

WEAVER, D. K.; PETROFF, A. R. Pest management for grain storage and fumigation. **Department of Entomology, Montana State University**, v.333, 2005.

YADAV, M.; RANA, J. S. Quantitative analysis of sinigrin in *Brassica juncea*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.7, n.2, p.948-954, 2018.

ZHANG, Y. Allyl isothiocyanate as a cancer chemopreventive phytochemical. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.54, n.1, p.127-135, 2010.

ZHAO, D.; TANG, J.; DING, X. Analysis of volatile components during potherb mustard (*Brassica juncea*, Coss.) pickle fermentation using SPME–GC–MS. **LWT-Food Science and Technology**, v.40, n.3, p.439-447, 2007.

EFEITOS TÓXICOS E FISIOLÓGICOS DO ISOTIOCIANATO DE ALILO SOBRE O CARUNCHO DO FEIJÃO-CAUPI

RESUMO: Este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade do isotiocianato de alilo (AITC) em adultos de *Callosobruchus maculatus* Fabr. (Coleoptera: Chrysomelidae) e seus efeitos sobre a oviposição, desenvolvimento populacional, taxa respiratória dos insetos e perda de massa seca dos grãos de feijão-caupi. A toxicidade do AITC foi determinada por bioensaio de concentrações letais (CL), em que as curvas de mortalidade foram estabelecidas usando concentrações crescentes de AITC variando de 5 a 13 mL m⁻³ de feijão-caupi. O desenvolvimento populacional foi avaliado por meio da oviposição, progênie e emergência diária e acumulada nas concentrações subletais (CL₁, CL₁₀, CL₃₀ e CL₅₀). Além disso, a perda de massa seca dos grãos, causada pela prole de *C. maculatus*, e a taxa respiratória dos adultos quando submetidos ao AITC foram avaliadas. As CL₅₀ e CL₉₅ para os adultos de *C. maculatus* foram de 9,41 e 17,85 mL m⁻³, respectivamente. O emprego das concentrações subletais do AITC (CL₁ = 3,81 mL m⁻³, CL₁₀ = 5,71 mL m⁻³, CL₃₀ = 7,67 mL m⁻³ e CL₅₀ = 9,41 mL m⁻³) ocasionou redução da taxa respiratória de *C. maculatus* e das taxas de oviposição e emergência de adultos, e preveniu a perda de massa dos grãos de feijão-caupi. Os resultados mostraram que o composto é potencialmente adequado para o controle de *C. maculatus*, evitando o seu desenvolvimento em ambiente de armazenagem.

Palavras-chave: *Callosobruchus maculatus*, *Vigna unguiculata*, bioinseticida.

TOXIC AND PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF ALLYL ISOTHIOCYANATE ON THE COWPEA WEEVIL

ABSTRACT: The goal of this study was to evaluate the toxicity of allyl isothiocyanate (AITC) in *Callosobruchus maculatus* Fabr. (Coleoptera: Chrysomelidae) adults and its effects on oviposition, population development, respiratory rate and dry weight loss of cowpea beans. AITC's toxicity was determined by lethal concentration bioassay (LC), where mortality curves were established using increasing concentrations of AITC ranging from 5 to 13 mL m⁻³ cowpea beans. Population development was assessed through oviposition, progeny, and daily and cumulative emergence at sublethal concentrations (LC₁, LC₁₀, LC₃₀ and LC₅₀). In addition, the loss of grain dry mass caused by *C. maculatus* offspring and the respiratory rate of adults when submitted to AITC were evaluated. LC₅₀ and LC₉₅ for adults of *C. maculatus* were 9.41 and 17.85 mL m⁻³, respectively. The use of sublethal concentrations of AITC (LC₁ = 3.81 mL m⁻³, LC₁₀ = 5.71 mL m⁻³, LC₃₀ = 7.67 mL m⁻³ e LC₅₀ = 9.41 mL m⁻³) resulted in reduced respiratory rate, oviposition and emergence of adults of *C. maculatus* and also prevented the loss of dry mass of cowpea beans. The results showed that the compound is potentially suitable for the control of *C. maculatus*, preventing its development in the storage environment.

Keywords: *Callosobruchus maculatus*, *Vigna unguiculata*, bioinsecticide.

1 INTRODUÇÃO

Insetos-praga, da ordem Coleoptera, são um problema em produtos armazenados, particularmente nos trópicos (PIMENTEL et al., 2010). A importância relativa das diferentes espécies varia entre as áreas e depende do produto armazenado (CHAMP & DYTE, 1976). O método empregado para controlar estes insetos em climas quentes é o uso de inseticidas convencionais devido à falta de alternativas de controle (DEY, 2016). Dentre eles, a fumigação com fosfina tem sido utilizada por quase meio século para eliminar insetos-praga da maioria dos grãos e outras mercadorias armazenadas (PRICE & MILLS, 1988; OPIT et al., 2016). No entanto, o uso a longo prazo de um único fumigante aumenta o risco de desenvolvimento de resistência em populações de insetos-praga (SOUSA et al., 2009; TAY et al., 2016), sendo que algumas espécies já apresentam 100% de sobrevivência na concentração discriminante de fosfina (PIMENTEL et al., 2010).

O gorgulho do feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], o *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Chrysomelidae), é uma praga de grãos de leguminosas tanto no campo quanto no armazenamento (DESHPANDE et al., 2011; SRIVASTAVA & SUBRAMANIAN, 2016). Além do feijão-caupi, é praga de ervilhas, grão-de-bico, feijão-guandu, entre outras espécies. O dano causado é consequência da colonização do interior dos grãos pelas larvas, causando perda de peso, desvalorização comercial e redução do valor nutritivo e da sanidade do produto por meio da presença de fezes, ovos e insetos (OKE et al., 2015; SRIVASTAVA & SUBRAMANIAN, 2016; AKAMI et al., 2017). Além disso, o dano ocasionado nos grãos também favorece a ocorrência de fungos e pragas secundárias. Para o controle de *C. maculatus*, o único inseticida registrado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2019) é a fosfina, e seu uso é difundido devido ao seu baixo custo, rápida difusão no ar e ausência de resíduos detectáveis nos produtos tratados. Porém, devido aos problemas de resistência em algumas espécies e a busca por inseticidas *eco-friendly*, aumentou-se o interesse em gerar diferentes estratégias de controle, sendo preferível que as mesmas apresentem características semelhantes às da fosfina (COSIMI et al., 2009; SANTOS et al., 2011).

Os óleos essenciais e seus constituintes se destacam como alternativas aos inseticidas convencionais devido à sua limitada persistência no meio ambiente, baixa toxicidade em mamíferos e baixa probabilidade de gerar resistência (SPOCHACZ et al., 2018). Numerosos estudos demonstraram que os óleos essenciais têm potencial como inseticidas e repelentes (TRIVEDI et al., 2018). Além disso, muitos deles foram estudados por seu efeito fumigante e

repelente em pragas, incluindo o isotiocianato de alilo (AITC), que é o composto majoritário do óleo essencial de mostarda (*Brassica nigra* L.). Os estudos das substâncias nativas presentes nos óleos essenciais são interessantes não apenas como inseticidas, mas também como “pontos de partida” para novas substâncias mais ativas (SPOCHACZ et al., 2018). Um exemplo é a classe de inseticidas dos piretróides, que foram sintetizados a partir de princípios ativos existentes nas flores secas do *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis., e tem como benefícios o baixo tempo de semi-vida e a baixa toxicidade para os mamíferos (ELLIOTT & JANES, 1978).

O AITC pode ser obtido naturalmente por hidrodestilação de tecidos vegetais do gênero *Brassica* ou sintetizados quimicamente pela reação de cloreto de alilo e tiocianato de potássio (ROMANOWKI & KLENK, 2005). Em vegetais, é gerado a partir de um metabólito secundário chamado sinigrina, a qual libera o AITC por meio da ação da mirosinase quando o tecido da planta é rompido (MARTON & LAVRIC, 2013). Nos Estados Unidos existem cinco registros ativos pela U. S. Environmental Protection Agency (EPA, 2019) onde o AITC é utilizado no tratamento foliar de algumas espécies de plantas ornamentais e relvas. Também, seu uso já foi relatado como inseticida (TSAO et al., 2002; HAMDÍ et al., 2015), fungicida (DHINGRA et al., 2004; TRACZ et al., 2017; REYES-JURADO, et al., 2019), bactericida (DELAQUIS & SHOLBERG, 1997; LIN et al., 2000) e nematocida (ZASADA & FERRIS, 2003; NEVES et al., 2005). Além disso, sua atividade inseticida fumigante também foi relatada contra insetos-praga de produtos armazenados. Wu et al. (2009), estudando o uso do AITC para controle de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae), *Rhyzopertha dominica* Fabr. (Coleoptera: Bostrichidae), *Liposcelis entomophila* End. (Psocoptera: Liposcelididae) e *Tribolium ferrugineum* Fabr. (Coleoptera: Tenebrionidae), encontraram uma mortalidade de 100% quando aplicado $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ em um período de exposição de 72 h. Também vale destacar que não foi constatada resistência cruzada entre o AITC e a fosfina em populações de *S. zeamais* e *T. castaneum* Herbst (SANTOS et al., 2011; FREITAS et al., 2016). Também para *S. zeamais*, a aplicação do AITC por fumigação causou 100% de mortalidade em todas as fases da espécie (PAES et al., 2012; SOUZA et al., 2018), mostrando ser uma alternativa em potencial para seu controle.

Os estudos de toxicidade de compostos botânicos são geralmente focados em estimativas de letalidade, contudo os efeitos subletais também são consideráveis, já que podem resultar em diminuição da perda dos grãos armazenados, devido à menor vitalidade ocasionada para os insetos, fecundidade ou capacidade de alimentação destes (SAID & PASHTE et al., 2015; CHOWANSKI et al., 2016; TRIVEDI et al., 2018). Sendo assim, este trabalho teve como objetivos avaliar a toxicidade do AITC sobre adultos de *C. maculatus* e analisar o efeito das

concentrações subletais na oviposição, desenvolvimento e taxa respiratória dos insetos, além de quantificar a perda de massa seca dos grãos de feijão-caupi.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Setor de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Foram utilizados grãos de feijão-caupi da variedade BRS Guariba, com 10% de umidade e massa específica aparente de 796 kg m^{-3} , cultivados no estado do Maranhão, Brasil [latitude $4^{\circ} 27' 18''$ (S), longitude $43^{\circ} 53' 09''$ (W) e altitude de 43 m]. A formulação comercial de AITC utilizada foi adquirida da Sigma-Aldrich, Estados Unidos, com 94% de pureza.

2.1 População de insetos

Adultos de *C. maculatus* foram obtidos no município de Crato, Ceará, Brasil em 2014. Deste então, a população é criada e mantida no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas de Grãos da Universidade Federal de Viçosa (MG), utilizando recipientes de vidro de 1,5 L, fechados com tampa plástica perfurada e revestida internamente com organza para permitir as trocas gasosas, sob temperatura controlada em câmara climática tipo B.O.D. à $27 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $60 \pm 5\%$ e escotofase de 24 h. Como substrato alimentar, são usados grãos de feijão-caupi inteiros, livres de pesticidas, com 10% de umidade, previamente expurgados e mantidos sob refrigeração ($-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$) para evitar reinfestação. Para a formação da colônia de insetos para este estudo, adultos de *C. maculatus* foram confinados durante 10 dias para efetuarem a postura, na proporção de 20 insetos para cada 50 g de substrato, conforme recomendação de Beck e Blumer (2014). O feijão-caupi infestado foi estocado até a emergência da geração F_1 e peneirado todos os dias para retirada dos adultos emergidos, de forma a garantir o controle de idade de 24 h. Esse procedimento foi efetuado durante todo o período dos bioensaios.

2.2 Bioensaios de toxicidade

A toxicidade do AITC para a população de *C. maculatus* foi avaliada por meio de estimativas das concentrações letais para 50 e 95% dos insetos adultos (CL_{50} e CL_{95}). Para isso, uma curva concentração-resposta foi gerada mediante bioensaios com exposição ao AITC em

concentrações que variaram de 5 a 13 mL m⁻³ de grão, as quais foram definidas em ensaios preliminares. Os bioensaios foram feitos em câmara climática tipo B.O.D. (27 ± 2 °C), umidade relativa do ar constante ($60 \pm 5\%$) e escotofase de 24 h. Foram utilizados insetos adultos não-sexados, com idade de até 24 h.

Cinquenta adultos de *C. maculatus* foram introduzidos em recipientes de vidro, com capacidade para 0,3 L (6,5 x 13,0 cm), totalmente preenchido de grãos de feijão-caupi (240 g \pm 1 g). O AITC foi aplicado em papel filtro de 5 cm de diâmetro, com o auxílio de um microseringa (10 μ L) (Hamilton Company, USA). Na parte superior do recipiente foi adaptado um suporte de PVC recoberto por tecido de organza com altura de 1 cm para simular um *plenum*, evitando o contato direto dos insetos com o papel filtro umidificado com AITC. Cada tratamento foi realizado em 4 replicatas. O tratamento controle foi realizado nas mesmas condições, porém, o papel filtro foi colocado sem aplicação de AITC. Os frascos foram fechados com tampa metálica rosqueável e vedados com parafilme (PM996, American, USA). Após o período de exposição por 24 h ao vapor do AITC, os recipientes foram abertos, a mortalidade foi avaliada e os insetos foram transferidos para frascos sem tratamento com inseticida e mantidos sob as mesmas condições para posterior confirmação da mortalidade com 48 h. Os insetos foram considerados mortos somente quando seus apêndices não exibiam nenhum movimento observável após serem estimulados com um pincel fino.

2.3 Efeitos subletais do isotiocianto de alilo sobre a taxa de oviposição, progênie e taxa de desenvolvimento populacional de *Callosobruchus maculatus*

Os bioensaios para determinação da taxa de oviposição e da progênie foram executados simultaneamente. Os insetos com até 24 h de idade foram expostos à quatro concentrações subletais ($CL_1 = 3,81$ mL m⁻³, $CL_{10} = 5,71$ mL m⁻³, $CL_{30} = 7,67$ mL m⁻³ e $CL_{50} = 9,41$ mL m⁻³) seguindo o mesmo procedimento de aplicação do AITC descrito para o bioensaio de toxicidade. Após 24 h de exposição, 20 insetos sobreviventes de cada repetição foram colocados para colonizar 50 g do feijão-caupi tratado, armazenados em câmara climática tipo B.O.D., sob condições constantes de temperatura (27 ± 2 °C), umidade relativa do ar constante ($60 \pm 5\%$) e escotofase de 24 h.

Para a determinação da taxa de oviposição, os insetos foram retirados após mortalidade, e o número de ovos em cada grão foi contabilizado. Para a avaliação da progênie, os grãos foram mantidos nas mesmas condições e contabilizou-se o número de adultos emergidos no substrato alimentar. Aproveitando-se das condições do experimento, a contagem dos novos

insetos foi realizada diariamente a partir da primeira emergência (19 dias após o início do período de oviposição) até a última emergência, sendo possível o cálculo de emergência acumulada e diária.

2.4 Perda de massa seca do feijão-caupi

A perda de massa seca foi determinada a partir do teste de desenvolvimento populacional. Os grãos foram pesados no início e ao final do período de emergência da geração F₁, em balança analítica (BK8000, Gehaka, Brasil). Simultaneamente com a pesagem dos grãos, determinou-se o teor de água das amostras para posterior correção do peso total e determinação da massa seca do feijão-caupi. A perda de massa seca do feijão-caupi foi determinada de acordo com a metodologia apresentada por Marcondes et al. (2013) (Equação 1) e expressa em porcentagem.

$$PM = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad (1)$$

em que M_i é a massa inicial e M_f é a massa final dos grãos.

2.5 Taxa respiratória de *Callosobruchus maculatus*

Para avaliação da taxa respiratória, utilizou-se um respirômetro do tipo TR2 equipado com um analisador de CO₂ (Sable System International, Las Vegas, USA). Os ensaios foram realizados em condições de laboratório (25 °C). Para mensuração da taxa respiratória média (produção de CO₂) foram utilizadas quatro repetições de 10 insetos adultos não-sexados, previamente submetidos à exposição de concentrações subletais de AITC (CL₁, CL₁₀, CL₃₀, CL₅₀) e controle (insetos não tratados com AITC), utilizando-se o mesmo procedimento do bioensaio de toxicidade. Após 2 h de exposição ao vapor de AITC, os insetos foram acondicionados em câmaras de 25 mL conectadas a um sistema completamente fechado. Para fazer a varredura de todo o CO₂ produzido no interior de cada câmara (μmol de CO₂ h⁻¹), procedeu-se à passagem de ar isento de CO₂ em fluxo de 600 mL min⁻¹ por um período de 2 min. Essa corrente de ar faz com que todas as moléculas de CO₂ produzidas passem por um leitor de infravermelho acoplado ao sistema, que continuamente faz a mensuração do CO₂ produzido pelos insetos contidos no interior de cada câmara. Como controle, utilizou-se uma câmara respirométrica sem insetos. A produção de CO₂ de cada tratamento foi normalizada em massa, dividindo-a pela massa corporal dos insetos.

2.6 Análises estatísticas

Os dados de mortalidade de insetos para cada tratamento foram corrigidos usando a fórmula de Abbott (ABBOTT, 1925), e os resultados foram submetidos à análise de Probit (PROC PROBIT; SAS Institute, 2011), gerando assim a curva de concentração-mortalidade.

Os dados de oviposição e progênie dos insetos foram submetidos a análise de regressão em função da concentração de AITC. Os dados de emergência diária e acumulada foram submetidos a ajustes não-lineares em função dos dias de emergência, utilizando-se modelos disponíveis no *software* SigmaPlot, versão 13.1 (SYSTAT SOFTWARE, INC., San Jose, CA, USA). Ressalta-se que a emergência acumulada foi analisada porque o modo de comparação é simples e os erros experimentais podem ser maiores com os dados das avaliações diárias (TREMATERRA et al., 1996).

A porcentagem de perda de massa seca e os dados respirométricos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de comparação de média Tukey, utilizando-se o *software* Statistica, versão 10 (STATSOFT, INC., Tulsa, OK, USA).

3 RESULTADOS

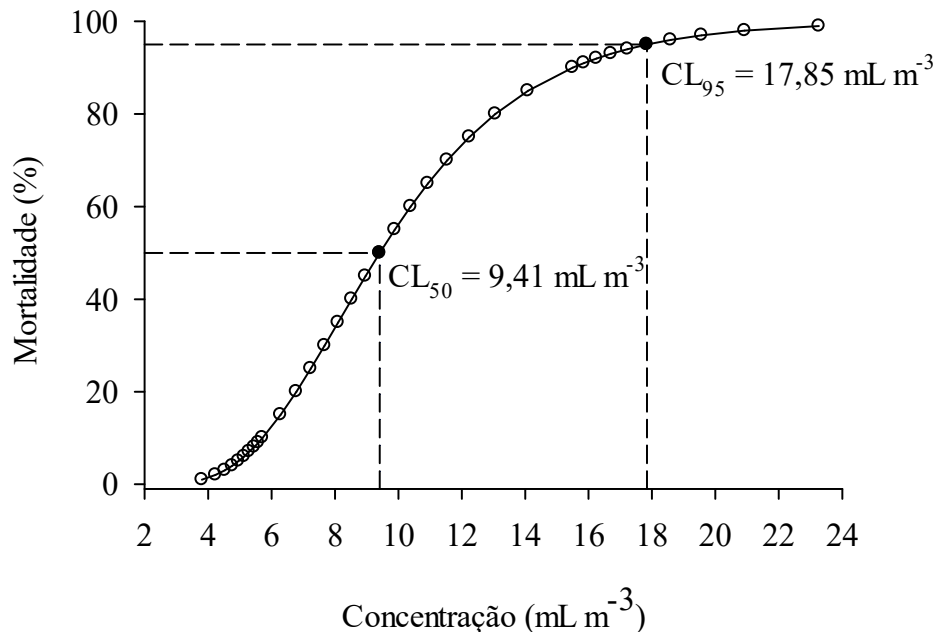
3.1 Toxicidade

Uma curva de concentração-mortalidade foi utilizada para confirmar a susceptibilidade de adultos *C. maculatus* ao AITC. O baixo valor de χ^2 e o elevado valor de P obtidos ($\chi^2 = 6,67$ e $P = 0,15$) indicam a adequação do modelo Probit para as estimativas pretendidas. As concentrações letais para 50 e 95% de mortalidade dos insetos (CL_{50} e CL_{95}) foram 9,41 (9,10 – 9,74) e 17,85 (16,48 – 19,71) mL m⁻³ de volume fumigado, respectivamente (Figura 1). O valor de inclinação da curva foi de $5,92 \pm 0,35$, indicando que pequenas variações na concentração de AITC promovem grandes variações na mortalidade de *C. maculatus*.

Os efeitos tóxicos do AITC já foram relatados anteriormente para *C. maculatus*, porém utilizando-se pouco ou nenhum grão durante os ensaios, uma vez que o escopo destas investigações eram comprovar a bioatividade do AITC. Os bioensaios de fumigação de Simões et al. (2007) foram realizados em frascos de vidro de 800 mL com ausência de grãos; os mesmos encontraram a CL_{50} de $0,576 \mu\text{L L}^{-1}$ de ar e a CL_{95} de $1,137 \mu\text{L L}^{-1}$ de ar para *C. maculatus*. O estudo de Sousa et al. (2014) foi realizado de forma semelhante, porém com a utilização de 10

g de feijão-caupi em cada amostra dos bioensaios, e eles encontraram uma CL_{50} de $1,20 \mu\text{L L}^{-1}$ de ar.

Figura 1 – Toxicidade fumigante do isotiocianato de alilo sobre *Callosobruchus maculatus* em feijão-caupi.



Fonte: A autora (2019).

Assim, é notável a importância do estudo acerca da toxicidade de um composto, aplicando-o em um recipiente preenchido pelo produto para não superestimar a toxicidade de um fumigante. Esse parecer corrobora com os resultados encontrados por Quiles et al. (2019), que observaram, durante um experimento utilizando AITC como fungicida por fumigação, que quanto maior o volume de grãos maior deve ser a concentração de AITC para alcançar um efeito inibitório total da população fúngica em cevada, milho e trigo. Da mesma forma, Lu et al (2013) descobriram que a presença da farinha de trigo afetou negativamente a toxicidade da alicina devido a uma porcentagem constante de sorção pelo trigo a ser fumigado, aumentando as concentrações letais em mais de 17, 7 e 9 vezes contra *T. castaneum*, *Oryzaephilus surinamensis* L. (Coleoptera: Silvanidae) e *Cryptolestes ferrugineus* Steph. (Coleoptera: Laemophloeidae), respectivamente.

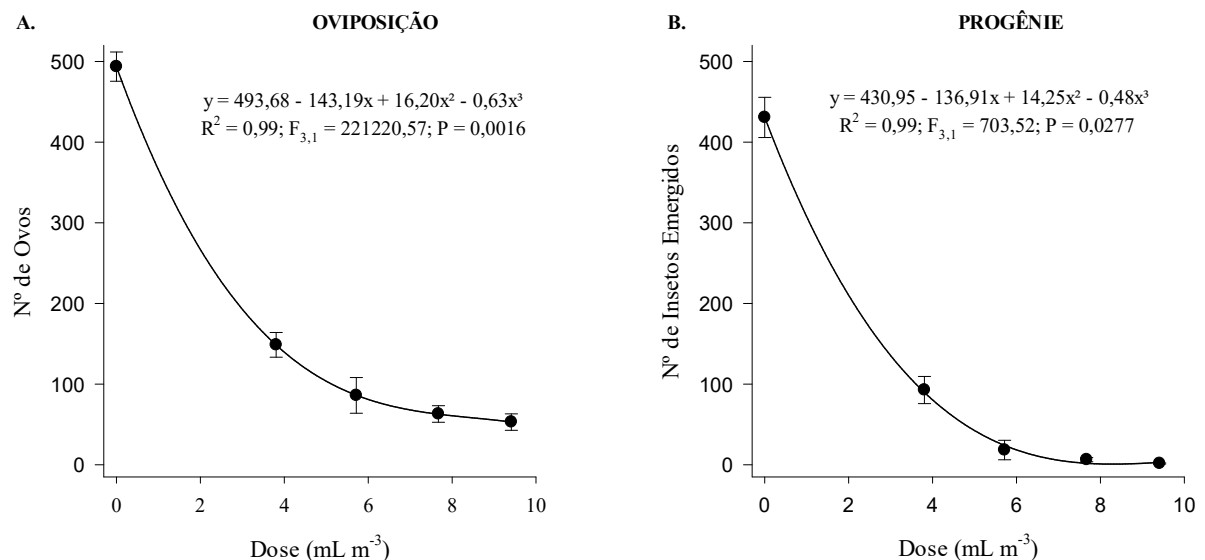
O efeito tóxico do óleo essencial de mostarda também foi relatado nos estágios imaturos de *C. maculatus* em concentrações CL_{50} inferiores a $4 \mu\text{L L}^{-1}$ de ar, indicando a capacidade do AITC de penetrar nos grãos e matar os estágios internos (SOUSA et al., 2014). Os mesmos autores encontraram inclinações das curvas de concentração-mortalidade semelhante entre os

estágios de desenvolvimento, indicando homogeneidade de resposta dentro da população testada nos bioensaios.

3.2 Efeitos subletais sobre a taxa de oviposição, progênie e desenvolvimento populacional de *Callosobruchus maculatus*

Para descrever a taxa de oviposição (Figura 2A) e a progênie adulta (Figura 2B) de *C. maculatus*, o modelo polinomial cúbico ($y=a+bx+cx^2+dx^3$) foi o que apresentou o melhor ajuste. A oviposição e a progênie dos adultos expostos ao AITC na menor concentração utilizada ($CL_1 = 3,81 \text{ mL m}^{-3}$) foram substancialmente menores que no controle, apresentando uma redução de 69,9 e 78,5%, respectivamente. O decréscimo na oviposição e na progênie adulta foi proporcional ao aumento da concentração de AITC ($P < 0,0001$), chegando a uma redução de 89,3 e 99,6%, respectivamente, quando aplicado a CL_{50} ($9,41 \text{ mL m}^{-3}$). Estes resultados confirmam a eficácia do AITC no controle da população de *C. maculatus*, indicando que os vapores liberados no feijão-caupi foram sorvidos pelos grãos e, conseqüentemente, foram efetivos no controle das fases imaturas do bruquídeo.

Figura 2 – Taxas de oviposição (A) e de emergência (B) de *Callosobruchus maculatus* em grãos de feijão-caupi fumigados com isotiocianato de alilo.

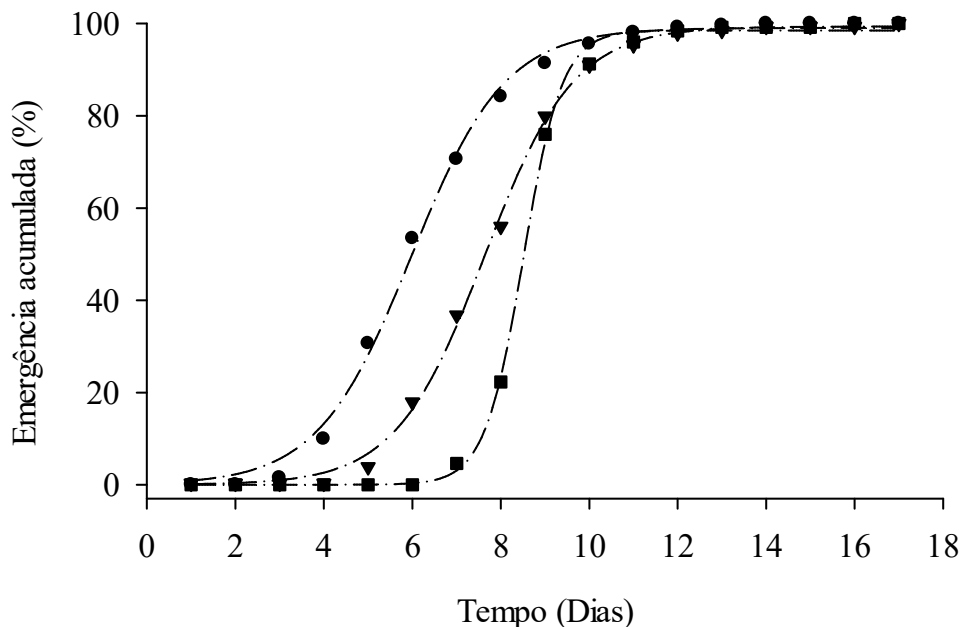


Fonte: A autora (2019).

Para a emergência acumulada de *C. maculatus* em relação as concentrações subletais aplicadas no feijão-caupi, o modelo sigmoidal de três parâmetros ($y=a/(1+\exp(-(x-b)/c))$) foi o

que melhor se ajustou (Figura 3). O parâmetro b da equação estimada mostra o valor do ponto de inflexão (Tabela 1), o qual representa a quantidade de dias para que a emergência acumulada alcance 50%, ou seja, houve um atraso na emergência dos insetos oriundos de feijão-caupi tratados com as concentrações subletais CL_1 ($3,81 \text{ mL m}^{-3}$) e CL_{10} ($5,71 \text{ mL m}^{-3}$) de AITC. No sexto dia, a emergência acumulada dos adultos provenientes de grãos não tratados alcançou 50%, já nos grãos tratados com a CL_1 e a CL_{10} , a mesma se deu por volta do oitavo dia de emergência.

Figura 3 – Efeito do isotiocianato de alilo sobre a emergência acumulada de *Callosobruchus maculatus* em feijão-caupi submetido às concentrações subletais CL_1 (▼) e CL_{10} (■) e de feijão-caupi controle (●).



Fonte: A autora (2019).

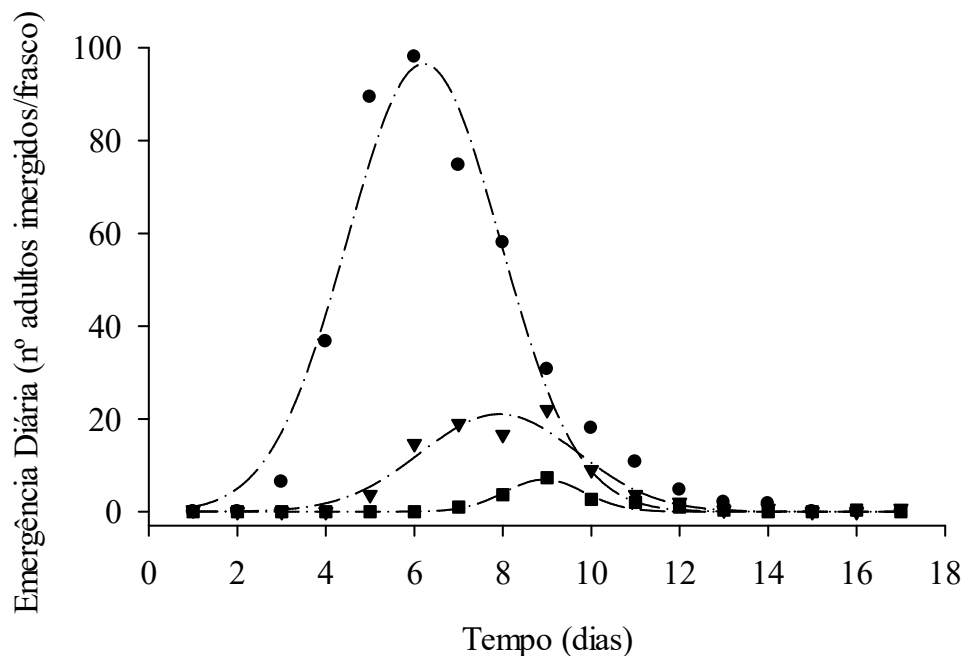
Para a emergência diária dos adultos de *C. maculatus*, o modelo que proporcionou o melhor ajuste foi o modelo gaussiano de três parâmetros ($y = a \exp(-0,5((x-b)/c)^2)$) ($P < 0,0001$; $R^2 \geq 0,92$; Figura 4). O parâmetro a da equação estimada mostra o valor da quantidade de insetos no pico máximo da emergência diária (Tabela 1). No tratamento controle emergiram aproximadamente 95 insetos/frasco no dia do pico máximo, enquanto nos tratamentos com a CL_1 ($3,81 \text{ mL m}^{-3}$) e a CL_{10} ($5,71 \text{ mL m}^{-3}$), aproximadamente, 21 e 7 insetos emergidos/frasco, o que representa uma redução de 77,9 e 92,6%, respectivamente.

Tabela 1 - Sumário das análises de regressão não-linear das curvas apresentadas na Figura 3.

Variável e Modelo	Conc. Subletal	Parâmetros estimados (\pm SEM)			g.l.erro	F	R ²
		a	b	c			
Emergência acumulada $y=a/(1+\exp(-(x-b)/c))$	Controle	99,07 \pm 0,80	5,97 \pm 0,06	1,05 \pm 0,05	14	7181,83	0,99
	CL ₁	98,51 \pm 0,57	8,50 \pm 0,02	0,43 \pm 0,02	14	7611,68	0,99
	CL ₁₀	99,38 \pm 0,59	7,63 \pm 0,04	1,01 \pm 0,03	14	2750,53	0,99
Emergência diária $y=a\exp(-0,5((x-b)/c)^2)$	Controle	96,57 \pm 5,05	6,21 \pm 0,10	1,72 \pm 0,10	14	168,92	0,96
	CL ₁	21,08 \pm 1,43	7,91 \pm 0,13	1,76 \pm 0,13	14	103,77	0,93
	CL ₁₀	6,91 \pm 0,54	8,93 \pm 0,08	0,89 \pm 0,07	14	88,62	0,92

Todas as estimativas dos parâmetros foram significativas em p -valor $< 0,0001$ pelo teste t de Student. Parâmetros estimados para emergência acumulada: a = assíntota ou emergência máxima calculada; b = ponto de inflexão ou dias necessários para atingir 50% da emergência acumulada; e , c = curva ou declive. Parâmetros para emergência diária: a = pico máximo de emergência diária; b = dias necessários para o pico de emergência diária; e , c = desvio padrão do parâmetro b .

Fonte: A autora (2019).

Figura 4 - Efeito do isotiocianato de alilo sobre a emergência diária de *Callosobruchus maculatus* em feijão-caupi submetido às concentrações subletais CL₁ (▼) e CL₁₀ (■) e de feijão-caupi controle (●).

Fonte: A autora (2019).

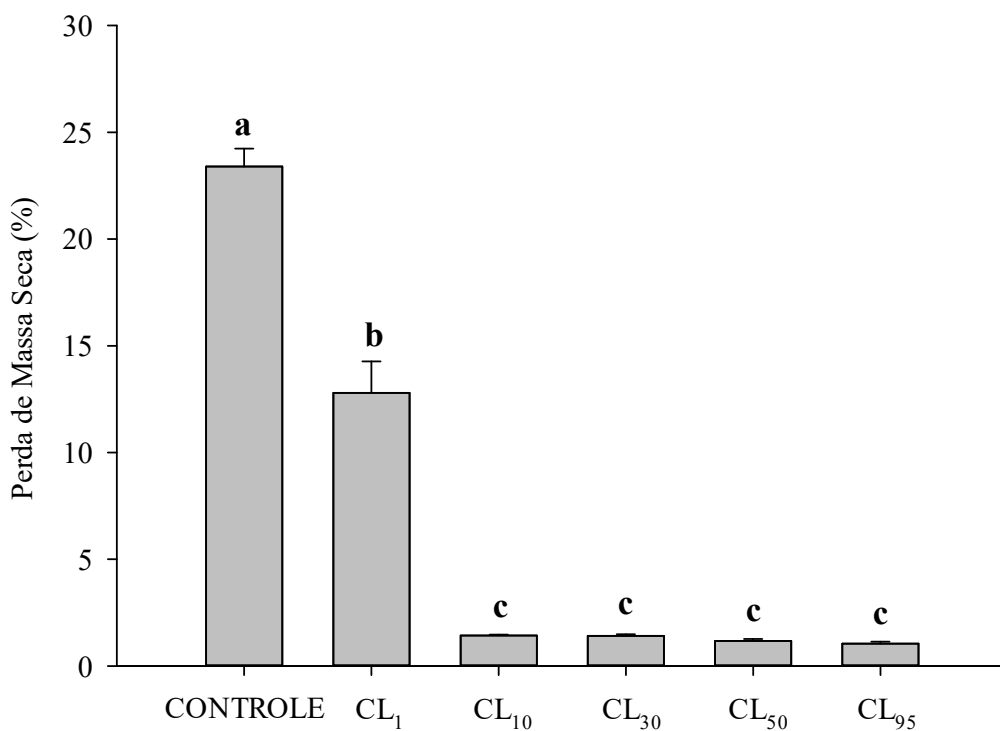
O desenvolvimento populacional de insetos está relacionado a estratégias de sobrevivência em resposta ao substrato alimentar (LOPES et al., 2018). Os adultos de *C. maculatus* tiveram sua taxa de desenvolvimento populacional afetada pela exposição subletal

ao AITC (CL₁ e CL₁₀). Os dados de emergência acumulada foram calculados conforme Trematerra et al. (1996). De acordo com esses autores, a interpretação dos dados de emergência diária é mais difícil e menos confiável que a emergência acumulada. Devido a influência do tempo em cada avaliação dos dados, os erros são mais prováveis quando limitados às classificações diárias de dados.

3.3 Perda de massa seca do feijão-caupi

A perda de massa seca dos grãos de feijão-caupi armazenados variou significativamente em relação à concentração aplicada de AITC ($F = 178,79$; $g.l.erro = 18$; $P < 0,0001$) após o período necessário para emergência da geração F₁ de *C. maculatus*. A perda dos grãos expostos às concentrações letais de AITC foi menor quando comparado ao controle, evidenciando a capacidade do AITC em reduzir os danos causados por *C. maculatus* (Figura 5). O feijão-caupi não submetido ao vapor de AITC apresentou perda de massa de 23,4% do valor inicial. Ao aplicar a CL₁ obteve-se uma perda de massa de 12,8% e nas demais concentrações (CL₁₀, CL₃₀, CL₅₀ e CL₉₅) a perda de massa dos grãos variou de 1,04% a 1,14%.

Figura 5 - Perda de massa seca dos grãos de feijão-caupi tratados com diferentes concentrações de vapor de isotiocianato de alilo.



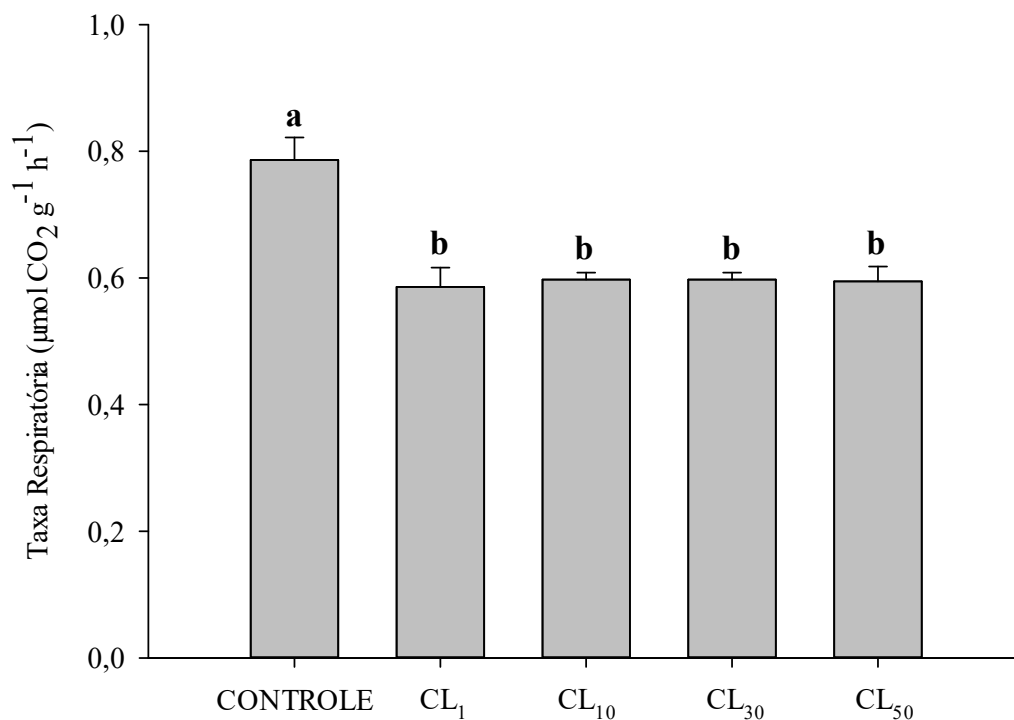
Fonte: A autora, 2019.

Simões et al. (2017) relataram que a espécie *C. maculatus* foi responsável por 44% de perda de peso dos grãos de feijão-caupi devido ao consumo. No mesmo ano, Massango et al. obtiveram resultados semelhantes, onde a perda de massa do feijão-caupi tratado com óleo essencial de *Petroselinum sativum* Hoffm. armazenado por 45 dias foi menor em relação ao controle, mostrando que a exposição dos insetos ao óleo essencial reduziu os danos causados por *C. maculatus*. A perda de massa seca é consequência do hábito alimentar dos insetos-praga (JÚNIOR et al., 2011; AKAMI et al., 2017).

3.4 Taxa respiratória

Houve variação da produção de CO₂ entre os insetos que foram submetidos ao vapor de AITC e os que não foram expostos ($F = 11,23$; g.l.erro = 15; $P = 0,0002$). A respiração dos adultos de *C. maculatus* diminuíram em média 24,5% quando expostos às concentrações subletais de AITC (Figura 6).

Figura 6 – Taxa respiratória de adultos de *Callosobruchus maculatus* submetidos a concentrações subletais de isotiocianato de alilo.



Fonte: A autora (2019).

O sistema respiratório é a principal rota de entrada dos gases tóxicos no corpo dos insetos, sendo este sistema constituído por tubos traqueais e traquéolas altamente ramificados, permitindo a oxigenação em todas as partes do corpo (SOUSA et al., 2014). Neste sentido, o emprego de concentrações subletais, na presente investigação, ocasionou a redução da taxa de CO₂. Isto implica em menor metabolismo respiratório, podendo interferir diretamente na biologia e no desenvolvimento populacional do bruquídeo, conforme constatou-se por meio da redução das taxas de oviposição e padrões reprodutivos analisados. Por outro lado, a taxa respiratória foi inversamente correlacionada com a toxicidade à fosfina em outras espécies de insetos-praga de produtos armazenados ($P < 0,05$) (PIMENTEL et al., 2007; 2009), onde as populações com menores taxas respiratórias apresentaram maiores níveis de resistência à fosfina. Isto sugere que a menor taxa respiratória está associada ao mecanismo fisiológico da resistência à fosfina devido à reduzida captação do fumigante, embora esta relação não tenha sido constatada para o AITC por Santos et al. (2011).

4 CONCLUSÃO

O isotiocianato de alilo apresentou toxicidade fumigante para adultos de *C. maculatus*. As concentrações subletais mostraram-se capazes de diminuir em quase 100% a emergência de novos insetos, além de retardar a emergência dos sobreviventes. O uso do AITC possibilitou a conservação da massa seca do feijão-caupi, evitando seu consumo pelo estágio imaturo da espécie. A respiração dos adultos diminuiu após a exposição ao AITC, resultando em menor metabolismo respiratório, o que pode interferir no desenvolvimento da espécie. Os resultados da presente investigação mostram o potencial fumigante do AITC como uma alternativa para controle de bruquídeos em grãos de feijão-caupi armazenados.

5 REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, p.265-267, 1925.

AKAMI, M.; CHAKIRA, H.; ANDONGMA, A. A.; KHAESO, K.; GBAYE, A. O.; NICOLAS, N. Y.; NUKENINE, E. N.; NIU, C. Y. Essential oil optimizes the susceptibility of *Callosobruchus maculatus* and enhances the nutritional qualities of stored cowpea *Vigna unguiculata*. **Royal Society Open Science**, v.4, p.1-12, 2017.

BECK, C. W.; BLUMER, L. S. A handbook on bean beetles, *Callosobruchus maculatus*. **National Science Foundation**, 2014.

CHAMP, B. R.; DYTE, C. E. Informe de la prospeccion mundial de la FAO sobre susceptibilidad a los insecticidas de las plagas de granos almacenados. **FAO**, Roma, 1976. 356p.

CHOWANSKI, S.; ADAMSKI, Z.; MARCINIAK, P.; ROSINSKI, G.; BUYUKGUZEL, E.; BUYUKGUZEL, K.; FALABELLA, P.; SCRANO, L.; VENTRELLA, E.; LELARIO, F.; BUFO, S. A. A review of bioinsecticidal activity of *Solanaceae* alkaloids. **Toxins**, v.8, n.3, 2016.

COSIMI, S.; ROSSI, E.; CIONI, P. L.; CANALE, A. Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebrio molitor* (L.). **Journal of Stored Products Research**, v.45, p.125-132, 2009.

DELAQUIS, P. J.; SHOLBERG, P. L. Antimicrobial activity of gaseous allyl isothiocyanate. **Journal of Food Protection**, v.60, n.8, p.943-947, 1997.

DESHPANDE, V. K.; MAKANUR, B.; DESHPANDE, S. K.; ADIGER, S.; SALIMATH, P. M. Quantitative and qualitative losses caused by *Callosobruchus maculatus* in cowpea during seed storage. **Plant Archives**, v.11, n.2, p.723-731, 2011.

DEY, D. Impact of indiscriminate use of insecticide on environmental pollution. **International Journal of Plant Protection**, v.9, p.264-267, 2016.

DHINGRA, O. D.; COSTA, M. L.; SILVA JR, G. J.; MIZUBUTI, E. S. Essential oil of mustard to control *Rhizoctonia solani* causing seedling damping off and seedling blight in nursery. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.6, p.683-686, 2004.

ELLIOTT, M.; JANES, N. F. Synthetic pyrethroids – a new class of insecticide. **Chemical Society Reviews**, v.7, n.4, p.473-505, 1978.

FREITAS, R. C. P.; FARONI, L. R. A.; HADDI, K.; JUMBO, L. O. V.; OLIVEIRA, E. E. Allyl isothiocyanate actions on populations of *Sitophilus zeamais* resistant to phosphine: Toxicity, emergence inhibition and repellency. **Journal of Stored Products Research**, v.69, p.257-264, 2016.

- HAMDI, S. H.; HEDJAL-CHEBHEBB, M.; KELLOUCHE, A.; KHOUJA, M. L.; BOUDABOUS, A.; JEMÂ, J. M. B. Management of three pests population strains from Tunisia and Algeria using *Eucalyptus* essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.74, p.551-556, 2015.
- JÚNIOR, A. L. M.; VILARINHO, A. A. Resistência de cultivares de feijão-caupi ao ataque de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) em condições de armazenamento. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v.9, n.1, p.51-55, 2011.
- LIN, C. M.; KIM, J.; DU, W. X.; WEI, C. I. Bactericidal activity of isothiocyanate against pathogens on fresh produce. **Journal of Food Protection**, v.63, n.1, p.25-30, 2000.
- LOPES, L. M.; SOUSA, A. H.; SANTOS, V. B.; SILVA, G. N.; ABREU, A. O. Development rates of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) in landrace cowpea varieties occurring in southwestern Amazonia. **Journal of Stored Products Research**, v.76, p.111-115, 2018.
- LU, Y.; ZHONG, J.; WANG, Z.; LIU, F.; WAN, Z. Fumigation toxicity of allicin against three stored product pests. **Journal of Stored Products Research**, v.55, p.48-54, 2013.
- MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Agrofit** – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. *Acessado em: 10 mar. 2019.*
- MARCONDES E.; RIBEIRO, M. A.; STANGERLIN, D. M.; SOUZA, A. P.; MELO, R. R. de; GATTO, D. A. Resistência natural da madeira de duas espécies amazônicas em ensaios de deterioração de campo. **Scientia Plena**, São Cristóvão, v.9, n.6, p.1-9, 2013.
- MARTON, M. R.; LAVRIC, V. A simple method for the quantification of isothiocyanates from mustard. **Science Bulletin**, v.1, n.75, p.63-72, 2013.
- MASSANGO, H. D. G. L. L.; FARONI, L. R. A.; HADDI, K.; HELENO, F. F.; JUMBO, L. V.; OLIVEIRA, E. E. Toxicity and metabolic mechanisms underlying the insecticidal activity of parsley essential oil on bean weevil, *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Pest Science**, v.90, n.2, p.723-733, 2017.
- NEVES, W. S.; FREITAS, L. G.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FABRY, C. F. S.; COUTINHO, M. M.; DHINGRA, O. D.; FERRAZ, S.; DEMUNER, A. J. Atividade de extratos de alho (*Allium sativum*), mostarda (*Brassica campestris*) e pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) sobre eclosão de juvenis de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v.29, n.2, p.273-278, 2005.
- OKE, O. A.; AKINTUNDE, E. M.; IJAOLA, S.; RAJI, D.; AGBON, J. Reduction of the nutritional values of cowpea infested with *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: bruchidae). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.4, n.8, p.912-918, 2015.

- OPIT, G. P.; THOMS, E.; PHILLIPS, T. W.; PAYTON, M. E. Effectiveness of sulfuryl fluoride fumigation for the control of phosphine-resistant grain insects infesting stored wheat. **Journal of Economic Entomology**, v.109, n.2, p.930-941, 2016.
- PAES, J. L.; FARONI, L. R. A.; DHINGRA, O. D.; CECON, P. R.; SILVA, T. A. Insecticidal fumigant action of mustard essential oil against *Sitophilus zeamais* in maize grains. **Crop Protection**, v.34, p.56-58, 2012.
- PIMENTEL, M. A. G.; FARONI, L. R. A.; TÓTOLA, M. R.; GUEDES, R. N. C. Phosphine resistance, respiration rate and fitness consequences in stored-product insects. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v.63, n.9, p.876-881, 2007.
- PIMENTEL, M. A. G.; FARONI, L. R. A.; GUEDES, R. N. C.; SOUSA, A. H.; TÓTOLA, M. R. Phosphine resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.45, n.1, p.71-74, 2009.
- PIMENTEL, M. A. G.; FARONI, L. R. A.; SILVA, F. H.; BATISTA, M. D.; GUEDES, R. N. C. Spread of phosphine resistance among Brazilian populations of three species of stored product insects. **Neotropical Entomology**, v.39, n.1, p.101-107, 2010.
- PRICE, L. A.; MILLS, K. A. The toxicity of phosphine to the immature stages of resistant and susceptible strains of some common stored product beetles, and implications for their control. **Journal of Stored Products Research**, v.24, p.51-59, 1988.
- QUILES, J. M.; NAZARETH, T. D. M.; LUZ, C.; LUCIANO, F. B.; MAÑES, J.; MECA, G. Development of an antifungal and antimycotoxigenic device containing allyl isothiocyanate for silo fumigation. **Toxins**, v.11, n.3, p.137, 2019.
- REYES-JURADO, F.; CERVANTES-RINCÓN, T.; BACH, H.; LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Antimicrobial activity of Mexican oregano (*Lippia berlandieri*), thyme (*Thymus vulgaris*), and mustard (*Brassica nigra*) essential oils in gaseous phase. **Industrial Crops and Products**, v.131, p.90-95, 2019.
- ROMANOWSKI, F.; KLENK, H. Thiocyanates and isothiocyanates, organic. In: DEGUSSA, A.G. Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. **Wiley-VCH**, Weinheim, Germany, p.749-759, 2005.
- SAID, P.; PASHTE, V. Botanicals: The protectants of stored grains pests. **Trends in Biosciences**, v.8, n.15, p.3750-3755, 2015.
- SANTOS, J. C.; FARONI, L. R. A.; SOUSA, A. H.; GUEDES, R. N. C. Fumigant toxicity of allyl isothiocyanate to populations of the red flour beetle *Tribolium castaneum*. **Journal of Stored Products Research**, v.47, n.3, p.238-243, 2011.
- SAS, SAS/STAT(R) 9.3 User's Guide. **SAS Institute**, Cary, 2011. Disponível em: <https://support.sas.com/documentation/cdl/en/statug/63962/HTML/default/viewer.htm#titlepage.htm>. Acessado em: 06 de março de 2019.

- SIMÕES, R. de O.; PIMENTEL, M. A. G.; SANTOS, J. C. dos; FARONI, L. R. A.; SILVA, T. A. da. Suscetibilidade de carunchos-praga (Coleoptera: Bruchidae) de feijão armazenado ao óleo essencial de mostarda. Passo Fundo: **Berthier Gráfica Editora**, v.1, p.621-626, 2007.
- SOUSA, A. H.; FARONI, L. R. A.; PIMENTEL, M. A. G.; GUEDES, R. N. Developmental and population growth rates of phosphine-resistant and susceptible populations of stored product insect pests. **Journal of Stored Products Research**, v.45, p.241-246, 2009.
- SOUSA, A. H.; FARONI, L. R. A.; FREITAS, R. da S. Relative toxicity of mustard essential oil to insect-pests of stored products. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 2, 2014.
- SOUZA, L. P. de; FARONI, L. R. A.; LOPES, L. M.; SOUSA, A. H.; PRATES, L. H. F. Toxicity and sublethal effects of allyl isothiocyanate to *Sitophilus zeamais* on population development and walking behavior. **Journal of Pest Science**, v.91, n.2, p.761-770, 2018.
- SPOCHACZ, M.; CHOWAŃSKI, S.; WALKOWIAK-NOWICKA, K.; SZYMCZAK, M.; ADAMSKI, Z. Plant-derived substances used against beetles–pests of stored crops and food– and their mode of action: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.17, n.5, p.1339-1366, 2018.
- SRIVASTAVA, C.; SUBRAMANIAN, S. Storage insect pests and their damage symptoms: an overview. **Indian Journal of Entomology**, v.78, n.special, p.53-58, 2016.
- TAY, W. T.; BECKETT, S. J.; BARRO, P. J. Phosphine resistance in Australian *Cryptolestes* species (Coleoptera: Laemophloeidae): perspectives from mitochondrial DNA cytochrome oxidase I analysis. **Pest Management Science**, v.72, p.1250-1259, 2016.
- TRACZ, B. L.; BORDIN, K.; NAZARETH, T.M.; COSTA, L. B.; MACEDO, R. E. F.; MECA, G.; LUCIANO, F. B. Assessment of allyl isothiocyanate as a fumigant to avoid mycotoxin production during corn storage. **LWT**, v.75, p.692-696, 2017.
- TREMATERRA, P.; FONTANA, F.; MANCINI, M. Analysis of development rates of *Sitophilus oryzae* (L.) in five cereals of the genus Triticum. **Journal of Stored Products Research**, v.32, n.4, p.315-322, 1996.
- TRIVEDI, A.; NAYAK, N.; KUMAR, J. Recent advances and review on use of botanicals from medicinal and aromatic plants in stored grain pest management. **Journal of Entomology Zoology Studies**, v.6, n.3, p.295-300, 2018.
- TSAO, R.; PETERSON, C. J.; COATS, J. R. Glucosinolate breakdown products as insect fumigantes and their effect on carbon dioxide emission of insects. **BMC Ecology**, v.2, n.1, p.5, 2002.
- WU, H.; ZHANG, G. A.; ZENG, S.; LIN, K. C. Extraction of allyl isothiocyanate from horseradish (*Armoracia rusticana*) and its fumigant insecticidal activity on four stored-product pests of paddy. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v.65, n.9, p.1003-1008, 2009.

ZASADA, I. A.; FERRIS, H. Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to isothiocyanates in laboratory assays. **Phytopathology**, v.93, p.747-750, 2003.

ATIVIDADE FUMIGANTE DE ISOTIOCIANATO DE ALILO NA REPRODUÇÃO DE *Callosobruchus maculatus* E SEU EFEITO NAS PROPRIEDADES FÍSICAS DO FEIJÃO-CAUPI

RESUMO: O feijão-caupi está sujeito a perdas quantitativas e qualitativas durante o armazenamento devido ao ataque do inseto-praga *Callosobruchus maculatus*. Para seu controle, é crescente o interesse por inseticidas proveniente das reações de metabólitos secundários produzidos por plantas, em decorrência de sua alta eficiência, ampla disponibilidade e seletividade para organismos alvos. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade fumigante do isotiocianato de alilo (AITC), produto da hidrólise da sinigrina, no desenvolvimento de *C. maculatus* e seu efeito nas propriedades físicas do feijão-caupi. Para avaliação da taxa instantânea de crescimento populacional (r_t) os insetos foram expostos às concentrações de AITC de 3,81, 5,71, 7,67, 9,41 e 17,85 mL m⁻³ de feijão-caupi, correspondentes às CL₁, CL₁₀, CL₃₀, CL₅₀ e CL₉₅, durante 40 dias. Ao final deste período, as propriedades físicas do feijão-caupi foram analisadas. O grau de infestação aumentou consideravelmente com o decréscimo da concentração de AITC, assim como o teor de água e a condutividade elétrica. O percentual de germinação e a massa específica aparente diminuíram com a redução da concentração de AITC. A concentração subletal CL₁₀ diminuiu a reprodução de *C. maculatus* e o grau de infestação dos grãos de feijão-caupi depois de 40 dias de armazenamento. O AITC inibe o desenvolvimento da espécie *C. maculatus* e contribui para a manutenção das propriedades físicas do feijão-caupi. Dessa forma, o AITC representa uma alternativa ao uso de inseticidas tradicionais além de apresentar potencial para o controle de insetos-praga de grãos armazenados.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, AITC, sinigrina.

FUMIGANT ACTIVITY OF ALLYL ISOTHIOCYANATE ON *Callosobruchus maculatus* REPRODUCTION AND ITS EFFECT ON COWPEA BEAN'S PHYSICAL PROPERTIES

ABSTRACT: The cowpea bean is subject to quantitative and qualitative losses during storage due to attacks of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus*. In order to control them, there is a growing interest in insecticides from the reactions of secondary metabolites produced by plants, due to their high efficiency, wide availability and selectivity for target organisms. Thus, the present work aimed to evaluate the fumigant activity of allyl isothiocyanate (AITC), a product of synigrin hydrolysis, on the development of *C. maculatus* and its effect on cowpea bean's physical properties. To evaluate the instantaneous population growth rate (r_i) the insects were exposed to AITC concentrations of 3.81, 5.71, 7.67, 9.41 and 17.85 mL m⁻³ of beans, corresponding to LC₁, LC₁₀, LC₃₀, LC₅₀ and LC₉₅, for 40 days. At the end of this period, the physical properties of the beans were analyzed. The degree of infestation increased considerably with the decrease of AITC concentration, as well as water content and electrical conductivity. Germination percentages and apparent specific mass decreased with declining AITC concentration. LC₁₀ sublethal concentration reduced *C. maculatus* reproduction and the degree of bean infestation after 40 days of storage. The AITC inhibits the development of *C. maculatus* and contributes to the maintenance of cowpea bean's physical properties. Thus, the AITC represents an alternative to the use of traditional insecticides and displays potential in the control of stored grain pest insects.

Keywords: *Vigna unguiculata*, AITC, synigrine.

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], conhecido popularmente como feijão-de-corda ou fradinho, está entre as cinco leguminosas mais cultivadas no cinturão tropical, devido à sua versatilidade no cultivo e à sua tolerância à seca e às temperaturas elevadas (DUKE, 1990; BEZERRA et al., 2010). Além disso, é um alimento rico em proteínas, minerais, vitaminas e fibras e com cozimento rápido, impactando positivamente nas dietas diárias da população das regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia, Europa e Américas (DESHPANDE et al., 2011).

Para preservar o valor nutricional do feijão-caupi e garantir a viabilidade para o consumo humano e para um novo cultivo, os grãos devem ser armazenados em local apropriado após a colheita. No entanto, durante o período de armazenamento, o feijão-caupi apresenta perdas quantitativas e qualitativas devido ao ataque de insetos-praga (SILVA & COSTA, 2016). O gênero *Callosobruchus* inclui um número de espécies economicamente importantes que infestam leguminosas em todo o mundo. Dentre elas, o *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Chrysomelidae) é comumente encontrado durante o armazenamento do feijão-caupi ao longo dos trópicos (NRI, 1996; BECK & BLUMER, 2014), causando perdas significativas no peso de até 60%, tornando os grãos impróprios para consumo e aumentando a formação de pó (TAMZUBIL, 1991; OKE et al., 2015). O dano causado no feijão-caupi por *C. maculatus* pode ser iniciado no campo e é consequência da colonização do interior dos grãos pelas larvas, as quais alimentam-se dos grãos e desenvolvem-se até a fase adulta, causando perda de peso, desvalorização comercial, redução do valor nutricional e higiene do produto pela presença de fezes, ovos e insetos, além de reduzir a germinação das sementes (AKAMI et al., 2017).

O manejo de infestações de insetos-praga em produtos armazenados depende de substâncias químicas que apresentam alta toxicidade (MANSOUR et al., 2012). A fosfina (PH₃) tem sido o fumigante mais comumente utilizado, já que é o único fumigante recomendado no tratamento curativo de insetos-praga (MAPA, 2019); no entanto, apresenta ação inseticida lenta e devido ao seu uso irrestrito, espécies de insetos demonstraram altos níveis de resistência (PIMENTEL et al., 2010; TAY et al., 2016). Assim, se faz necessário o desenvolvimento de alternativas seguras, as quais devem apresentar potencial não apenas em termos de características tóxicas e resistência, mas também na minimização dos impactos ambientais e dos efeitos em organismos não-alvos (ASLAN et al., 2004; DUTRA et al., 2016). Neste contexto, os inseticidas botânicos, se devidamente aplicados, serão um passo importante para

alcançar este objetivo, já que as plantas são uma fonte rica em substâncias secundárias que podem ser bioativas contra uma gama de insetos-praga (MANSOUR et al., 2012; BENELLI et al., 2019).

Os metabólitos secundários característicos na família Brassicaceae são os glucosinolatos, que são normalmente influenciados por fatores bióticos e abióticos (HOPKINS et al., 2009), porém todos são ricos em nitrogênio e enxofre (QUILES et al., 2019). Após o dano tecidual, os glucosinolatos sofrem hidrólise resultando em compostos biologicamente ativos, como isotiocianatos (ITCs) e nitrilos (YADAV & RANA, 2018). Dentre os glucosinolatos existentes, a sinigrina encontrada na mostarda marrom (*Brassica juncea* L.), quando hidrolisada pela enzima mirosinase, é convertida principalmente em isotiocianato de alilo (AITC). O AITC é um composto volátil, de aroma pungente e apresenta uma ampla gama de efeitos biológicos como inseticida (SANTOS et al., 2011; MANSOUR et al., 2012; WU et al., 2014; FREITAS et al., 2016a; REYES-JURADO et al., 2019), sendo possivelmente o composto com maior potencial para biofumigação dentre os produtos de degradação de glucosinolatos (MAYTON et al., 1996). Além da obtenção natural por meio da hidrodestilação de tecidos vegetais do gênero *Brassica*, o AITC pode ser sintetizado quimicamente pela reação de cloreto de alilo e tiocianato de potássio (ROMANOWKI & KLENK, 2005), evitando as barreiras advindas do cultivo como a contaminação e a variabilidade em sua composição. Entre as espécies de *Brassica*, as maiores concentrações de AITC são encontradas em algumas espécies de mostardas, rábano e wasabi e há uma variação considerável entre cultivares de uma mesma espécie (YU et al., 2003).

Estudos recentes têm sido realizados com o intuito de avaliar a toxicidade de compostos botânicos em diferentes insetos-praga de grãos armazenados, entretanto poucos são os que relacionam os seus efeitos letais e subletais com a qualidade do grão tratado após a infestação. Desta forma, objetivou-se com este trabalho avaliar a influência do AITC na taxa instantânea de crescimento populacional de *C. maculatus* e o seu efeito nas propriedades físicas do feijão-caupi infestado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Setor de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Foram utilizados grãos de feijão-caupi da variedade BRS Guariba com grau de infestação por insetos de 3%, teor de água de 10% (b.u.), massa específica de 796 kg m⁻³,

germinação de 90% e condutividade elétrica de $170 \mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$. A formulação comercial de AITC utilizada foi adquirida da Sigma-Aldrich, Estados Unidos, com 94% de pureza.

A população de *C. maculatus*, proveniente do município de Crato – CE em 2014, foi criada e mantida no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas de Grãos da Universidade Federal de Viçosa (MG), utilizando recipientes de vidro de 1,5 L, fechados com tampa plástica perfurada e revestida internamente com organza para permitir as trocas gasosas, sob temperatura controlada em câmara climática tipo B.O.D. ($27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), umidade relativa do ar constante ($60 \pm 5\%$) e escotofase de 24 h. Para a formação da colônia de insetos, adultos de *C. maculatus* foram confinados durante 10 dias para efetuarem a postura em grãos de feijão-caupi livres de pesticidas, na proporção de 20 insetos para cada 50 g de substrato, conforme recomendação de Beck e Blumer (2014). O feijão-caupi infestado foi estocado até a emergência da geração F_1 e foi peneirado todos os dias para retirada dos adultos emergidos, de forma a garantir o controle de idade de 24 h. Esse procedimento foi efetuado durante todo o período dos bioensaios.

2.1 Efeitos subletais sobre a taxa instantânea de crescimento populacional (r_i)

Cinquenta adultos de *C. maculatus* com até 24 h de idade foram submetidos ao procedimento de fumigação em recipientes de vidro com capacidade de 0,3 L, totalmente preenchido por feijão-caupi ($240 \text{ g} \pm 1 \text{ g}$), e vedados. Na parte superior do recipiente foi adaptado um suporte de PVC recoberto por organza com altura de 1 cm, de modo a formar um *plenum*, para guardar o papel filtro umedecido com AITC. A massa de grãos infestada foi exposta às concentrações de 3,81, 5,71, 7,67, 9,41 e 17,85 mL m^{-3} de feijão-caupi, correspondentes, respectivamente, às concentrações subletais (CL_1 , CL_{10} , CL_{30} e CL_{50}) e à CL_{95} determinadas no capítulo 1, e o tratamento controle foi realizado nas mesmas condições, porém sem a presença do AITC. Todos os tratamentos foram replicados quatro vezes. Após 24 h de fumigação, os frascos foram abertos e cobertos apenas com tecido de organza, e armazenados em condições ideais de desenvolvimento dos insetos (temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de $60 \pm 5\%$), durante 40 dias – tempo suficiente para completar um ciclo de vida. Ao final desse período, a taxa instantânea de crescimento foi calculada por meio da equação proposta por Walthall e Stark (1997) (Equação 1), baseando-se no total de insetos obtidos ao final do período de armazenamento e no número inicial de insetos.

$$r_i = \frac{\left[\ln\left(\frac{N_f}{N_0}\right) \right]}{\Delta T} \quad (1)$$

em que N_f = Número final de insetos; N_0 = Número inicial de insetos; e ΔT = Variação de tempo (número de dias em que o ensaio foi executado).

2.2 Análises de qualidade do feijão-caupi

Após os bioensaios de taxa instantânea de crescimento, a qualidade do feijão-caupi foi avaliada depois de 40 dias de armazenamento, em função da concentração de AITC aplicada nos grãos. Avaliaram-se os parâmetros grau de infestação, teor de água, massa específica aparente, germinação e condutividade elétrica.

Para avaliar o percentual de grãos danificados por insetos, duas amostras de 100 grãos, escolhidas ao acaso, foram imersas em água durante 24 h, tempo suficiente para amolecer os grãos. Em seguida, os grãos foram cortados e examinados individualmente. Foram considerados infestados, além dos grãos que continham larva, pupa ou inseto adulto, todos aqueles que apresentavam orifícios de saída do inseto, conforme recomendações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). O resultado foi obtido por meio da média de grãos infestados e expresso em porcentagem.

O teor de água dos grãos foi determinado utilizando-se o método de estufa, segundo as normas das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), que prescrevem a utilização de estufa com circulação de ar forçado a 105 ± 3 °C, durante 24 h. Foram utilizadas três repetições de 25 g de grãos e os resultados expressos em porcentagem, base úmida (b.u.).

A determinação da massa específica aparente foi realizada em três repetições com auxílio de balança hectolétrica (modelo 40, Dellemolle, Brasil), com capacidade de um quarto de litro (250 mL). Como o peso hectolétrico de uma amostra varia de acordo com o seu teor de água, fizeram-se determinações simultaneamente (BRASIL, 2009).

O potencial de germinação foi determinado de acordo com Brasil (2009), em quatro repetições de 50 grãos onde estes foram distribuídos em rolos de papel toalha tipo Germitest, umedecidos com quantidade de água destilada equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco, e mantidas em câmara de germinação do tipo BOD a 25 °C. A contagem foi realizada depois de 7 dias e os resultados foram expressos em porcentagem de germinação.

A condutividade elétrica da solução contendo grãos de feijão-caupi foi medida utilizando-se o Sistema de Copo ou Condutividade de Massa (VIEIRA & CARVALHO, 1994).

Foram realizadas quatro repetições com 50 grãos inteiros, selecionados aleatoriamente. Os grãos foram pesados e colocados em copos plásticos com 75 mL de água deionizada. Os grãos embebidos foram colocados em câmara climática tipo BOD regulada à 27 °C por 24h. Após esse período, a solução resultante foi utilizada para realizar a leitura da condutividade elétrica com um medidor da marca Tecnopon, modelo mCA-150. O valor fornecido pelo condutivímetro ($\mu\text{S cm}^{-1}$) foi dividido pela massa total dos 50 grãos, obtendo-se o valor expresso em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

2.3 Análises estatísticas

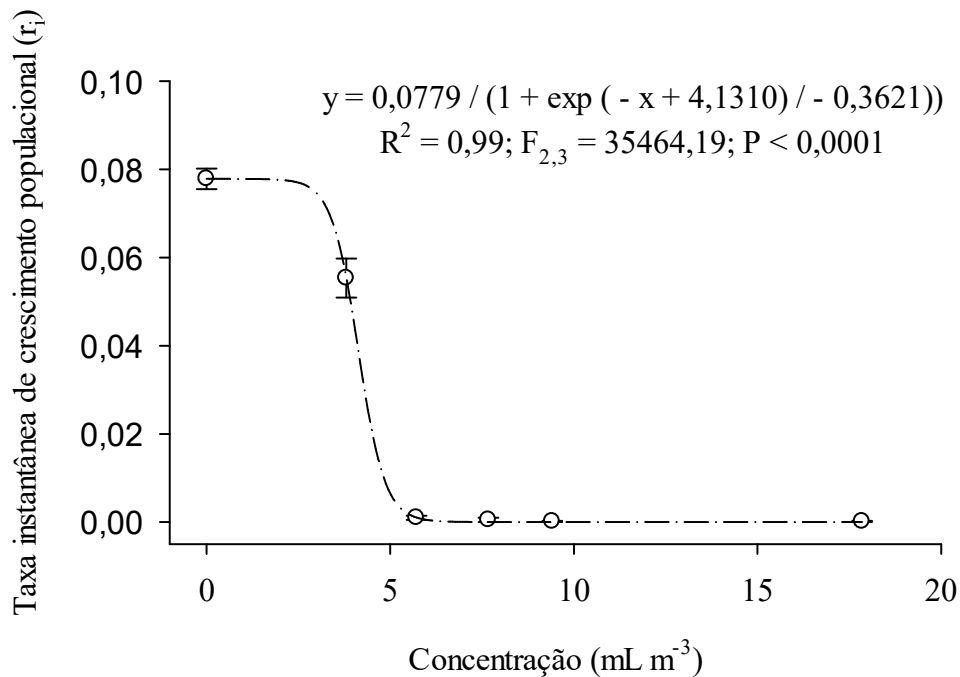
Os dados da taxa instantânea de crescimento e da qualidade do grão foram submetidos a análises de regressão em função da concentração de AITC. Além disso, os dados de qualidade dos grãos foram analisados por meio da correlação canônica (PROC CANCORR; SAS Institute, 2011) entre a taxa de infestação e as variáveis qualitativas do feijão-caupi e as médias comparadas pelo teste de agrupamento de Dunnett, utilizando-se o *software* Statistica, versão 10 (STATSOFT, INC., Tulsa, OK, USA). Os gráficos foram plotados no *software* SigmaPlot 13.1 (SYSTAT SOFTWARE, INC., San Jose, CA, USA).

3 RESULTADOS

3.1 Taxa instantânea de crescimento populacional (r_i)

A exposição dos insetos às concentrações subletais de AITC no feijão-caupi, influenciou significativamente na taxa instantânea de crescimento populacional da espécie *C. maculatus* ($F = 286,55$; g.l.erro = 18; $P < 0,0001$). A r_i diminuiu com o aumento das concentrações de AITC no período de 40 dias, o que comprova o efeito inibitório exercido pelo AITC sobre o crescimento de *C. maculatus*. O modelo sigmoidal de três parâmetros ($y = a / (1 + \exp(-(x-b)/c))$) foi o que melhor se ajustou ao decréscimo da r_i com o aumento das concentrações de AITC (Figura 1).

Figura 1 – Taxa instantânea de crescimento populacional de *C. maculatus* em função da concentração de AITC.



Fonte: A autora, 2019.

A partir da concentração de AITC de 5,7 mL m⁻³, referente à CL₁₀, a taxa instantânea de crescimento populacional foi aproximadamente zero, indicando que, embora a CL₁₀ não cause a mortalidade dos adultos, a concentração inibe o desenvolvimento da população. Resultados semelhantes foram encontrados por Moura et al. (2019) ao estudarem o óleo essencial de candeieiro para o controle de *C. maculatus*. Souza et al. (2018) constataram que a exposição a óleos essenciais pode atingir camadas internas dos grãos, o que interfere diretamente no desenvolvimento das larvas e conseqüentemente acarreta a interrupção da emergência dos adultos. A redução da r_i está associada ao menor período de sobrevivência dos insetos adultos nos grãos tratados com concentrações elevadas, impedindo a oviposição e a progênie relacionadas a possíveis efeitos tóxicos dos óleos sobre ovos e larvas dos insetos (JUMBO et al., 2014; MOURA et al., 2019).

3.2 Propriedades físicas dos grãos tratados com isotiocianato de alilo

As propriedades físicas do feijão-caupi foram influenciadas pela exposição subletal de AITC. Quanto maior a concentração aplicada no feijão-caupi infestado com 50 insetos, menor foi a taxa instantânea de crescimento populacional de *C. maculatus* e, conseqüentemente, menor

foi o dano nos grãos armazenados por 40 dias. Foi encontrado uma correlação canônica significativa (Wilks' Lambda = 0,0014; $F = 2505,46$; $g.l.(num/den) = 5/18$; $P < 0,0001$) entre a r_i da população de *C. maculatus* e o grupo de características usadas para expressar a qualidade dos grãos de feijão-caupi submetidos à diferentes concentrações de AITC (grau de infestação, teor de água, germinação, massa específica aparente e condutividade elétrica). A associação entre a r_i e esse grupo de característica foi alta (0,99).

Desde que a taxa instantânea de crescimento populacional foi baixa, as características físicas e fisiológicas foram mantidas durante o período de 40 dias. A análise de correlação indica que o grau de infestação, o teor de água e a condutividade elétrica do feijão-caupi aumentaram com o incremento da r_i , apresentando grau de correlação de 0,97, 0,98 e 0,93, respectivamente, e que a germinação e a massa específica reduziram com o aumento da r_i . Ou seja, a medida que a concentração de AITC foi aumentada, a r_i se aproximou de zero e todas as características físicas dos grãos mantiveram-se próximas ao valor inicial, na caracterização do grão (Tabela 1).

Tabela 1 – Qualidade do feijão-caupi infestado por *Callosobruchus maculatus* em função da concentração de isotiocianato de alilo, e comparada aos valores da caracterização inicial dos grãos.

Concentração	Variáveis de Qualidade do Feijão-Caupi				
	Grau de Infestação (%)	Teor de Água (%)	Germinação (%)	Massa Específica (kg m ⁻³)	Condutividade Elétrica (μS cm ⁻¹ g ⁻¹)
Controle	100,0 a	21,0 a	27,5 a	651,3 a	328,1 a
CL1	100,0 a	15,9 b	78,0 b	728,0 b	302,4 b
CL10	12,6 b	10,5 c	89,3 b	784,8 c	251,2 c
CL30	6,6 bc	10,4 c	89,3 b	784,8 c	234,8 cd
CL50	4,0 c	10,2 c	89,8 b	786,0 c	223,7 d
CL95	3,5 c	10,2 c	89,8 b	786,3 c	215,8 d
Caracterização Inicial	3,0 c	10,00 c	90,0 b	796,0 c	170,0 e

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Fonte: A autora, 2019.

O tratamento de feijão-caupi com AITC permitiu controlar a infestação de *C. maculatus* e preservar a qualidade dos grãos no armazenamento, exceto nos grãos tratados com a concentração mínima (CL₁). A infestação dos grãos aumentou substancialmente elevando o teor de água e, conseqüentemente, à perda da qualidade dos grãos (Tabela 1). Uma das principais

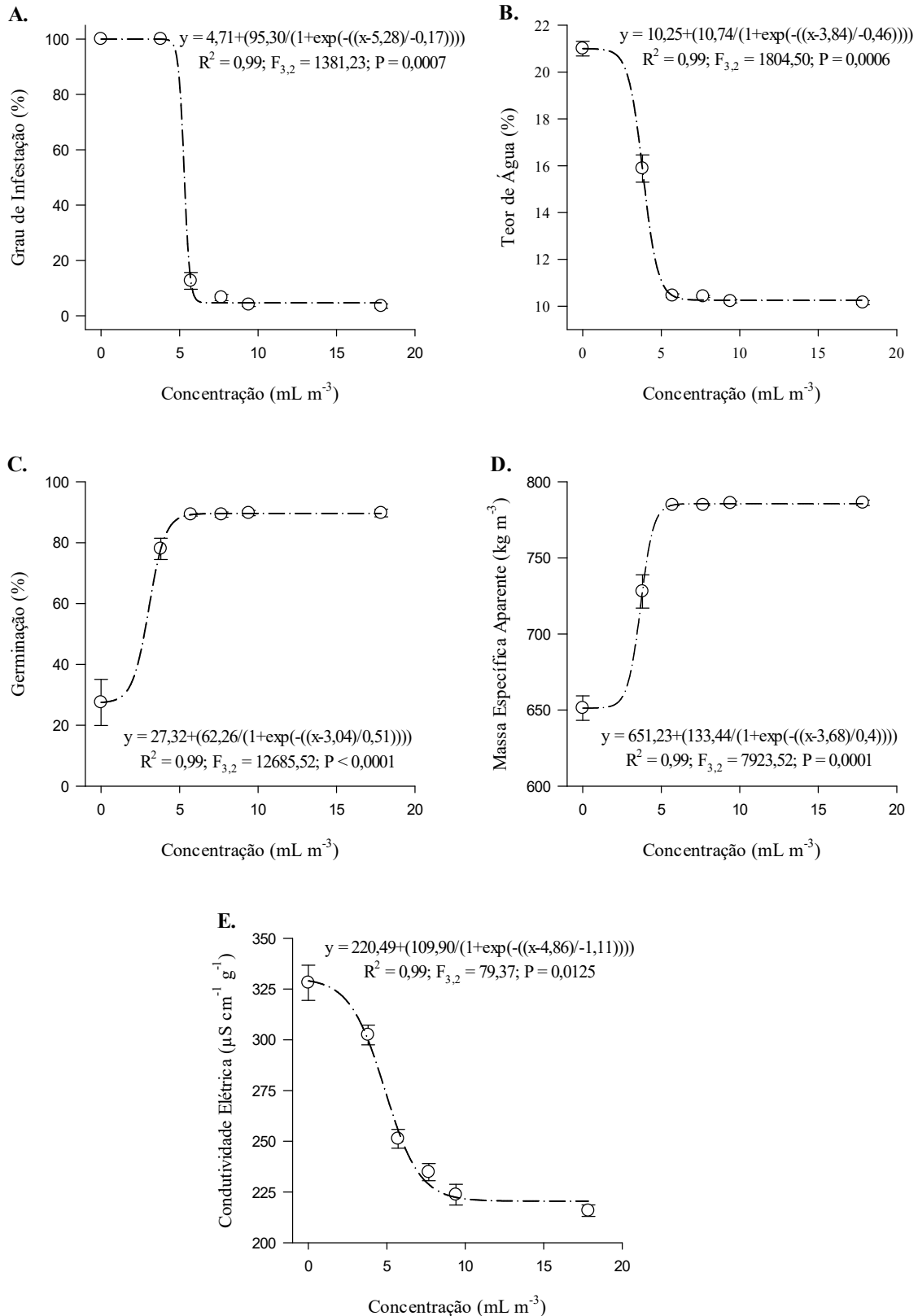
causas associadas com a perda de qualidade dos grãos durante o período de armazenamento é o aumento no teor de água, principalmente associado com o grau de infestação, ácaros e fungos e condições de armazenamento (QUEZADA et al., 2006; FREITAS et al., 2016b).

O aumento da concentração de AITC resultou em uma variação significativa do grau de infestação ($F = 1217,66$; $g.l_{\text{erro}} = 18$; $P < 0,0001$). Enquanto os grãos de feijão-caupi sem tratamento foram 100% infestados por *C. maculatus*, a CL_{10} proporcionou uma redução de 87,37% na infestação dos grãos. Além disso, a partir da CL_{30} o grau de infestação se manteve constante (Figura 2A) e próximo ao valor encontrado na caracterização do grão (3%) (Tabela 1).

O teor de água variou significativamente em relação a concentração utilizada no tratamento do feijão-caupi infestado por *C. maculatus* ($F = 265,01$; $g.l_{\text{erro}} = 18$; $P < 0,0001$). A partir da CL_{10} o teor de água dos grãos manteve-se igual ao valor inicial (10%) (Tabela 1, Figura 2B). Nos grãos não tratados, o teor de água chegou a 21% devido à maior presença e atividade biológica dos insetos. Teores elevados de água favorecem o desenvolvimento de fungos na massa de grãos, prejudicando sua qualidade no armazenamento (ALENCAR et al., 2009), o que propicia ainda mais o aumento do teor de água, já que está relacionado a atividade biológica de insetos, fungos e ácaros, além de ser influenciado pelo armazenamento incorreto (MUTUNGI et al., 2015; FREITAS et al., 2016b; SILVA et al., 2018).

A porcentagem de germinação também variou significativamente entre os tratamentos ($F = 50,68$; $g.l_{\text{erro}} = 18$; $P < 0,0001$). A redução na germinação foi expressiva no feijão-caupi não tratado quando comparado ao valor inicial de germinação (90%), enquanto os grãos tratados com pelo menos a CL_{10} continuaram com a germinação próxima desse valor (Tabela 1, Figura 2C). Durante o desenvolvimento populacional dos insetos presente na massa de grão, as larvas de *C. maculatus* consomem o interior do grão e, por vezes, destroem o embrião durante a alimentação, reduzindo a capacidade de germinação do produto (NJOROGE et al., 2014; VALES et al., 2014).

Figura 2 – Propriedades físicas do feijão-caupi infestado por *Callosobruchus maculatus* em função da concentração de isotiocianato de alilo aplicado, e suas respectivas equações de regressão não-linear.



Fonte: A autora, 2019.

A massa específica aparente do feijão-caupi tratado com AITC diferiu significativamente entre o controle e as diferentes concentrações aplicadas ($F = 96,2$; $g.l_{\text{erro}} = 18$; $P < 0,0001$). Uma vez que nos grãos tratados ocorre a inibição da infestação do *C. maculatus* e, conseqüentemente, o menor consumo de massa pelas larvas, a aplicação da CL_{10} no controle dos insetos proporcionou uma redução de apenas 1%, mantendo o valor inicial da massa específica aparente dos grãos (796 kg m^{-3}) (Tabela 1, Figura 2D). A infestação por insetos-praga de grãos armazenados leva ao decréscimo da massa específica aparente, visto que eles danificam o tegumento, e as larvas se alimentam do conteúdo interno, causando redução da matéria seca (MUTUNGI et al., 2015). Sementes de baixa massa específica estão mais deterioradas, e perdem sua viabilidade rapidamente durante o armazenamento (ALENCAR et al., 2009).

A infestação por *C. maculatus* também levou ao aumento da condutividade elétrica dos grãos, a qual variou significativamente em função das concentrações de AITC ($F = 72,61$; $g.l_{\text{erro}} = 18$; $P < 0,0001$). Maiores valores de condutividade elétrica representam maiores quantidades de lixiviados na solução e está relacionado com a integridade das membranas celulares (SMIDERLE et al., 1997). Em feijão-caupi, o adulto de *C. maculatus* rompe a parede externa do grão na sua emergência aumentando a lixiviação eletrolítica dos solutos e, conseqüentemente, o valor de condutividade elétrica (FREITAS et al., 2016b). Apesar do tratamento com AITC reduzir a condutividade elétrica, a manutenção do valor inicial pode ser dificultada pelo próprio AITC, já que é um composto químico sujeito a degradações.

O tratamento do feijão-caupi, infestado por *C. maculatus*, com o vapor de AITC preservou o teor de água e inibiu o desenvolvimento dos insetos, prevenindo a ocorrência de danos como perda de peso, deterioração da membrana celular, aumento do teor de água e proliferação de microorganismos nos grãos.

4 CONCLUSÃO

O uso do isotiocianato de alilo (AITC), de modo geral, não interferiu nas propriedades físicas dos grãos de feijão-caupi, exercendo papel fundamental na preservação dessas características e no controle da infestação por *C. maculatus*. Além disso, verificou-se que, embora a CL_{10} não cause a mortalidade dos insetos adultos, controlou o desenvolvimento da população, impedindo a oviposição e a progênie, devido a possíveis efeitos tóxicos do AITC sobre os ovos e larvas de *C. maculatus*.

5 REFERÊNCIAS

- AKAMI, M.; CHAKIRA, H.; ANDONGMA, A. A.; KHAESO, K.; GBAYE, A. O.; NICOLAS, N. Y.; NUKENINE, E. N.; NIU, C. Y. Essential oil optimizes the susceptibility of *Callosobruchus maculatus* and enhances the nutritional qualities of stored cowpea *Vigna unguiculata*. **Royal Society Open Science**, v.4, n.8, p.1-12, 2017.
- ALENCAR, E. R.; FARONI, L. R. A.; FILHO, A. F. L.; PETERNELLI, L. A.; COSTA, A. R. Qualidade dos grãos de soja armazenados em diferentes condições. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 5, p. 606-613, 2009.
- ASLAN, I.; ÖZBEK, H.; ÇALMAŞUR, Ö.; ŞAHİN, F. Toxicity of essential oil vapours to two greenhouse pests, *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. **Industrial Crops and Products**, v.19, n.2, p.167-173, 2004.
- BECK, C. W.; BLUMER, L. S. A handbook on bean beetles, *Callosobruchus maculatus*. **National Science Foundation**, 2014.
- BENELLI, G.; PAVELA, R.; DRENAGGI, E.; MAGGI, F. Insecticidal efficacy of the essential oil of jambú (*Acmella oleracea* (L.) RK Jansen) cultivated in central Italy against filariasis mosquito vectors, houseflies and moth pests. **Journal of Ethnopharmacology**, v.229, p.272-279, 2019.
- BEZERRA, A. K. P.; LACERDA, C. F. de; HERNANDEZ, F. F. F.; DA SILVA, F. B.; GHEYI, H. R. Rotação cultural feijão caupi/milho utilizando-se águas de salinidades diferentes. **Ciência Rural**, v.40, n.5, p.1075-1082, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395p.
- DESHPANDE, V. K.; MAKANUR, B.; DESHPANDE, S. K.; ADIGER, S.; SALIMATH, P. M. Quantitative and qualitative losses caused by *Callosobruchus maculatus* in cowpea during seed storage. **Plant Archives**, v.11, n.2, p.723-731, 2011.
- DUKE, J. A. Introduction to food legumes. In SINGH, S. R. Insect Pests of Tropical Food Legumes. **John Wiley & Sons**, Chichester, p.1-42, 1990.
- DUTRA, K. A.; OLIVEIRA, J. V.; NAVARRO, D. M. A. F.; BARBOSA, D. R. S.; SANTOS, J. P. O. Control of *Callosobruchus maculatus* (FABR.) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in *Vigna unguiculata* (L.) WALP. with essential oils from four *Citrus* spp. plants. **Journal of Stored Products Research**, v.68, p.25-32, 2016.
- FREITAS, R. C. P.; FARONI, L. R. A.; HADDI, K.; JUMBO, L. O. V.; OLIVEIRA, E. E. Allyl isothiocyanate actions on populations of *Sitophilus zeamais* resistant to phosphine: Toxicity, emergence inhibition and repellency. **Journal of Stored Products Research**, v.69, p.257-264, 2016a.

FREITAS, R. S.; FARONI, L. R. A.; SOUSA, A. H. Hermetic storage for control of common bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* (Say). **Journal of Stored Products Research**, n.66, p.1-5, 2016b.

HOPKINS, R. J.; VAN DAM, N. M.; VAN LOON, J. J. A. Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions. **Annual Review of Entomology**, v.54, p.57-83, 2009.

JUMBO, L. O. V.; FARONI, L. R. A.; OLIVEIRA, E. E.; PIMENTEL, M. A.; SILVA, G. N. Potential use of clove and cinnamon essential oils to control the bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* Say, in small storage units. **Industrial Crops and Products**, v.56, p.27-34, 2014.

MANSOUR, E. E.; MI, F.; ZHANG, G.; JIUGAO, X.; WANG, Y.; KARGBO, A. Effect of allyl isothiocyanate on *Sitophilus oryzae*, *Tribolium confusum* and *Plodia interpunctella*: Toxicity and effect on insect mitochondria. **Crop protection**, v.33, p.40-51, 2012.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Agrofit** – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. *Acessado em: 10 mar. 2019.*

MAYTON, H. S.; OLIVIER, C.; VAUGHN, S. F.; LORIA, R. Correlation of fungicidal activity of *Brassica* species with allyl isothiocyanate production in macerated leaf tissue. **Journal Phytopathology**, v.86, p.267-271, 1996.

MOURA, E. S.; FARONI, L. R. A.; ZANUNCIO, J. C.; HELENO, F. F.; PRATES, L. H. F. Insecticidal activity of *Vanillosmopsis arborea* essential oil and of its major constituent α -bisabolol against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Scientific Reports**, v.9, n.1, p.3723, 2019.

MUTUNGI, C.; AFFOIGNON, H. D.; NJOROGE, A. W.; MONONO, J.; BARIBUTSA, D.; MURDOCK, L. L. Triple-layer plastic bags protect dry common beans (*Phaseolus vulgaris*) against damage by *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Chrysomelidae) during storage. **Journal of Economic Entomology**, v.108, n.5, p.2479-2488, 2015.

NJOROGE, A. W.; AFFOIGNON, H. D.; MUTUNGI, C. M.; MANONO, J.; LAMUKA, P. O.; MURDOCK, L. L. Triple bag hermetic storage delivers a lethal punch to *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) in stored maize. **Journal of Stored Products Research**, v.58, p.12-19, 2014.

NRI (Natural Resource Institute). *Insect Pests of Nigerian Crops: Identification, Biology, and Control*. NRI, Chatham U.K., 1996.

OKE, O. A.; AKINTUNDE, E. M.; IJAOLA, S.; RAJI, D.; AGBON, J. Reduction of the nutritional values of cowpea infested with *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: bruchidae). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.4, n.8, p.912-918, 2015.

- PIMENTEL, M. A.; FARONI, L. R. A.; DA SILVA, F. H.; BATISTA, M. D.; GUEDES, R. N. Spread of phosphine resistance among Brazilian populations of three species of stored product insects. **Neotropical Entomology**, v.39, n.1, p.101-107, 2010.
- QUEZADA, M. Y.; MORENO, J.; VÁZQUEZ, M. E.; MENDOZA, M.; MÉNDEZ-ALBORES, A.; MORENO-MARTÍNEZ, E. Hermetic storage system preventing the proliferation of *Prostephanus truncatus* Horn and storage fungi in maize with different moisture contents. **Postharvest Biology and Technology**, n.39, p.321-326, 2006.
- QUILES, J. M.; NAZARETH, T. D. M.; LUZ, C.; LUCIANO, F. B.; MAÑES, J.; MECA, G. Development of an antifungal and antimycotoxigenic device containing allyl isothiocyanate for silo fumigation. **Toxins**, v.11, n.3, p.137, 2019.
- REYES-JURADO, F.; CERVANTES-RINCÓN, T.; BACH, H.; LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Antimicrobial activity of Mexican oregano (*Lippia berlandieri*), thyme (*Thymus vulgaris*), and mustard (*Brassica nigra*) essential oils in gaseous phase. **Industrial Crops and Products**, v.131, p.90-95, 2019.
- ROMANOWSKI, F.; KLENK, H. Thiocyanates and isothiocyanates, organic. In: DEGUSSA, A.G. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. **Wiley-VCH**, Weinheim, Germany, p.749-759, 2005.
- SANTOS, J. C.; FARONI, L. R. A.; SOUSA, A. H.; GUEDES, R. N. C. Fumigant toxicity of allyl isothiocyanate to populations of the red flour beetle *Tribolium castaneum*. **Journal of Stored Products Research**, v.47, n.3, p.238-243, 2011.
- SAS, SAS/STAT(R) 9.3 User's Guide. **SAS Institute**, Cary, 2011. Disponível em: <https://support.sas.com/documentation/cdl/en/statug/63962/HTML/default/viewer.htm#titlepage.htm>. Acessado em: 06 de março de 2019.
- SILVA, T. T.; COSTA, F. M. Survey of insects that attack stored bean grains *Vigna unguiculata* (L.) and *Phaseolus vulgaris* L. in Porto Velho, Rondônia, Brazil. **EntomoBrasilis**, v.9, n.2, p.124-128, 2016.
- SILVA, M. G.; SILVA, G. N.; SOUSA, A. H.; FREITAS, R. S.; SILVA, M. S.; ABREU, A. O. Hermetic storage as an alternative for controlling *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) and preserving the quality of cowpeas. **Journal of Stored Products Research**, v.78, p.27-31, 2018.
- SMIDERLE, O. J.; SANTOS FILHO, B. D.; SANTOS, D. D.; LOECK, A. E.; SILVA, J. D. Qualidade física e fisiológica de sementes de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) submetidos ao ataque de *Rhizopertha dominica* Fabricius e *Sitophilus* sp. durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v.19, n.1, p.1-8, 1997.
- SOUZA, L. P. de; FARONI, L. R. A.; LOPES, L. M.; SOUSA, A. H.; PRATES, L. H. F. Toxicity and sublethal effects of allyl isothiocyanate to *Sitophilus zeamais* on population development and walking behavior. **Journal of Pest Science**, v.91, n.2, p.761-770, 2018.
- TANZUBIL, P. B. Control of some insect pests of cowpea (*Vigna unguiculata*) with neem (*Azadirachta indica*) in Northern Ghana. **Tropical Pest Management**, v.37, p.216-217, 1991.

TAY, W. T.; BECKETT, S. J.; BARRO, P. J. Phosphine resistance in Australian *Cryptolestes* species (Coleoptera: Laemophloeidae): perspectives from mitochondrial DNA cytochrome oxidase I analysis. **Pest Management Science**, v.72, p.1250-1259, 2016.

VALES, M. I.; RANGA RAO, G. V.; SUDINI, H.; PATIL, S. B.; MURDOCK, L. L. Effective and economic storage of pigeonpea seed in triple layer plastic bags. **Journal of Stored Products Research**, v.58, p.29-38, 2014.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164p.

WALTHALL, W. K.; STARK, J. D. A comparison of acute mortality and population growth rate as endpoints of toxicological effect. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.37, n.1, p.45-52, 1997.

WU, H.; LIU, X. R.; YU, D. D.; ZHANG, X.; FENG, J. T. Effect of allyl isothiocyanate on ultra-structure and the activities of four enzymes in adult *Sitophilus zeamais*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.109, p.12-17, 2014.

YADAV, M.; RANA, J. S. Quantitative analysis of Sinigrin in *Brassica juncea*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.7, n.2, p.948-954, 2018.

YU, J. C.; JIANG, Z. T.; LI, R.; CHAN., S. M. Chemical composition of the essential oils of *Brassica juncea* (L.) Coss. grown in different regions, Hebei, Shaanxi and Shandong, of China. **Journal of Food Drug Anal**, v.11, p.22-26, 2003.

**MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM *HEADSPACE*: VALIDAÇÃO DE
MÉTODO E ANÁLISE DA PERSISTÊNCIA DO ISOTIOCIANATO DE ALILO EM
FEIJÃO-CAUPI**

RESUMO: Óleos essenciais têm sido reconhecidos como uma alternativa eficiente e segura aos inseticidas tradicionais para o controle de insetos-praga de produtos armazenados. Assim, métodos para determinação de resíduos de bioinseticidas em produtos alimentícios são de grande importância. O presente estudo otimizou e validou um método simples e eficaz para extração e quantificação dos resíduos do isotiocianato de alilo (principal componente do óleo essencial de mostarda) em amostras de feijão-caupi. O método proposto utiliza microextração em fase sólida em *headspace* (HS-SPME) e análise por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/FID). Na otimização, um planejamento composto central (CCD) com fatorial 2^2 foi utilizado para avaliar o comportamento simultâneo dos fatores. Melhores condições de extração do AITC foram alcançadas quando se utilizou o tempo de exposição da fibra (15 min) e temperatura do banho (30 °C). O método otimizado HS-SPME foi validado, avaliando os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), exatidão e precisão. O LOD e LOQ do método para o AITC foi 0,01 e 0,03 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. O método alcançou um alto nível de seletividade, onde o coeficiente de determinação (r^2) encontrado para o AITC foi superior a 0,99, na faixa de concentração utilizada. A taxa de recuperação relativa variou de 108,2 a 114,8%, com coeficiente de variação inter-dias inferior a 9%. A persistência do AITC em amostras de feijão-caupi foi avaliada, onde 36 h após a fumigação do composto não foi detectado a presença dos resíduos nos grãos, demonstrando sua segurança como fumigante em alimentos.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, AITC, resíduo de pesticidas, cromatografia gasosa, HS-SPME.

HEADSPACE SOLID-PHASE MICROEXTRACTION: METHOD VALIDATION AND ANALYSIS OF ALLYL ISOTHIOCYANATE PERSISTENCE IN COWPEA BEANS

ABSTRACT: Essential oils have been known as an efficient and safe alternative to traditional insecticides in pest control of stored products. Thus, methods for determining bioinsecticides residues in food products are incredibly important. The present study optimized and validated a simple and effective method for extraction and quantification of allyl isothiocyanate residues (major component of mustard essential oil) in cowpea beans samples. The proposed method uses headspace solid phase microextraction (HS-SPME) and flame ionization detector gas chromatography (GC/FID) analysis. For optimization, a central composite design (CCD) with a 2^2 factorial was used to evaluate the simultaneous behavior between factors. Better AITC extraction conditions were achieved by using fiber exposure time (15 min) and bath temperature (30 °C). The optimized HS-SPME method was validated by evaluating the following parameters: selectivity, linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), accuracy and precision. The LOD and LOQ of the method for AITC were 0.01 and 0.03 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. The method reached a high level of selectivity, where the determination coefficient (r^2) achieved for the AITC was above 0.99 in the concentration range used. The relative recovery rate ranged from 108.2 to 114.8%, with an inter-day coefficient of variation of less than 9%. The persistence of AITC in cowpea samples was evaluated, where 36 h after the compound fumigation no presence of residue was detected in the grains, demonstrating its safety as a fumigant in food products.

Keywords: *Vigna unguiculata*, AITC, pesticide residue, gas chromatography, HS-SPME.

1 INTRODUÇÃO

No armazenamento de produtos agrícolas os inseticidas protetores (piretróides e organofosforados) e o fumigante fosfina (PH_3) tem sido os mais utilizados para controlar insetos-praga (GBAYE et al., 2016; OPIT et al., 2016). Para controle de *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Chrysomelidae) em feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], a fosfina é o único inseticida permitido (MAPA, 2019), mas seu uso apresenta riscos devido à poluição ambiental e danos à saúde (HASHIMOTO et al., 2019), além do desenvolvimento de populações de insetos-praga resistentes (PIMENTEL et al., 2010; GBAYE et al., 2016; TAY et al., 2016). Consequentemente, tem havido um esforço para encontrar produtos de origem botânica com as mesmas funções e características dos inseticidas convencionais (HU et al., 2017). Os bioinseticidas são considerados mais seguros, não estão relacionados ao desenvolvimento de resistência das pragas e apresentam menor risco de contaminação do meio ambiente e à saúde humana e animal (PAVELA & BENELLI, 2016; SMITH et al., 2018).

O isotiocianato de alilo (AITC) pode ser obtido a partir de vários vegetais crucíferos comuns, como a de mostarda preta (*Brassica nigra* L.), a mostarda indiana (*Brassica juncea* L.) ou o wasabi (*Eutrema japonicum* (Miq.) Koidz). É conhecido por sua atividade tóxica e repelente contra vários ácaros, fungos, nematoides, insetos e microrganismos (LIN et al., 2000; DINGRA et al., 2004; NEVES et al., 2005; HAMDI et al., 2015; REYES-JURADO et al., 2019). Além disso, é um produto natural considerado seguro para a saúde humana e para o meio ambiente (European Food Safety Authority, 2010). A exposição humana ao AITC é, sem dúvida, generalizada e frequente, uma vez que muitos vegetais crucíferos comuns são uma fonte rica de AITC, mas os níveis de exposição não foram bem documentados (ZHANG, 2010). No geral, o AITC exibe muitos atributos desejáveis de um inseticida, porém estudos adicionais são necessários para elucidar seu mecanismo de ação e persistência. Devido à negligência e a consequente exposição do público aos pesticidas, há um aumento na demanda por alimentos livres destes produtos, o que instigou pesquisas para monitorar e avaliar o risco de consumir alimentos contaminados.

A análise da persistência de inseticidas é importante para garantir segurança alimentar e serve para determinar o período de carência (PIMENTEL et al., 2005). Vale ressaltar que há carência de estudos relacionados com a avaliação da persistência de inseticidas botânicos em grãos armazenados. Há trabalhos que relatam a utilização do método de microextração em fase sólida (SPME) para determinar resíduo de fosfina (PH_3) em grãos armazenados (REN et al.

2012); porém, para o AITC não há. É necessário desenvolver métodos que identifiquem e quantifiquem a presença de óleos essenciais e seus compostos em grãos a fim de garantir a segurança no seu uso.

Técnicas para a determinação de resíduos de pesticidas em amostras complexas evoluíram significativamente em termos de simplificação, melhoria da extração e purificação de amostras, com os principais objetivos de minimizar o consumo de solventes e reagentes e otimizar a limpeza (GHARARI et al., 2016). Entre os modernos métodos analíticos para quantificação de pesticidas em diferentes matrizes destacam-se a cromatografia gasosa (GC). Por esta técnica as substâncias são separadas, identificadas e quantificadas, sendo necessária, entretanto, etapa prévia de extração e concentração (CARLOS et al., 2011).

A microextração em fase sólida (SPME) é uma das técnicas de extração mais empregada atualmente, principalmente quando se trata de extração multirresíduo de compostos orgânicos. Estudos reportados na literatura têm mostrado a eficiência desta técnica para extração de piretroides e organoclorados, além de propostas de extração simultânea de pesticidas pertencentes a diferentes classes (CASAS et al., 2006; JÚNIOR & RE-POPPI, 2007; ABDULRA'UF & TAN, 2015; LI et al., 2018). O método de microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME) tem vantagens sobre os demais métodos por reduzir ou eliminar o uso de solventes orgânicos, além de permitir a extração e concentração do analito de forma simultânea (GHARARI et al., 2016; KREUTZ et al., 2018).

Vários são os estudos que avaliam a toxicidade de compostos botânicos sobre diversos insetos-praga de produtos armazenados. No entanto, monitorar a persistência destes compostos em produtos alimentícios é necessário para garantir a segurança do seu consumo. O objetivo principal deste trabalho foi otimizar e validar um método para a determinação dos resíduos de AITC em feijão-caupi por meio das técnicas de microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME) e cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/FID); e analisar a persistência do resíduo de AITC em feijão-caupi depois de fumigado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes, soluções e matéria-prima

Inicialmente, foram realizados testes preliminares, a fim de selecionar os solventes orgânicos que não apresentassem toxicidade para os insetos adultos de *C. maculatus* e que fossem compatíveis com a cromatografia gasosa. Os solventes que atenderam a estes critérios

foram o tolueno ($\geq 99,5\%$ v/v, Vetec, Brasil), acetonitrila ($\geq 99,9\%$ v/v, Sigma-Aldrich, Brasil), etanol ($\geq 99,5\%$ v/v, Êxodo Científica, Brasil) e octanol ($\geq 99\%$ v/v, Vetec, Brasil). Dentre os solventes testados para realizar a diluição do padrão do isotiocianato de alilo (AITC), o etanol foi o solvente que apresentou melhor resposta cromatográfica. Para a etapa de otimização do método, uma solução estoque do AITC adquirido da Sigma-Aldrich ($>95\%$ v/v, Brasil) foi preparada em etanol na concentração de $2,4 \text{ g L}^{-1}$. Para a validação do método, foi preparada uma solução estoque de AITC na concentração de $5,0 \text{ g L}^{-1}$ de etanol e a partir desta solução foram preparadas as soluções de trabalho nas concentrações adequadas. Todas as soluções padrão foram armazenadas em *freezer*, à temperatura de $-18 \text{ }^\circ\text{C}$.

Como matéria prima para todos os experimentos, foram utilizados grãos de feijão-caupi da variedade BRS Guariba, com 10% de umidade e massa específica aparente de 796 kg m^{-3} , cultivados no estado do Maranhão, Brasil [latitude $4^\circ 27' 18''$ (S), longitude $43^\circ 53' 09''$ (W) e altitude de 43 m], livres de inseticidas e mantidos sob refrigeração ($-18 \text{ }^\circ\text{C}$) para evitar infestação.

2.2 Análise cromatográfica

A identificação e quantificação de AITC nas amostras de feijão-caupi foi realizada em um cromatógrafo a gás equipado com detector por ionização em chama (GC/FID) modelo 2014 (Shimadzu, Japão). A separação cromatográfica foi realizada em coluna capilar HP-5 (Agilent Technologies, USA), com fase estacionária composta por 5% de fenil e 95% de dimetilsiloxano ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm d.i.}$ e $0,10 \text{ } \mu\text{m}$ de espessura de filme) empregando o nitrogênio (99,999%, Air Products, Brasil) como gás de arraste em um fluxo de $1,8 \text{ mL min}^{-1}$ e razão de *split* de 1:5. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas em 280 e $300 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. A temperatura inicial do forno da coluna foi $45 \text{ }^\circ\text{C}$ (2 min), com rampa de aquecimento de $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até atingir $110 \text{ }^\circ\text{C}$ (1,8 min), totalizando 6 min de corrida. O período de dessorção térmica foi de 3,0 min, após o qual a fibra era retirada do injetor. As corridas foram gerenciadas por meio do *software* CGsolution (Shimadzu, Japão).

2.3 Microextração em fase sólida com *headspace* (HS-SPME)

Amostras de $5,0 \text{ g}$ de feijão-caupi foram colocadas em frascos de vidro âmbar de 40 mL de capacidade, com tampa de teflon e septo de silicone/PTFE, e fortificadas com o AITC. Os frascos contendo as amostras foram transferidos para um banho com água equipado com um

agitador magnético com aquecimento, a uma temperatura fixa previamente ajustada e agitação constante. A fibra, diariamente condicionada conforme recomendações do fabricante, era colocada em contato com a parte gasosa da amostra (*headspace*) durante todo o período de aquecimento, empregando-se um suporte manual (*holder*) próprio para SPME (Supelco Bellefort, USA). Após o tempo de extração, a fibra foi recolhida, retirada do frasco e imediatamente introduzida no injetor do cromatógrafo a gás. A fibra foi exposta e os analitos foram termicamente desorvidos da fibra sob fluxo do gás de arraste e carreados para a coluna cromatográfica.

2.4 Otimização da fortificação da amostra de feijão-caupi

Os solventes tolueno, acetonitrila, etanol e octanol, usados para diluição do padrão de AITC, foram testados a fim de verificar a melhor resposta cromatográfica. Para isso, 5,0 g de amostras de feijão-caupi foram colocadas nos frascos e fortificadas com 50 μL de solução de AITC na concentração de 2,4 g L^{-1} , preparados nos solventes citados acima. As amostras foram homogeneizadas em vortex (Vortex Mixer CE, Coreia) por 1 min e mantidas em repouso por 5 min. A fibra foi mantida exposta a 40 °C por 10 min e logo após introduzida no injetor do cromatógrafo a gás.

Outro estudo realizado foi para avaliar se a condição do frasco (aberto ou fechado) durante o tempo de fortificação influenciaria a resposta cromatográfica. Assim, após a fortificação das amostras, os frascos foram fechados e agitados em vortex por 1 min, e então colocados em repouso por 5 min nas duas condições diferentes. As extrações de AITC foram realizadas na temperatura de 30 °C durante um tempo de exposição da fibra de 8, 14 ou 20 min, sendo que cada combinação foi realizada com o frasco aberto ou fechado durante o tempo de repouso.

Foi avaliado, também, se o tempo de fortificação influenciaria na resposta cromatográfica por meio de testes com 5, 10 ou 15 min. A temperatura e o tempo de extração utilizados no procedimento de HS-SPME foram de 30 °C e 15 min, respectivamente. Em todos os testes, a solução de AITC foi aplicada diretamente nos grãos com microseringa de 50 μL (Hamilton Company, USA) e a fibra utilizada foi a de divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) *stableflex* de 50/30 μm (Supelco Bellefort, USA). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

2.5 Otimização do método de microextração em fase sólida em *headspace* para amostras de feijão-caupi

2.5.1 Avaliação univariada dos tipos de fibras

Três fibras comercialmente disponíveis foram comparadas univariadamente: a fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) de sílica fundida de 100 μm de espessura, a fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) de sílica fundida de 65 μm e a fibra de divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) *stableflex* de 50/30 μm (Supelco Bellefort, USA). As amostras de feijão (5,0 g) foram colocadas nos frascos e fortificadas com 50 μL de solução de AITC na concentração de 2,4 g L^{-1} , preparados em etanol. A solução foi aplicada diretamente nos grãos com microsseringa de 50 μL , resultando em uma concentração de AITC de 22,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de feijão-caupi, que corresponde a concentração letal do AITC para mortalidade de 95% da população (CL_{95}) de *C. maculatus*, obtida no capítulo 1. Para garantir uma boa distribuição do AITC nos grãos, as amostras foram homogenizadas em vortex por 1 min e deixadas em repouso por 5 min até a extração, para equilíbrio do vapor de AITC no *headspace*. Realizou-se o procedimento de HS-SPME a 40 °C por 5 min. Os ensaios foram realizados em duplicatas. Antes do uso, as fibras foram condicionadas conforme recomendado pelo fabricante.

2.5.2 Avaliação multivariada de tempo e temperatura de extração

Nesta etapa de otimização da técnica de extração, a temperatura do banho em agitador magnético com aquecimento (30, 40 ou 50 °C) e o tempo de exposição da fibra (3, 9 ou 15 min) foram avaliados por um planejamento composto central para avaliar o comportamento simultâneo dos dois fatores. O planejamento empregado foi o fatorial 2^2 com seis pontos centrais, totalizando 14 ensaios (Tabela 1).

Amostras de feijão-caupi (5,0 g) foram fortificadas com 50 μL da solução de AITC na concentração de 2,4 g L^{-1} , resultando em uma concentração final de 22,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ nos grãos. As amostras foram homogeneizadas, deixadas em repouso com o frasco aberto durante 5 min e, submetidas às diferentes condições de extração. A fibra utilizada foi a que apresentou melhor resposta cromatográfica no item 2.5.1.

Tabela 1 – Planejamento composto central realizado para estabelecer as melhores condições para extração do AITC em amostras de feijão.

ENSAIO	FATORES (VALORES CODIFICADOS)		FATORES (VALORES REAIS)	
	A	B	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	-	-	30,0	3,0
2	+	-	50,0	3,0
3	-	+	30,0	15,0
4	+	+	50,0	15,0
5	0	0	40,0	9,0
6	0	0	40,0	9,0
7	0	0	40,0	9,0
8	-	-	30,0	3,0
9	+	-	50,0	3,0
10	-	+	30,0	15,0
11	+	+	50,0	15,0
12	0	0	40,0	9,0
13	0	0	40,0	9,0
14	0	0	40,0	9,0

A: temperatura do banho em agitador magnético com aquecimento e B: tempo de exposição da fibra.

Fonte: A autora, 2019.

2.6 Validação do método otimizado

A validação do método HS-SPME otimizado para extração de AITC em feijão-caupi baseou-se nos seguintes parâmetros: seletividade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, exatidão e precisão intermediária. A validação do método foi desenvolvida de acordo com as normas do guia SANTE/11813/2017 (EURL, 2017).

Para avaliar a seletividade, amostras de feijão-caupi tratadas com AITC e não tratadas (branco) foram submetidas ao método de extração e análise, e seus cromatogramas foram comparados. O LOD e LOQ do método proposto para amostras de feijão foi determinado considerando o valor maior ou igual a 3 e 10 vezes o sinal da linha de base (ruído), respectivamente.

A linearidade de resposta do método foi determinada pelas análises de amostras de feijão-caupi fortificadas com sete diferentes níveis de concentração (1LOQ, 10LOQ, 50LOQ, 100LOQ, 250LOQ, 500LOQ e 1000LOQ). Os ensaios foram realizados em triplicatas. Após as

injeções cromatográficas, foi construída uma curva analítica, seguida de análise de regressão linear.

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação relativa e repetibilidade. As amostras de feijão-caupi foram fortificadas com três níveis de concentração de AITC, correspondentes aos valores de 1LOQ, 50LOQ e 250LOQ. A porcentagem da recuperação relativa foi calculada pela razão entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente e a repetibilidade foi determinada pelo valor do coeficiente de variação (CV%) das concentrações obtidas experimentalmente, ambas em sete replicatas. Para determinar a precisão intermediária do método (reprodutibilidade intra-laboratorial), amostras de feijão-caupi foram fortificadas com AITC no nível referente ao valor de 50LOQ em 3 dias diferentes. Em cada um dos dias, sete amostras idênticas foram analisadas por um mesmo analista, no mesmo laboratório, sob as mesmas condições de trabalho. O resultado foi determinado pelo CV%.

2.7 Aplicação do método de microextração em fase sólida em *headspace* associado à análise por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama para avaliação de persistência de resíduo do isotiocianato de alilo em feijão-caupi

O método otimizado e validado foi empregado para avaliar a persistência dos resíduos AITC em amostras de feijão-caupi. Para a parte experimental, amostras de feijão (240 g) foram adicionadas em frasco de vidro com capacidade de 0,3 L e tratados por fumigação com o AITC na concentração de $22,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ (CL₉₅ para *C. maculatus*).

Na parte superior do frasco foi adaptado um cano de PVC com espessura de 1,0 cm, coberto com organza, para simular um *plenum*, onde foi colocado um papel filtro umedecido com o AITC. Os frascos foram fechados com tampa metálica rosqueável, selados com *parafilm* (PM996, American, USA) e mantidos em câmara incubadora (Lucadema, São Paulo, Brazil) com temperatura constante de 27 °C.

O tempo de fumigação dos bioensaios foi de 24 h, contudo desde a primeira hora após o início do tratamento, o resíduo de AITC foi quantificado pelo método de HS-SPME-GC/FID validado. Em cada intervalo de tempo (1, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 h após o início da fumigação) os frascos contendo feijão-caupi eram homogeneizados, as amostras pesadas rapidamente e submetidas a extração e análise por cromatografia gasosa. Vinte e quatro horas após a fumigação, os grãos foram transferidos para sacos de náilon (12 x 16 cm), e novamente armazenados na câmara. Assim, sucessivamente, a análise do resíduo foi realizada a cada 4 h

até que não fosse mais possível quantificar o AITC nos grãos. O experimento foi realizado em triplicata e em cada intervalo de tempo eram retiradas duas alíquotas de 5,0 g de cada frasco e submetidas a análise.

A persistência do AITC foi calculada por meio da curva analítica do método, e diferentes modelos foram testados para explicar a dissipação dos resíduos de AITC em feijão-caupi.

2.8 Análises estatísticas

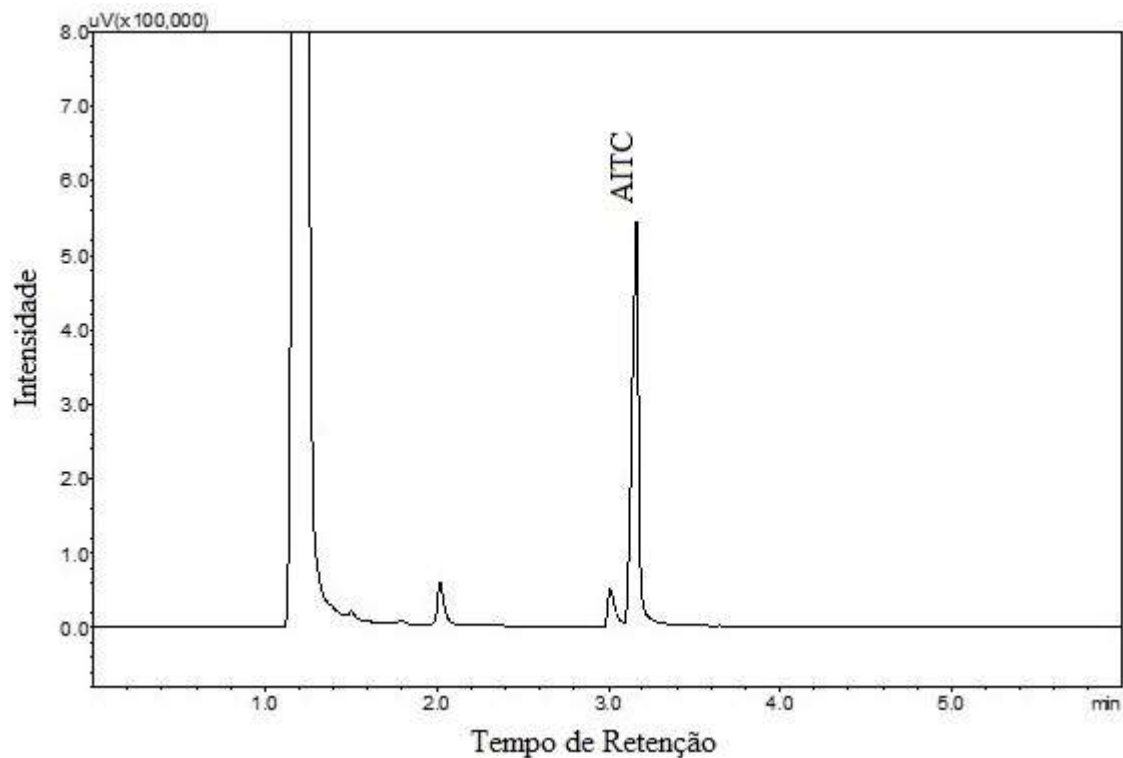
As respostas cromatográficas das fibras de SPME expostas ao AITC, dos diferentes tipos de solventes, e da condição do tempo de repouso foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey ($P > 0,05$). O tempo e a temperatura de extração (planejamento fatorial 2^2) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão por superfície resposta. A curva de calibração para extração de AITC e as curvas de persistência do resíduo de AITC no feijão-caupi foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão. As análises foram realizadas no *software* Statistica, versão 10 (STATSOFT, INC., Tulsa, OK, USA), e os gráficos foram plotados no *software* SigmaPlot 13.1 (SYSTAT SOFTWARE, INC., San Jose, CA, USA).

3 RESULTADOS

3.1 Análise cromatográfica

As condições cromatográficas otimizadas permitiram a separação do analito de interesse (AITC) com um tempo de análise de 6 min. No cromatograma, o AITC apresentou pico duplo devido à conversão em isômeros durante a injeção no cromatógrafo. Deste modo foi necessário o somatório das áreas dos picos dos respectivos isômeros para obtenção do valor total da área atribuída ao AITC. Na Figura 1 está representado um cromatograma obtido após análise de feijão-caupi fortificado com AITC em concentração de $22,8 \mu\text{g kg}^{-1}$, referente a CL_{95} utilizada no controle de *C. maculatus*.

Figura 1 – Cromatograma obtido após microextração em *heapspace* em feijão-caupi fortificado com AITC (tempo de retenção = 3 min) na concentração de $22,8 \mu\text{g kg}^{-1}$.

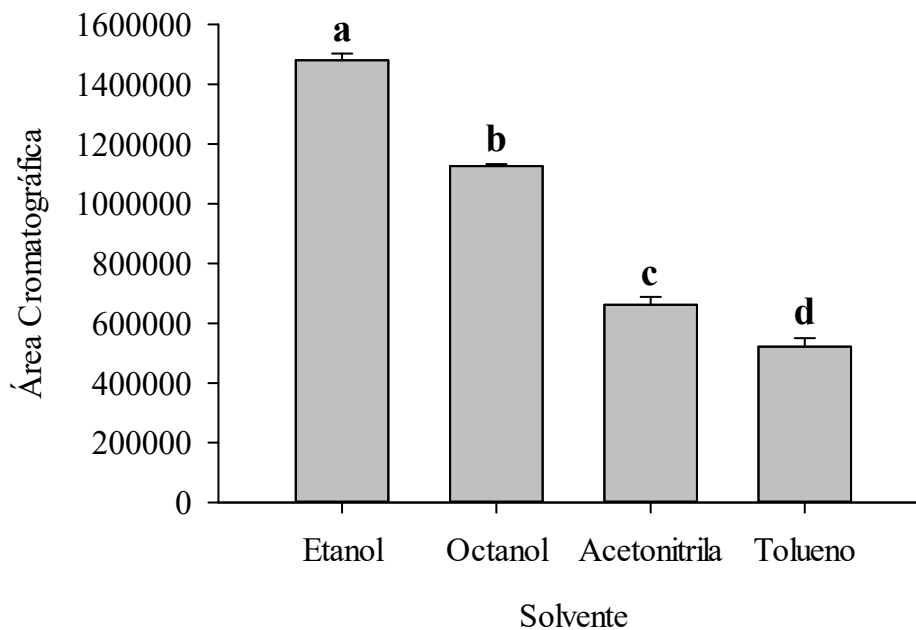


Fonte: A autora, 2019.

3.2 Otimização da fortificação das amostras de feijão-caupi

Os solventes pré-selecionados em função da mortalidade dos insetos da espécie *C. maculatus* foram testados quanto à resposta cromatográfica obtida para o AITC. Houve diferença significativa entre os solventes ($F = 382,03$; $g.l_{\text{erro}} = 4$; $P < 0,0001$), sendo que o etanol apresentou maior área cromatográfica, seguido do octanol, acetonitrila e tolueno (Figura 2). Além disso, o etanol apresenta baixo custo e facilidade de acesso. Assim, todas as etapas seguintes do trabalho utilizou o etanol como solvente para diluição do padrão de AITC.

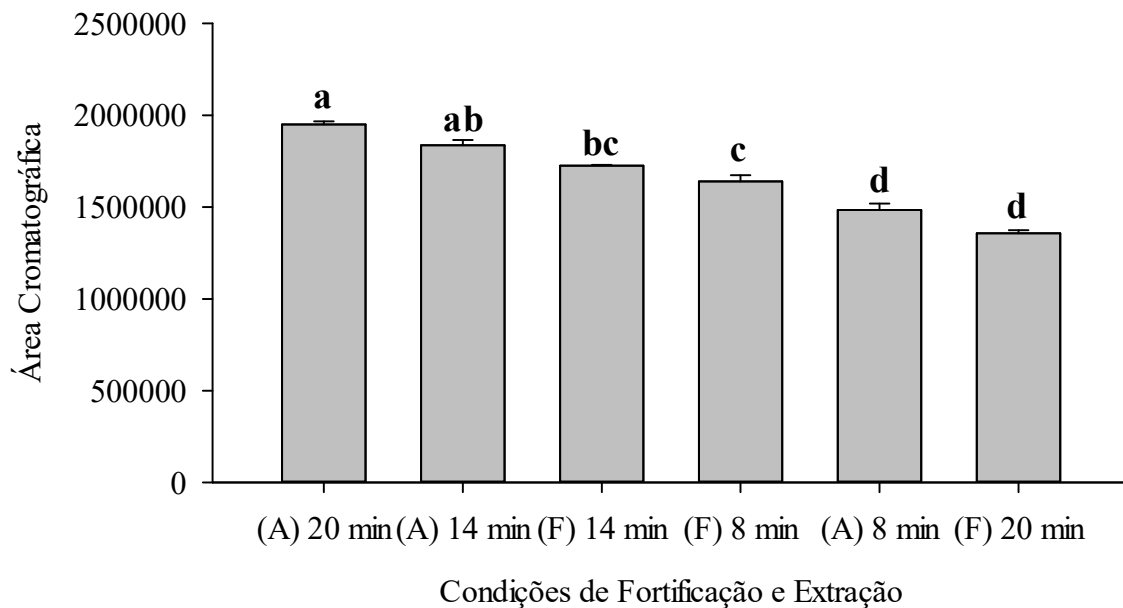
Figura 2 – Otimização univariada do solvente a ser utilizada no método de HS-SPME para extração de AITC em feijão-caupi.



Fonte: A autora, 2019.

Um dos passos mais importantes na extração de agrotóxicos é a homogeneização entre da amostra. As combinações testadas com o frasco aberto ou fechado e em diferentes tempos de fortificação diferiram significativamente ($F = 55,63$; $g.l_{\text{erro}} = 7$; $P < 0,0001$). Os ensaios em que os frascos ficaram abertos durante o tempo de fortificação, apresentaram uma maior resposta de área cromatográfica em relação aos que ficaram fechados, exceto no tempo de 8 min (Figura 3). Para o tempo de extração, observa-se que em 20 e 14 min as áreas cromatográficas foram estatisticamente iguais.

Figura 3 - Otimização univariada da fortificação: (A) aberto ou (F) fechado, combinado ao tempo de extração das amostras pelo método de HS-SPME.



Fonte: A autora, 2019.

Para avaliar a influência do tempo de fortificação na extração do AITC foram empregados a temperatura e tempo de extração de 30 °C e 15 min, respectivamente. Os tempos testados (5, 10 ou 15 min) não apresentaram diferença estatística ao nível de 5% probabilidade por meio do teste F ($F = 0,0522$; g.l._{erro} = 3; $P = 0,9499$). Desta forma, o menor tempo de fortificação das amostras (5 min) foi escolhido para dar prosseguimento ao método.

3.3 Otimização do método de microextração em fase sólida em *headspace* para amostras de feijão-caupi

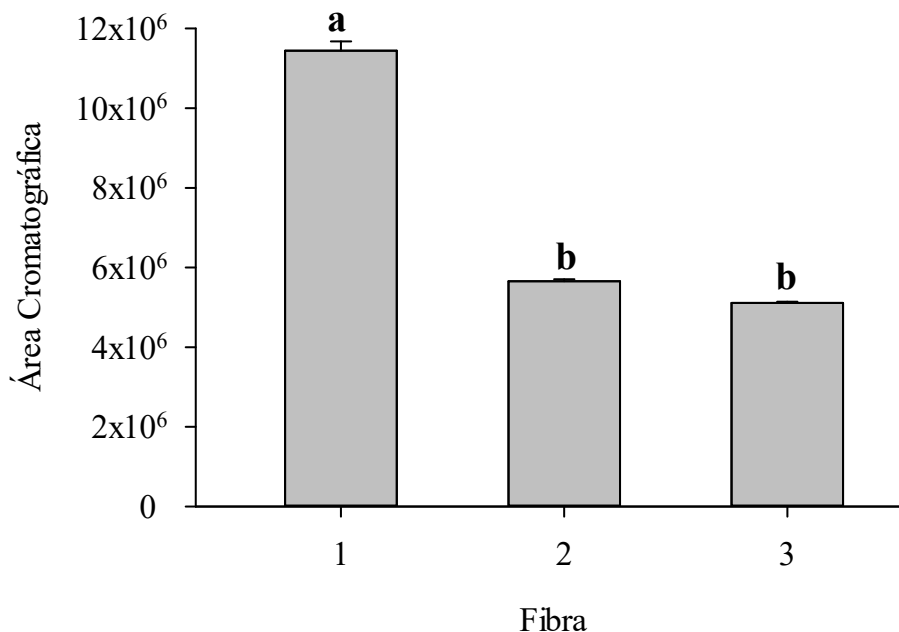
A otimização do método de extração foi estudada de duas maneiras: i) otimização univariada da fibra e, ii) otimização multivariada do tempo e da temperatura. As melhores condições de extração foram avaliadas comparando os valores da área do pico referente ao AITC.

3.3.1 Avaliação da fibra

A escolha adequada da fibra é essencial para o estabelecimento de um método sensível para microextração em fase sólida e depende da natureza química do composto de interesse. A

determinação da fibra para extração do AITC foi baseada na área da resposta cromatográfica de cada fibra exposta ao AITC na temperatura de 40 °C e tempo de extração de 5 min (Figura 4). O comportamento das três fibras diferiu significativamente para extração de AITC ($F = 653,45$; $g.l_{\text{erro}} = 6$; $P < 0,0001$). A fibra de DVB/CAR/PDMS *stableflex* de 50/30 μm diferiu das fibras de PDMS de sílica fundida de 100 μm e de PDMS/DVB de sílica fundida de 65 μm , apresentando resposta com maior área cromatográfica, indicando melhor extração do AITC.

Figura 4 – Otimização univariada da fibra a ser utilizada no método de HS-SPME. Fibras testadas: (1) fibra de divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) *stableflex* de 50/30 μm ; (2) fibra de PDMS de sílica fundida de 100 μm , e; (3) fibra de PDMS/DVB de sílica fundida de 65 μm .



Fonte: A autora, 2019.

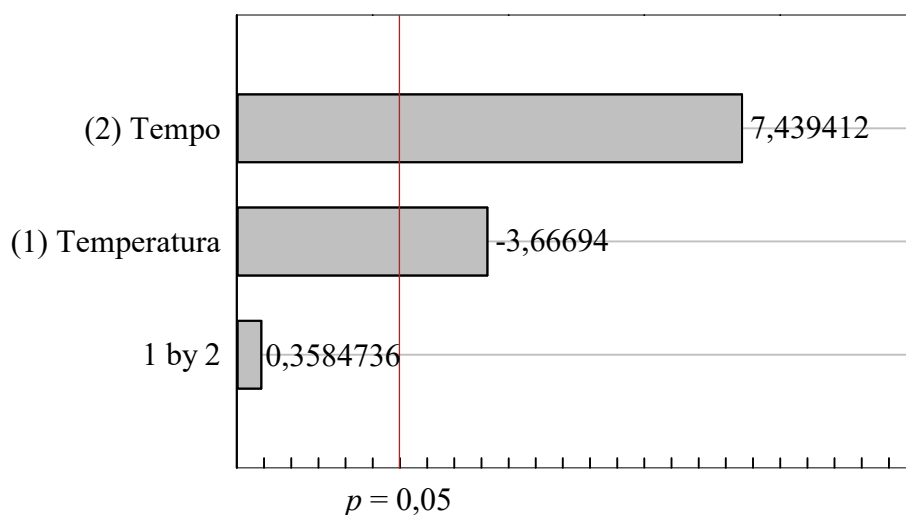
A polaridade, o peso molecular e o tamanho do analito a ser analisado são critérios que devem ser considerados para determinação da fibra adequada para a técnica de HS-SPME (KREUTZ et al., 2018). As fibras revestidas pelo PDMS são melhores, pois a longo prazo apresentam estabilidade e desempenho, nos seguintes aspectos: cromatografia, características de extração e recuperação do analito. Além disso, são fibras duráveis e normalmente mantêm seu desempenho por até 100 ciclos analíticos. As fibras de PDMS não são polares, portanto, são recomendadas pelos fornecedores para extração de analitos não polares, como compostos aromáticos e voláteis dos óleos essenciais. No caso das fibras mistas, que apresentam revestimentos contendo DVB ou CAR, tem um aumento na sua capacidade de retenção devido

a um efeito mutuamente potencializador na extração e distribuição da fase estacionária. A fibra de revestimento duplo DVB/CAR/PDMS compreende uma camada de PDMS-DVB sobre uma camada de CAR-PDMS e é recomendada para extração de compostos responsáveis pelo sabor e odor (voláteis e semi-voláteis) em alimentos (DUCKI et al., 2008).

3.3.2 Avaliação multivariada de tempo e temperatura de extração

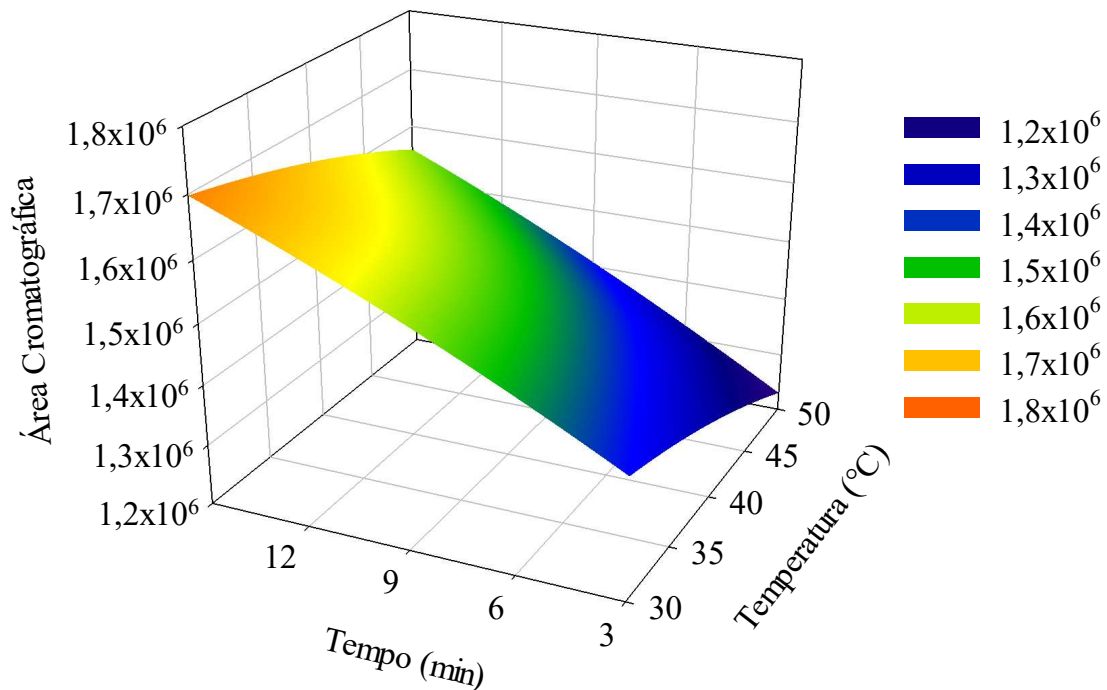
A eficiência da microextração em fase sólida em *headspace* (HS-SPME) pode sofrer a influência de alguns fatores como a escolha do tempo ideal de exposição da fibra e a temperatura do banho. Para avaliar as melhores condições de extração, um planejamento composto central (CCD) com fatorial 2^2 com seis pontos centrais foi empregado. Assim, a melhor condição de extração do AITC foi na temperatura de 30 °C e no tempo de 15 min. Nesta condição de extração obteve-se a maior área cromatográfica pela análise no GC/FID. Na Figura 5 é apresentado o gráfico de Pareto para os efeitos desses fatores sobre a extração do AITC. A análise de regressão por superfície de resposta apresentou comportamento linear para os dois parâmetros ($R^2 = 0,87$), e mostrou que o tempo de extração influenciou positivamente a resposta cromatográfica, assim como a temperatura influenciou negativamente o tamanho da área referente ao AITC, ambos ao nível de 5% (Figura 6).

Figura 5 – Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados em relação à variável área cromatográfica.



Fonte: A autora, 2019.

Figura 6 – Otimização multivariada da do tempo e da temperatura a serem utilizados no método de HS-SPME para extração de AITC em feijão-caupi.



Fonte: A autora, 2019.

O método de HS-SPME envolve um processo de equilíbrio multifásico. De modo geral, o tempo e a temperatura de extração estão entre os fatores mais importantes que afetam o método e geralmente são investigados e otimizados (GHARARI et al., 2016). O tempo de equilíbrio no *headspace* está relacionado com a temperatura de extração, espessura do revestimento da fibra e coeficientes de difusão dos analitos (LIU et al., 2006). Observa-se, na Figura 6, que com o aumento da temperatura em qualquer tempo de extração há uma diminuição nas respostas, o que pode ser explicado pela dessorção do composto na fibra à altas temperaturas ao custo do processo de sorção do composto.

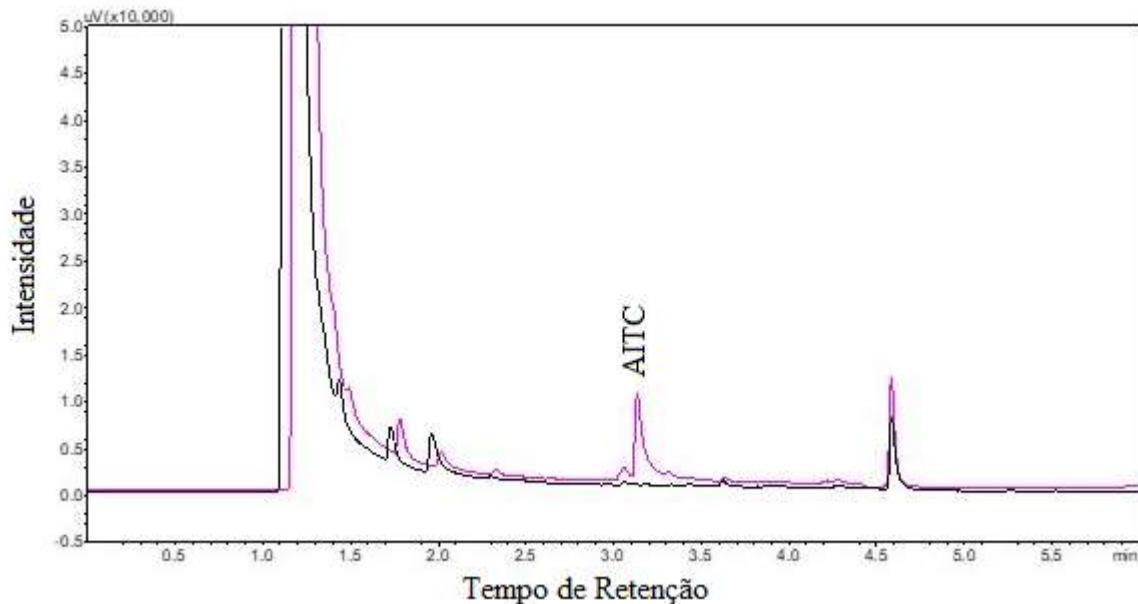
3.4 Validação do método otimizado

3.4.1 Seletividade do método

Para avaliar a seletividade, o método otimizado foi aplicado em amostras de feijão-caupi-livre de qualquer aplicação de pesticida. Posteriormente, essas amostras foram fortificadas com o AITC e submetidas novamente ao método de extração e análise. Os cromatogramas referentes a essas amostras foram comparados (Figura 7), não sendo observado

nenhum interferente com resposta no tempo de retenção do analito de interesse. A amostra de feijão-caupi livre de aplicações não possui substâncias no mesmo tempo do composto testado, o que faz com que o método seja seletivo.

Figura 7 – Cromatogramas das amostras de feijão-caupi fortificadas com solução de AITC na concentração de 10 vezes o valor do LOQ (---) e com etanol (---).



Fonte: A autora, 2019.

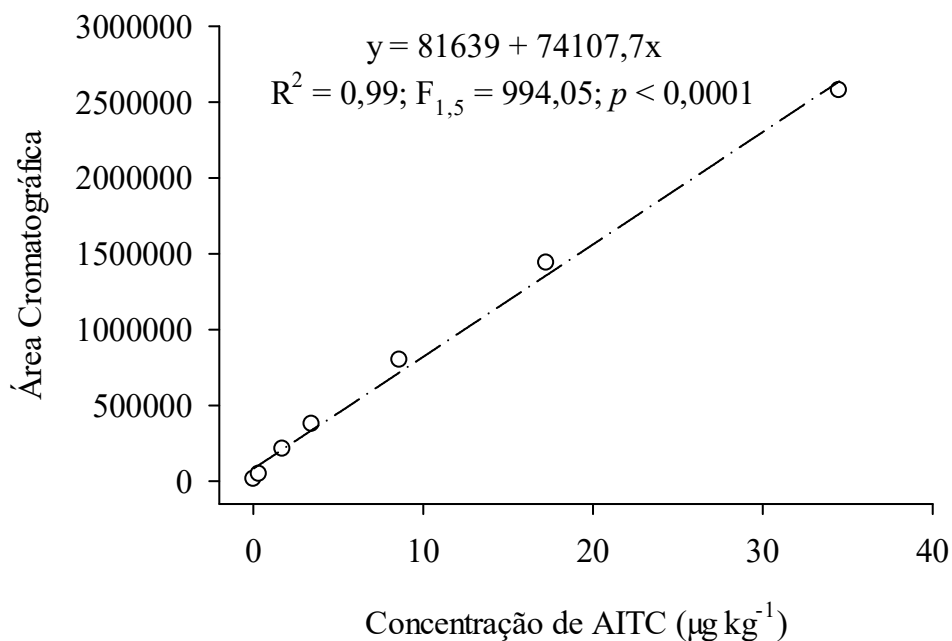
3.4.2 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

O LOD é a menor concentração do analito detectável na amostra por qualquer método analítico, enquanto que o LOQ é a menor concentração de analito que pode ser quantificada com um nível aceitável de precisão atendendo os critérios de repetibilidade e precisão (ABAD et al., 2010; EURL, 2017). O LOD e LOQ para o AITC foram determinados pela razão sinal/ruído, onde apresentaram concentrações de $0,01 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $0,03 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. O AITC não é atualmente registrado por agências reguladoras do governo para fumigação de grãos, por isso não há limites máximos de resíduos (LMR) relatados para o AITC em produtos armazenados. Nazareth et al. (2018) estudando a eficácia do vapor de AITC na inibição de fungos em milho, também validou um método para quantificação do AITC nos grãos de milho, Os autores realizaram a extração com etanol e ultrassom, utilizaram o método da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), e encontraram o LOD e o LOQ de $0,2$ e $0,8 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

3.4.3 Linearidade de resposta do método

Para avaliar a linearidade do método, construiu-se uma curva analítica com sete níveis de concentração no intervalo entre 0,03 a 34,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AITC em feijão-caupi (Figura 8). A curva foi significativa para o modelo linear ($y = ax + b$) ($P < 0,0001$). A curva de calibração é descrita pela relação entre a concentração teórica do analito na amostra (estímulo) e a área cromatográfica (resposta) (ERMER & MILLER, 2005). O método apresentou linearidade de resposta adequada, nos intervalos de concentração avaliada e coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99.

Figura 8 – Curva analítica de calibração do método de HS-SPME para extração de AITC em feijão-caupi.

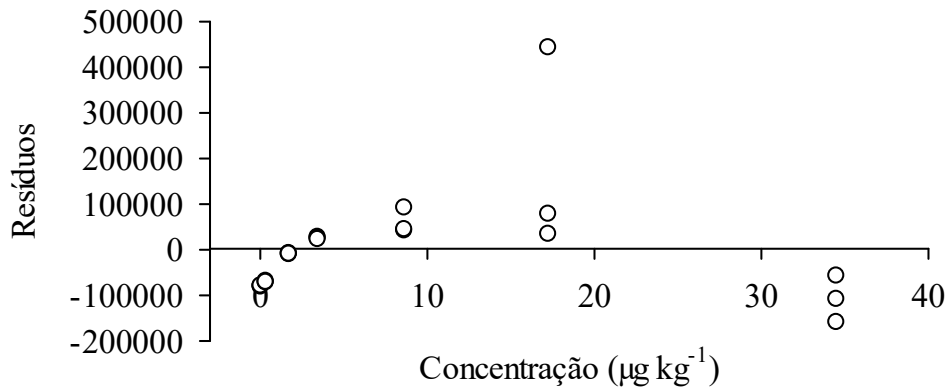


Fonte: A autora, 2019.

Entretanto, apenas o coeficiente de determinação não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva analítica. Dessa forma, a linearidade do método foi também avaliada através do gráfico de resíduos. Modelos com altos valores de resíduos no sinal analítico ou pontos mal distribuídos ao longo da faixa de calibração poderão fornecer um bom coeficiente de correlação, mesmo que uma função linear não seja a melhor descrição para o comportamento entre as variáveis dependente e independente.

A Figura 9 apresenta o gráfico de resíduos da regressão linear obtido para o AITC. Os resíduos apresentaram distribuição uniforme, onde não foram observados valores discrepantes, o que é um indicativo que o ajuste de modelo pode ser aplicado para o composto em estudo, indicando um comportamento homocedástico.

Figura 9 – Gráfico de resíduos para o ajuste linear para as respostas cromatográficas do princípio ativo AITC.



Fonte: A autora, 2019.

3.4.4 Exatidão e precisão intermediária

A exatidão foi avaliada pelo experimento de recuperação e repetibilidade nas amostras de feijão-caupi fortificadas com três níveis de concentração de AITC. A recuperação relativa encontrada foi de 114,8; 108,1 e 109,4% para as concentrações de 1, 50 e 250 vezes o valor do LOQ, respectivamente. Para os mesmos níveis, a repetibilidade, dada pelo valor do coeficiente de variação (CV%), foi de 17,3; 5,1 e 3,9%, respectivamente. A recuperação relativa para determinação de resíduos de pesticidas é satisfatória quando dentro do intervalo de 70 a 120%, com uma repetibilidade associada ao $CV \leq 20\%$ (EURL, 2017).

A precisão intermediária (reprodutibilidade intra-laboratorial) também foi avaliada pelo valor do CV%, o qual deve ser menor que 20% (EURL, 2017). Amostras de feijão-caupi fortificadas com AITC, no nível referente à concentração de 50 vezes o valor de LOQ ($1,72 \mu\text{g kg}^{-1}$), foram submetidas ao método em 3 dias diferentes e consecutivos. A média encontrada da concentração referente as amostras de todos os dias foi de $1,73 \pm 0,15 \mu\text{g kg}^{-1}$, com $CV = 8,66\%$.

Segundo o “Documento de orientação sobre controle de qualidade analítica e procedimentos de validação de métodos para resíduos de pesticidas e análise em alimentos e rações” orientada pelo SANTE/11813/2017, a validação do método deve ser realizada para fornecer evidência de que o método é adequado para o propósito pretendido. Desta forma o

método proposto é viável para determinação de AITC em feijão-caupi, já que ele apresentou resultados de validação de acordo com os critérios necessários (EURL, 2017).

3.5 Persistência do resíduo de isotiocianato de alilo em feijão-caupi

Para explicar a degradação/dissipação do resíduo de AITC nos grãos de feijão-caupi tratados por fumigação em função do tempo foram ajustados diferentes modelos matemáticos (Tabela 2), sendo que o melhor modelo ajustado foi o polinomial quadrático ($y=a+bx+cx^2$), com os valores de R^2 de 0,97 (Figura 10).

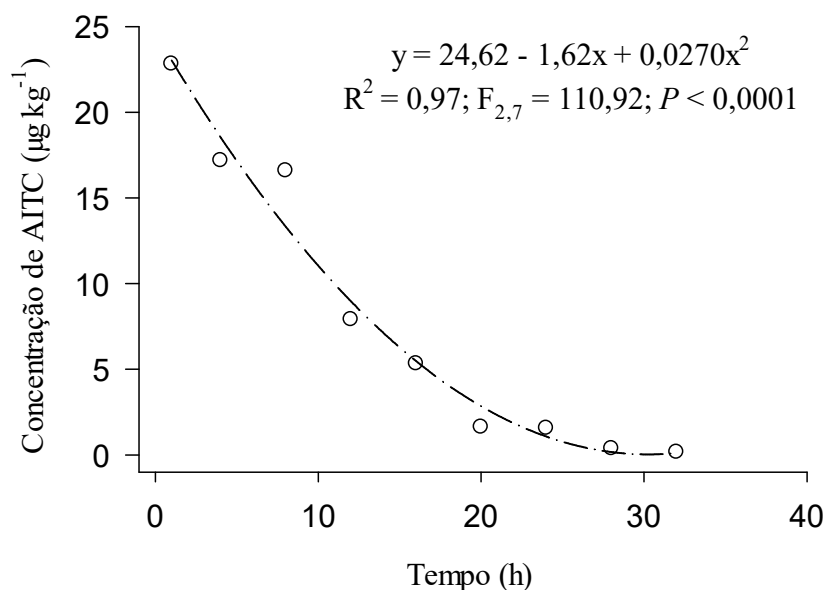
Tabela 2 – Modelos matemáticos ajustados para os resíduos de AITC em feijão-caupi tratado por fumigação.

MODELO	EQUAÇÃO	R^2	REQM	P -valor
Exponencial	$y = 42,999e^{-0,16x}$	0,9495	8,0262	<0,0001
Linear	$y = -0,748x + 20,219$	0,8868	2,7683	0,0001
Logarítmico	$y = -7,291\ln(x) + 25,742$	0,9070	2,3349	<0,0001
Polinomial Quadrático	$y = 0,027x^2 - 1,6286x + 24,626$	0,9737	1,2496	<0,0001
Potência	$y = 72,122x^{-1,286}$	0,6579	14228,5	1,00

R^2 = coeficiente de determinação; REQM = raiz quadrada do erro quadrático médio.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 10 – Persistência do resíduo de AITC em feijão-caupi tratado por fumigação em função do tempo após aplicação.



Fonte: A autora, 2019.

Com 24 h de fumigação (tempo de tratamento), a concentração de AITC detectada nos grãos tratados foi de $1,6 \mu\text{g kg}^{-1}$, o correspondente a uma redução de 93,2% na concentração inicial. A taxa de sorção de AITC pelos grãos são significativas ao estimar a quantidade de produto necessário para a eficiência da fumigação (LU et al., 2013). Contudo, os resultados mostram que em 36 h de tratamento não foi possível quantificar o AITC, ou seja, ele já se encontrava abaixo do limite de quantificação do método ($0,03 \mu\text{g kg}^{-1}$). Após 32 h o AITC foi, aproximadamente, 100% dissipado, o que demonstra sua segurança no uso como fumigante. Aplicações de pesticidas com pouco ou nenhum resíduo tóxico em produtos tratados é um dos parâmetros mais cruciais para a fumigação segura de produtos alimentares. Por outro lado, a rápida dissipação do AITC pode comprometer a difusão do produto por toda a massa de grãos.

Quiles et al. (2019), estudando a concentração residual de AITC em cevada, milho e trigo, também encontraram uma redução significativa após 24 h de tratamento, de 99,8%. Estudos demonstram que inseticidas botânicos apresentam baixa persistência em produtos armazenados (COITINHO et al., 2010; LU et al., 2013). É comum ocorrer reações de oxidação, isomerização, ciclização ou desidrogenação que são desencadeadas por enzimas ou por outras moléculas, como o oxigênio. A temperatura, a luz e a disponibilidade de oxigênio atmosférico também influenciam a estabilidade dos óleos essenciais (TUREK & STINTZING, 2013). Desta forma, o resultado do presente trabalho se torna importante para o desenvolvimento de tecnologias que viabilizem a eficácia da fumigação com o AITC para o controle de insetos-praga no armazenamento de grãos.

4 CONCLUSÃO

O método proposto de microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME) apresentou desempenho analítico satisfatório em relação aos parâmetros seletividade, linearidade, precisão e exatidão. Por se tratar de um método que não emprega solvente orgânico e que exige etapas simples de manipulação, o protocolo de análise proposto permite a análise rotineira deste composto em feijão-caupi destinado ao consumo.

A análise de amostras de feijão-caupi tratado mostrou que após 32 h do início da fumigação o AITC sorvido já se encontrava 100% dissipado, demonstrando sua segurança no uso como fumigante em produtos alimentares.

5 REFERÊNCIAS

- ABAD, F. C.; WINCK, P. R.; SILVA, J. M.; CARAMÃO, E. B.; ZINI, C. A. Multiresidue determination of pesticides in carrots using pressurized liquid extraction and gas chromatography with mass spectrometry detector. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, p.61-468, 2010.
- ABDULRA'UF, L. B.; TAN, G. H. Chemometric approach to the optimization of HS-SPME/GC-MS for the determination of multiclass pesticide residues in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v.177, p.267-273, 2015.
- CARLOS, E. A.; NEVES, A. A.; REIS, C.; QUEIROZ, M. E. L. R. Determinação simultânea de trialomitanos e agrotóxicos em água por cromatografia gasosa. **Química Nova**, n.34, v.2, p.272-278, 2011.
- CASAS, V.; LLOMPART, M.; GARCÍA-JARES, C.; CELA, R.; DAGNAC, T. **Journal of Chromatography A**, v.1124, p.148, 2006.
- COITINHO, R. L. B. C.; OLIVEIRA, J. V.; GONDIM JUNIOR, M. G. C.; CÂMARA, C. A. G. Persistência de óleos essenciais em milho armazenado, submetido à infestação de gorgulho do milho. **Ciência Rural**, v.40, n.7, p.1492-1496, 2010.
- DHINGRA, O. D.; COSTA, M. L.; SILVA JR, G. J.; MIZUBUTI, E. S. Essential oil of mustard to control *Rhizoctonia solani* causing seedling damping off and seedling blight in nursery. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.6, p.683-686, 2004.
- DUCKI, S.; MIRALLES-GARCIA, J.; ZUMBE, A.; TORNERO, A.; STOREY, D. M. Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the headspace analysis of volatile compounds in cocoa products. **Talanta**, v.74, p.1166-1174, 2008.
- EURL. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. European Commission, Directorate General For Health And Food Safety. **Safety of the Food Chain Pesticides and Biocides**, n.SANTE/11813/2017, 2017. 42p.
- ERMER, J.; MILLER, J. H. M. Method validation in pharmaceutical analysis: a guide to best practice. **Copyright, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA**, Weinheim, 2005. 403p.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. EFSA panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS): scientific opinion on the safety of allyl isothiocyanate for the proposed uses as a food additive. **EFSA Journal**, v.8, p.1943-1983, 2010.
- GBAYE, O. A.; OYENIYI, E. A.; OJO, O. B. Resistance of *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae) populations in Nigeria to dichlorvos. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v.9, p.41-46, 2016.
- GHRARI, H.; FARJAMINEZHAD, M.; MAREFAT, A.; FAKHARI, A. R. All-in-one solid-phase microextraction: development of a selective solid-phase microextraction fiber

assembly for the simultaneous and efficient extraction of analytes with different polarities. **Journal of Separation Science**, v.39, n.9, p.1709-1716, 2016.

HAMDI, S. H.; HEDJAL-CHEBHEBB, M.; KELLOUCHE, A.; KHOUJA, M. L.; BOUDABOUS, A.; JEMÂ, J. M. B. Management of three pests population strains from Tunisia and Algeria using *Eucalyptus* essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.74, p.551-556, 2015.

HASHIMOTO, Y.; YOSHIMURA, M.; HUANG, R. N. Wasabi versus red imported fire ants: preliminary test of repellency of microencapsulated allyl isothiocyanate against *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) using bait traps in Taiwan. **Applied Entomology and Zoology**, v.54, n.2, p.193-196, 2019.

HU, W.; ZHANG, N.; CHEN, H.; ZHONG, B.; YANG, A.; KUANG, F.; OUYANG, Z.; CHUN, J. Fumigant activity of sweet orange essential oil fractions against red imported fire ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Economic Entomology**, v.110, p.1556-1562, 2017.

JÚNIOR, J. L. R.; RE-POPPI. Determination of organochlorine pesticides in ground water samples using solid-phase microextraction by gas chromatography-electron capture detection. **Talanta**, v.72, n.5, p.1833-1841, 2007.

KREUTZ, T.; LUCCA, L. G.; LOUREIRO-PAES, O. A. R.; TEIXEIRA, H. F.; VEIGA JR, V. F.; LIMBERGER, R. P.; ORTEGA, G. G.; KOESTER, L. S. Optimization, validation and application of headspace solid-phase microextraction gas chromatography for the determination of 1-nitro-2-phenylethane and methyleugenol from *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez essential oil in skin permeation samples. **Journal of Chromatography A**, v.1564, p.163-175, 2018.

LI, J.; ZHANG, Z.; SUN, M.; ZHANG, B.; FAN, C. Use of a headspace solid-phase microextraction-based methodology followed by gas chromatography–tandem mass spectrometry for pesticide multiresidue determination in teas. **Chromatographia**, v.81, n.5, p.809-821, 2018.

LIN, C. M.; KIM, J.; DU, W. X.; WEI, C. I. Bactericidal activity of isothiocyanate against pathogens on fresh produce. **Journal of Food Protection**, v.63, n.1, p.25-30, 2000.

LIU, W.; HU, Y.; ZHAO, J.; XU, Y.; GUAN, Y. Physically incorporated extraction phase of solid-phase microextraction by sol-gel technology. **Journal of Chromatography A**, v.1102, p.37-43, 2006.

LU, Y.; ZHONG, J.; WANG, Z.; LIU, F.; WAN, Z. Fumigation toxicity of allicin against three stored product pests. **Journal of Stored Products Research**, v.55, p.48-54, 2013.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Agrofit** – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. *Acessado em: 10 mar. 2019.*

- NAZARETH, T. M.; CORRÊA, J. A.; PINTO, A. C.; PALMA, J. B.; MECA, G.; BORDIN, K.; LUCIANO, F. B. Evaluation of gaseous allyl isothiocyanate against the growth of mycotoxigenic fungi and mycotoxin production in corn stored for 6 months. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.98, n.14, p.5235-5241, 2018.
- NEVES, W. S.; FREITAS, L. G.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FABRY, C. F. S.; COUTINHO, M. M.; DHINGRA, O. D.; FERRAZ, S.; DEMUNER, A. J. Atividade de extratos de alho (*Allium sativum*), mostarda (*Brassica campestris*) e pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) sobre eclosão de juvenis de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v.29, n.2, p.273-278, 2005.
- OPIT, G. P.; THOMS, E.; PHILLIPS, T. W.; PAYTON, M. E. Effectiveness of sulfuryl fluoride fumigation for the control of phosphine-resistant grain insects infesting stored wheat. **Journal of Economic Entomology**, v.109, n.2, p.930-941, 2016.
- PAVELA, R.; BENELL, G. Essential oils as ecofriendly biopesticides: challenges and constraints. **Tendências em Ciência Vegetal**, v.21, n.12, p.1000-1007, 2016.
- PIMENTEL, M. A. G.; FARONI, L. R. A.; GUEDES, R. N. C.; GONÇALVES, J. R.; OLIVEIRA, C. R. F. Eficácia biológica de bifentrina aplicado em milho armazenado sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.9, n.2, p.263-267, 2005.
- PIMENTEL, M. A. G.; FARONI, L. R. A.; SILVA, F. H.; BATISTA, M. D.; GUEDES, R. N. C. Spread of phosphine resistance among Brazilian populations of three species of stored product insects. **Neotropical Entomology**, v.39, n.1, p.101-107, 2010.
- QUILES, J. M.; NAZARETH, T. D. M.; LUZ, C.; LUCIANO, F. B.; MAÑES, J.; MECA, G. Development of an antifungal and antimycotoxigenic device containing allyl isothiocyanate for silo fumigation. **Toxins**, v.11, n.3, p.137, 2019.
- REN, Y. L.; PADOVAN, B.; DESMARCHELIER, J. M. Evaluation of headspace solid-phase microextraction for analysis of phosphine residues in wheat. **Journal of AOAC International**, v.95, n.2, p.549-553, 2012.
- REYES-JURADO, F.; CERVANTES-RINCÓN, T.; BACH, H.; LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Antimicrobial activity of Mexican oregano (*Lippia berlandieri*), thyme (*Thymus vulgaris*), and mustard (*Brassica nigra*) essential oils in gaseous phase. **Industrial Crops and Products**, v.131, p.90-95, 2019.
- SMITH, G. H.; ROBERTS, J. M.; POPE, T. W. Terpene based biopesticides as potential alternatives to synthetic insecticides for control of aphid pests on protected ornamentals. **Crop Protection**, v.110, p.125-130, 2018.
- TAY, W. T.; BECKETT, S. J.; BARRO, P. J. Phosphine resistance in Australian *Cryptolestes* species (Coleoptera: Laemophloeidae): perspectives from mitochondrial DNA cytochrome oxidase I analysis. **Pest Management Science**, v.72, p.1250-1259, 2016.
- TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of essential oils: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.12, p.40-53, 2013.

ZHANG, Y. Allyl isothiocyanate as a cancer chemopreventive phytochemical. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.54, n.1, p.127-135, 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostrou que o isotiocianato de alilo (AITC) tem potencial para se tornar um fumigante de grãos, ecologicamente correto, para o controle do bruquídeo *Callosobruchus maculatus* em feijão-caupi. Os resultados mostraram que o composto é potencialmente adequado para o controle de *C. maculatus*, evitando o seu desenvolvimento em ambiente de armazenagem e contribuindo para a manutenção da qualidade dos grãos de feijão-caupi. Foi relatado, também, que após 36 h do início da fumigação, o AITC sorvido já se encontrava 100% dissipado, demonstrando sua segurança no uso como fumigante. Aplicações de pesticidas com pouco ou nenhum resíduo tóxico em produtos tratados é um dos parâmetros mais cruciais para a fumigação segura de produtos alimentares, assim o uso do AITC é uma estratégia útil e sustentável para a proteção de feijão-caupi contra *C. maculatus*.

O AITC é considerado inofensivo para a saúde humana e para o meio ambiente (European Food Safety Authority), mas seu uso é, por vezes, descartado como pesticida devido à sua forte volatibilidade e conseqüente irritação para os olhos e respiração humana. Por essa razão, é necessário pesquisas que investigam alternativas para a aplicação do composto. Recentemente, a tecnologia de microencapsulação de AITC utilizando secagem por pulverização em *spray-drying* e material de polietileno foi estabelecida (PATENT n°. JP5033232B, WasaP TM). Essa tecnologia permite a liberação controlada de AITC através de membranas de cápsula semipermeáveis, que podem diminuir a irritação, evitando a liberação excessiva. Por outro lado, caso a aplicação pura do AITC não seja difundida, o seu estudo é apropriado como “ponto de partida” para novas substâncias mais ativas.