

MARIA SUELY SIQUEIRA FERRAZ

**POTENCIAL INSETICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper hispidinervum* SOBRE
Callosobruchus maculatus E SUA PERSISTÊNCIA EM 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*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

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

T

F381p
2018 Ferraz, Maria Suely Siqueira, 1994-
Potencial inseticida do óleo essencial de *Piper hispidinervum* sobre *Callosobruchus maculatus* e sua persistência em feijão-caupi / Maria Suely Siqueira Ferraz. – Viçosa, MG, 2018.
viii, 54 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

1. *Vigna unguiculata*. 2. Bruchídeo. 3. Inseticidas botânicos. 4. Piperaceae. 5. Safrol. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia Agrícola. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 632.9517

MARIA SUELY SIQUEIRA FERRAZ

**POTENCIAL INSETICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper hispidinervum* SOBRE
Callosobruchus maculatus E SUA PERSISTÊNCIA EM 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 agosto de 2018.

Adalberto Hipólito de Sousa
(Coorientador)

Fernanda Fernandes Heleno
(Coorientadora)

Maria Eliana L. Ribeiro de Queiroz

Lêda Rita D'Antonino Faroni
(Orientadora)

DEDICO...

...aos meus pais amados e minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas graças concedidas para concluir essa jornada.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Engenharia Agrícola (DEA) pela acolhida e oportunidade de realizar este curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsas e apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto.

À professora Dra. Lêda Rita D'Antonino Faroni pela orientação durante o mestrado. Agradeço pela oportunidade, incentivos, confiança e conselhos que me ajudaram a crescer.

Ao professor Dr. Adalberto Hipólito de Sousa e a Dra. Fernanda Fernandes Heleno pela coorientação, pela amizade, incentivos e ensinamentos.

Ao professor Dr. Paulo Roberto Cecon e a professora Dra. Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, pelo tempo, recursos, equipamentos, confiança, conhecimento e amizade.

Agradeço ao professor Dr^a. Carlos Romero Ferreira de Oliveira e a professora Dra. Cláudia Helena Cysneiros Matos de Oliveira pela amizade, apoio, incentivos e conselhos para cursar o mestrado na UFV.

À minha família, meus pais, Severino e Maria da Soledade, meus irmãos (Zé, Zeza, Lúcia, Luciene, Josean, Eliana, Célia, João Paulo, Júnior e Silvana) e aos demais familiares pelo carinho, amizade e amor, por todos os momentos que estiveram comigo, me apoiando e ajudando quando precisei, onde descobri o sentido da vida.

Ao meu namorado Ronylson pelo incentivo, companheirismo e compreensão em todos os momentos.

Aos meus amigos pelo apoio e incentivos, em especial à Tássia, Sara, Ione, Carla e Ilma.

Aos amigos do DEA, Patrícia, Eridiane, Lauana, Lucas, Marcus, Artur, Ailyn, Thamiris, Jéssica, Samuel, Cristiane, Raiane e Ana Paula que sempre me apoiaram.

A todos os professores e aos funcionários da UFV que contribuíram com a minha formação acadêmica e profissional.

Enfim, a todos que contribuíram com esse trabalho direta ou indiretamente, *OBRIGADA!*

BIOGRAFIA

MARIA SUELY SIQUEIRA FERRAZ, filha de Severino Ferraz de Valões e Maria da Soledade Siqueira de Valões, nasceu em 23 de setembro de 1994 em São José do Belmonte-PE. cursou o nível médio na Escola de Referência em Ensino Dr. Walmy Campos Bezerra, concluindo em 2011, em São José do Belmonte. Em março de 2012, ingressou no Curso de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, onde foi bolsista de iniciação científica e de iniciação ao desenvolvimento tecnológico durante quase a totalidade do curso, sob a orientação do Professor Carlos Romero Ferreira de Oliveira e Coorientação da Professora Cláudia Helena Cysneiros Matos de Oliveira. Graduou-se em Engenharia Agrônoma em julho de 2016. Em agosto de 2016 iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa – MG, sob a orientação da Professora Lêda Rita D’Antonino Faroni, submetendo-se à defesa de dissertação em 31 de agosto de 2018.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	4
ARTIGO 1 - Toxicidade do óleo essencial de <i>Piper hispidinervum</i> sobre <i>Callosobruchus maculatus</i> e qualidade do feijão-caupi	9
Resumo	9
Introdução	9
Material e Métodos	11
Colônia estoque de insetos	11
Caracterização do feijão-caupi	12
Extração do óleo essencial	12
Composição do óleo essencial	12
Quantificação absoluta do safrol	12
Toxicidade fumigante	13
Toxicidade por contato	13
Análises da qualidade do feijão-caupi	14
Análises estatísticas	15
Resultados	15
Composição do óleo essencial	15
Toxicidade fumigante	16
Toxicidade por contato	16
Análises da qualidade do feijão-caupi	19
Discussão	21
Conclusão	24
Referências	25
ARTIGO 2 - Persistência do óleo essencial de <i>Piper hispidinervum</i> em feijão-caupi	32
Resumo	32
Introdução	32
Material e Métodos	34
Reagentes	35

Composição do óleo essencial	35
Quantificação de safrol no óleo essencial	35
Otimização do método de extração de safrol em feijão-caupi	36
Validação do método de extração e análise de safrol	37
Persistência do resíduo de safrol em feijão-caupi	37
Análises estatísticas	38
Resultados e Discussão.....	38
Composição do óleo essencial	38
Quantificação de safrol	39
Otimização do método de extração de safrol	40
Escolha da fibra.....	40
Condição ótima de temperatura e tempo de extração	42
Validação do método de extração e análise	43
Persistência do resíduo de safrol.....	45
Conclusão	47
Referências	47
CONCLUSÕES GERAIS	54

RESUMO

FERRAZ, Maria Suely Siqueira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2018. **Potencial inseticida do óleo essencial de *Piper hispidinervum* sobre *Callosobruchus maculatus* e sua persistência em feijão-caupi.** Orientadora: Lêda Rita D'Antonino Faroni. Coorientadores: Adalberto Hipólito de Sousa e Fernanda Fernandes Heleno.

Este trabalho teve como objetivos avaliar o potencial inseticida do óleo essencial de *Piper hispidinervum* por fumigação e por contato para adultos de *Callosobruchus maculatus*, o efeito do óleo essencial sobre a qualidade do feijão-caupi e a persistência do óleo essencial sobre o feijão-caupi armazenado. No bioensaio por fumigação foram utilizadas as seguintes concentrações do óleo essencial 14,3; 57,1; 100,0; 142,9 e 185,7 $\mu\text{L L}^{-1}$ de ar, e no bioensaio por contato as concentrações utilizadas foram de 60, 80, 100, 120 e 140 $\mu\text{L kg}^{-1}$. A mortalidade de *C. maculatus* foi avaliada após quatro dias do início do bioensaio por fumigação e após um dia do bioensaio por contato. As taxas de oviposição e de emergência foram avaliadas após sete e 50 dias de armazenamento, respectivamente. O teor de água, a perda de massa, a germinação e a massa específica aparente do feijão-caupi foram analisados após 50 dias de armazenamento. A persistência do resíduo de safrol no feijão-caupi foi analisada pelo método de microextração em fase sólida em *headspace* acoplado ao cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama. O feijão-caupi foi tratado com óleo essencial por contato e por fumigação e em seguida armazenado por 5, 10, 26, 60 e 90 dias. As concentrações letais para causar de 50 e 95% de mortalidade no bioensaio por fumigação foram de 91,23 e 242,59 $\mu\text{L L}^{-1}$ de ar, respectivamente. Para o bioensaio por contato as concentrações letais para causar 50 e 95% de mortalidade foram de 101,51 e 208,52 $\mu\text{L kg}^{-1}$ de feijão-caupi, respectivamente. Em ambos bioensaios as taxas de oviposição e de progênie de *C. maculatus* reduziram com o incremento da concentração do óleo essencial. A qualidade do feijão-caupi foi preservada, até mesmo nas concentrações subletais. As concentrações de safrol detectadas no feijão-caupi tratado por contato com o óleo essencial variaram de 1,0945 a 0,0513 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de feijão-caupi e por fumigação variam de 2,1606 a 0,1239 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de feijão-caupi, para os períodos de armazenamento avaliados. As concentrações detectadas a partir do quinto dia representam menos de 1% da concentração inicial. Assim, o óleo essencial de *P. hispidinervum* apresenta potencial inseticida para *C. maculatus* e também preserva a qualidade do feijão-caupi armazenado por inibir o desenvolvimento da progênie. Além disso, apresenta baixa persistência nos grãos armazenados.

ABSTRACT

FERRAZ, Maria Suely Siqueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2018. **Insecticide potential of essential oil of *Piper hispidinervum* on *Callosobruchus maculatus* and its persistence in cowpea.** Adviser: Lêda Rita D'Antonino Faroni. Co-advisers: Adalberto Hipólito de Sousa e Fernanda Fernandes Heleno.

This work aimed to evaluate the insecticide potential of essential oil of *Piper hispidinervum* by fumigation and contact for adults of *Callosobruchus maculatus*, the effect of essential oil on the quality of cowpea and the persistence of essential oil on the stored cowpea. In the fumigation bioassay, the following essential oil concentrations were used 14.3, 57.1, 100.0, 142.9, and 185.7 $\mu\text{L L}^{-1}$ air, and for the contact bioassay the concentrations were 60, 80, 100, 120 and 140 $\mu\text{L kg}^{-1}$. The mortality of *C. maculatus* was evaluated after four day beginning of the fumigation bioassay and one day from the beginning contact bioassays. The oviposition and emergency rates were evaluated after seven and 50 days of storage, respectively. The water content, the loss of mass, the germination and the apparent density of cowpea grains were examined after 50 days of storage. The persistence of the safrole residue in cowpea was analysed by the solid-phase microextraction method in *headspace* coupled to gas chromatograph with flame ionization detector. The cowpea was treated with essential oil of *P. hispidinervum* by fumigation and contact, and then stored for 5, 10, 26, 60 and 90 days. Lethal concentrations to cause 50 and 95% mortality by fumigation were 91.23 and 242.59 $\mu\text{L L}^{-1}$ air, respectively. For the contact bioassay, lethal concentrations to cause 50 and 95% mortality was 101.51 and 208.52 $\mu\text{L kg}^{-1}$ of cowpea, respectively. In both bioassays, oviposition rates and the progeny of *C. maculatus* reduced with the increase of the concentration of the essential oil of *P. hispidinervum*. The quality of cowpea was preserved even at sublethal concentrations. Safrole concentrations detected in cowpea treated by contact ranged from 1.0945 to 0.0513 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of cowpea and by fumigation ranged from 0.1239 to 2.1606 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of cowpea to the storage periods evaluated. The concentrations detected from the fifth day represent less than 1% of the initial concentration. Thus, the essential oil of *P. hispidinervum* presents insecticide potential for *C. maculatus* and preserves the quality of stored cowpea by inhibiting the development of its progeny. In addition, it has low persistence in stored grains.

INTRODUÇÃO GERAL

O cultivo de leguminosas traz diversos benefícios para a agricultura e para a dieta humana e animal (Foyer et al., 2016). Considerando o acelerado crescimento populacional das últimas décadas e consequentemente a elevada demanda por alimento (FAO, 2017), as leguminosas podem ser mais exploradas para compor a dieta nutricional do ser humano, visto o seu valor nutritivo. Feijão-caupi como é popularmente conhecido o *Vigna unguiculata* (L.) Walp. pertence à família Fabaceae e é uma das leguminosas mais cultivada nas regiões tropicais e subtropicais, como na Ásia, África, América Central e do Sul, Estados Unidos e parte do sul da Europa (Tan et al., 2012). O feijão-caupi destaca-se como uma importante fonte de proteínas, carboidratos, vitaminas e sais minerais (Akami et al., 2017). Estima-se que no mundo a sua área plantada é de aproximadamente 14,5 milhões de hectares, com uma produção superior a 6,5 milhões de toneladas por ano. A produção de feijão-caupi está concentrada principalmente na África, com cerca de 83% de toda a produção mundial. A Nigéria, o Níger e o Brasil são os seus principais produtores, representando 45, 15 e 12%, respectivamente (Boukar et al., 2016).

Após a colheita, os grãos podem ser processados e comercializados imediatamente ou então são destinados ao armazenamento, podendo ficar por longos períodos até a comercialização. Durante o armazenamento é fundamental garantir a qualidade da produção, conforme as exigências de mercado. A qualidade dos grãos armazenados pode ser associada as suas propriedades físicas, químicas e nutricionais, tais como: teor de água, massa específica aparente, condutividade elétrica, porcentagem de germinação (Freitas et al., 2016; Silva et al., 2018), porcentagem de grãos danificados (Mutungi et al., 2015), índice de infestação de pragas (Pessoa et al., 2016), contaminação por patógenos (Nopsa et al., 2015), tempo de cocção (Freitas et al., 2016), composição química (Akami et al., 2017), ausência de resíduos agrotóxicos (Freitas et al., 2017), entre outras.

Dentre os diversos fatores que podem afetar a qualidade dos grãos armazenados destaca-se a ocorrência de insetos-praga, os quais são responsáveis por ocasionar perdas em grãos, sementes e subprodutos armazenados (Silva et al., 2018). Métodos inadequados do manejo fitossanitário durante a colheita, secagem, beneficiamento e armazenamento dos grãos podem propiciar o desenvolvimento de pragas. No feijão-caupi armazenado o caruncho *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) 1775 (Coleoptera: Chrysomelidae) é o inseto-praga mais comum, podendo ocorrer no campo e no armazenamento (Silva e Costa, 2016). A ocorrência de *C. maculatus* provoca perda de peso, redução do poder germinativo (Freitas et al., 2016;

Silva et al., 2018) e do valor nutricional (Akami et al., 2017). Além disso, os excrementos e detritos dos insetos causam a redução do valor comercial dos grãos (Silva e Costa, 2016).

Os inseticidas sintéticos utilizados como protetores de grãos (piretróides e organofosforados) e o fumigante (fosfina) apresentam efeitos indesejáveis, incluindo risco para o homem (Kim et al., 2017) e para o meio ambiente (Sánchez-Bayo et al., 2016). O uso contínuo e indiscriminado destes inseticidas tem ocasionado o desenvolvimento de diferentes populações de insetos resistentes ao fumigante (Pimentel et al., 2007; Holloway et al., 2016; Tay et al., 2016) e aos protetores (Oliveira et al., 2005; Odeyemi et al., 2006; Santos et al., 2009; Gbaye et al., 2016). Dentre os métodos alternativos ao uso dos inseticidas sintéticos no controle de insetos-praga de grãos armazenados estão os óleos essenciais e seus constituintes (Chu et al., 2011; Massango et al., 2016).

Os óleos essenciais (OEs) são classificados como metabólitos secundários produzidos por diversas partes da planta, tais como sementes, caules, folhas e flores. São misturas de substâncias voláteis, naturais, caracterizadas por apresentar forte odor e na maioria dos casos possuem constituição lipofílica (Bakkali et al., 2008). Os OEs possuem grande potencial biocida, apresentando toxicidade sobre insetos (Oliveira et al., 2017), vírus (Gilling et al., 2014), bactérias (Diao et al., 2014), fungos, nematoides (Andrés et al., 2017) e amebas (Sauter et al., 2012). A atividade inseticida de alguns OEs está associada ao neuromodulador octopamina, encontrado em todos os invertebrados, mas não em mamíferos. Por esse motivo apresentam menor toxicidade para o homem. Quando a octopamina é interrompida provoca a ruptura do funcionamento do sistema nervoso (Isman, 2006; Shaaya e Kostyukovsky, 2006). A octopamina é responsável pela regulação dos batimentos cardíacos, dos movimentos corporais, do comportamento e do metabolismo dos insetos, atuando como neurohormônio, neuromodulador e neurotransmissor (Roeder, 1999). Acredita-se que os OEs e seus compostos apresentam uma maior barreira à resistência de pragas e um menor risco à saúde humana e à contaminação do meio ambiente quando comparados aos inseticidas convencionais (Correa et al., 2015).

A família Piperaceae é representada por plantas herbáceas, arbustos e, raramente, árvores (Bergo et al., 2005). O gênero *Piper* se destaca com mais de 700 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais (Sauter et al., 2012). A pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) é uma planta aromática endêmica da Amazônia que possui um grande potencial na produção de OE (Gottlieb et al., 1981; Maia et al., 1987). O OE dessa planta é constituído principalmente por safrol, pentadecano, spathulenol, biciclogermacreno, P-cymen-8-ol, (E)-cariofileno (Sauter et al., 2012; Oliveira et al., 2017). O safrol, seu composto

majoritário, é um fenilpropanóide (Figura 1) utilizado na indústria química para síntese de heliotropina (fixador de fragrâncias) (Ramos et al., 2014) e butóxido de piperolina - PBO (sinergista de inseticidas) (Sohilait e Kainama, 2016).

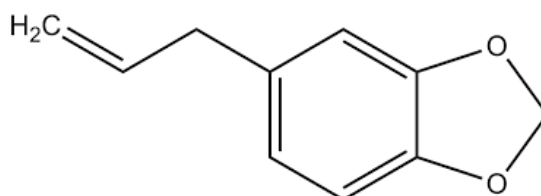


Figura 1. Fórmula estrutural do safrol.

As atividades inseticidas do óleo essencial de *P. hispidinervum* (OEPH) vêm sendo estudadas sobre insetos-praga de grãos armazenados, tais como toxicidade (fumigante e por contato) (Estrela et al., 2006; Fazolin et al., 2007; Araújo et al., 2017; Oliveira et al., 2017), repelência (Oliveira et al., 2017), redução das taxas de desenvolvimento (Pereira et al., 2008) e o efeito residual sobre o inseto adulto (Pereira et al., 2009; Coitinho et al., 2010). No entanto, há pouca informação sobre os efeitos dos OEs quanto à qualidade dos grãos armazenados, tais como teor de água, germinação, massa específica aparente e perda de massa, além da persistência do resíduo dos OEs. Estudos dessa natureza são importantes para avaliar a proteção contra pragas, a qualidade e o período de carência do produto tratado (Pimentel et al., 2005).

Assim, a presente pesquisa teve como objetivo (i) avaliar a toxicidade por fumigação e contato do OEPH para adultos de *C. maculatus* e a sua influência sobre a progênie desse inseto; (ii) analisar o efeito do OEPH por fumigação e contato sobre a qualidade do feijão-caupi armazenado; (iii) desenvolver, otimizar e validar o método de extração e quantificação do resíduo do safrol do OEPH em feijão-caupi; e (iv) analisar a persistência do resíduo do safrol do OEPH em feijão-caupi em diferentes períodos de armazenamento, tratado por fumigação e contato.

REFERÊNCIAS

- Akami M, Chakira H, Andongma AA, Khaeso K, Gbaye AO, Nicolas NY, Nukenine EN, Niu CY (2017) Essential oil optimizes the susceptibility of *Callosobruchus maculatus* and enhances the nutritional qualities of stored cowpea *Vigna unguiculata*. Royal Society Open Science 4: 1-12. doi: <https://doi.org/10.1098/rsos.170692>
- Andrés MF, Rossa GE, Cassel E, Vargas RMF, Santana O, Díaz CE, Gonzalez-Coloma A (2017) Biocidal effects of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil and synergism among its main components. Food and Chemical Toxicology 109: 1086-1092. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.017>
- Araújo AMN, Faroni LRA, Oliveira JV, Barbosa DRS, Breda MO, França SM (2017) Lethal and sublethal responses of *Sitophilus zeamais* populations to essential oils. Journal of Pest Science 90: 589-600. doi: <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0822-z>
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology 46: 446-475. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bergo CL, Mendonça HA, Silva MR (2005) Efeito da época e frequência de corte de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) no rendimento de óleo essencial. Acta Amazonica 35(2): 111-117. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672005000200001>
- Boukar O, Fatokun CA, Huynh B, Roberts PA, Fechar TJ (2016) Genomic tools in cowpea breeding programs: status and perspectives. Frontiers in Plant Science 7: 1-13. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00757>
- Coitinho RLBC, Oliveira JV, Gondim Junior MGC, Câmara CAG (2011) Toxicidade por fumigação, contato e ingestão de óleos essenciais para *Sitophiluszeamais* Motschulsky, 1885 (Coleoptera: Curculionidae). Ciência Agrotecnica 35(1): 172-178. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000100022>
- Correa YDCG, Faroni LRA, Haddi K, Oliveira EE, Pereira EJG (2015) Locomotory and physiological responses induced by clove and cinnamon essential oils in the maize weevil *Sitophilus zeamais*. Pesticide Biochemistry and Physiology 125: 31-37. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.06.005>
- Chu SS, Wang CF, Du SS, Liu SL, Liu ZL (2011) Toxicity of the essential oil of *Illicium difengpi* Stem Bark and its constituent compounds towards two grain storage insects. Journal of Insect Science 11(152): 1-10. doi: <https://doi.org/10.1673/031.011.15201>

- Diao WR, Hu QP, Zhang H, Xu JG (2014) Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control* 35: 109-116. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.056>
- Estrela JLV, Fazolin M, Catani V, Alécio MR, Lima MS (2006) Toxicity of essential oils of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* against *Sitophilus zeamais*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41(2): 217-222. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2006000200005>
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2017). The future of food and agriculture: trends and challenges. Rome. 163p.
- Fazolin M, Estrela JLV, Catani V, Alécio MR, Lima MS (2007) Insecticidal properties of essential oils of *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. and *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum against *Tenebrio molitor* L., 1758. *Ciência e Agrotecnologia* 31(1): 113-120. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542007000100017>
- Foyer CH, Lam H, Nguyen HT, Siddique KHM, Varshney RK, Colmer TD, Cowling W, Bramley H, Mori TA, Hodgson JM, Cooper JW, Miller AJ, Kunert K, Vorster J, Cullis C, Ozga JA, Wahlqvist ML, Liang Y, Shou H, Shi K, Yu J, Fodor N, Kaiser BN, Wong F, Valliyodan B, Considine MJ (2016) Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. *Nature Plants* 2: 1-10. doi: <https://doi.org/10.1038/NPLANTS.2016.112>
- Freitas RS, Faroni LRA, Sousa AH (2016) Hermetic storage for control of common bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Journal of Stored Products Research* 66: 1-5. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2015.12.004>
- Freitas RS, Faroni LRA, Queiroz MELR, Heleno FF, Prates LHF (2017) Degradation kinetics of pirimiphos-methyl residues in maize grains exposed to ozone gas. *Journal of Stored Products Research* 74: 1-5. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2017.08.008>
- Gbaye OA, Oyeniya EA, Ojo OB (2016) Resistance of *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae) populations in Nigeria to dichlorvos. *Jordan Journal of Biological Sciences* 9: 41-46. doi: <https://doi.org/10.12816/0027007>
- Gilling DH, Kitajima M, Torrey JR, Bright KR (2014) Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. *Journal of Applied Microbiology* 116: 1149-1163. doi: <https://doi.org/10.1111/jam.12453>

- Gottlieb OR, Koketsu M, Magalhães MT, Maia JGS, Mendes PH, Rocha AI, Silva ML, Wilberg VC (1981) Óleos essenciais da Amazônia VII. *Acta Amazônica* 11(1): 143-148. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1809-439219811111143>
- Holloway JC, Falk MG, Emergy RN, Collins PJ, Nayak MK (2016) Resistance to phosphine in *Sitophilus oryzae* in Australia: a national analysis of trends and frequencies over time and geographical spread. *Journal of Stored Products Research* 69: 129-137. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2016.07.004>
- Isman MB (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology* 51: 45-66. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>
- Kim K, Kabir E, Jahan AS (2017) Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment* 575: 525-535. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>
- Maia JGS, Silva ML, Luz AIR, Zoghbi MGB, Ramos LS (1987) Espécies de *Piper* da Amazônia rica em safrol. *Química Nova* 10(3): 200-204.
- Massango HGLL, Faroni LRA, Haddi K, Heleno FF, Viteri JLO, Oliveira EE (2016) Toxicity and metabolic mechanisms underlying the insecticidal activity of parsley essential oil on bean weevil, *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Pest Science* 90(2): 723-733. doi: <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0826-8>
- Mutungi C, Affognon HD, Njoroge AW, Manono J, Baributsa D, Murdock LL (2015) Triple-layer plastic bags protect dry common beans (*Phaseolus vulgaris*) against damage by *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Chrysomelidae) during storage. *Journal of Economic Entomology* 108(5): 2479-2488. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/jee/tov197>
- Nopsa JFH, Daghli GJ, Hagstrum DW, Leslie JF, Phillips TW, Scoglio C, Thomas-Sharma S, Walter GH, Garrett KA (2015) Ecological networks in stored grain: key postharvest nodes for emerging pests, pathogens, and mycotoxins. *BioScience* 65(10): 985-1002. doi: <https://doi.org/10.1093/biosci/biv122>
- Odeyemi OO, Gbaye OA, Akeju O (2006) Resistance of *Callosobruchus maculatus* (Fab.) to pirimiphos methyl in three zones in Nigeria. In: Lorini I, Bacaltchuk B, Beckel H, Deckers D, Sundfeld E, Santos JP, Biagi JD, Celaro JC, Faroni LRD, Bortolini LOF, Sartori MR, Elias MC, Guedes RNC, Fonseca RG, Scussel VM (Eds.), *Proceedings of the ninth international working conference on stored-product protection*. 15-18, 2006 ABRAPOS, Campinas, São Paulo, Brasil, pp. 324-329.

- Oliveira EE, Guedes RNC, Corrêa AS, Damasceno BL, Santos CT (2005) Resistência vs susceptibilidade a piretróides em *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): há vencedor? *Neotropical Entomology* 34(6): 981-990. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2005000600015>
- Oliveira JV, França SM, Barbosa DRS, Dutra KA, Araújo AMN, Navarro DMAF (2017) Fumigation and repellency of essential oils against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in cowpea. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 52(1): 10-17. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2017000100002>
- Pereira ACRL, Oliveira JV, Gondim Junior MGC, Câmara CAG (2008) Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Ciência e Agrotecnologia* 32(3): 717-724. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542008000300003>
- Pereira ACRL, Oliveira JV, Gondim Junior MGC, Câmara CAG (2009) Influência do período de armazenamento do caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], tratado com óleos essenciais e fixos, no controle de *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae). *Ciência e Agrotecnologia* 33(1): 319-325. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542009000100044>
- Pessoa EB, Almeida FAC, Neto AF, Vieira JF (2016) Treatment of bean seeds with plant extracts for controlling *Zabrotes subfasciatus* and its effects on physical and physiological quality during storage. *African Journal of Agricultural Research* 11(42): 4233-4241. doi: <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11067>
- Pimentel MAG, Faroni LRA, Guedes RNC, Gonçalves JR, Oliveira CRF (2005) Eficácia biológica de bifentrina aplicado em milho armazenado sob diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 9(2): 263-267. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662005000200018>
- Pimentel MAG, Faroni LRA, Tótola MR, Guedes RNC (2007) Phosphine resistance, respiration rate and fitness consequences in stored-product insects. *Pest Management Science* 63: 876-881. doi: <https://doi.org/10.1002/ps.1416>
- Ramos CS, Barbosa QPS, Vanin SA (2014) Metabolism of safrole by *Heracles thoas brasiliensis* (Papilionidae). *Journal of the Lepidopterists' Society* 68(4): 283-285. doi: <https://doi.org/10.18473/lepi.v68i4.a6>
- Roeder T (1999) Octopamine in invertebrates. *Progresso em Neurobiologia* 59(5): 533-561. doi: [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00016-7](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00016-7)

- Sánchez-Bayo F, Goulson D, Pennacchio F, Nazzi F, Goka K, Desneux N (2016) Are bee diseases linked to pesticides? - A brief review. *Environment International* 89-90: 7-11. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.01.009>
- Santos JC, Faroni LRA, Simões RO, Pimente MAG, Sousa AH (2009) Toxicidade de inseticidas piretróides e organofosforados para populações brasileiras de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Bioscience Journal* 25(6): 75-81.
- Sauter IP, Rossa GE, Lucas AM, Cibulski SP, Roehc PM, Silva LAA, Rott MB, Vargas MF, Cassel E, Poser GL (2012) Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. *Industrial Crops and Products* 40: 292-295. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.03.025>
- Shaaya E, Kostyukovysky M (2006) Essential oils: potency against stored product insects and mode of action. *Stewart Postharvest Review* 4(5): 1-6. doi: <https://doi.org/10.2212/spr.2006.4.5>
- Silva TT, Costa FM (2016) Survey of insects that attack stored bean grains *Vigna unguiculata* (L.) and *Phaseolus vulgaris* L. in Porto Velho, Rondônia, Brazil. *EntomoBrasilis* 9(2): 124-128. doi: <http://dx.doi.org/10.12741/ebrasilis.v9i2.598>
- Silva MGC, Silva GN, AH, Freitas RS, Silva MSG, Abreu AO (2018) Hermetic storage as an alternative for controlling *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) and preserving the quality of cowpeas. *Journal of Stored Products Research* 78: 27-31. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2018.05.010>
- Sohilait HJ, Kainama H (2016) Synthesis of 1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1-butene-3- one from safrole. *European Journal of Pure and Applied Chemistry* 3(1): 66-70. doi: <http://dx.doi.org/10.11648/j.sjc.20150303.15>
- Tan H, Tie M, Luo Q, Zhu Y, Lai J, Li H (2012) A Review of Molecular Markers Applied in Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) Breeding. *Journal of Life Sciences* 6: 1190-1199.
- Tay WT, Beckett SJ, Barro PJ (2016) Phosphine resistance in Australian *Cryptolestes* species (Coleoptera: Laemophloeidae): perspectives from mitochondrial DNA cytochrome oxidase I analysis. *Pest Management Science* 72: 1250-1259. doi: <https://doi.org/10.1002/ps.3805>

ARTIGO 1

Toxicidade do óleo essencial de *Piper hispidinervum* sobre *Callosobruchus maculatus* e qualidade do feijão-caupi

Resumo: Este trabalho teve como objetivos investigar a toxicidade por fumigação e por contato do óleo essencial de *Piper hispidinervum* C. DC para adultos *Callosobruchus maculatus* e o efeito sobre a sua progênie, bem como o seu efeito sobre a qualidade do feijão-caupi armazenado. As unidades experimentais foram constituídas por frascos de vidro contendo 200 g de feijão-caupi e 50 adultos de *C. maculatus*. No bioensaio por fumigação foram utilizadas as seguintes concentrações do óleo essencial 14,3; 57,1; 100,0; 142,9; e 185,7 $\mu\text{L L}^{-1}$ de ar, e no bioensaio por contato as concentrações utilizadas foram de 60; 80; 100; 120 e 140 $\mu\text{L kg}^{-1}$. A mortalidade de *C. maculatus* foi avaliada após quatro e um dia para os bioensaios por fumigação e contato, respectivamente. As taxas de oviposição e de emergência foram avaliadas após sete e 50 dias de armazenamento, respectivamente. Em relação ao teor de água, a perda de massa, a germinação e a massa específica aparente dos grãos de feijão-caupi foram analisados após 50 dias de armazenamento. O safrol foi o composto majoritário do óleo essencial de *P. hispidinervum*. Constatou-se que o óleo essencial de *P. hispidinervum* apresentou toxicidade fumigante e por contato para adultos de *C. maculatus*. As concentrações letais para causar 50 e 95% de mortalidade por fumigação foram de 91,23 e 242,59 $\mu\text{L L}^{-1}$ de ar, respectivamente. Por outro lado, as concentrações letais para causar 50 e 95% de mortalidade por contato foram de 101,51 e 208,52 $\mu\text{L kg}^{-1}$ de feijão-caupi, respectivamente. Em ambos os bioensaios as taxas de oviposição e de progênie de *C. maculatus* reduziram com o incremento da concentração do óleo essencial de *P. hispidinervum*. A qualidade do feijão-caupi foi preservada até mesmo nas concentrações subletais. Constatou-se, portanto, que o óleo essencial de *P. hispidinervum* apresenta potencial para controlar *C. maculatus*, e consequentemente preserva a qualidade do feijão-caupi armazenado.

Palavras-chave: Piperaceae, bioinseticida, *Vigna unguiculata*, bruchídeo, qualidade de grãos.

Introdução

Óleos essenciais (OEs) são oriundos do metabolismo secundário das plantas aromáticas e caracterizados por um complexo de compostos voláteis com forte odor (Bakkali et al., 2008). Os OEs e seus constituintes são uma alternativa promissora para a proteção de produtos armazenados (Nenaah et al., 2015), pois, apresentam atividades inseticidas como toxicidade por fumigação (Nenaah et al., 2015; Araújo et al., 2017) e por contato (Dutra et al., 2016), repelência (Arena et al., 2017) e afetam negativamente as taxas de crescimento e desenvolvimento populacional (Santos et al., 2011), reprodução (Souza et al., 2018), além de alterar o comportamento (Araújo et al., 2017) e a fisiologia da praga (Santos et al., 2011;

Araújo et al., 2017). Em geral, os OEs são considerados uma alternativa segura para o meio ambiente e seres humanos (Pavela e Benelli, 2016; Smith et al., 2018).

O gênero *Piper* (Piperaceae) está distribuído nas regiões tropicais e subtropicais (Frodin, 2004; Negreiros e Miqueloni, 2015). Algumas espécies do gênero apresentam valor comercial devido ao seu potencial na produção de OEs e, também, devido à bioatividade dos seus compostos secundários, os quais são utilizados pela indústria alimentícia e farmacêutica (Basak e Guha, 2017; Branquinho et al., 2017). *Piper hispidinervum* C. DC. é um arbusto endêmico da Amazônia e destaca-se entre as espécies aromáticas do gênero, tendo utilizações na indústria de cosméticos e inseticidas (Gottlieb et al., 1981). Estudos apontam a toxicidade fumigante e por contato, repelência e efeitos comportamentais do óleo essencial de *P. hispidinervum* (OEPH) sobre insetos-praga de produtos armazenados (Coitinho et al., 2011; Araújo et al., 2017; Oliveira et al., 2017). Os principais constituintes do OEPH são safrol, terpinoleno e *E*- β -ocimene (Rossa et al., 2018). O safrol (fenilpropanoide) é o seu composto majoritário (Andrés et al., 2017; Araújo et al., 2017; Oliveira et al., 2017). Este é utilizado na indústria química para sintetizar o butóxido de piperonila (PBO) (sinergista de inseticidas) (Ramos et al., 2014), e na síntese de heliotropina (fixador de fragrâncias) na indústria de cosméticos (Sohilait e Kainama, 2016).

A ocorrência de insetos-praga durante o armazenamento é uma das principais causas de perdas qualitativas e quantitativas de grãos. O caruncho *Callosobruchus maculatus* Fabr. 1775 (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) é a principal praga do feijão-caupi armazenado (Nenaah et al., 2015). O seu ciclo de vida consiste em quatro estágios de desenvolvimento ovo, larva, pupa e adulto. Durante a fase larval, o caruncho alimenta-se do conteúdo nutritivo do grão, sendo capaz de provocar perda total em poucos meses, devido a sua alta capacidade reprodutiva e ciclo de vida curto (Ahn et al., 2013; Akami et al., 2017). O seu ataque causa perdas nutricionais (proteína, carboidratos, taninos, fenólicos e minerais) e redução do valor comercial do feijão-caupi, sendo uma ameaça à segurança alimentar, pois muitos agricultores dependem da produção dessa cultura para sobreviver (Akami et al., 2017). A fosfina (PH₃) é o inseticida fumigante mais utilizado no controle de insetos-praga de produtos armazenados (Opit et al., 2016) e em alguns países é o único fumigante com uso permitido. Adicionalmente, os inseticidas sintéticos protetores (piretróides e organofosforados) também são utilizados no manejo de insetos-praga. Todavia, o uso demasiado de inseticidas sintéticos tem ocasionado o surgimento de populações resistentes de diferentes espécies de insetos-praga a fosfina (Pimentel et al., 2007; Holloway et al., 2016; Tay et al., 2016) e aos inseticidas protetores (Oliveira et al., 2005; Odeyemi et al., 2006; Santos et al., 2009; Gbaye et al., 2016).

O uso de inseticidas com diferentes princípios ativos, como ocorre, por exemplo, com óleos essenciais, pode mitigar ou retardar o desenvolvimento de populações resistentes (Isman et al., 2011; Hagstrum e Phillips, 2017).

O feijão-caupi *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Fabaceae) é uma leguminosa rica em proteínas, carboidratos, vitaminas e sais minerais (Akami et al., 2017). Durante o armazenamento é importante manter as propriedades físicas, químicas, fisiológicas e nutricionais dos grãos e/ou sementes para preservar a qualidade inicial do produto e seu valor comercial (Freitas et al., 2016). O teor de água, massa específica aparente, condutividade elétrica, germinação (Freitas et al., 2016; Silva et al., 2018), quantidade de grãos danificados (Mutungi et al., 2015), índice de infestação de pragas (Pessoa et al., 2016), tempo de cocção (Freitas et al., 2016) e ausência de resíduos de agrotóxicos (Freitas et al., 2017) são propriedades dos grãos e de sementes utilizadas para a avaliação da qualidade destes produtos.

Embora a toxicidade de vários óleos essenciais seja conhecida para insetos-praga de produtos armazenados, a maioria das investigações se restringe apenas a análises em relação à toxicidade dos óleos essenciais sobre a fase adulta dos insetos, negligenciando os seus efeitos sobre a progênie e sobre a qualidade dos grãos. Assim, este trabalho teve como objetivo determinar a toxicidade fumigante e por contato do óleo essencial de *P. hispidinervum* em feijão-caupi para *C. maculatus*; avaliar a oviposição e a progênie de *C. maculatus* em feijão-caupi tratado por fumigação e por contato com diferentes concentrações do OEPH; e avaliar o efeito do OEPH sobre o teor de água, perda de massa, germinação e massa específica aparente do feijão-caupi tratados por fumigação e por contato.

Material e Métodos

Colônia estoque de insetos

Os insetos foram criados em feijão-caupi sobre condições constantes de temperatura (25 ± 2 °C), umidade relativa ($70\pm 5\%$) e escotofase 24 h. Foram utilizados frascos de vidro de 1,5 L, fechados com tampa plástica perfurada e revestida internamente com organza para permitir as trocas gasosas. Adultos de *C. maculatus* foram confinados durante sete dias para efetuarem a postura. Após esse período os insetos foram retirados e o feijão-caupi foi estocado até a emergência da geração F₁. A cada dois dias o feijão-caupi foi peneirado para retirada dos adultos emergidos, de forma a garantir o controle de idade de 48 h. Este procedimento foi efetuado durante todo o período dos bioensaios.

Caracterização do feijão-caupi

O feijão-caupi utilizado (variedade BRS Guariba) foi cultivado no município de Codó, estado do Maranhão, Brasil, (latitude 4° 27' 18" (S), longitude 43° 53' 09" (W) e altitude de 43 m). O feijão-caupi apresentava as seguintes características qualitativas: infestação por pragas = 4%, teor de água = 12,3% b.u., germinação = 98% e massa específica aparente = 787 kg m⁻³.

Extração do óleo essencial

O material vegetal de *P. hispidinervum* foi coletado próximo a BR 317, 30 km Ramal Iquiri no município de Rio Branco, AC, na Floresta Amazônica brasileira, localizado na latitude 9° 58' 29" (S) e longitude 67° 48' 36" (W) e 153 m de altitude ao nível do mar. A coleta do material vegetal foi realizada no período da manhã durante o mês de junho de 2017. Foi realizada a triagem do material a fim de separar folhas e ramos. As folhas foram secas parcialmente sob condição ambiente, depois foram levadas para estufa a 36 °C para secagem até obter peso constante. A extração do OEPH foi realizada com a manta aquecedora (0321A28, Quimis, Brasil), balão volumétrico de 5 L e aparelho tipo Clevenger. Em seguida o OEPH foi separado da emulsão por decantação em um funil de separação e uso de sulfato de sódio anidro (Synth, 99,0%, Brasil) e armazenado em um frasco âmbar a uma temperatura 4±1 °C.

Composição do óleo essencial

O OEPH foi analisado por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) (QP2020, Shimadzu, Japão). As condições cromatográficas foram: coluna capilar (SH-Rtx-5MS, Shimadzu, Japão) de 30 m de comprimento com 0,25 mm de diâmetro interno e espessura de 0,25 µm, hélio (Air Products, 99,999%, Brasil) foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,17 mL min⁻¹, temperatura do injetor de 220 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 60 °C com aumento de 2 °C min⁻¹ até 200 °C e depois de um aumento de 5 °C min⁻¹ até 250 °C e mantido nessa temperatura por 1 min. O cromatógrafo foi operado em modo *full scan* com razão de split de 1:20. O tempo total de análise foi de 81 min. Os espectros de massas obtidos foram comparados com os espectros da biblioteca NIST 14 e pelo cálculo do índice de Kovats relativo a uma série de alcanos saturados (C7-C30) (49451-U, Supelco, Bellefonte, 99,0%, EUA).

Quantificação absoluta do safrol

A quantificação absoluta do safrol presente no OEPH foi determinada no cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama (CG/DIC) (GC2014, Shimadzu, Japão). Foram injetadas cinco soluções de safrol em metanol (Solução de safrol, Supelco, 99,0%, Alemanha) nas concentrações 0,25; 0,50; 1,00; 1,50 e 2,00 mg mL⁻¹, em três repetições. Também foi injetado o OEPH em metanol na concentração de 1 mg mL⁻¹ (Vetec, 99,9%, Alemanha) com triplicatas para cada uma das três repetições. As condições cromatográficas para quantificação do safrol foram: coluna capilar (DB-5, Shimadzu, Japão) de 30 m de comprimento com 0,25 mm de diâmetro interno e espessura de filme de 0,10 µm, nitrogênio (Air Products, 99,999%, Brasil) como gás de arraste com fluxo de 1,82 mL min⁻¹, temperatura do injetor de 220 °C e do detector por ionização em chama de 300 °C. Com razão de split de 1:5. A temperatura inicial da coluna de 60 °C com taxa de aumento de 5 °C min⁻¹ até 120 °C e mantida nessa temperatura por 1 min. O tempo total da análise foi de 12 min.

Toxicidade fumigante

Os bioensaios foram realizados sob condições constantes de temperatura (25±2 °C), umidade relativa (70±5%) e escotofase de 24 h. Inicialmente, foram realizados testes preliminares para estimar a concentração com maior e menor mortalidade, dentro do intervalo de 5 a 95%. Com base nos dados obtidos foram estabelecidas as concentrações de 14,3; 57,1; 100,0; 142,9; e 185,7 µL L⁻¹ de ar e a testemunha (apenas o feijão-caupi), com seis repetições. As unidades experimentais foram constituídas por frasco de vidro com capacidade de 300 mL, contendo 200 g de feijão-caupi e 50 insetos adultos de *C. maculatus* não sexados com idade de até 48 h após a emergência. O OEPH foi aplicado em papel filtro (2,5 x 8,0 cm) envolto por tela metálica (12,3 x 5,6 x 0,5 cm), com malha de 4 mm e organza (15 x 15 cm), para impedir o contato dos insetos com o óleo essencial, sendo colocado na posição vertical entre os grãos. Os frascos foram fechados com tampa metálica rosqueável e selados com parafilm (PM996, American, EUA). Após quatro dias de exposição os insetos foram removidos do feijão-caupi e posteriormente contados o número de indivíduos vivos e mortos. A mortalidade corrigida foi calculada pela fórmula de Abbott (Abbott, 1925).

Toxicidade por contato

Os bioensaios foram realizados sob condições constantes de temperatura (25±2 °C), umidade relativa (70±5%) e escotofase de 24 h. Inicialmente, foram realizados testes preliminares para estimar a concentração com maior e menor mortalidade. Com base nos dados obtidos foram estabelecidas as seguintes concentrações 60, 80, 100, 120 e 140 µL kg⁻¹

de feijão-caupi e a testemunha (acetona pura), com seis repetições. O OEPH foi diluído em acetona a fim de homogeneizar a distribuição do produto na massa de grãos. O volume de calda aplicado foi de 400 μL para 200 g de feijão-caupi, que corresponde a 2 L t^{-1} de grãos. O OEPH foi pulverizado com um aerógrafo de dupla ação, sistema de mistura interna e depósito por gravidade (modelo BC 60, Steula, São Paulo, Brasil), com pressão de trabalho de 15 Psi. Após a pulverização, os insetos foram liberados na massa de grãos. A unidade experimental foi composta por frasco de vidro com capacidade de 0,8 L (8 cm de diâmetro x 15 cm de altura) com 200 g de feijão-caupi e 50 insetos adultos de *C. maculatus* não-sexados, com até 48 h de idade após a emergência. Os frascos foram fechados com tecido do tipo organza (15 x 15 cm) para evitar a fuga dos insetos e permitir trocas gasosas. Após o período de exposição de 24 h, o número de insetos vivos e mortos foi avaliado. A mortalidade corrigida foi calculada pela fórmula de Abbott (Abbott, 1925).

Oviposição e progênie

Os grãos de feijão-caupi utilizados nos bioensaios de toxicidade por fumigação e por contato foram armazenados durante 50 dias, sob condições constantes de temperatura (25 ± 2 °C) e umidade relativa ($70\pm 5\%$), sendo então avaliadas as taxas de oviposição e de emergência de *C. maculatus*. A taxa de oviposição foi determinada após sete dias da avaliação da mortalidade, por meio da quantificação de ovos de *C. maculatus* em uma amostra de 50 g de feijão-caupi. A taxa de emergência foi determinada pela contagem do número total de insetos adultos após 50 dias de armazenamento.

Análises da qualidade do feijão-caupi

Após os bioensaios de toxicidade por fumigação e por contato, o feijão-caupi foi armazenado e a sua qualidade foi avaliada em função da concentração do OEPH, após 50 dias. Os parâmetros avaliados foram: teor de água (% b.u.), perda de massa (%), germinação (%) e massa específica aparente (kg m^{-3}) (Brasil, 2009). As unidades experimentais foram mantidas sob condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C) e umidade relativa ($70\pm 5\%$).

O teor de água do feijão-caupi foi determinado pelo método da estufa. Foram utilizados 30 g em triplicata para cada uma das seis repetições. Essas amostras foram colocadas em estufa com convecção forçada de ar e aquecimento regulado a 105 ± 3 °C durante 24 h. Após este período procedeu-se a pesagem das amostras para determinar o teor de água. Os resultados foram expressos em base úmida (% b.u.). A perda de massa do feijão-caupi durante o armazenamento foi determinada por meio de pesagem dos grãos em balança

analítica (BK8000, Gehaka, São Paulo, Brasil), realizada no início e no final do armazenamento. Para o teste de germinação foram utilizadas oito amostras de 50 grãos para cada repetição. Utilizou-se papel-germitest como substrato, que por sua vez foi umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel. O material foi acondicionado em uma câmara de germinação (Biomatic, Porto Alegre, Brasil) a temperatura de 25 ± 1 °C. A contagem foi realizada após 8 dias, considerando-se o número de grãos germinados. Os dados foram expressos em porcentagem média de germinação. A massa específica aparente foi determinada em balança de peso hectolítrico (modelo 40, Dellemolle, Caxias do Sul, Brasil), com capacidade de um quarto de litro (250 mL). As avaliações foram realizadas em triplicata para cada repetição e os resultados foram expressos em kg m^{-3} .

Análises estatísticas

Os dados de concentração-mortalidade foram submetidos à análise de Probit (PROC PROBIT; SAS Institute, 2011). As taxas de oviposição e de emergência dos insetos e as variáveis qualitativas do feijão-caupi foram submetidas à análise de regressão em função da concentração do OE. Os gráficos foram plotados no *software* Sigmaplot versão 12.5 (SPSS, Inc., Chicago, IL, EUA).

Resultados

Composição do óleo essencial

A composição química e a quantificação relativa dos compostos do óleo essencial das folhas de *P. hispidinervum* foram realizadas através de CG-EM. Os constituintes principais foram identificados através do seu índice de retenção (IR) em relação a uma série homóloga de n-alcanos e confirmados através da comparação do espectro de massas dos compostos com a espectroteca NIST 14. A análise cromatográfica mostrou a presença de seis constituintes do OEPH (Tabela 1). O safrol é o composto majoritário, representando 93,0% dos compostos identificados, seguido por biciclogermacreno, pentadecano, spathulenol, p-cymen-8-ol e (E)-Cariofileno com 2,05; 1,60; 1,46; 1,20 e 0,69%, respectivamente. A concentração absoluta do safrol no OEPH foi determinada através do CG-DIC conforme o tempo de retenção do safrol, onde se constatou que a solução do OEPH em metanol de $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ contém $0,85 \text{ mg L}^{-1}$ de safrol, que representa 85% do OEPH.

Tabela 1. Composição química e concentrações relativas dos compostos identificados no óleo essencial de *Piper hispidinervum* utilizando análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-EM)

Constituinte	IR ¹ Literatura	IR ¹ Calculado	% Relativa
p-Cymen-8-ol	1179	1184	1,20
Safrol	1285	1292	93,00
(E)-Cariofileno	1417	1415	0,69
Biciclogermacreno	1500	1493	2,05
Pentadecano	1500	1498	1,60
Spatulenol	1577	1573	1,46

IR¹ = Índice de Retenção.

Toxicidade fumigante

O modelo do Probit foi adequado para os dados de concentração-mortalidade do OEPH baseado no baixo valor de χ^2 e no elevado valor de P ($\chi^2 = 3,92$; $P = 0,27$) obtidos na curva de concentração-mortalidade do OEPH sobre *C. maculatus*. As concentrações letais para causar 50 e 95% de mortalidade dos insetos (CL₅₀ e CL₉₅) foram de 91,23 (83,23 - 99,07) $\mu\text{L L}^{-1}$ de ar e 242,59 (208,90 - 298,24) $\mu\text{L L}^{-1}$ de ar, respectivamente (Figura 1A). O valor de inclinação da curva foi de $(3,87 \pm 0,36)$ indicando heterogeneidade genética entre os indivíduos da população de *C. maculatus*.

Toxicidade por contato

O modelo do Probit foi adequado para os dados de concentração-mortalidade, baseado no baixo valor de χ^2 e no elevado valor de P ($\chi^2 = 3,54$; $P = 0,31$) obtidos na curva do OEPH sobre *C. maculatus*. As concentrações letais para causar 50% e 95% de mortalidade dos insetos (CL₅₀ e CL₉₅) foram de 101,51 (96,33–107,21) $\mu\text{L kg}^{-1}$ e 208,52 (183,33– 250,76) $\mu\text{L kg}^{-1}$ de feijão-caupi, respectivamente (Figura 1B). A inclinação da curva foi de $(5,26 \pm 0,51)$ indicando homogeneidade genética entre os indivíduos da população de *C. maculatus*.

A. TOXICIDADE POR FUMIGAÇÃO

B. TOXICIDADE POR CONTATO

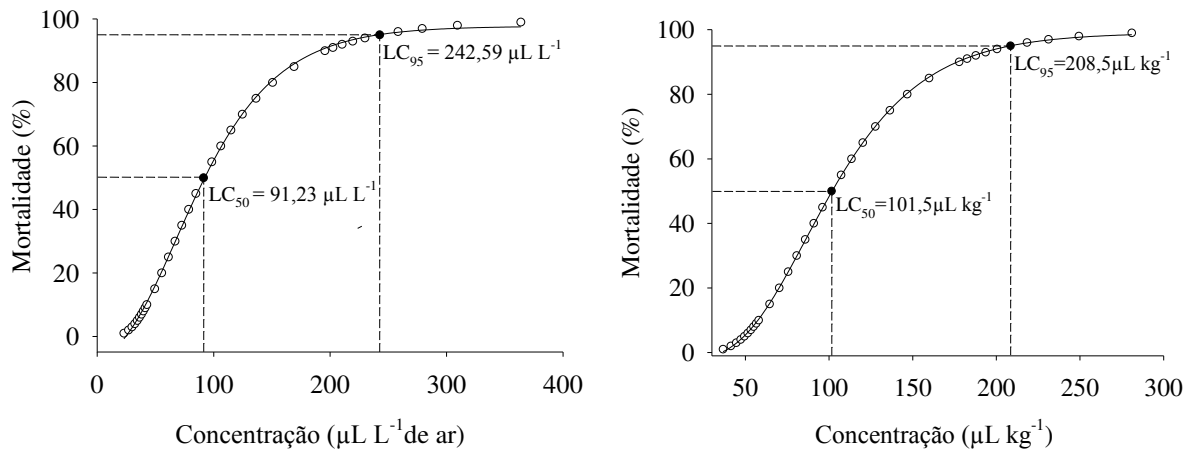


Figura 1. Toxicidade por fumigação (A) e toxicidade por contato (B) do óleo essencial de *Piper hispidinervum* sobre *Callosobruchus maculatus* em feijão-caupi.

Taxa de oviposição e progênie

Bioensaio por fumigação

As taxas de oviposição e de emergência de *C. maculatus* diminuíram significativamente com o incremento da concentração do OEPH ($P \leq 0,0005$). O modelo matemático raiz quadrada ($y = ax^{0,5} + bx + c$) apresentou os melhores ajustes para a taxa de oviposição (Figura 2A) e para taxa de emergência de *C. maculatus* (Figura 2B). A taxa de oviposição na concentração de 14,3 µL L⁻¹ de ar (menor concentração) foi de 143,2 ovos, correspondendo à redução de 54,9% em relação à testemunha. Nas concentrações de 57,1 a 185,7 µL L⁻¹ de ar o número de ovos variou de 35,3 a 21,5, o que equivale a reduções na oviposição de 88,9 a 93,2%, respectivamente. Em relação à taxa de emergência constatou-se 269,7 insetos emergidos na concentração de 14,3 µL L⁻¹ de ar, que corresponde a uma redução de 64,9% na emergência quando comparado à testemunha. Nas concentrações 57,1 a 185,7 µL L⁻¹ de ar o número de insetos emergidos foi de 37,8 a 0,17, equivalente à redução na emergência de 95,1 e 100%, respectivamente.

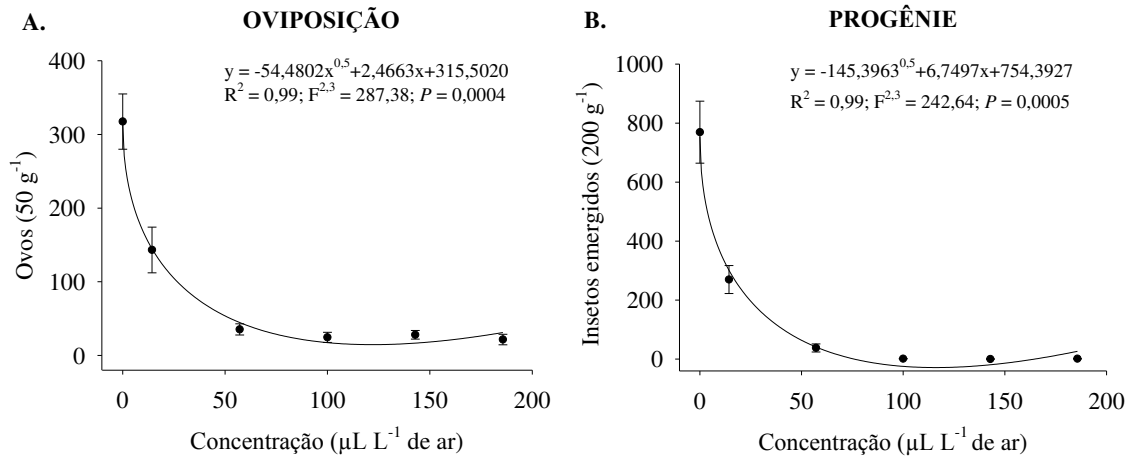


Figura 2. Efeito do óleo essencial de *Piper hispidinervum* por fumigação sobre as taxas de oviposição (A) e de emergência da progênie (B) de *Callosobruchus maculatus* em feijão-caupi.

Bioensaio por contato

As taxas de oviposição e de emergência de *C. maculatus* diminuíram significativamente com o incremento da concentração do OEPH ($P \leq 0,0011$) nos grãos de feijão-caupi. O modelo matemático de raiz quadrada ($y = ax^{0,5} + bx + c$) apresentou os melhores ajustes para a taxa de oviposição (Figura 3A) e para taxa de emergência de *C. maculatus* (Figura 3B). A taxa de oviposição de *C. maculatus* em todas as concentrações avaliadas (60 a 140 $\mu\text{L kg}^{-1}$) variou de 1,2 a 12,3 ovos por 50 g de feijão-caupi, enquanto na testemunha foi de 107,0 ovos por 50 g de feijão-caupi. Esses valores representam uma redução de 88,5 a 98,9% na oviposição. Para a taxa de emergência, constatou-se que o número de insetos emergidos nas concentrações de 60 a 140 $\mu\text{L kg}^{-1}$ variou de 2,3 a 33,0 adultos de *C. maculatus* em 200 g de feijão-caupi, enquanto na testemunha foi de 259,8 adultos de *C. maculatus* em 200 g de feijão-caupi. O OEPH reduziu de 87,3 a 99,1% o número de insetos adultos emergidos quando comparados à testemunha.

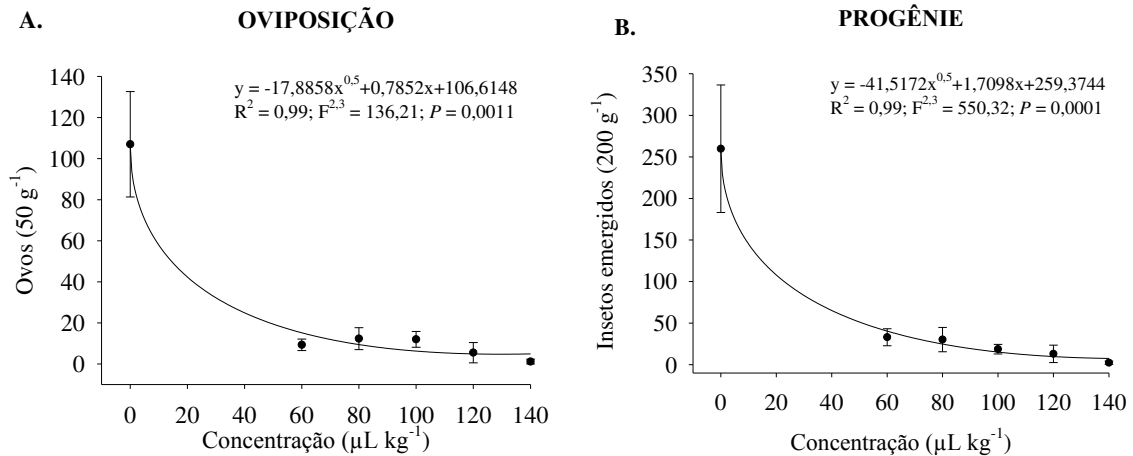


Figura 3. Efeito do óleo essencial de *Piper hispidinervum*, por contato, sobre as taxas de oviposição (A) e de emergência da progênie (B) de *Callosobruchus maculatus* em feijão-caupi.

Análises da qualidade do feijão-caupi

Bioensaio por fumigação

As variáveis qualitativas do feijão-caupi mudaram significativamente em função da concentração do OEPH ($P \leq 0,0040$) para um período de armazenamento de 50 dias. O modelo matemático raiz quadrada ($y = ax^{0,5} + bx + c$) apresentou os melhores ajustes para todas as variáveis analisadas, teor de água (Figura 4A), perda de massa (Figura 4B), germinação (Figura 4C) e massa específica aparente (Figura 4D). O OEPH foi eficaz na preservação da qualidade dos grãos nas concentrações a partir de $57,1 \mu\text{L L}^{-1}$ de ar após 50 dias de armazenamento. O teor de água do feijão-caupi variou de 12,8 a 13,0% b.u. para as concentrações de $57,1$ a $185,7 \mu\text{L L}^{-1}$ de ar. Para a concentração de $14,3 \mu\text{L L}^{-1}$ de ar o teor de água foi de 13,5% b.u. e a testemunha atingiu valores de 14,0% b.u. A perda de massa após 50 dias de armazenamento variou de 1,8 a $4,8 \text{ g kg}^{-1}$ para as concentrações de $57,1$ a $185,7 \mu\text{L L}^{-1}$ de ar. Para a concentração de $14,3 \mu\text{L L}^{-1}$ de ar a perda de massa foi de $23,5 \text{ g kg}^{-1}$ de grão e na testemunha de $37,8 \text{ g kg}^{-1}$. A porcentagem de germinação inicial do feijão-caupi, de 98%, foi preservada nas concentrações de $57,1$ a $185,7 \mu\text{L L}^{-1}$ de ar. Para a concentração de $14,3 \mu\text{L L}^{-1}$ de ar a germinação foi de 95% e para a testemunha de 92%. Para a massa específica aparente, as concentrações de $57,1$ a $185,7 \mu\text{L L}^{-1}$ de ar apresentaram valores de 783,8 a $786,6 \text{ kg m}^{-3}$, que corresponde a uma redução de até 0,4% do valor inicial. Na concentração de $14,3 \mu\text{L L}^{-1}$ de ar a massa específica aparente reduziu 2,6% e na testemunha 6,0%.

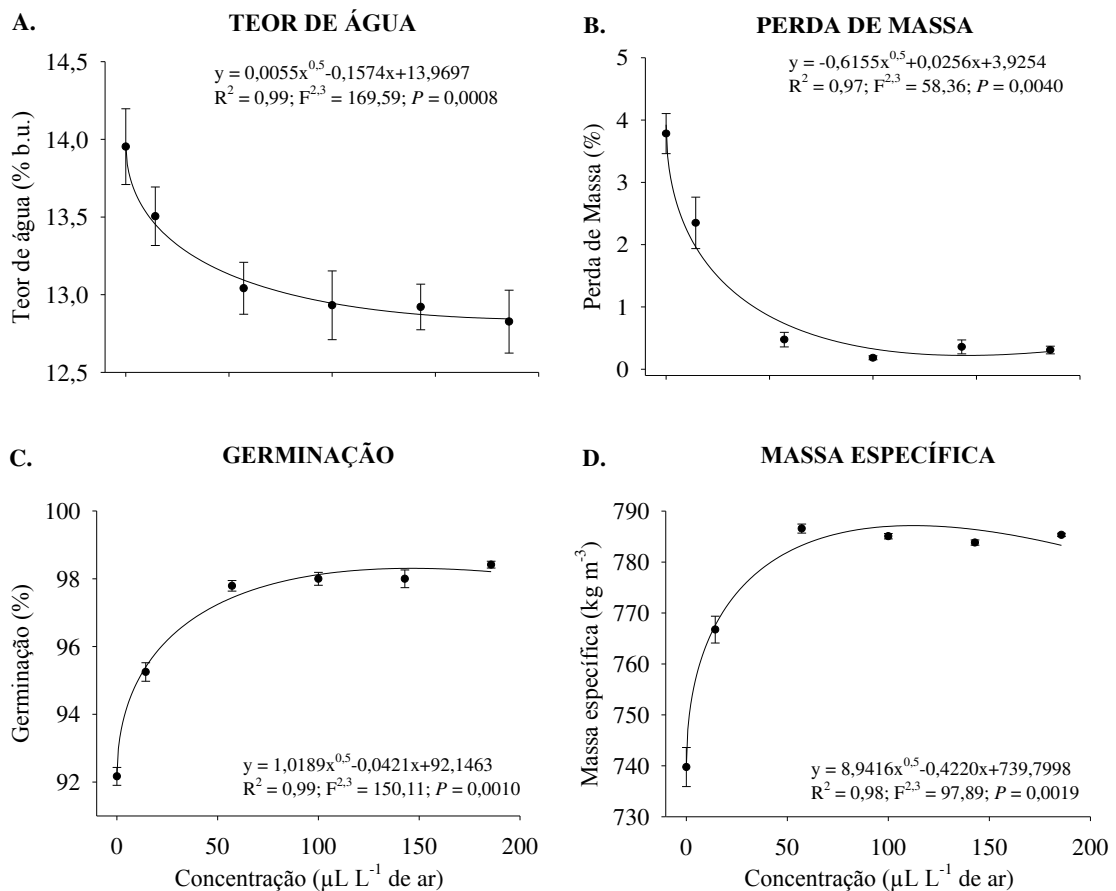


Figura 4. Efeito das concentrações do óleo essencial de *Piper hispidinervum*, por fumigação, sobre teor de água (b.u.) (A), perda de massa (B), germinação (C) e massa específica aparente (D) do feijão-caupi armazenados.

Bioensaio por contato

As variações para o teor de água (Figura 5A), a perda de massa (Figura 5B), a germinação (Figura 5C) e a massa específica aparente (Figura 5D) do feijão-caupi foram significativos para as concentrações utilizadas do OEPH ($P \leq 0,0025$) no período de armazenamento de 50 dias. O modelo matemático raiz quadrada ($y = ax^{0,5} + bx + c$) foi o que melhor se ajustou aos parâmetros de qualidade. O teor de água do feijão-caupi foi de 12,3 a 12,9% b.u. para as concentrações do OEPH de 60 a 140 $\mu\text{L kg}^{-1}$. Na testemunha o teor de água atingiu 15,6% b.u. Com relação à perda de massa houve redução de até 1,8 g kg^{-1} de grão para as concentrações de 60 a 140 $\mu\text{L kg}^{-1}$ e na testemunha a perda foi de 20,9 g kg^{-1} . A porcentagem de germinação do feijão-caupi foi superior a 94,4% para as concentrações de 60 a 140 $\mu\text{L kg}^{-1}$ e na testemunha a porcentagem de germinação reduziu para 73,7%. A massa específica aparente variou de 779,4 a 783,2 kg m^{-3} nas concentrações de 60 a 140 $\mu\text{L kg}^{-1}$ e na testemunha foi de 759,50 kg m^{-3} .

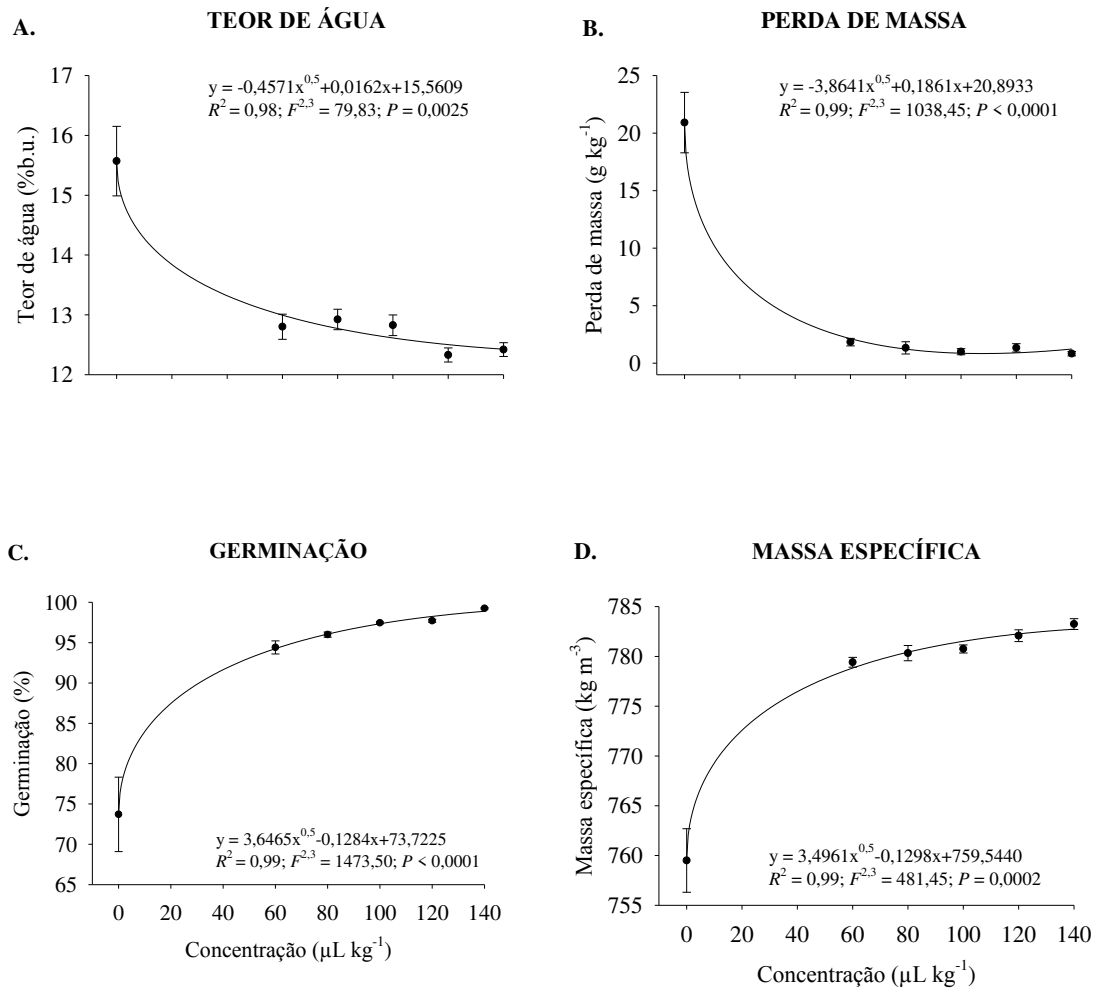


Figura 5. Efeito das concentrações do óleo essencial de *Piper hispidinervum*, por contato, sobre teor de água (b.u.) (A), perda de massa (B), germinação (C) e massa específica aparente (D) do feijão-caupi armazenado.

Discussão

O óleo essencial de *P. hispidinervum* foi eficaz no controle de adultos de *C. maculatus* e na inibição o desenvolvimento da sua progênie em grãos de feijão-caupi tratados por fumigação e por contato. Além disso, a qualidade do feijão-caupi foi preservada nas concentrações subletais do OEPH por ambos os métodos de aplicação. Embora no bioensaio de toxicidade fumigante do OEPH para os insetos adultos tenha apresentado CL_{50} e CL_{95} de 91,23 e 242,59 $\mu\text{L L}^{-1}$ de ar, respectivamente, em geral a progênie adulta foi reduzida substancialmente e a qualidade dos grãos foi preservada a partir da concentração de 57,1 $\mu\text{L L}^{-1}$ de ar, no período de fumigação de quatro dias. Numa investigação para determinar a toxicidade de óleos essenciais de seis espécies botânicas para *C. maculatus*, constatou-se que

a CL₅₀ do OEPH foi de apenas 41,46 µL L⁻¹ de ar, no período de fumigação de dois dias. Porém, nestes bioensaios com menor CL₅₀ não foram utilizados grãos nas unidades experimentais (Oliveira et al., 2017). Na presente investigação foram usadas 200 g de feijão-caupi, indicando que o grão pode absorver o OEPH e atuar como barreira física no processo de fumigação, reduzindo a toxicidade do óleo essencial. De acordo com Lu et al. (2013) a alicina, composto majoritário do OE de *Allium sativum* L. (Amaryllidaceae), foi absorvido pelos grãos de trigo *Triticum* sp. (Poaceae) durante a operação de fumigação, ocorrendo um declínio na sua concentração ao longo do tempo.

A toxicidade por contato também foi constatada no presente trabalho. Este resultado corrobora com o estudo realizado por Coitinho et al. (2011) com o OEPH, rico em safrol (94,7%), que apresentou toxicidade por contato e ingestão para adultos de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). Os autores obtiveram uma CL₅₀ de 25 µL kg⁻¹ de semente de milho para um período de exposição de 48 h. Mossi et al., (2013) observaram uma alta toxicidade tópica do OE de sassafrás, *Ocotea odorifera* (Vellozo) Rohwer (Lauraceae), rico em cânfora (43%) e safrol (42%), para adultos de *S. zeamais*, em que a dose letal para matar 50% da população (DL₅₀) foi de 0,09 µL cm⁻². Em outro estudo, avaliando-se a atividade inseticida do safrol e do isosafrole constatou-se que a toxicidade, por contato, desses compostos é semelhante para os adultos de *S. zeamais* e *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). Além disso, os autores observaram que as larvas com 16 dias apresentaram maior tolerância que as larvas mais jovens (12 e 14 dias) aos compostos avaliados (Huang et al., 1999). Assim, de acordo com os estudos apresentados pode-se inferir que a toxicidade do OEPH está associada aos seus constituintes, principalmente o safrol.

O safrol é o composto majoritário do óleo essencial de *P. hispidinervum*, conforme apresentado nesta e em outras investigações (Sauter et al., 2012; Andrés et al., 2017; Araújo et al., 2017; Oliveira et al., 2017; Rossa et al., 2018), sendo também o principal constituinte dos óleos essenciais de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel (Clemes et al., 2015), *Peperomia inaequalifolia* Ruiz & Pav (Piperaceae) (Rivera et al., 2015), *Sassafras albidum* (Nutt.) (Lauraceae) (Simić et al., 2004), *Ocotea odorifera* (Vellozo) Rohwer (Lauraceae) (Mossi et al., 2013), *Cinnamomum kanehirai* Hayata e *Cinnamomum micranthum* Hayat (Lauraceae) (Chan et al., 2018) e *Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao (Song et al., 2014). Os demais compostos identificados por outros autores para o OEPH pentadecano (Sauter et al., 2012), biciclogermacreno e (E)-cariofileno (Sauter et al., 2012; Andrés et al., 2017; Araújo et al., 2017; Oliveira et al., 2017), spathulenol (Andrés et al., 2017; Araújo et al., 2017; Oliveira et al., 2017) e o P-cymen-8-ol (Araújo et al., 2017; Oliveira et al., 2017). O

safrol é um componente facilmente encontrado em especiarias e condimentos como a canela, a noz-moscada, a pimenta preta e o manjericão. Também tem sido amplamente utilizado como agente aromatizante natural ou sintético. A maioria dos terpenóides e fenóis encontrados nos OEs possuem baixa toxicidade para os vertebrados, por esse motivo foram aprovados como agentes aromatizantes em alimentos e bebidas pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (Shaaya e Kostyukovysky, 2006). No Brasil, conforme dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é permitido o uso do safrol como agente aromatizante em produtos alimentícios, como bebidas alcoólicas e alimentares que contenham macis e noz-moscada (ANVISA, 2007). O regulamento (CE) nº 1334/2008, indica que substâncias vegetais, como o safrol, podem ser utilizadas em alimentos quando este é um componente natural do aromatizante. No entanto, o uso do safrol puro é proibido, todavia aromatizantes que possuem safrol em sua composição podem ser utilizados em bebidas alcoólicas, carnes e derivados, aves, peixes, sopas e molhos (Of the European Parliament And Of The Council, 2008).

A redução da oviposição de *C. maculatus* pode ser atribuída à ação dos componentes do óleo essencial, os quais podem ter atuado durante a fase reprodutiva, dificultando a cópula ou afetando o processo fisiológico das fêmeas acasaladas, inibindo a sua postura. A redução da oviposição também pode estar associada à mortalidade dos insetos adultos nas concentrações letais e, conseqüentemente, à redução da emergência da progênie, que produziu um menor número de ovos. Além disso, o efeito residual do óleo essencial pode ter atuado sobre as fases jovens de *C. maculatus*, com a atividade ovicida e larvicida, reduzindo a emergência dos adultos, conforme observado por Oliveira et al. (2017). Nesse estudo, os autores investigaram a repelência de seis óleos essenciais para *C. maculatus* em bioensaios com chance de escolha na concentração de 500 $\mu\text{L kg}^{-1}$ de feijão-caupi. Os autores constataram que os OEs de *P. hispidinervum* e *P. aduncum* reduziram a oviposição em 45 e 66%, e a emergência em 44 e 69%, respectivamente. Dessa maneira, os autores confirmam a ação inseticida do gênero *Piper* sobre a reprodução em adultos e o desenvolvimento das fases jovens. Babarinde et al. (2017) observaram a atividade inseticida do óleo essencial de *P. guineense*, por contato, sobre a oviposição e emergência de *C. maculatus* em três variedades de feijão-caupi. Esses autores constataram que a variedade e o óleo essencial de *P. guineense* afetaram negativamente a oviposição, emergência da progênie (F_1 e F_2) e eficiência reprodutiva de *C. maculatus*, além de reduzir a porcentagem de sementes danificadas pelos insetos.

O óleo essencial de *P. hispidinervum* preservou a qualidade do feijão-caupi durante 50 dias de armazenamento devido à toxicidade para *C. maculatus* por diferentes vias de contaminação. Para todas as concentrações do OEPH avaliadas, a qualidade dos grãos foi superior à testemunha e praticamente não teve emergência do caruncho. A elevação do teor de água dos grãos está diretamente associada à diminuição da qualidade dos grãos, sendo o parâmetro mais utilizado. O seu incremento está diretamente relacionado à atividade biológica de insetos, ácaros e fungos, além do armazenamento inadequado (Mutungi et al., 2015; Freitas et al., 2016; Silva et al., 2018). Nesse estudo, o teor de água dos grãos foi preservado em todas as concentrações avaliadas do OEPH. O aumento da perda de massa e redução da massa específica aparente ocorrem devido à perda de matéria seca dos grãos. O hábito alimentar dos insetos-praga consiste em romper o tegumento e consumir o embrião e os cotilédones (Njoroge et al., 2014; Vales et al., 2014; Akami et al., 2017). Nas concentrações analisadas com OEPH, a perda de massa foi mínima e a massa específica aparente manteve-se próxima ao valor inicial. A redução da capacidade de germinação dos grãos é um efeito indireto do inseto-praga, visto que esse se alimenta do embrião (Vales et al., 2014; Freitas et al., 2016; Hamdi et al., 2017). Pode-se observar que em todas as concentrações do OEPH, a germinação manteve-se próxima do valor inicial, ao contrário da testemunha, que teve uma redução.

O óleo essencial de *P. hispidinervum* apresenta potencial inseticida para *C. maculatus* em grãos de feijão-caupi. Além de causar resposta letal nos adultos, reduziu a taxa de oviposição e a progênie do bruchídeo até mesmo nas concentrações subletais de Kovats nos bioensaios por fumigação e por contato. Em geral, os resultados do presente estudo indicam que o OEPH, rico em safrol ($0,85 \text{ mg L}^{-1}$), pode vir a ser utilizado no manejo de insetos-praga devido a sua toxicidade. Além disso, pode ser incluído em estratégias de manejo que visam minimizar a evolução da resistência à inseticidas sintéticos, que por sua vez são utilizados de forma contínua e indiscriminada a mais de quatro décadas. Sabe-se que a rotação do uso de inseticidas pode contribuir substancialmente para reduzir a velocidade do desenvolvimento da resistência (McKenzie, 1996; Souza et al., 2018). Também vale destacar que em condições de armazenamento pode ocorrer exposições subletais aos inseticidas. Todavia a exposição do feijão-caupi às concentrações subletais OEPH não comprometeu a proteção dos grãos contra *C. maculatus*.

Conclusão

O óleo essencial de *P. hispidinervum*, rico em safrol ($0,85 \text{ mg L}^{-1}$) apresenta potencial inseticida para *C. maculatus* em grãos de feijão-caupi. Neste trabalho constatou-se a

toxicidade fumigante e por contato do óleo essencial para adultos de *C. maculatus*. O óleo essencial reduziu a taxa de oviposição e o desenvolvimento da progênie do bruchídeo e preservou a qualidade do feijão-caupi, tratado por fumigação e por contato, após 50 dias de armazenamento.

Referências

- Abbott WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267. doi: <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Ahn J, Zhou X, Dowd SE, Chapkins RS, Zhu-Salzman K (2013) Insight into hypoxia tolerance in cowpea bruchid: metabolic repression and heat shock protein regulation via hypoxia-inducible factor 1. *Plos One* 8(4): 1-11. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057267>
- Akami M, Chakira H, Andongma AA, Khaeso K, Gbaye AO, Nicolas NY, Nukenine EN, Niu CY (2017) Essential oil optimizes the susceptibility of *Callosobruchus maculatus* and enhances the nutritional qualities of stored cowpea *Vigna unguiculata*. *Royal Society Open Science* 4: 1-12. doi: <https://doi.org/10.1098/rsos.170692>
- Andrés MF, Rossa GE, Cassel E, Vargas RMF, Santana O, Díaz CE, Gonzalez-Coloma A (2017) Biocidal effects of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil and synergism among its main components. *Food and Chemical Toxicology* 109: 1086-1092. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.017>
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2007) Resolução RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Ministério da Saúde – MS. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_02_2007_COMP.pdf/c966caff-1c19-4a2f-87a6-05f7a09e940b>. Acesso em: 02 de julho de 2018.
- Araújo AMN, Faroni LRA, Oliveira JV, Barbosa DRS, Breda MO, França SM (2017) Lethal and sublethal responses of *Sitophilus zeamais* populations to essential oils. *Journal of Pest Science* 90: 589-600. doi: <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0822-z>
- Babarinde SA, Esan EO, Olatunde OZ, Ajayi DS, Olaniyi JP (2017) Combination of *Piper guineense* essential oil with cowpea varietal resistance in control of cowpea seed beetle, *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). *Journal of Northeast Agricultural University* 24(3): 10-18.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46: 446-475. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

- Basak S, Guha P (2017) Use of predictive model to describe sporicidal and cell viability efficacy of betel leaf (*Piper betle* L.) essential oil on *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* and its antifungal activity in raw apple juice. Food Science and Technology. 80: 510-516. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.024>
- Branquinho LS, Santos JA, Cardoso CAL, Mota JS, Lanza Junior U, Kassuya CAL, Arena AC (2017) Anti-inflammatory and toxicological evaluation of essential oil from *Piper glabratum* leaves. Journal of Ethnopharmacology 198: 372-378. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jp.2017.01.008>
- Brasil (2009) Regras para Análises de Sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília.
- Chan SC, Choong YM, Weng SH (2018) Rapid method for the gas chromatographic quantitative analysis to determinate safrole in commercial essential oils. Journal of Cosmetic Science 69(2): 145-156.
- Clemes SM, Santos TG, Rebelo RA, Laps RR, Pescador R (2015) Seasonality and hydrodistillation time effects on the yield and chemical composition of leaves essential oil of *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel. Eclética Química 40: 117-125. doi: <http://dx.doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v40.1.2015.p117-125>
- Coitinho RLBC, Oliveira JV, Gondim Junior MGC, Câmara CAG (2011) Toxicidade por fumigação, contato e ingestão de óleos essenciais para *Sitophiluszeamais* Motschulsky, 1885 (Coleoptera: Curculionidae). Ciência Agrotecnica 35(1): 172-178. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000100022>
- Dutra KA, Oliveira JV, Navarro DMAF, Barbosa DRS, Santos JPO (2016) 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 68: 25-32. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2016.04.001>
- Freitas RS, Faroni LRA, Sousa AH (2016) Hermetic storage for control of common bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* (Say). Journal of Stored Products Research 66: 1-5. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2015.12.004>
- Freitas R.S, Faroni LRA, Queiroz MELR, Heleno FF, Prates LHF (2017) Degradation kinetics of pirimiphos-methyl residues in maize grains exposed to ozone gas. Journal of Stored Products Research 74: 1-5. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2017.08.008>
- Frodin, DG 2004. História e conceitos de grandes gêneros de plantas. Taxon 53: 753-776.

- Gbaye OA, Oyeniya EA, Ojo OB (2016) Resistance of *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae) populations in Nigeria to dichlorvos. *Jordan Journal of Biological Sciences* 9: 41-46. doi: <https://doi.org/10.12816/0027007>
- Gottlieb OR, Koketsu M, Magalhães MT, Maia JGS, Mendes PH, Rocha AI, Silva ML, Wilberg VC (1981) Óleos essenciais da Amazônia VII. *Acta Amazônica* 11(1): 143-148. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1809-43921981111143>
- Hagstrum DW, Phillips TW (2017) Evolution of stored-product entomology: protecting the world food supply. *Annual Review of Entomology* 62: 379-97. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035146>
- Hamdi SH, Abidi S, Sfayhi D, Dhraief MZ, Amri M, Boushah E, Hedjal-Chebheb M, Larbi KM, Jemâa JMB (2017) Nutritional alterations and damages to stored chickpea in relation with the pest status of *Callosobruchus maculatus* (Chrysomelidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 20: 1067-1076. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.08.008>
- Holloway JC, Falk MG, Emergy RN, Collins PJ, Nayak MK (2016) Resistance to phosphine in *Sitophilus oryzae* in Australia: a national analysis of trends and frequencies over time and geographical spread. *Journal of Stored Products Research* 69: 129-137. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2016.07.004>
- Huang Y, Ho SH, Kini RM (1999) Bioactivities of safrole and isosafrole on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology* 92(3): 676-683. doi: <https://doi.org/10.1093/jee/92.3.676>
- Isman MB, Miresmailli S, Machial C (2011) Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. *Phytochemistry Reviews* 10: 197-204. doi: <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9170-4>
- Lu Y, Zhong J, Wang Z, Liu F, Wan Z (2013) Fumigation toxicity of allicin against three stored product pests. *Journal of Stored Products Research* 55: 48-54. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jspr.2013.08.002>
- McKenzie JA (1996) Ecological and evolutionary aspects of insecticide resistance. R.G. Landes Company and Academic Press, Georgetown, TX.
- Mossi AJ, Zanella CA, Kubiak G, Lerin LA, Cansian RL, Frandoloso FS, Prá VD, Mazutti MA, Costa JAV, Treichel H (2013) Essential oil of *Ocotea odorifera*: an alternative against *Sitophilus zeamais*. *Renewable Agriculture and Food Systems* 29(2): 161-166. doi: 10.1017/S1742170513000045

- Mutungi C, Affognon HD, Njoroge AW, Manono J, Baributsa D, Murdock LL (2015) Triple-layer plastic bags protect dry common beans (*Phaseolus vulgaris*) against damage by *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Chrysomelidae) during storage. *Journal of Economic Entomology* 108(5): 2479-2488. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/jee/tov197>
- Negreiros JRS, Miqueloni DP (2015) Morphological and phytochemical characterization of *Piper hispidinervum* DC. and *Piper aduncum* L. populations in the state of Acre. *Revista Ceres* 62(1): 078-086. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737X201562010010>
- Nenaah GE, Ibrahim SIA, Al-Assiuty BA (2015) Chemical composition, insecticidal activity and persistence of three Asteraceae essential oils and their nanoemulsions against *Callosobruchus maculatus* (F.). *Journal of Stored Products Research* 61: 9-16. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2014.12.007>
- Njoroge AW, Affognon HD, Mutungi CM, Manono J, Lamuka PO, Murdock LL (2014) Triple bag hermetic storage delivers a lethal punch to *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) in stored maize. *Journal of Stored Products Research* 58: 12-19. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2014.02.005>
- Odeyemi OO, Gbaye OA, Akeju O (2006) Resistance of *Callosobruchus maculatus* (Fab.) to pirimiphos methyl in three zones in Nigeria. In: Lorini I, Bacaltchuk B, Beckel H, Deckers D, Sundfeld E, Santos JP, Biagi JD, Celaro JC, Faroni LRD, Bortolini LOF, Sartori MR, Elias MC, Guedes RNC, Fonseca RG, Scussel VM (Eds.), *Proceedings of the ninth international working conference on stored-product protection*. 15-18, 2006 ABRAPOS, Campinas, São Paulo, Brazil, pp. 324-329.
- Oliveira EE, Guedes RNC, Corrêa AS, Damasceno BL, Santos CT (2005) Resistência vs susceptibilidade a piretróides em *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): há vencedor? *Neotropical Entomology* 34(6):981-990. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2005000600015>
- Oliveira JV, França SM, Barbosa DRS, Dutra KA, Araújo AMN, Navarro DMAF (2017) Fumigation and repellency of essential oils against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in cowpea. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 52(1): 10-17. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2017000100002>
- Opit GP, Thoms E, Phillips TW, Payton ME (2016) Effectiveness of sulfuryl fluoride fumigation for the control of phosphine-resistant grain insects infesting stored wheat. *Journal of Economic Entomology* 109(2): 930-941. doi: <https://doi.org/10.1093/jee/tov395>

- Pavela R, Benelli G (2016) Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends in Plant Science* 21(12): 1000-1007. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.005>
- Pessoa EB, Almeida FAC, Neto AF, Vieira JF (2016) Treatment of bean seeds with plant extracts for controlling *Zabrotes subfasciatus* and its effects on physical and physiological quality during storage. *African Journal of Agricultural Research* 11(42): 4233-4241. doi: <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11067>
- Pimentel MAG, Faroni LRA, Tótola MR, Guedes RNC (2007) Phosphine resistance, respiration rate and fitness consequences in stored-product insects. *Pest Management Science* 63: 876-881. doi: <https://doi.org/10.1002/ps.1416>
- Ramos CS, Barbosa QPS, Vanin SA (2014) Metabolism of safrole by *Heraclides thoas brasiliensis* (Papilionidae). *Journal of the Lepidopterists' Society* 68(4): 283-285. doi: <https://doi.org/10.18473/lepi.v68i4.a6>
- Regulation (EC) (2008) nº 1334, 16 de dezembro de 2008. Of the European Parliament And Of The Council. Official Journal of the European Union. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32008R1334>>. Acesso em: 02 de julho de 2018.
- Rivera PN, Mosquera T, Baldisserotto A, Abad J, Aillon C, Cabezas D, Piedra J, Coronel I, Manfredini S (2015) Chemical composition and in-vitro biological activities of the essential oil from leaves of *Peperomia inaequalifolia* Ruiz & Pav. *American Journal of Essential Oils and Natural Products* 2(4): 29-31.
- Rossa GE, Almeida RN, Vargas RMF, Cassel E, Movna G (2018) Sequential extraction methods applied to *Piper hispidinervum*: an improvement in the processing of natural products. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 96: 756-762. doi: <https://doi.org/10.1002/cjce.23020>
- Santos JC, Faroni LRA, Simões RO, Pimentel MAG, Sousa AH (2009) Toxicidade de inseticidas piretróides e organofosforados para populações brasileiras de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Bioscience Journal* 25(6): 75-81.
- Santos JC, Faroni LRA, Sousa AH, Guedes RNC (2011) Fumigant toxicity of allyl isothiocyanate to populations of the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Journal of Stored Products Research* 47: 238-243. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2011.03.004>
- SAS, SAS/STAT(R) 9.3 User's Guide (2011) SAS Institute, Cary, NC, USA. Disponível em: http://support.sas.com/documentation/cdl/en/statug/63962/HTML/default/viewer.htm#chap0_toc.htm. Acesso em 07 maio 2018.

- Sauter IP, Rossa GE, Lucas AM, Cibulski SP, Roehec PM, Silva LAA, Rott MB, Vargas MF, Cassel E, Poser GL (2012) Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. *Industrial Crops and Products* 40: 292-295. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.03.025>
- Shaaya E, Kostyukovysky M (2006) Essential oils: potency against stored product insects and mode of action. *Stewart Postharvest Review* 4(5): 1-6. doi: <https://doi.org/10.2212/spr.2006.4.5>
- Silva MGC, Silva GN, AH, Freitas RS, Silva MSG, Abreu AO (2018) Hermetic storage as an alternative for controlling *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) and preserving the quality of cowpeas. *Journal of Stored Products Research* 78: 27-31. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2018.05.010>
- Simić A, Soković MD, Ristić M, Grujić-Jovanović S, Vukojević J, Marin PD (2004) The Chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research* 18: 713–717. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.1516>
- Sohilait HJ, Kainama H (2016) Synthesis of 1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1-butene-3- one from safrole. *European Journal of Pure and Applied Chemistry* 3(1): 66-70. doi: <http://dx.doi.org/10.11648/j.sjc.20150303.15>
- Song X, Yin Z, Ye K, Wei Q, Jia R, Zhou L, Du Y, Xu J, Liang X, He C, Shu G, Yin L, Lv C (2014) Anti-hepatoma effect of safrole from *Cinnamomum longepaniculatum* leaf essential oil in vitro. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 7(5): 2265-2272.
- Souza LP, Faroni LRA, Lopes LML, Sousa AH, Prates LHF (2018) Toxicity and sublethal effects of allyl isothiocyanate to *Sitophilus zeamais* on population development and walking behavior. *Journal of Pest Science* 91: 761-770. doi: <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0950-0>
- Smith GH, Roberts JM, Pope TW (2018) Terpene based biopesticides as potential alternatives to synthetic insecticides for control of aphid pests on protected ornamentals. *Crop Protection* 110: 125-130. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.04.011>
- Tay WT, Beckett SJ, Barro PJ (2016) Phosphine resistance in Australian *Cryptolestes* species (Coleoptera: Laemophloeidae): perspectives from mitochondrial DNA cytochrome oxidase I analysis. *Pest Management Science* 72: 1250-1259. doi: <https://doi.org/10.1002/ps.3805>

Vales MI, ao GVR, Sudini H, Patil SB, Murdock LL (2104) Effective and economic storage of pigeonpea seed in triple layer plastic bags. *Journal of Stored Products Research* 58: 29-38. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2014.01.004>

ARTIGO 2

Persistência do óleo essencial de *Piper hispidinervum* em feijão-caupi

Resumo: Este trabalho teve como objetivos desenvolver, otimizar e validar um método de extração de resíduos de safrol em feijão-caupi; e avaliar a persistência de resíduo do safrol em feijão-caupi, tratado com óleo essencial de *P. hispidinervum* por contato e por fumigação. O método de microextração em fase sólida em *headspace* acoplado ao cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama (MEFS/HS-CG/DIC) foi otimizado em função da fibra (divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano stableflex de 50/30 μm , poliacrilato de sílica fundida de 85 μm , polidimetilsiloxano de sílica fundida de 100 μm e polidimetilsiloxano de sílica fundida de 7 μm), da temperatura (30 e 60 $^{\circ}\text{C}$) e do tempo de extração (3 e 10 min). A validação do método analítico baseou-se nos seguintes parâmetros: linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão. O novo método foi aplicado para analisar a persistência do resíduo de safrol no feijão-caupi tratado por contato e por fumigação e armazenado por 5, 10, 26, 60 e 90 dias. A condição ótima de extração do safrol em feijão-caupi foi obtida com a fibra revestida por divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano stableflex de 50/30 μm na temperatura de 60 $^{\circ}\text{C}$ e o tempo de extração de 10 min. Nestas condições, o método apresentou uma boa linearidade nas faixas testadas, bons limites de detecção e quantificação, e boa repetibilidade. As concentrações de safrol detectadas no feijão-caupi tratado com o óleo essencial de *P. hispidinervum* variaram no teste por contato de 1,0945 a 0,0513 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e por fumigação de 2,1606 a 0,1239 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de feijão-caupi, para os períodos de armazenamento avaliados. As concentrações detectadas a partir do quinto dia representam menos de 1% da concentração inicial, o que mostra que o safrol não apresenta alta persistência no feijão-caupi.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, pimenta longa, safrol, microextração em fase sólida.

Introdução

Os inseticidas são amplamente utilizados no manejo de pragas agrícolas para reduzir as perdas na produção (Alexandratos e Bruinsma, 2012; Oliveira et al., 2014). No armazenamento de produtos agrícolas são utilizados inseticidas sintéticos protetores (piretróides e organofosforados) e o fumigante (fosfina - PH_3) para controlar insetos-praga (Gbaye et al., 2016; Opit et al., 2016). No entanto, alguns efeitos indesejáveis estão associados ao uso indevido desses produtos, tais como o desenvolvimento de populações de insetos-praga resistentes (Gbaye et al., 2016; Holloway et al., 2016; Tay et al., 2016), o aumento dos custos operacionais (Sparks, 2013), a poluição ambiental (Starner e Goh, 2012), o risco à saúde humana (Aktar et al., 2009) e à fauna (Liu et al., 2018). Por outro lado, os inseticidas botânicos que são considerados mais seguros, não estão relacionados ao desenvolvimento de resistência das pragas, e conseqüentemente apresentam menor risco de

contaminação ao meio ambiente e à saúde humana e animal (Correa et al., 2015; Pavela e Benelli, 2016; Smith et al., 2018).

Os óleos essenciais (OEs) são substâncias voláteis que possuem forte odor, na maioria dos casos possuem constituição lipofílica e são produtos do metabolismo secundário das plantas (Bakkali et al., 2008). A atividade biocida dos OEs foi relatada para diferentes tipos de pragas e patógenos, tais como insetos (Oliveira et al., 2017), ácaros (Tak e Isman, 2017), fungos (Kedia et al., 2014), vírus (Gilling et al., 2014), bactérias (Diao et al., 2014), nematoides (Andrés et al., 2017) e amebas (Sauter et al., 2012).

A composição dos óleos essenciais está relacionada a fatores como a espécie vegetal (Benelli et al., 2018), condições ambientais no cultivo (Baher et al., 2002), modo de extração do óleo essencial (Sefidkon et al., 2006), entre outros. O óleo essencial da pimenta longa (*Piper hispidinervum* C.DC) (Piperaceae) (OEPH), planta aromática endêmica da Amazônia que possui um grande potencial na produção de OE (Gottlieb et al., 1981; Maia et al., 1987), é constituído principalmente de safrol, que representa entre 77,7 a 94,7% da sua constituição (Coitinho et al., 2011; Sauter et al., 2012; Andrés et al., 2017; Araújo et al., 2017; Oliveira et al., 2017). Além da pimenta longa, o safrol faz parte da constituição dos OEs de outras espécies das famílias Piperaceae (Conde-Hernández e Guerrero-Beltrán, 2014; Clemes et al., 2015; Rivera et al., 2015), Lauraceae (Mossi et al., 2013; Song et al., 2014) e Myristicaceae (Pandey et al., 2016). Diversas pesquisas evidenciam a atividade inseticida de OEs que apresentam o safrol na sua constituição em insetos-praga de grãos armazenados (Coitinho et al., 2011; Mossi et al., 2013; Araújo et al., 2017; Oliveira et al., 2017).

O safrol (4-alil-1,3-benzodioxol) é um fenilpropanóide utilizado na síntese de heliotropina (fixador de fragrâncias) pela indústria de cosméticos (Ramos et al., 2014) e na síntese do butóxido de piperolina - PBO (sinergista de inseticidas) pela indústria de agrotóxicos (Sohilait e Kainama, 2016). Além disso, o safrol é utilizado como aromatizante natural ou sintético na indústria alimentícia e de bebidas alcoólicas (Siano et al., 2003). Todavia, estudos mostram o potencial carcinogênico do safrol (Hung et al., 2015; Yang et al., 2017). Conforme dados da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), o safrol está classificado no grupo 2B, ou seja, possivelmente carcinogênico para humanos (IARC, 2015). Além disso, a toxicidade aguda do safrol já foi determinada para ratos e camundongos, onde a dose letal para matar 50% (DL₅₀) dos indivíduos é de 1950 e 2350 mg kg⁻¹ de peso corporal, respectivamente (Jenner et al., 1964).

No Brasil, o uso do safrol é regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução (RDC) nº 2 de 15 de janeiro de 2007. Segundo a

ANVISA (2007), a máxima concentração permitida para a utilização do safrol pela indústria de alimentos é de 2 mg kg⁻¹ para bebidas e 15 mg kg⁻¹ para alimentos. Na União Europeia seu uso é regulamentado pela Resolução (EC) nº 1334 de 16 de dezembro de 2008. De acordo com esta resolução fica permitido o uso do safrol em alimentos desde que este seja um componente natural de aditivos alimentares e que a sua concentração não ultrapasse o limite de 25 mg kg⁻¹ (Of the European Parliament And Of The Council, 2008).

Para estabelecer critérios quanto ao uso do OEPH no controle de pragas em grãos armazenados é importante que se faça uma avaliação de sua persistência na massa de grãos após um tratamento. 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 ausência de trabalhos relacionados com a avaliação da persistência de inseticidas botânicos em grãos armazenados. Portanto, é necessário desenvolver métodos que quantifiquem a persistência de óleos essenciais e seus compostos em alimentos a fim de garantir a segurança no seu uso.

A técnica de microextração em fase sólida (MEFS) é amplamente utilizada em análises de resíduos, pois permite a extração e pré-concentração de analitos simultaneamente (Kreutz et al., 2018; Moreira et al., 2019). A fibra de MEFS pode ser utilizada tanto no *headspace* como diretamente imerso na amostra. No entanto, quando o analito é volátil ou se tem amostras muito complexas, a microextração em fase sólida em *headspace* (MEFS-HS) é mais adequada (Behzadi et al., 2013). Além disso, alguns parâmetros podem afetar a eficiência da extração, tais como, tipo de revestimento da fibra, adição de sal à solução, velocidade de agitação, temperatura de extração, tempo para alcançar o equilíbrio no *headspace*, tempo de exposição da fibra (adsorção dos compostos voláteis pela fibra) e tempo de dessorção no injetor do cromatógrafo (Rocha et al., 2017; Xiao et al., 2017).

Atualmente, várias pesquisas avaliam a toxicidade dos OEs sobre diferentes pragas de produtos armazenados. Entretanto, é de fundamental importância realizar estudos mais detalhados sobre a persistência deste composto em produtos alimentícios a fim de garantir a segurança do seu uso. Diante da situação apresentada, esse trabalho teve como objetivos desenvolver, otimizar e validar um método para a extração e análise de resíduos de safrol do OEPH em feijão-caupi por cromatografia gasosa; e avaliar a persistência dos resíduos do safrol em feijão-caupi tratado com OEPH por contato e por fumigação, durante o armazenamento.

Material e Métodos

Reagentes

Foram utilizados metanol grau UV/HPLC 99,9% (Vetec, Alemanha), acetona (Neon, 99,0%, Brasil), solução de safrol TraceCERT® 2000 µg mL⁻¹ em metanol (Sigma-Aldrich, 99,9%, Alemanha) e o OEPH extraído mediante hidrodestilação das folhas de *P. hispidinervum* (Universidade Federal do Acre - UFAC, Acre, Brasil).

Composição do óleo essencial

O OEPH foi analisado por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) (QP2020, Shimadzu, Japão). As condições cromatográficas foram: coluna capilar (SH-Rtx-5MS, Shimadzu, Japão) de 30 m de comprimento com 0,25 mm de diâmetro interno e espessura de 0,25 µm, o hélio (Air Products, 99,999%, Brasil) foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,17 mL min⁻¹, temperatura do injetor de 220 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 60 °C com aumento de 2 °C min⁻¹ até 200 °C e depois de um aumento de 5 °C min⁻¹ até 250 °C e mantido nessa temperatura por 1 min. O cromatógrafo foi operado em modo *full scan* com razão de split de 1:20. O tempo total de análise foi de 81 min. Os espectros de massas obtidos foram comparados com os espectros da biblioteca NIST 14 e pelo cálculo do índice de Kovats relativo a uma série de alcanos saturados (C7-C30) (49451-U, Supelco, Bellefonte, 99,0%, EUA).

Quantificação de safrol no óleo essencial

O safrol presente no OEPH foi quantificado em cromatógrafo a gás equipado com detector por ionização em chama (CG-DIC) GC2014 (Shimadzu, Japão). Para construção da curva analítica e quantificação do safrol no OEPH, foram injetadas cinco concentrações de safrol (250, 500, 1000, 1500 e 2000 µg mL⁻¹ em metanol) e uma amostra de 1000 µg mL⁻¹ de OEPH em metanol. As injeções foram realizadas em triplicata, para cada concentração e amostra, com auxílio do injetor automático AOC-20i. O safrol presente no OEPH foi determinado a partir da curva analítica padrão de safrol.

Condições cromatográficas

A quantificação de safrol em amostras do óleo essencial e do feijão-caupi foi realizada no CG-DIC nas seguintes condições cromatográficas: coluna capilar (DB-5, Shimadzu, Japão) de 30 m de comprimento com 0,25 mm de diâmetro interno e espessura de filme de 0,10 µm,

nitrogênio (Air Products, U.P. 99,999%, Brasil) como gás de arraste com fluxo de 1,82 mL min⁻¹, temperatura do injetor de 220 °C e do detector de 300 °C, com razão de split de 1:5. A temperatura inicial da coluna foi 60 °C, com aumento de 5 °C min⁻¹ até 120 °C e mantida nessa temperatura por 1 min. O tempo total da análise foi de 12 min.

Otimização do método de extração de safrol em feijão-caupi

O método de MEFS/HS-CG/DIC foi utilizado para extração do safrol nos grãos de feijão-caupi. A otimização do método de extração foi dividida em duas etapas: i) otimização univariada da fibra a ser utilizada e ii) otimização multivariada do tempo e temperatura de extração. Na primeira etapa foram testadas quatro tipos de fibras revestidas com os seguintes materiais: divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) *stableflex* de 50/30 µm, poliacrilato (PA) de sílica fundida de 85 µm, PDMS de sílica fundida de 100 µm e PDMS de sílica fundida de 7 µm (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Para isso, foram utilizados grãos de feijão-caupi com teor de água de 13% b.u. e isentos de agrotóxicos. Amostras de feijão-caupi (15 g) foram colocadas em *vials* de vidro âmbar de 40 mL, com tampa de plástico e septo de borracha silicone/PTFE. As amostras de feijão-caupi foram fortificadas com safrol na concentração de 0,187 µg kg⁻¹ de feijão e um volume de calda de 2 mL kg⁻¹ feijão-caupi, diluído em acetona. Para homogeneizar as amostras fortificadas, essas foram agitadas por 1 min no vortex (Vortex Mixer CE, Vixar, Coreia) e deixadas em repouso por 30 min antes da extração do safrol. Após esse período os frascos com as amostras fortificadas foram aquecidos em banho-maria a 30 °C e as fibras foram expostas por 3 min no *headspace*. Após o período de adsorção do analito, a fibra foi recolhida, retirada do frasco, e imediatamente inserida e exposta no injetor do cromatógrafo para dessorção térmica. Cada fibra foi testada separadamente em duplicata. Na segunda etapa da otimização, utilizou-se o planejamento fatorial completo 2² (Tabela 1) para avaliar o comportamento dos fatores independentes temperatura e tempo de extração, no nível superior (+) e inferior (-). As análises, em duplicata, foram realizadas utilizando a fibra que apresentou a melhor resposta cromatográfica na primeira etapa de otimização.

Tabela 1. Planejamento fatorial completo 2² para a otimização das condições de extração de safrol em feijão-caupi

Experimentos	Tempo (min)	Temperatura (°C)
--------------	-------------	------------------

	Real	Codificada	Real	Codificada
1	3	-	30	-
2	3	-	60	+
3	10	-	30	-
4	10	-	60	+
5	3	+	30	-
6	3	+	60	+
7	10	+	30	-
8	10	+	60	+

Validação do método de extração e análise de safrol

A validação da extração e análise de safrol em feijão-caupi pelo método otimizado de MEFS/HS-CG/DIC baseou-se nos seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão (EURL, 2017). Para construir a curva analítica do safrol utilizou-se cinco concentrações de safrol que variaram de 0,0187 a 3,7366 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de feijão-caupi. As amostras de 5 g de feijão-caupi tratadas foram avaliadas em triplicata. Os limites de detecção e quantificação da curva analítica do safrol foram determinados por meio de testes preliminares. Os grãos de feijão-caupi foram contaminados com diferentes concentrações de safrol. O LD é a menor concentração de safrol que pode ser quantificada e reportada pelo método analítico, porém não apresentam precisão aceitável. O LQ é a menor concentração de safrol que pode ser quantificada e validada com precisão aceitável do método analítico.

Persistência do resíduo de safrol em feijão-caupi

Os grãos de feijão-caupi foram tratados por contato com o OEPH na concentração 208,52 $\mu\text{L kg}^{-1}$ de grão, que corresponde à concentração de safrol de 194,77 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os grãos também foram submetidos ao processo de fumigação com o OEPH na concentração de 242,59 $\mu\text{L L}^{-1}$ de ar, que corresponde à concentração de safrol de 226,62 $\mu\text{L L}^{-1}$ de ar. As concentrações utilizadas correspondem às concentrações letais do OEPH para matar 95% da população (CL_{95}) de *C. maculatus*, como observado no Artigo 1. Para o tratamento por contato, o OEPH foi pulverizado com um aerógrafo de dupla ação, com sistema de mistura interna e depósito por gravidade (modelo BC 60, Steula, São Paulo, Brasil). A pressão de trabalho utilizada na pulverização foi de 15 Psi. As unidades experimentais foram compostas por frascos de vidro com capacidade de 0,8 L (8 cm de diâmetro x 15 cm de altura) contendo

200 g de feijão-caupi. Para a fumigação utilizou-se unidades experimentais constituídas por frascos de vidro com capacidade de 300 mL, contendo 200 g de feijão-caupi. O OEPH foi aplicado em papel filtro (2,5 x 8,0 cm) envolto por tela metálica (12,3 x 5,6 x 0,5 cm), com malha de 4 mm e organza (15 x 15 cm) sendo colocada na posição vertical entre os grãos. Os frascos foram fechados com tampa metálica rosqueável e selados com *parafilm* (PM996, American, EUA).

Após os tratamentos do feijão-caupi por contato e por fumigação, os grãos foram mantidos pelo período de exposição de 24 h para o teste de contato e 96 h para o teste de fumigação. O tempo de exposição foi determinado pelos bioensaios de toxicidade para *C. maculatus*. Após o período de exposição, os grãos foram transferidos para sacos de náilon (12 x 16 cm) e armazenados sob condições constantes de temperatura (25 ± 2 °C) e umidade relativa (70 ± 5 %). A análise do resíduo do safrol foi realizada pelo método otimizado e validado de MEFS/HS-CG/DIC nos períodos de armazenamento de 5, 10, 26, 60 e 90 dias. A persistência de safrol foi calculada pela curva analítica do método. Diferentes modelos matemáticos foram testados para explicar a degradação do resíduo de safrol. A escolha do modelo foi realizada com base no coeficiente de determinação (R^2), na estimativa da raiz quadrada do erro médio (RQEM) (mais próxima de zero) e a significância ($P < 0,05$).

Análises estatísticas

As repostas cromatográficas das soluções de safrol diluído em metanol em diferentes concentrações foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão. As repostas cromatográficas de cada fibra de MEFS exposta ao safrol foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). A extração do safrol em grãos de feijão-caupi foi submetida à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão por superfície resposta em função do tempo e temperatura de extração. A curva analítica para extração de safrol e as curvas de persistência do resíduo de safrol no feijão-caupi foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão. Os gráficos foram plotados com auxílio do *software* Sigmaplot 12.5 (SPSS, Inc., Chicago, IL, EUA).

Resultados e Discussão

Composição do óleo essencial

A composição química e a quantificação relativa dos compostos do óleo essencial das folhas de *P. hispidinervum* foram realizadas através de CG-EM. Os constituintes principais

foram identificados através do seu índice de retenção (IR) em relação a uma série homóloga de n-alcanos e confirmados através da comparação do espectro de massas dos compostos com a espectroteca NIST 14. A análise cromatográfica mostrou a presença de seis constituintes do OEPH (Tabela 1). O safrol é o composto majoritário, representando 93,0% dos compostos identificados, seguido por biciclogermacreno, pentadecano, spathulenol, p-cymen-8-ol e (E)-cariofileno com 2,05; 1,60; 1,46; 1,20 e 0,69%, respectivamente. A concentração absoluta do safrol no OEPH foi determinada através do CG-FID conforme o tempo de retenção do safrol, onde se constatou que o safrol representa 0,85 mg L⁻¹ da composição do óleo essencial. Conforme outros estudos, o safrol é o composto majoritário do OEPH (Sauter et al., 2012; Andrés et al., 2017; Araújo et al., 2017; Oliveira et al., 2017). Além disso, os demais constituintes identificados também foram relatados por outros autores, como o pentadecano (Sauter et al., 2012), biciclogermacreno e (E)-cariofileno (Sauter et al., 2012; Andrés et al., 2017; Araújo et al., 2017; Oliveira et al., 2017), spathulenol (Andrés et al., 2017; Araújo et al., 2017; Oliveira et al., 2017) e o P-cymen-8-ol (Araújo et al., 2017; Oliveira et al., 2017).

Tabela 1. Composição química e concentrações relativas dos compostos identificados no óleo essencial de *Piper hispidinervum* utilizando análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-EM)

Constituinte	IR ¹ Literatura	IR ¹ Calculado	% Relativa
p-Cymen-8-ol	1179	1184	1,20
Safrol	1285	1292	93,00
(E)-Cariofileno	1417	1415	0,69
Biciclogermacreno	1500	1493	2,05
Pentadecano	1500	1498	1,60
Spatulenol	1577	1573	1,46

IR¹ = Índice de Retenção

Quantificação de safrol

A curva analítica da resposta cromatográfica em função das concentrações da solução de safrol foi significativa para o modelo linear ($y = ax + b$) ($P < 0,0001$) (Figura 1). O tempo de retenção do safrol foi de 9 min na análise por CG/DIC. Constatou-se que a solução do OEPH em metanol de 1,00 mg L⁻¹ contém 0,85 mg L⁻¹ de safrol, ou seja, o safrol representa 85% de toda a constituição do OEPH. Conforme a literatura, não há informações sobre a determinação da concentração de safrol por CG/DIC. Porém, outras análises realizadas por

cromatografia gasosa e acoplada a um espectrômetro de massa (CG/EM) mostram que o safrol é o composto majoritário do óleo essencial de *P. hispidinervum*, com concentração relativa de 77,7 a 94,7% da sua constituição (Coitinho et al., 2011; Sauter et al., 2012; Araújo et al., 2017; Oliveira et al., 2017).

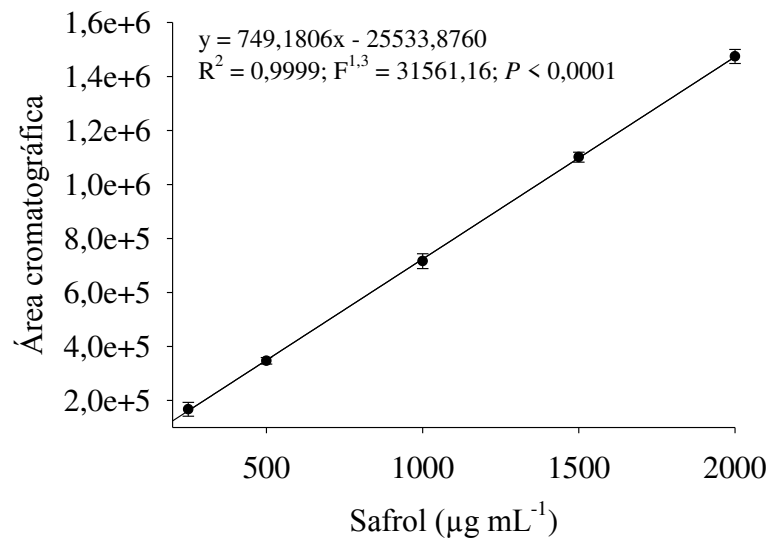


Figura 1. Curva analítica da resposta cromatográfica em função da concentração de safrol em $\mu\text{g mL}^{-1}$ de metanol.

Otimização do método de extração de safrol

Escolha da fibra

A escolha da fibra para extração do safrol pelo método de MEFS/HS-CG/DIC foi baseada na área da resposta cromatográfica de cada fibra exposta ao safrol na temperatura de 30 °C e tempo de extração de 3 min. As fibras avaliadas apresentaram comportamentos distintos para extração de safrol e diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). A fibra de DVB/CAR/PDMS *stableflex* de 50/30 μm diferiu das fibras de PDMS de sílica fundida de 100 μm e PDMS de sílica fundida de 7 μm . A fibra de PA de sílica fundida de 85 μm diferiu apenas da PDMS de sílica fundida de 7 μm (Figura 2). A fibra escolhida foi a recoberta com (DVB/CAR/PDMS) *stableflex* de 50/30 μm que apresentou resposta com maior área cromatográfica, indicando melhor extração do safrol. A polaridade, a massa molecular e o tamanho dos analitos são critérios que devem ser considerados para determinação da fibra adequada para a MEFS-HS (Kreutz et al., 2018).

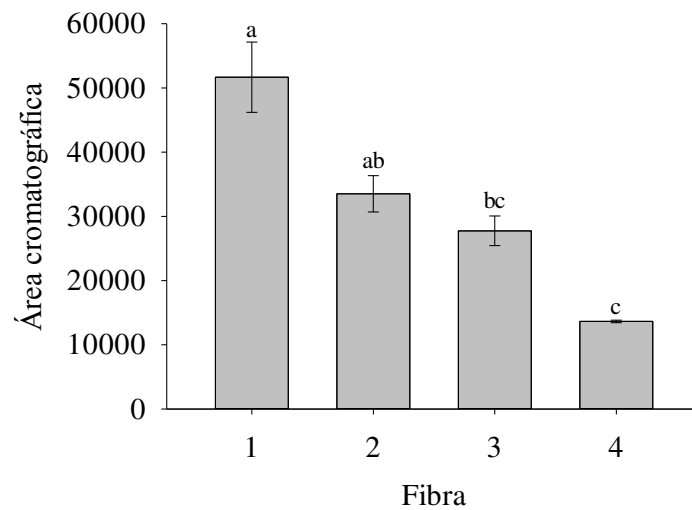


Figura 2. Extração de safrol em feijão-caupi pelo método de microextração fase sólida em *headspace* acoplado ao cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama com as fibras divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) *stableflex* de 50/30 μm (1), poliacrilato (PA) de 85 μm (2), PDMS de 100 μm (3) e PDMS de 7 μm (4).

Xiao et al. (2017) avaliaram o desempenho de quatro fibras com diferentes revestimentos (DVB/CAR/PDMS *stableflex* 50/30 μm , PDMS/DVB 65 μm , CAR/PDMS 75 μm e PDMS 100 μm) para extração de compostos voláteis em vinhos de cereja. De acordo com os seus resultados, a fibra de DVB/CAR/PDMS *stableflex* 50/30 μm apresentou o melhor desempenho para extração dos seguintes compostos: 3-metil-butanol, hexanoato de etila, acetato de hexila, lactato de etila e guaiacol 4-etílico. A fibra de DVB/CAR/PDMS *stableflex* 50/30 μm também apresentou a melhor resposta para extração de compostos aromáticos do cacau pelo método da MEFS/HS-CG/DIC quando comparadas as fibras revestidas por PDMS, PDMS/DVB e CAR/PDMS (Ducki et al., 2008), o que corrobora com o presente estudo.

As fibras revestidas pelo PDMS, 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 OEs. No caso das fibras mistas, que apresentam revestimentos contendo DVB ou CAR, ocorre 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 sabor e odor (voláteis e semi-voláteis) em alimentos (Ducki et al., 2008).

Condição ótima de temperatura e tempo de extração

A melhor condição de extração foi na temperatura de 60 °C e no tempo de 10 min. Nesta condição de extração, obteve-se a maior área cromatográfica pela análise no CG-DIC (Figura 3). A análise de regressão por superfície de resposta apresentou comportamento linear para os dois parâmetros ($z = 1172,88929xy - 1356,21786x - 22662,76429y + 38058,24286$) ($R^2 = 0,99579$; $P < 0,05$), onde x é a temperatura e y é o tempo de exposição. A técnica de MEFS envolve um processo de equilíbrio multifásico. De modo geral, o tempo e a temperatura de extração estão entre os fatores mais importantes que afetam a técnica de MEFS 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 os coeficientes de difusão dos analitos (Liu et al., 2006). O analito é liberado da matriz com maior eficiência quando é exposto a temperaturas mais altas. Isso ocorre devido à cinética das reações, onde a energia cinética molecular do analito é diretamente proporcional ao aumento da temperatura (Gharari et al., 2016).

Jeong et al. (2018) utilizaram o método de MEFS/HS-CG/DIC com a fibra de PDMS de 100 µm para extrair monoterpenos voláteis do extrato de *Mentha piperita* L. (Lamiaceae). A condição ótima para extração destes compostos foi na temperatura de 64 °C e no tempo de 28,5 min. A temperatura ótima determinada por Jeong et al. (2018) é próxima da temperatura encontrada no presente estudo, todavia o tempo de exposição foi maior. Provavelmente esse maior tempo deve-se ao tipo de revestimento da fibra (PDMS de 100 µm), que neste estudo apresentou um menor desempenho na extração de safrol. Resultados encontrados por Ducki et al. (2008) corroboram com esta investigação, em que a melhor condição de extração de compostos aromáticos do cacau ocorreu com a fibra de DVB/CAR/PDMS *stableflex* de 50/30 µm na temperatura de 60 °C e tempo de extração de 15 min.

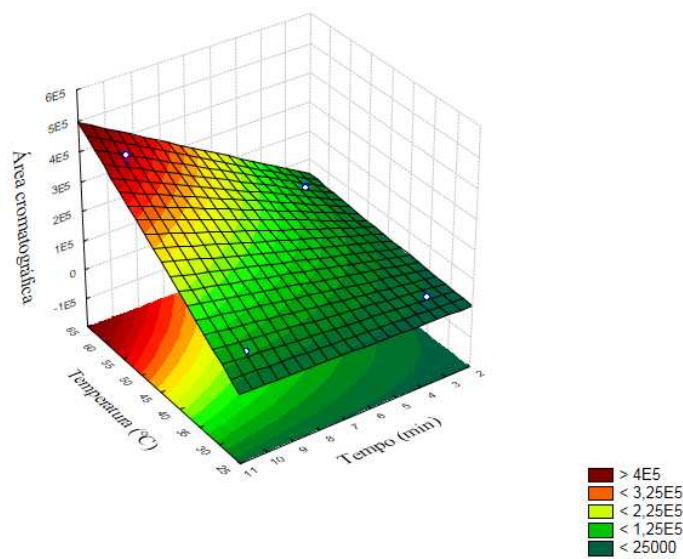


Figura 3. Otimização da extração de safrol em feijão-caupi pelo método de microextração fase sólida em *headspace* acoplado ao cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama, em função da temperatura e tempo de extração.

Validação do método de extração e análise

A curva analítica para extração de safrol em feijão-caupi foi significativa para o modelo linear ($y = ax + b$) ($P < 0,0001$). A faixa de linearidade do método foi de 0,0187 a 3,7366 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de feijão-caupi ($R^2 = 0,9990$) (Figura 4). A curva analítica é descrita pela relação entre a concentração teórica do analito na amostra e a área cromatográfica (Ermer e Miller 2005). Os valores encontrados para o LD e LQ foram muito inferiores à concentração máxima permitida para a utilização do safrol pela indústria de alimentos. O LD foi de 0,0094 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de feijão-caupi e o LQ foi de 0,0187 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de feijão-caupi. O LD é a menor concentração do analito detectável na amostra por qualquer método analítico, enquanto que o LQ é a menor concentração de analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão (Abad et al., 2010; EURL, 2017).

A precisão e exatidão foram avaliadas nos níveis de 0,0187, 0,0934 e 0,1868 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de feijão-caupi (Tabela 2). Para os três níveis de concentração avaliados, a recuperação média variou de 99,26 a 104,85%, estando dentro dos padrões aceitáveis para métodos cromatográficos (70 - 120%) (EURL, 2017). O método MEFS/HS-CG/DIC apresentou recuperações próximas a 100% e boa precisão, com coeficiente de variação igual ou inferior a 14,82%. Em análises de resíduos são aceitos coeficientes de variação de até 20% (EURL, 2017).

Tabela 2. Exatidão e precisão do método de microextração fase sólida em *headspace* acoplado ao cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama para extração de safrol em feijão-caupi

Concentração teórica ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentração nominal \pm ¹ EP ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Exatidão (n = 6) Recuperação (%)	Precisão ² CV (%)
0,0187	0,0185 \pm 0,0010	99,26	12,76
0,0934	0,0939 \pm 0,0057	100,48	14,82
0,1868	0,1959 \pm 0,0117	104,85	14,61

¹EP = Erro Padrão; ²CV = Coeficiente de Variação.

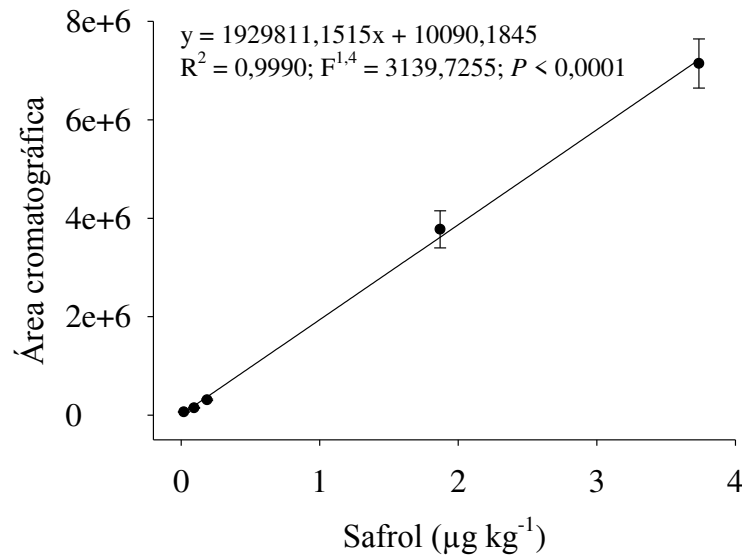


Figura 4. Curva analítica do método de microextração fase sólida em *headspace* acoplado ao cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama de safrol em feijão-caupi.

Estudos acerca da quantificação de safrol em alimentos são escassos na literatura. Siano et al. (2003) utilizaram a técnica de destilação-extração simultânea (DES) com o aparelho de Likens e Nickerson para determinar safrol em produtos alimentícios (manjeriço, salsichas, molhos e bebidas). Porém, estes autores determinaram o limite de detecção apenas do equipamento ($0,005 \mu\text{g mL}^{-1}$) e não determinaram o limite de detecção do safrol utilizando o método de extração e análise proposto para as diferentes matrizes.

O método de MSFS/HS-CG/DIC 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; Moreira et al., 2019).

Persistência do resíduo de safrol

Para explicar a degradação do resíduo de safrol nos grãos de feijão-caupi tratados com o OEPH por contato e por fumigação foram ajustados diferentes modelos matemáticos (Tabela 3). Nos grãos tratados por contato, o melhor modelo ajustado foi o exponencial ($y = ae^{-bx} + c$) (Figura 5a), com os valores de R^2 de 0,9571; RQEM de 0,0771 e P de 0,0429. Para os grãos tratados por fumigação o modelo ajustado foi o logarítmico ($y = y_0 - a \ln(x - x_0)$) (Figura 5b), com o R^2 de 0,9660; RQEM de 0,1338 e P de 0,0340. O resíduo de safrol foi avaliado durante o armazenamento do feijão-caupi. As concentrações detectadas para os grãos tratados por contato foram de 1,0945 $\mu\text{g kg}^{-1}$ no quinto dia e 0,0513 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para 90 dias. Para os grãos tratados por fumigação o resíduo de safrol foi de 2,1606 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o quinto dia e 0,1239 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para 90 dias. Observou-se 99% de redução na concentração de safrol presente nos grãos após 5 dias de armazenamento. As concentrações de safrol utilizadas no tratamento do feijão-caupi são menores que os limites de concentração permitidos pela ANVISA (Resolução (RDC) nº 2 de 15 de janeiro de 2007) e União Europeia (Resolução (EC) nº 1334 de 16 de dezembro de 2008) para bebidas e alimentos, além disso, é capaz de controlar pragas como o *C. maculatus* em feijão-caupi armazenado.

Tabela 3. Modelos matemáticos ajustados para os resíduos de safrol em feijão-caupi tratado com óleo essencial de *Piper hispidinervum* por contato (a) e por fumigação (b) durante o armazenamento

Tratamento	Modelo	Equação	R^2	RQEM	P
Contato	Linear	$y = -0,0079x + 0,6689$	0,4635	0,2727	0,2058
	Quadrático	$y = 0,0002x^2 - 0,0250x + 0,8649$	0,5788	0,2504	0,4212
	Exponencial	$y = 10,5423e^{-0,4861x} + 0,1669$	0,9571	0,0771	0,0429
	Potencial	$y = 18,0598(1 + x)^{-1,5842}$	0,8810	0,1284	0,0181
	Logarítmico	$y = -0,0653\ln(x - 5,0000) + 0,4012$	0,9790	0,4925	0,0210
Fumigação	Linear	$y = -0,0180x + 1,5231$	0,6440	0,4330	0,1022
	Quadrático	$y = 0,0004x^2 - 0,0522x + 1,9133$	0,7642	0,3778	0,2358
	Exponencial	$y = 6,5277e^{-0,2606x} + 0,3811$	0,8942	0,2360	0,1058
	Potencial	$y = 11,1563(1 + x)^{-0,9445}$	0,9151	0,2114	0,0108
	Logarítmico	$y = -0,2711\ln(x - 4,9413) + 1,3914$	0,9660	0,1338	0,0340

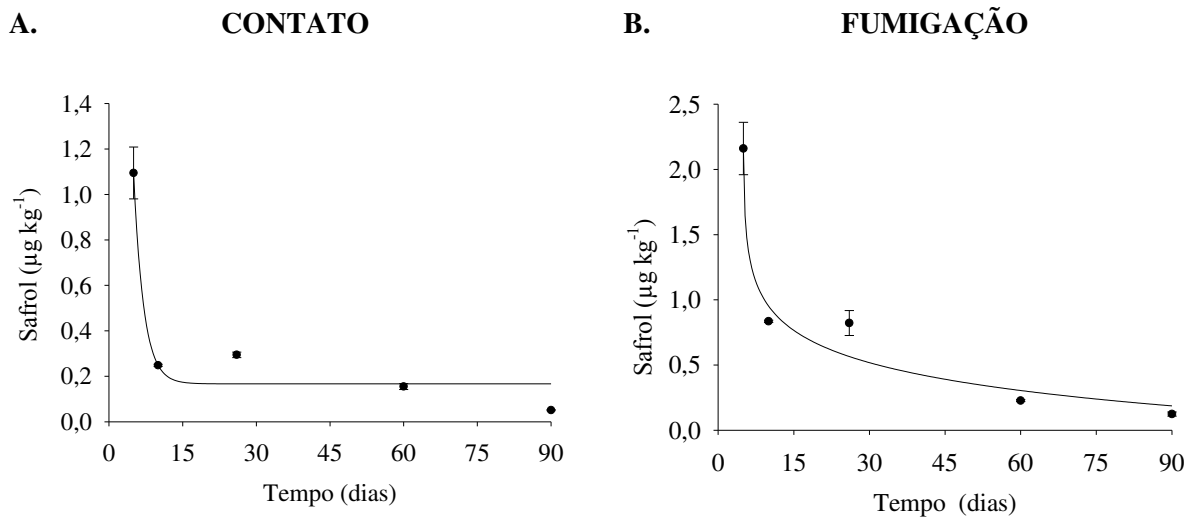


Figura 5. Persistência do resíduo de safrol em feijão-caupi tratado com óleo essencial de *Piper hispidinervum* por contato (a) e por fumigação (b) durante o armazenamento.

O efeito residual do OEPH em grãos de feijão-caupi e milho armazenados por até 120 dias, para *C. maculatus* e *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) foi avaliado por Pereira et al. (2009) e Coitinho et al. (2010). A toxicidade do OEPH foi maior logo após a contaminação dos grãos, com valores de 100 a 93,8% de mortalidade. Após 30 dias de armazenamento, observou-se baixo efeito residual, com mortalidade inferior a 17,5%. Neste estudo a degradação de 99% do OEPH ocorreu após 5 dias de armazenamento, o que pode explicar a baixa toxicidade encontrada por Pereira et al. (2009) e Coitinho et al. (2010), após 30 dias de armazenamento.

Estudos demonstram que inseticidas botânicos apresentam baixa persistência em produtos armazenados (Pereira et al., 2009; Coitinho et al., 2010; Lu et al., 2013). A alicina, composto majoritário do OE de *Allium sativum* L (Amaryllidaceae), foi monitorada durante e após a fumigação do trigo; sendo que após a fumigação os grãos foram aerados (Lu et al., 2013). Esses autores constataram que a concentração de alicina reduziu à medida que o tempo de fumigação e aeração aumentou. O decaimento da concentração apresentou comportamento exponencial. A concentração de alicina utilizada para a fumigação dos grãos de trigo foi de $615 \mu\text{L L}^{-1}$ de ar. Após um dia da fumigação, a concentração reduziu em 98,99% e com 16 dias de aeração, a redução da concentração de alicina atingiu 99,99%. A degradação dos óleos essenciais é explicada pela instabilidade química dos seus constituintes. É comum ocorrer reações de oxidação, isomerização, ciclização ou desidrogenação as quais 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 e Stintzing, 2013).

Conclusão

O método de microextração fase sólida em *headspace* acoplado com o cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama para extrair o safrol do feijão-caupi tratado com OEPH foi otimizado. A condição ótima para extração do safrol foi a temperatura de 60 °C e tempo de 10 min utilizando a fibra DVB/CAR/PDMS *stableflex* de 50/30 µm. O método otimizado apresentou uma boa linearidade nas faixas testadas, com repetibilidade, bons limites de detecção e quantificação. As concentrações de safrol avaliadas durante o armazenamento do feijão-caupi tratado com o OEPH por contato variaram de 1,0945 a 0,0513 µg kg⁻¹ e por fumigação de 2,1606 a 0,1239 µg kg⁻¹. As concentrações detectadas a partir do quinto dia representam menos de 1% da concentração inicial, o que mostra que o safrol apresenta baixa persistência nos grãos de feijão-caupi.

Referências

- Abad FC, Winck PR, Silva JM, Caramão EB, Zini CA (2010) Multiresidue determination of pesticides in carrots using pressurized liquid extraction and gas chromatography with mass spectrometry detector. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 21: 461-468. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532010000300010>
- Aktar MW, Sengupta D, Chowdhury A (2009) Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology* 2(1): 1-12. doi: <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Alexandratos N, Bruinsma J (2012) World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. ESA Working paper, n° 12- 03. FAO, Rome.
- Andrés MF, Rossa GE, Cassel E, Vargas RMF, Santana O, Díaz CE, Gonzalez-Coloma A (2017) Biocidal effects of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil and synergism among its main components. *Food and Chemical Toxicology* 109: 1086-1092. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.017>
- ANVISA. Resolução RDC n° 2, de 15 de janeiro de 2007. Ministério da Saúde - MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_02_2007_COMP.pdf/c966caff-1c19-4a2f-87a6-05f7a09e940b. Acesso em: 02 de julho de 2018.

- Araújo AMN, Faroni LRA, Oliveira JV, Barbosa DRS, Breda MO, França SM (2017) Lethal and sublethal responses of *Sitophilus zeamais* populations to essential oils. *Journal of Pest Science* 90: 589-600. doi: <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0822-z>
- Baher ZF, Mirza M, Ghorbanli M, Rezaii MB (2002) The influence of water stress on plant height, herbal and essential oil yield and composition in *Satureja hortensis* L. *Flavour and Fragrance Journal* 17: 275-277. doi: <https://doi.org/10.1002/ffj.1097>
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46: 446-475. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Behzadi M, Noroozian E, Mirzaei M (2013) A novel coating based on carbon nanotubes/poly-ortho-phenylenediamine composite for headspace solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Talanta* 108: 66-73. doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.02.040>
- Benelli G, Pavela R, Giordani C, Casettari L, Curzi G, Cappellacci L, Petrelli R, Maggi F (2018) Acute and sub-lethal toxicity of eight essential oils of commercial interest against the larvae of the mosquito *Culex quinquefasciatus* and the housefly *Musca domestica*. *Industrial Crops & Products* 112: 668-680. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.062>
- Clemes SM, Santos TG, Rebelo RA, Laps RR, Pescador R (2015) Seasonality and hydrodistillation time effects on the yield and chemical composition of leaves essential oil of *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel. *Eclética Química* 40: 117-125. doi: <http://dx.doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v40.1.2015.p117-125>
- Coitinho RLBC, Oliveira JV, Gondim Junior MGC, Câmara CAG (2010) Persistência de óleos essenciais em milho armazenado, submetido à infestação de gorgulho do milho. *Ciência Rural* 40(7): 1492-1496. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010005000109>
- Coitinho RLBC, Oliveira JV, Gondim Junior MGC, Câmara CAG (2011) Toxicidade por fumigação, contato e ingestão de óleos essenciais para *Sitophiluszeamais* Motschulsky, 1885 (Coleoptera: Curculionidae). *Ciência Agrotecnica* 35(1): 172-178. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000100022>
- Conde-Hernández LA, Guerrero-Beltrán JA (2014) Total phenolics and antioxidant activity of *Piper auritum* and *Porophyllum ruderale*. *Food Chemistry* 142: 455-460. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.078>

- Correa YDCG, Faroni LRA, Haddi K, Oliveira EE, Pereira EJG (2015) Locomotory and physiological responses induced by clove and cinnamon essential oils in the maize weevil *Sitophilus zeamais*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 125: 31-37. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.06.005>
- Diao WR, Hu QP, Zhang H, Xu JG (2014) Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control* 35: 109-116. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.056>
- Ducki S, Miralles-Garcia J, Zumbé A, Tornero A, Storey DM (2008) Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry for the headspace analysis of volatile compounds in cocoa products. *Talanta* 74: 1166-1174. doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.08.034>
- EURL (2017) 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. nº. SANTE/11813/2017, p. 42.
- Ermer J, Miller JHM (2005) Method validation in pharmaceutical analysis: a guide to best practice. Copyright, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, p. 403. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/3527604685>
- Gbaye OA, Oyeniya EA, Ojo OB (2016) Resistance of *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae) populations in Nigeria to dichlorvos. *Jordan Journal of Biological Sciences* 9: 41-46. doi: <https://doi.org/10.12816/0027007>
- Gharari H, Farjaminezhad M, Marefat A, Fakhari AR (2016) 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* 39(9): 1709-1716. doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.201501385>
- Gilling DH, Kitajima M, Torrey JR, Bright KR (2014) Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. *Journal of Applied Microbiology* 116: 1149-1163. doi: <https://doi.org/10.1111/jam.12453>
- Gottlieb OR, Koketsu M, Magalhães MT, Maia JGS, Mendes PH, Rocha AI, Silva ML, Wilberg VC (1981) Óleos essenciais da Amazônia VII. *Acta Amazônica* 11(1): 143-148. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1809-43921981111143>
- Holloway JC, Falk MG, Emergy RN, Collins PJ, Nayak MK (2016) Resistance to phosphine in *Sitophilus oryzae* in Australia: a national analysis of trends and frequencies over time

- and geographical spread. *Journal of Stored Products Research* 69: 129-137. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2016.07.004>
- Hung T, Chou C, Sun T, Liang W, Cheng J, Fang Y, Li Y, Shieh P, Ho C, Kuo C, Lin J, Kuo D, Jan C (2015) The Mechanism of safrole-induced $[Ca^{2+}]_i$ rises and non- Ca^{2+} -triggered cell death in SCM1 human gastric cancer cells. *Chinese Journal of Physiology* 58(5): 302-311. doi: <https://doi.org/10.4077/CJP.2015.BAD315>
- IARC (2015) List of classifications. International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>>. Acesso em: 10 de agosto de 2018.
- Jenner PM, Hagan EC, Taylor JM, Cook EL, Fitzhugh OG (1964) Food flavourings and compounds of related structure. I. Acute oral toxicity. *Food and Cosmetics Toxicology* 2: 327-343. doi: [https://doi.org/10.1016/S0015-6264\(64\)80192-9](https://doi.org/10.1016/S0015-6264(64)80192-9)
- Jeong JM, Jin Y, Yoo DE, Han SY, Kim EM, Lee J (2018) One-step sample preparation for convenient examination of volatile monoterpenes and phenolic compounds in peppermint leaves using deep eutectic solvents. *Food Chemistry* 251: 69-76. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.079>
- Kedia A, Prakash B, Mishra PK, Dubey NK (2014) Antifungal and antiaflatoxicogenic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. *International Journal of Food Microbiology* 168-169: 1-7. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.008>
- Kreutz T, Lucca LG, Loureiro-Paes OAR, Teixeira HF, Veiga Jr. VF, Limberger RP, Ortega GG, Koester LS (2018) 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* 1564: 163-175. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.05.073>
- Liu X, Zhang Q, Li S, Mi P, Chen D, Zhao X, Feng X (2018) Developmental toxicity and neurotoxicity of synthetic organic insecticides in zebrafish (*Danio rerio*): A comparative study of deltamethrin, acephate, and thiamethoxam. *Chemosphere* 199: 16-25. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.176>
- Liu W, Hu Y, Zhao J, Xu Y, Guan Y (2006) Physically incorporated extraction phase of solid-phase microextraction by sol-gel technology. *Journal of Chromatography A* 1102: 37-43. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.10.026>

- Lu Y, Zhong J, Wang Z, Liu F, Wan Z (2013) Fumigation toxicity of allicin against three stored product pests. *Journal of Stored Products Research* 55: 48-54. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jspr.2013.08.002>
- Maia JGS, Silva ML, Luz AIR, Zoghbi MGB, Ramos LS (1987) Espécies de *Piper* da Amazônia rica em safrol. *Química Nova* 10(3): 200-204.
- Moreira N, Araújo AM, Rogerson F, Vasconcelos I, Freitas V, Pinho PG (2019) Development and optimization of a HS-SPME-GC-MS methodology to quantify volatile carbonyl compounds in Port wines. *Food Chemistry* 270: 518-526. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.093>
- Mossi AJ, Zanella CA, Kubiak G, Lerin LA, Cansian RL, Frandoloso FS, Prá VD, Mazutti MA, Costa JAV, Treichel H (2013) Essential oil of *Ocotea odorifera*: an alternative against *Sitophilus zeamais*. *Renewable Agriculture and Food Systems* 29(2): 161-166. doi: 10.1017/S1742170513000045
- Oliveira CM, Auad AM, Mendes SM, Frizzas MR (2014) Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. *Crop Protection* 56: 50-54. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2013.10.022>
- Oliveira JV, França SM, Barbosa DRS, Dutra KA, Araújo AMN, Navarro DMAF (2017) Fumigation and repellency of essential oils against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in cowpea. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 52(1): 10-17. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2017000100002>
- Opit GP, Thoms E, Phillips TW, Payton ME (2016) Effectiveness of sulfuryl fluoride fumigation for the control of phosphine-resistant grain insects infesting stored wheat. *Journal of Economic Entomology* 109(2): 930-941. doi: <https://doi.org/10.1093/jee/tov395>
- Pandey R, Mahar R, Hasanain M, Shukla SK, Sarkar J, Rameshkumar KB, Brijesh Kumar B (2016) Rapid screening and quantitative determination of bioactive compounds from fruit extracts of *Myristica* species and their in vitro antiproliferative activity. *Food Chemistry* 211: 483-493. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.065>
- Pavela R, Benell G (2016) Essential oils as ecofriendly biopesticides? challenges and constraints. *Tendências em Ciência Vegetal* 21(12): 1000-1007. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.005>
- Pereira ACRL, Oliveira JV, Gondim Junior MGC, Câmara CAG (2009) Influência do período de armazenamento do caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], tratado com óleos essenciais e fixos, no controle de *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera,

- Chrysomelidae, Bruchinae). *Ciência Agrotecnologia* 33(1): 319-325. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542009000100044>
- Pimentel MAG, Faroni LRA, Guedes RNC, Gonçalves JR, Oliveira CRF (2005) Eficácia biológica de bifentrina aplicado em milho armazenado sob diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 9(2): 263-267. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662005000200018>
- Ramos CS, Barbosa QPS, Vanin SA (2014) Metabolism of safrole by *Heracles thoas brasiliensis* (Papilionidae). *Journal of the Lepidopterists' Society* 68(4): 283-285. doi: <https://doi.org/10.18473/lepi.v68i4.a6>
- Regulation (EC) n° 1334, 16 de dezembro de 2008. Of the European Parliament and Of The Council. Official Journal of the European Union. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32008R1334>>. Acesso em: 02 de julho de 2018.
- Rivera PN, Mosquera T, Baldisserotto A, Abad J, Aillon C, Cabezas D, Piedra J, Coronel I, Manfredini S (2015) Chemical composition and in-vitro biological activities of the essential oil from leaves of *Peperomia inaequalifolia* Ruiz & Pav. *American Journal of Essential Oils and Natural Products* 2(4): 29-31.
- Rocha RFJ, Araújo IMS, Freitas SM, Garruti DS (2017) Optimization of headspace solid phase micro-extraction of volatile compounds from papaya fruit assisted by GC-olfactometry. *Journal of Food Science and Technology* 54(12): 4042-4050. doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2871-6>
- Sauter IP, Rossa GE, Lucas AM, Cibulski SP, Roehec PM, Silva LAA, Rott MB, Vargas MF, Cassel E, Poser GL (2012) Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. *Industrial Crops and Products* 40: 292-295. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.03.025>
- Sefidkon F, Abbasi K, Khaniki GB (2006) Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*. *Food Chemistry* 99: 19-23. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.026>
- Siano F, Ghizzoni C, Gionfriddo F, Colombo E, Servillo L, Castaldo D (2003) Determination of estragole, safrole and eugenol methyl ether in food products. *Food Chemistry* 81: 469-475. doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00004-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00004-9)
- Smith GH, Roberts JM, Pope TW (2018) Terpene based biopesticides as potential alternatives to synthetic insecticides for control of aphid pests on protected ornamentals. *Crop Protection* 110: 125-130. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.04.011>

- Sohilait HJ, Kainama H (2016) Synthesis of 1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1-butene-3- one from safrole. *European Journal of Pure and Applied Chemistry* 3(1): 66-70. doi: <http://dx.doi.org/10.11648/j.sjc.20150303.15>
- Song X, Yin Z, Ye K, Wei Q, Jia R, Zhou L, Du Y, Xu J, Liang X, He C, Shu G, Yin L, Lv C (2014) Anti-hepatoma effect of safrole from *Cinnamomum longepaniculatum* leaf essential oil in vitro. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 7(5): 2265-2272.
- Sparks TC (2013) Insecticide discovery: An evaluation and analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107: 8-17. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.05.012>
- Starnes K, Goh KS (2012) Detections of the Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid in Surface Waters of Three Agricultural Regions of California, USA, 2010–2011. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 88: 316-321. doi: <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0515-5>
- Tak J, Isman MB (2017) Acaricidal and repellent activity of plant essential oil-derived terpenes and the effect of binary mixtures against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Industrial Crops & Products* 108: 786-792. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.003>
- Tay WT, Beckett SJ, Barro PJ (2016) Phosphine resistance in Australian *Cryptolestes* species (Coleoptera: Laemophloeidae): perspectives from mitochondrial DNA cytochrome oxidase I analysis. *Pest Management Science* 72: 1250-1259. doi: <https://doi.org/10.1002/ps.3805>
- Turek C, Stintzing FC (2013) Stability of essential oils: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12: 40-53. doi: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>
- Xiao Z, Wu Q, Niu Y, Liu Q, Chen F, Ma N, Zhou X, Zhu J (2017) Optimization of headspace solid-phase micro-extraction and its application in analysis of volatile compounds in cherry tomato by gas chromatography. *Food Analytical Methods* 10:596-609. doi: <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0622-3>
- Yang A, Zhang L, Zhi D, Liu W, Gao X, He X (2017) Identification and analysis of the reactive metabolites related to the hepatotoxicity of safrole. *Xenobiotica*. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/00498254.2017.1399227>

CONCLUSÕES GERAIS

O óleo essencial de *P. hispidinervum*, rico em safrol ($0,85 \text{ mg L}^{-1}$), apresenta potencial inseticida para *C. maculatus* em grãos de feijão-caupi. Neste trabalho constatou-se a toxicidade fumigante e por contato do óleo essencial para adultos de *C. maculatus*.

O óleo essencial reduziu a taxa de oviposição e o desenvolvimento da progênie de *C. maculatus* e preservou a qualidade do feijão-caupi, tratado por fumigação e por contato, após 50 dias de armazenamento.

O método de microextração fase sólida em *headspace* para extrair o safrol do feijão-caupi tratado com OEPH foi otimizado. A condição ótima para extração do safrol foi na temperatura de $60 \text{ }^\circ\text{C}$ e tempo de 10 min utilizando a fibra DVB/CAR/PDMS *stableflex* de $50/30 \text{ }\mu\text{m}$. O método otimizado apresentou uma boa linearidade nas faixas testadas, com repetibilidade, bons limites de detecção e quantificação.

O óleo essencial de *P. hispidinervum* possui baixa persistência no feijão-caupi tratado por fumigação e contato. O resíduo de safrol detectado a partir do quinto dia de armazenamento foi inferior a 1% da concentração inicial, o que mostra que o safrol apresenta baixa persistência nos grãos de feijão-caupi.

Diante dos resultados deste trabalho, é possível concluir que o óleo essencial de *P. hispidinervum* apresenta potencial inseticida para *C. maculatus* e é capaz de preservar a qualidade de feijão-caupi armazenado, pois este inibe o desenvolvimento do inseto-praga e assim reduz a perda de qualidade dos grãos armazenados. Além disso, o safrol apresenta baixa persistência nos grãos de feijão-caupi, o que sugere que o óleo essencial de *P. hispidinervum* é uma alternativa segura para o tratamento de produtos alimentícios, como o feijão-caupi.