**Universidade de São Paulo**
**Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**

# Potencial bioativo e investigações químicas de Solanaceae em relação a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

**Andreísa Fabri Lima**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba**
**2017**

**Andreísa Fabri Lima**
**Bacharela em Agronomia**

# Potencial bioativo e investigações químicas de Solanaceae em relação a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ DJAIR VENDRAMIM**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba**
**2017**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**
**DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Lima, Andreísa Fabri

Potencial bioativo e investigações químicas de Solanaceae em relação a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)/ Andreísa Fabri Lima. - - Piracicaba, 2017.

72p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Biopesticida 2. Extratos 3. Fagodeterrência 4. Lagarta-do-cartucho 5. Vitanolidos . I. Título

*À minha família, por acreditarem nos meus sonhos,*
*Dedico e Ofereço*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me deu forças, iluminação e proteção em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. José Djair Vendramim, pelos valiosos ensinamentos, paciência e por ser um exemplo de profissionalismo.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massas Aplicado à Química de Produtos Naturais pelas análises realizadas no espectrômetro de massas adquirido dentro da chamada de projetos Multiusuários da FAPESP (processo nº 09/54094-0), sob a coordenação do Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes. Agradeço ao Dr. Eduardo J. Crevelin, pela aquisição dos espectros.

Ao Dr. Leandro do Prado Ribeiro, por toda troca de experiência e por estar sempre disposto a ajudar.

A Prof. Drª Simone Possedente de Lira, por todo ensinamento e ajuda na realização das etapas "químicas".

Ao Gabriel Luiz Padoan Gonçalves, pelo companheirismo nas atividades do laboratório.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", por todos os ensinamentos e conhecimentos transmitidos, em especial ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, pelo fornecimento de insetos e outros materiais necessários.

À Dra. Marineia Lara Haddad e ao José Bruno Malaquias, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À técnica do laboratório de Biologia de Insetos, Neide Zério, por ser sempre tão prestativa e atenciosa.

Ao Danilo Soares Gissi, pelo auxílio na identificação e coleta das espécies.

A todos os meus amigos do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, em especial, a Patrícia Sanches, Fernanda Canassa, Fábio Duarte e Giovani Coura por terem trazido "leveza e doçura" aos momentos mais difíceis.

Aos novos laços de amizades com Flávio e Alessandro, que sem dúvida, são um grande presente pra mim.

À Sueme, pela amizade tão sincera e por ter me proporcionado a chance de conhecer pessoas maravilhosas.

Às minhas amigas de Lavras, por toda torcida, apoio e carinho.

Aos meus pais, Mirtes Fabri de O. Lima e Clóvis Oliveira Lima, e ao meu irmão, Alex Fabri Lima, por todo amor, apoio e por estarem comigo em todas as etapas.

Às minhas mães de coração, tia Mariinha e Dilma Abreu, pelo amor e apoio incondicional que sempre me ofereceram.

Às minhas queridas avós, Leonides e Carmem, por todas as orações, atenção e carinho.

A todos os familiares, tias (os) e primas (os), pela torcida.

Ao meu namorado Diogo, que apesar da distância, sempre esteve ao meu lado preenchendo minha vida de amor e calma.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!*
*Não é motivo para não querê-las...*
*Que triste os caminhos se não fora*
*A presença distante das estrelas!”*
*Mario Quintana*

# SUMÁRIO

**RESUMO** ..... 8
**ABSTRACT** ..... 9
**1. INTRODUÇÃO** ..... 11
1.1. Texto de Sistematização dos Principais Resultados e Discussão Geral ..... 12
**REFERÊNCIAS** ..... 13
**2. BIOATIVIDADE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE SOLANACEAE SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)** ..... 15
**RESUMO** ..... 15
**ABSTRACT** ..... 15
**2.1. Introdução** ..... 16
**2.2. Material e métodos** ..... 17
2.2.1. EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS: FONTE E PREPARO ..... 17
2.2.2. MANUTENÇÃO DA POPULAÇÃO DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* (J.E. SMITH) EM LABORATÓRIO ..... 20
2.2.3. BIOENSAIOS ..... 20
2.2.3.1. TRIAGEM PARA SELEÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS MAIS PROMISSORES ..... 20
2.2.3.2. PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DOS EXTRATOS MAIS PROMISSORES ..... 21
2.2.3.3. CURVAS DE CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA DAS FRAÇÕES SELECIONADAS E TEMPO LETAL MÉDIO ..... 21
2.2.3.4. REFRACIONAMENTO DAS FRAÇÕES ATIVAS ..... 22
2.2.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE UV ACOPLADO AO ESPECTRO DE MASSAS ..... 22
2.2.5. ANÁLISE DOS DADOS ..... 23
**2.3. Resultados e discussão** ..... 23
2.3.1. RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO ..... 23
2.3.2. TRIAGEM PARA A SELEÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS MAIS PROMISSORES ..... 26
2.3.3. PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DOS EXTRATOS SELECIONADOS E BIOATIVIDADE DAS FRAÇÕES OBTIDAS ..... 32
2.3.4. CURVAS DE CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA E TEMPO LETAL MÉDIO PARA AS FRAÇÕES SELECIONADAS ..... 35
2.3.5. REFRACIONAMENTO DAS FRAÇÕES MAIS ATIVAS ..... 38
2.3.6. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE UV ACOPLADO AO ESPECTRO DE MASSAS ..... 41
**Referências** ..... 50
**3. EFEITO DE DERIVADOS DE *Acnistus arborescens* E *Datura stramonium* (SOLANACEAE) NO DESENVOLVIMENTO E CONSUMO ALIMENTAR DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH)** ..... 55
**Resumo** ..... 55
**Abstract** ..... 55
**3.1. Introdução** ..... 56
**3.2. Material e métodos** ..... 58
3.2.1. MANUTENÇÃO DA POPULAÇÃO DE INSETOS EM LABORATÓRIO ..... 58
3.2.2. OBTENÇÃO E PREPARO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES ..... 58
3.2.3. BIOENSAIOS ..... 59
3.2.3.1. EFEITO DOS EXTRATOS BRUTOS SOBRE PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE *S. FRUGIPERDA* ..... 59
3. 2.3.2. EFEITO DAS FRAÇÕES DICLOROMETÂNICAS SOBRE PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE *S. FRUGIPERDA* ..... 59
3.2.3.3. EFEITO DAS FRAÇÕES DICLOROMETÂNICAS SOBRE O CONSUMO ALIMENTAR DE *S. FRUGIPERDA* ..... 60
3.2.4. ANÁLISE DOS DADOS ..... 60
**3.3. Resultados e discussão** ..... 61
3.3.1. EFEITO DOS EXTRATOS BRUTOS SOBRE PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE *S.FRUGIPERDA* ..... 61
3.3.2. EFEITO DAS FRAÇÕES DICLOROMETÂNICAS SOBRE PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE *S.FRUGIPERDA* ..... 64
3.3.3. EFEITO DAS FRAÇÕES DICLOROMETÂNICAS SOBRE O CONSUMO ALIMENTAR DE *S. FRUGIPERDA* ..... 67
**Referências** ..... 70

# RESUMO


## Potencial bioativo e investigações químicas de Solanaceae em relação a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

Visando explorar o potencial bioativo de plantas da família Solanaceae como fonte alternativa para o manejo de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta-do-cartucho-do-milho, realizou-se, primeiramente, uma triagem de extratos etanólicos preparados de diferentes partes de 25 espécies vegetais. Após sete dias de exposição das lagartas em dietas tratadas, constatou-se que os extratos etanólicos de folhas de *Acnistus arborscens* e de *Datura stramonium*, na concentração de 4.000 mg kg $^{-1}$, foram os mais promissores causando inibição do ganho de peso de 97,85 e 95,72%, respectivamente. A seguir, foi realizado um fracionamento biomonitorado, a partir do qual, a fração diclorometânica foi selecionada como a mais ativa para essas duas espécies, causando efeito subletal (inibição do ganho do peso) e letal (mortalidade), porém este inferior ao causado pela formulação comercial Azamax® 1,2 EC (controle positivo). Em sequencia, foi possível estimar as concentrações letais para as frações diclorometânicas durante o período de 168 horas. Em relação ao efeito sobre o desenvolvimento do inseto, os extratos etanólicos foram testados na concentração de 4.000 mg kg $^{-1}$ e as frações diclorometânicas na concentração letal mediana (4.088 e 3.694 mg kg $^{-1}$ para *D. stramonium* e *A. arborescens*, respectivamente). Na fase larval, os extratos etanólicos de *D. stramonium* e *A. arborescens* ocasionaram 77,50 e 62,50% de mortalidade, respectivamente, e, além disso, ambos os tratamentos causaram alongamento dessa fase, e mortalidade, deformidade e redução do peso pupal. A fração diclorometânica de *A. arborescens* proporcionou 100% de mortalidade das lagartas expostas, enquanto a mortalidade em *D. stramonium* foi 83,19% e, as lagartas necessitaram de 41,75 dias para atingir a fase pupa, que apresentou baixo peso (158,60 mg) e altas deformidades (40%) em comparação ao controle (255,90 mg e 8,26%, respectivamente). Além disso, as frações diclorometânicas ocasionaram atividade fagodeterrente nas $CL_{25}$, $CL_{50}$ e $CL_{90}$. Novamente, utilizando-se a fração diclorometânica, foi realizado novo fracionamento, e após sete dias de exposição das lagartas neonatas, todas as subfrações ocasionaram efeitos subletais. Com isso, tornaram-se necessárias novas investigações químicas a fim de se compreender o (s) composto (os) responsável (is) pela bioatividade, porém a complexidade de algumas subfrações não permitiu uma caracterização química. Ainda assim, foi constatada nas subfrações acetato de etila e metanólica de *D. stramonium* a presença de compostos pertencentes à classe dos vitanolidos. Dessa forma, os derivados de Solanaceae apresentam potencial bioativo passíveis de serem estudados mais profundamente visando ao emprego dos mesmos no manejo de *S. frugiperda*.


**Palavras-chave:** Biopesticida; Extratos; Fagodeterrência; Lagarta-do-cartucho; Vitanolidos

## ABSTRACT

**Bioactive potential and chemical investigations of Solanaceae in relation to *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**

Aiming to explore the bioactive potential of Solanaceae plants as alternative resources for the management of *Spodoptera frugiperda* (Lepitoptera: Noctuidae), the fall armyworm, it was performed, firstly, a screening of ethanolic extracts prepared from different parts of 25 plant species. After seven days of exposure of caterpillars to treated diets, it was verified that ethanolic extracts of *Acnistus arborscens* and *Datura stramonium* leaves in the concentration of 4,000 mg $kg^{-1}$ were the most promising, causing an inhibition of 97.85% and 95.72%, respectively, in weight gain. After this, a bioguided fractionation was performed, from which the dichloromethane fraction was selected as the most active in both species, causing sublethal (inhibition of weight gain) and lethal (mortality) effects, although both were less effective than the Azamax® 1,2 EC commercial formulation (positive control). Following the previous step, it was possible to estimate the lethal concentrations for dichloromethane fraction during the period of 168 hours. In relation to the effect on the insect development, the ethanolic extracts were tested in the concentration of 4,000 mg $kg^{-1}$ and the dichloromethane fractions in their median lethal concentrations (4,088 and 3,694 mg $kg^{-1}$ for *D. stramonium* and *A. arborescens*, respectively). In the larval phase, ethanolic extracts of *D. stramonium* and *A. arborescens* lead to 77.50% and 62.50% of mortality, respectively, and both treatments lead to the elongation of this phase, mortality, deformity and pupal weight reduction. The dichloromethane fraction of *A. arborescens* lead to 100% of mortality of the exposed caterpillars, while mortality of *D. stramonium* was 83.19%, and the caterpillars needed 41.75 days to reach the pupal stage, which presented low weight (158.60 mg) and were highly deformed (40%) in comparison with the negative control (255.90 mg and 8.26%, respectively). Furthermore, the dichloromethane lead to antifeedant activity in $CL_{25}$, $CL_{50}$ and $CL_{90}$. Once again, using the dichloromethane fraction, another fractionation was performed, and after seven days of exposure of neonates caterpillars, all subfractions lead to sublethal effects. Therefore, new chemical evaluations are necessary to understand the compounds responsible for bioactivity, however, the complexity of some subfractions did not permit chemical characterization. Nevertheless, it was verified in the ethyl acetate and methanolic subfractions of *D. stramonium* the presence of withanolides compounds. Therefore, derivatives of Solanaceae present bioactive potential that may be liable for further evaluation aiming their employment in the management of *S. frugiperda*.

**Keywords:** Biopesticide; Extracts; Antifeedant; Fall armyworm; Withanolides

# 1. INTRODUÇÃO

As regiões tropicais, destacando-se o Brasil, apresentam uma enorme variedade de compostos orgânicos produzidos pelo metabolismo secundário de espécies vegetais, sendo, denominados de metabólitos secundários. A sua principal função está relacionada à defesa vegetal, desempenhando, na maioria dos casos, inibição da alimentação em vários insetos-praga e herbívoros (Raven et al., 1996), além de atuarem na defesa contra estresses bióticos e abióticos (Taiz & Zeiger, 2009). Em adição, os derivados vegetais têm ganhado destaque para o controle de insetos, os quais são conhecidos como inseticidas botânicos e estão presentes em quase todas as classes de metabólitos secundários (Miresmailli & Isman, 2014).

A utilização dos inseticidas botânicos, de maneira geral, é uma estratégia mais segura que os inseticidas sintéticos convencionais para o homem, ambiente e inimigos naturais (Rattan et al., 2010). Entretanto, para a sua utilização em larga escala é necessário elucidar diversos fatores, principalmente os relacionados com a composição química, fator este, ainda relativamente pouco abordado em estudos (Isman & Grieneisen, 2014).

A família Solanaceae produz uma enorme diversidade de metabólitos secundários passíveis de serem estudados, inclusive para a proteção de culturas. Suas espécies são ricas em compostos biologicamente ativos, destacando-se o grupo dos alcaloides, os quais podem causar efeitos estimulantes e tóxicos para mamífero, mesmo em pequenas doses (Hassine et al., 2013; Indhumathi et al., 2014; Diaz, 2015), e os vitanolidos, formando o grupo mais abundante de compostos presentes nas solanáceas, cujos efeitos podem acarretar, como exemplo, inibição da alimentação em insetos (Asher et al., 1987) e atividades citotóxicas (Minguzzi et al., 2011).

Chowański et al. (2016) descrevem efeitos letais e subletais de derivados de solanáceas em diferentes ordens de insetos-praga, ambos com vantagens, uma vez que a letalidade aguda proporciona uma rápida proteção as culturas, e os efeitos subletais, tendem a causar um desequilíbrio no ciclo do inseto, como deformidades, diminuição da oviposição e alongamento de estágios.

A lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma praga com ampla distribuição no Brasil devido ao seu hábito polífago, podendo ocorrer no algodão, amendoim, arroz, trigo, soja, hortaliças, e cana-de-açúcar (Gallo et al., 2002), embora seja marcante a preferência do inseto por plantas de milho (Lara, 1979), na qual, o ataque pode reduzir a produtividade entre 34 e 52%, fazendo-se necessárias, em

algumas regiões do país, até 15 aplicações de inseticidas químicos durante o ciclo da cultura (Valicente, 2015). Porém, a utilização excessiva de inseticidas sintéticos como uma única tática de controle pode ocasionar a seleção de populações resistentes de insetos a inseticidas, ressurgência de pragas e implicações negativas ao homem e meio ambiente (Moreira et al., 2006), além de aumentar o custo agregado de cultivo. Assim, o emprego de inseticidas botânicos torna-se uma alternativa viável, uma vez que quando utilizados em rotação com os inseticidas sintéticos ou em misturas, há redução do uso de inseticidas sintéticos e do custo de proteção da cultura (Isman, 2015).

Considerando o potencial bioativo das solanáceas, bem como a necessidade de novas táticas de controle para *S. frugiperda*, este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas e no Laboratório de Química Orgânica e Produtos Naturais, ambos da ESALQ/USP, com os seguintes objetivos:

- Investigar a bioatividade dos extratos brutos etanólicos de 25 plantas da família Solanaceae em *S. frugiperda*;
- Fazer o biomonitoramento das espécies ativas utilizando-se de técnicas cromatográficas para obtenção das frações;
- Caracterizar quimicamente as frações semipuras bioativas, por técnicas espectroscópicas;
- Avaliar os efeitos dos extratos brutos e frações promissoras sobre os parâmetros biológicos e alimentar de *S. frugiperda*.

## 1.1. TEXTO DE SISTEMATIZAÇÃO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL

Para determinar o potencial bioativo de solanáceas foram testados 38 extratos brutos etanólicos em função das partes vegetais disponíveis de 25 espécies coletadas. Os extratos foliares de *Acnistus arborescens* e de *Datura stramonium* foram selecionados para as etapas posteriores de investigações químicas. Os extratos brutos, inicialmente, foram submetidos a um processo de separação líquido-líquido, e após ensaio biomonitorado das frações obtidas, constatou-se elevado efeito letal e subletal de *A. arborescens* e *D. stramonium* na fração diclorometânica. Em sequência, as frações selecionadas foram submetidas a mais um processo de separação, dessa vez em coluna pré-empacotada tipo Sep-Pak. Como após o bioensaio todas as subfrações proporcionaram inibição da alimentação, a próxima etapa consistiu em fazer identificação química das mesmas. Foi

constatada a presença de compostos compatíveis com a classe dos vitanolidos, grupo este, mais abundante entre as solanáceas, inclusive do gênero *Datura* e *Acnistus*.

Visando uma maior compreensão dos possíveis efeitos dos extratos brutos etanólicos selecionados e das frações diclorometânicas sobre o inseto-praga em estudo, foram avaliados os parâmetros biológicos da mesma, e foram observados efeitos antibióticos e antixenóticos, sendo o ultimo constatado pela alta inibição da alimentação das frações diclorometânicas em teste de consumo.

## REFERÊNCIAS


Ascher, K.R.S., Eliyahu, M., Goldman, A., Kirson, I., Abraham, A., Jacobson, M., Schmutterer, H., 1987. The antifeedant effect of some new withanolides on three insect species, *Spodoptera littoralis*, *Epilachna varivestis* and *Tribolium castaneum.* Phytoparasitica. 15, 15-29.

Chowański, S., Adamski, Z., Marciniak, P., Rosiński, G., Büyükgüzel, E., Büyükgüzel K., Falabella, P., Scrano, L., Ventrella, E., Lelario F., Bufo, S.A., 2016. A review of bioinsecticidal activity of Solanaceae alkaloids. Toxins. 8, 1-28.

Diaz, G.J., 2015. Toxicosis by plant alkaloids in humans and animals in Colombia. Toxins. 7, 5408-5416.

Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C., 2002. Entomologia Agrícola. FEALQ. 920p.

Hassine,T., Mansour, A., Hammami, S., 2013. Case report of fatal poisoning by *Nicotina tabacum* in cattle in Tunisia. Rev. Med. Vet. 164, 141-144.

Indhumathi, T., Mohandass, S., Shibi, A., 2014. Acute toxicity study of ethanolic extract of *Solanum incanum* L. fruit. Asian J. Pharm. Clin. Res. 7, 98-100.

Isman, M.B., Grieneisen, M.L., 2014. Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. Trends Plant Sci.19, 140-145.

Isman, M.B., 2015. A renaissance for botanical insecticides? Pest Manage. Sci. 71, 1587-1590.

Lara, F.M., 1979. Princípios de resistência de plantas a insetos. Livroceres. 201p.

Minguzzi, S., Barata, L.E.S., Cordell, G.A., 2011. Derivados citotóxicos de vitanolidos isolados das folhas de *Acnistus arborescens.* Quim. Nova. 34, 237-241.

Miresmailli, S., Isman, M.B., 2014. Botanical insecticides inspired by plant-herbivore chemical interactions. Trends Plant Sci. 19, 29-35.

Moreira, M.D., Picanço, M.C., Silva, E.M., Moreno, S.C., Martins, J.C., 2006. Capítulo cinco: Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas. Controle alternativo de pragas e doenças. 89-116.

Rattan, R.S., 2010. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. Crop Prot. 29, 913-920.

Raven, P.H., Evert, R.F., Eechhorn, S.E., 1996. Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente. Biologia Vegetal -EMBRAPA-CNPMA Série Documentos 12, 46p.

Taiz, L.; Zeiger, E., 2009. Fisiologia Vegetal. 4 ed., 819p.

Valicente, F.H., 2015. Manejo integrado de pragas na cultura do milho - Circular Técnica n° 208, Sete Lagoas, p. 1-13.

## 2. BIOATIVIDADE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE SOLANACEAE SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)


### Resumo

O milho é um dos principais pilares da agricultura brasileira, o que torna necessária a busca por novas tecnologias a serem incorporadas na cultura, principalmente para o manejo de pragas, ressaltando que *Spodoptera frugiperda* é o inseto-praga com maior destaque. Com isso, buscando novas alternativas de manejo para a espécie foram triados 38 extratos brutos etanólicos de Solanaceae preparados a partir de diferentes partes vegetais. Após bioensaio de ingestão, os extratos das espécies *Acnistus arborescens* (L.) Schltdl. e *Datura stramonium* (L.) foram os que mostraram maior bioatividade à espécie-alvo. A seguir, foi realizada uma separação líquido-líquido dos mesmos, e para ambas as espécies, a fração diclorometânica foi a mais ativa, proporcionando 62,96 e 33,33% de mortalidade para *A. arborescens* e *D. stramonium*, respectivamente, além de reduzir em 99% os pesos das lagartas sobreviventes. Com isso, essa fração foi selecionada para estimar as concentrações letais ($CL_{25}$, $CL_{50}$, $CL_{90}$), o tempo letal mediano ($TL_{50}$) e para realização do fracionamento biomonitorado. Após separação cromatográfica em coluna pré-empacotada, todas as subfrações obtidas (diclorometânica, acetato de etila e metanólica) mostraram bioatividade quanto à inibição do ganho de peso, porém com valores pouco significativos para mortalidade. Nas investigações quanto ao perfil químico das espécies, pode se observar que grande parte dos compostos de *A. arborescens* estava presentes nas três subfrações, enquanto que para *D. stramonium*, as subfrações metanólica e acetato de etila apresentaram dois compostos majoritários e distintos, pertencentes à classe dos vitanolidos.


**Palavras-chave:** Frações; Lagarta-do-cartucho; Milho; Subletal; Triagem


### Abstract

Corn is one of the main commodities of Brazilian agriculture, which makes it necessary to search for new technologies, especially for pest management, emphasizing that *Spodoptera frugiperda* is the most important insect-pest of the crop. Thus, searching for new management alternatives for the species, 38 crude ethanol extracts of Solanaceae prepared from different plant parts were screened. The crude ethanol extracts of *Acnistus arborescens* (L.) Schltdl. and *Datura stramonium* (L.) promoted the highest bioactivity on the target species. Next, a liquid-liquid separation was carried out and, for both species, the dichloromethane fraction was the most active, leading to 62.96 and 33.33% mortality for *A. arborescens* and *D. stramonium*, respectively, in addition to reduce the weights of surviving caterpillars by 99%. Thus, this fraction was selected to estimate the lethal concentrations ($CL_{25}$, $CL_{50}$, $CL_{90}$), the median lethal

time ($TL_{50}$) and for the biomonitored fractionation. After chromatographic separation on a prepackaged column, all subfractions obtained (dichloromethane, ethyl acetate and methanolic) showed bioactivity in inhibiting weight gain, but with no significant values for mortality. In the investigation of the chemical profile of the species, it can be observed that most of the *A. arborescens* compounds were present in the three subfractions, whereas for *D. stramonium*, the methanolic and ethyl acetate subfractions presented two major and distinct compounds belonging to the class of the withanolides.

**Keywords:** Fractions; Fall armyworm; Corn; Sublethal; Screening

## 2.1. Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é um importante insumo no agronegócio brasileiro com 15.279,3 ha total de área plantada na safra 15/16, representando 39,03% da produção de grãos (Conab, 2015). Sua produção ocorre em pequenas propriedades, para fins de subsistência e em grandes extensões para abastecer o mercado, sendo amplamente utilizado na alimentação devido a sua qualidade nutricional (Pavão & Filho, 2011). A crescente demanda pelo produto requer a busca de novas tecnologias para serem incorporadas no manejo da cultura visando ao aumento de produtividade, entre as quais se inclui a utilização de cultivares transgênicas (*Bt*). Entretanto, espécies-praga do milho têm demonstrado resistência a esses genótipos, como é o caso de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Waquil et al., 2002).

Conhecida popularmente como lagarta-do-cartucho-do-milho, *S. frugiperda* é uma espécie de hábito polífago, o que dificulta seu manejo, uma vez que a oferta de hospedeiros ao longo do ano é grande, tornando, assim, frequente a ocorrência da praga, bem como a utilização de inseticidas sintéticos para reduzir sua densidade populacional (Barros et al., 2010). Ressalte-se que a utilização isolada de uma tática de controle aumenta a probabilidade de seleção de populações de insetos resistentes, diminuindo, consequentemente, a rentabilidade da cultura, além de causar problemas ao homem e ao meio ambiente (Hardstone & Scott, 2010). Nesse contexto, tem aumentado o interesse por técnicas mais seguras a serem integradas ao manejo de pragas, destacando-se entre elas o uso de inseticidas botânicos (Moreira et al., 2006).

Muitos trabalhos têm sido realizados com derivados de plantas como modelos potenciais para obtenção de substâncias defensivas contra pragas (Crombie, 1999), uma vez que substâncias oriundas do metabolismo secundário vegetal podem afetar a biologia, desenvolvimento e reprodução dos insetos e, algumas delas já são utilizadas inclusive como inseticidas (Isman et al., 2011; Kakeru et al., 2013). Do mesmo modo, o aumento da demanda

por pesquisas relacionadas a plantas com atividade inseticida vem crescendo consideravelmente, devido ao fato de que os metabólitos secundários de plantas apresentam algumas vantagens quando comparados aos produtos sintéticos: são renováveis e facilmente degradáveis, não contaminando o meio ambiente; dificilmente propiciam a seleção de insetos resistentes; não deixam resíduos nos alimentos; são seguros aos operadores e apresentam baixo custo, tornando-se acessível aos pequenos produtores (Oliveira et al., 2007).

As plantas pertencentes à flora tropical e subtropical constituem uma fonte rica de aleloquímicos utilizados como defensivos contra o ataque de organismos fitófagos (Isman, 2005). Como exemplo, destacam-se diversas espécies pertencentes às famílias Meliaceae, Annonaceae e Solanaceae (Sanchez et al., 2010). Solanaceae é constituída por 34 gêneros e 470 espécies de plantas distribuídas entre os vários biomas brasileiros (Stehmann et al., 2015), incluindo plantas de grande importância, por se constituírem em fonte de alimentos (batata, tomate, berinjela, pimenta e outras), por apresentarem propriedades medicinais (tabaco, beladona, mandrágora etc.) e por serem utilizadas como plantas ornamentais (petúnias e jasmins, entre outras) (Filgueira, 2003; Silva et al., 2003; Knapp et al., 2004; Pinto et al., 2011).

Os alcaloides são os compostos biologicamente mais ativos presentes nas solanáceas e possuem um enorme potencial para proteção de culturas especialmente contra insetos, fungos e ácaros (Chowański et al., 2016). O efeito pode ser letal como relatado por Elango et al. (2011) que testaram extratos de folhas de *Datura metel* sobre larvas de *Anopheles subpictus* e subletal como ocasionado por *Datura stramonium* sobre diferentes espécies de coleópteros (Mehrabadi et al., 2011), sendo que ambos os efeitos tendem a permitir redução do uso de inseticidas químicos.

Para maior compreensão da bioatividade das espécies pertencentes à família Solanaceae, 38 extratos etanólicos, provenientes de 25 espécies, foram testados sobre lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda* e comparados a um inseticida comercial de origem natural [Azamax® 1,2 EC (UPL Brasil, Ltd., Campinas, São Paulo, Brasil)]. Posteriormente, os extratos mais promissores foram selecionados e submetidos a investigações químicas.

## 2.2. Material e métodos

### 2.2.1. Extratos etanólicos brutos: fonte e preparo

Os dados de coleta das 25 espécies de plantas da família Solanaceae utilizadas no presente estudo encontram-se detalhados na Tabela 1. Após a coleta, uma exsicata de cada espécime foi enviada a Danilo Soares Gissi, mestrando do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" ESALQ/USP, em Piracicaba, SP, Brasil para confirmação taxonômica. Feito isso, um *voucher* de cada uma das espécies foi depositado no herbário da mesma instituição (ESA).

Para obtenção dos extratos brutos, as partes vegetais coletadas foram inicialmente secas em estufa com circulação forçada de ar a 40 $^{o}$C por um período de 48-72 h. Após a completa secagem, o material vegetal foi triturado usando um moinho de facas (Thomas Scientific, Filadélfia, PA, EUA) para obtenção de um pó fino. O método de extração adotado foi o de maceração a frio em solvente etanol (polaridade: 5,2) na proporção de 5:1 (p/v). Para isso, o pó obtido das respectivas partes de cada espécie foi submetido à agitação constante por 3 min com o solvente e, logo após, mantido em repouso por três dias e filtrado, sendo tal procedimento repetido por três vezes. Os solventes das amostras filtradas foram eliminados utilizando-se um rotaevaporador a 50 ºC e à pressão de -600 mmHg, obtendo-se, assim, o extrato etanólico das partes vegetais de cada uma das espécies de Solanaceae em estudo. O rendimento de extração foi calculado em função da quantidade de pó (g) submetida ao processo inicial de extração.

**Tabela 1.** Dados de coleta das espécies de plantas da família Solanaceae estudadas.

| Espécies | Local de coleta | Data de coleta | Número de voucher |
|---|---|---|---|
| *Acnistus arborescens* (L.) Schltdl. | Campus CENA/USP, Piracicaba, SP (22°42'30.2"S 47°38'38.2"W) | 16/11/15 | D. S. Gissi 46 |
| *Brugmansia suaveolens* (Willd.) Bercht. & J.Presl | Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°42'27.4"S 47°37'46.0"W) | 31/10/15 | G. L. P. Gonçalves 01 |
| *Brunfelsia uniflora* (Pohl) D. Don | Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP 22°42'34.0"S 47°37'53.4"W | 04/08/15 | F. Rocha 02 |
| *Capsicum* sp. | Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°42'54.4"S 47°37'50.5"W) | 07/03/16 | D. S. Gissi 277 |
| *Cestrum intermedium* Sndtn. | Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°42'27.4"S 47°37'46.0"W) | 22/08/15 | D. S. Gissi 274 |
| *Cestrum nocturnum* L. | Louveira, SP (23°04'48.0"S 46°57'00"W) | 10/08/15 | F. Rocha 03 |
| *Datura stramonium* L. | Sitio Retiro, Lavras, MG (21°12'03.5"S 45°09'54.5"W) | 31/12/15 | A. F. Lima 01 |
| *Lycianthes asarifolia* (Kunth & Bouché) Bitter | Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°42'54.4"S 47°37'50.5"W) | 16/11/15 | D. S. Gissi 47 |
| *Lycianthes rantonnei* (Carrière) Bitter | Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°42'27.4"S 47°37'46.0"W) | 17/08/15 | A. F. Lima 03 |
| *Nicandra physaloides* (L.) Gaertn | Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°42'28.9"S 47°37'48.9"W) | 02/09/15 | D. S. Gissi 36 |
| *Nicotiana longiflora* Cav. | Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°42'27.4"S 47°37'46.0"W) | 05/01/15 | D. S. Gissi 274 |
| *Solanum americanum* Mill. | Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°42'27.4"S 47°37'46.0"W) | 16/11/15 | A. F. Lima 04 |
| *Solanum cernuum* Vell. | Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°42'28.9"S 47°37'50.4"W) | 17/11/15 | D. S. Gissi 38 |
| *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil | Sitio Três Irmãos, Buri, SP (23°45'30.22"S 48°38'57.16"W) | 29/02/16 | D. S. Gissi 269 |
| *Solanum granulosoleprosum* Dunal. | Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°41'59.4"S 47°37'59.8"W) | 05/01/16 | D. S. Gissi 271 |
| *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil | Sitio Retiro, Lavras, MG (21°12'08.3"S 45°09'52.2"W) | 31/12/15 | A. F. Lima 02 |
| *Solanum mauritianum* Scop. | Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP 22°42'34.6"S 47°37'56.6"W | 07/03/16 | D. S. Gissi 272 |
| *Solanum palinacanthum* Dunal. | Sitio Retiro, Lavras, MG (21°12'48.0"S 45°08'16.9"W) | 31/12/16 | A. F. Lima 05 |
| *Solanum paniculatum* L. | Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°42'28.9"S 47°37'48.9"W) | 10/09/2015 | D. S. Gissi 35 |
| *Solanum pseudocapsicum* L. | Sitio Três Irmãos, Buri, SP (23°45'30.22"S 48°38'57.16"W) | 29/02/16 | D. S. Gissi 267 |

**continua**

| Espécies | Local de coleta | Data de coleta | Número de voucher |
|---|---|---|---|
| *Solanum robustum* H.L.Wendl. | São Paulo, SP (23°38'18.4"S 46°37'38.6"W) | 24/02/16 | D. S. Gissi 268 |
| *Solanum scuticum* M. Nee. | Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°41'59.5"S 47°37'59.8"W) | 05/01/16 | D. S. Gissi 270 |
| *Solanum seaforthianum* Andrews. | Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP 22°42'36.1"S 47°37'58.5"W | 16/11/15 | F. Rocha 01 |
| *Solanum sisymbriifolium* Lam. | Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°42'28.5"S 47°38'01.2"W) | 07/03/16 | D. S. Gissi 273 |
| *Solanum viarum* Dunal. | Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°42'28.9"S 47°37'48.9"W) | 16/11/15 | D. S. Gissi 37 |

### 2.2.2. Manutenção da população de *Spodoptera frugiperda (*J.E. Smith) em laboratório

A população de *S. frugiperda* foi mantida sob condições laboratoriais controladas (temperatura de 25±1 $^{o}$C, U.R. de 60±10% e fotofase de 14 h). As lagartas foram alimentadas com dieta artificial proposta por Greene et al. (1976), mantida em copos plásticos descartáveis com capacidade de 50 mL e vedados com tampas de acrílico. As pupas foram retiradas e acondicionadas em gaiolas de tubo de PVC (20 cm de diâmetro e 20 cm de altura) e, após a emergência, os adultos foram alimentados com solução de mel a 10% (p/v).

### 2.2.3. Bioensaios

Todos os bioensaios foram realizados nas condições laboratoriais citadas no item 2.2.2. e sob delineamento experimental inteiramente aleatorizado.

#### 2.2.3.1. Triagem para seleção dos extratos etanólicos brutos mais promissores

A bioatividade dos 38 extratos brutos etanólicos obtidos foi avaliada por meio de incorporação em dieta artificial (bioensaio de ingestão), seguindo o procedimento descrito por Ansante et al. (2015), na concentração diagnóstica de 4.000 mg kg$^{-1}$. Para isso, os extratos foram solubilizados em 6 mL de uma solução de solventes [acetona:metanol (1:1,v/v)] e incorporados na dieta artificial (150 g), quando esta se encontrava a 50 $^{o}$C, visando evitar a degradação dos compostos termolábeis presentes no extrato.

Para cada tratamento utilizaram-se seis repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Elisa com 24 células, na qual foi depositado um volume de 1,5 mL de dieta

artificial, com o auxílio de um pipetador (Boeco Co., Hamburgo, Alemanha), em 14 células de cada placa, totalizando 84 lagartas por tratamento. Além do controle negativo (solução de solventes utilizada na solubilização dos extratos), também foi utilizado um controle positivo constituído por um inseticida comercial de origem botânica [Azamax® 1,2 EC (UPL Brasil, Ltd., Campinas, São Paulo, Brasil)] incorporado na concentração recomendada (4.000 mg $kg^{-1}$) para controle de *S. frugiperda* na cultura do milho no Brasil (Agrofit, 2016).

As plantas avaliadas foram divididas em grupos, de acordo com a obtenção dos extratos, para facilitar a condução dos experimentos. Decorridas 24 horas da deposição da dieta artificial nas placas, cada célula foi infestada com uma lagarta neonata (< 24 h de idade) de *S. frugiperda.*

Diariamente, por um período de sete dias, foi contabilizado o número de lagartas mortas e, ao sétimo dia de exposição, foi avaliado o peso das lagartas sobreviventes.

#### 2.2.3.2. Partição líquido-líquido dos extratos mais promissores

Visando separar os compostos interferentes dos ativos, os extratos mais promissores foram submetidos à partição líquido-líquido dos mesmos. Para isso, 15 g dos extratos etanólicos foram solubilizados em água e metanol (1,5:1,v/v) e particionados em um funil de separação (volume de 2.000 mL). O procedimento foi iniciado com 500 mL do solvente apolar, hexano, sendo separado por três vezes. Logo após, a fração de água/ metanol foi submetida ao rotoevaporador até a obtenção da fração aquosa, a qual, posteriormente, foi reparticionada com solvente diclorometano por três vezes. As frações obtidas (aquosa, hexânica e diclorometânica) foram concentradas em rotaevaporador sob as mesmas condições de temperatura e pressão adotadas para a obtenção dos extratos brutos, e, posteriormente foram testadas frente a *S. frugiperda* utilizando a mesma metodologia, concentração e parâmetros biológicos descritos no bioensaio anterior (item 2.2.3.1.).

#### 2.2.3.3. Curvas de concentração-resposta das frações selecionadas e tempo letal médio

Com base nos resultados obtidos na avaliação da bioatividade, as frações mais promissoras foram selecionadas e testadas novamente visando estimar as $CL_{25}$, $CL_{50}$ e $CL_{90}$ (concentrações necessárias para matar 25, 50 e 90% da população de lagartas, respectivamente), após sete dias de exposição. Para isso, foram utilizadas cinco concentrações (intervalo: 500-8.000 mg $kg^{-1}$) definidas com base em testes preliminares (Finney, 1971),

sendo a mortalidade avaliada diariamente. Os mesmos procedimentos do item 2.2.3.1. foram adotados para este bioensaio. Além das concentrações letais, também foi estimado o $TL_{50}$ (tempo necessário para matar 50 % da população de lagartas) nas concentrações 4.000 e 8.000 mg $kg^{-1}$.

### 2.2.3.4. Refracionamento das frações ativas

As frações ativas selecionadas anteriormente foram submetidas à separação cromatográfica utilizando-se coluna pré-empacotada tipo Sep-Pak de 10 g (60 mL), marca Phenomenex®, com fase estacionária de sílica e fase móvel em modo isocrático com os solventes orgânicos diclorometano, acetato de etila e metanol (todos de grau PA, marca Synth). Para as análises por cromatografia de camada delgada (CCD), foram utilizadas cromatofolhas de sílica-gel 60 (20 x 20 cm) sobre poliéster com indicador ultravioleta (Macherey-Nagel®) e eluição de diclorometano/metanol 9:1. Após as eluições, as placas foram inspecionadas sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm. Finalmente, para análise da bioatividade das subfrações obtidas, foram utilizados os mesmos procedimentos e parâmetros descritos anteriormente (item 2.2.3.1.). No entanto, a concentração utilizada foi a equivalente à $CL_{50}$ estimada para a respectiva fração. Foram utilizadas seis repetições para cada tratamento, sendo cada repetição representada por uma placa de Elisa com 10 células (n = 60 lagartas).

### 2.2.4. Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV acoplado ao espectro de massas

As subfrações metanólicas, diclorometânicas e acetato de etila de *A. arborescens* e de *D. stramonium* foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de ultravioleta e espectrômetro de massas.

O cromatógrafo utilizado foi da marca Waters ACQUITY, com detectores UV com arranjo de diodos e espectrômetro de massas. Foi utilizada uma coluna Ascentis express $C_{18,}$ com gradiente de água (acidificada a 0,1% com ácido fórmico) em acetonitrila. A vazão foi de 0,45 mL $min^{-1}$ e a corrida foi de 33 min. O detector de massas foi o XEVO-TQS com varredura de 96 a 1963 Da, resolução 2,8/14,6, íon de energia 0,4, capilar (kV) 3,20, voltagem do cone 30.00, temperatura da fonte 150 °C e fluxo do gás 150 L $h^{-1}$.

### 2.2.5. Análise dos dados

Para análise dos dados de mortalidade larval de *S. frugiperda* após o sétimo dia de infestação foi utilizado o modelo linear generalizado (GLM) (Nelder & Wedderburn, 1972) com distribuição do tipo binomial. Havendo diferença significativa entre os tratamentos, foram realizadas comparações múltiplas (teste de *pos hoc* de Tukey, $p < 0,05$) por meio da função glht do pacote multicomp com ajuste dos valores de *p*.

A análise da variável inibição do ganho de peso (IGP) foi avaliada no software SAS versão 9.2 (SAS Institute, 2011), e foi adotada a sobreposição do intervalo de confiança para determinar diferenças entre os tratamentos.

Os dados referentes aos pesos larvais foram testados, primeiramente, quanto aos pressupostos da ANOVA. Atendendo aos mesmos, foram adotadas comparações múltiplas, teste de Tukey ($p<0,05$). Para a mesma variável, quando necessário, os dados originais foram transformados mediante o método da potência ótima de BOX-COX, ou o modelo Gamma foi ajustado aos dados utilizando-se a função de ligação do tipo Log, caso em que as médias foram comparadas mediante o pacote multicomp. As análises foram realizadas utilizando-se o software estatístico "R", versão 2.15.1 (R Development Core Team, 2012).

Análises multivariadas foram utilizadas para verificar o agrupamento dos extratos brutos a partir das variáveis analisadas na triagem, utilizando-se, para isso, a distância euclidiana média e o método UPMGA (*Unweighted Pair-group Method with Arithmatic Mean*) no software Statistica 13.

Para estimativa das concentrações letais foi utilizado um modelo binomial com função de ligação complemento log-log (modelo de gompit), utilizando-se o *Probit Procedure* do software SAS versão 9.2 (SAS Institute, 2011).

Finalmente, para estimativa do tempo letal médio foi utilizado o método proposto por Throne et al. (1995) para análise de Probit de correlação dos dados.

## 2.3. Resultados e discussão

### 2.3.1. Rendimento de extração

Houve diferença no rendimento de extração (1,86 a 18,15%) quando comparadas as diferentes espécies e partes vegetais (Tabela 2). O maior rendimento foi obtido com frutos de *S. granulosoleprosum* (18,15%) e folhas de *S. viarum* (17,57%), seguidos por flores de *A.*

*arborescens* (17,31%), folhas de *L. asarifolia* (16,96%) e folhas de *D. stramonium* (16,83%). Já os menores valores foram encontrados nos ramos de quatro espécies: *S. viarum* (1,86%), *A. arborescens* (2,82%), *S. scuticum* (4,09%) e *S. guaraniticum* (4,29%).

O rendimento de extração pode ser influenciado por diversos fatores ambientais que afetam o acúmulo de compostos secundários. Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007), a época de coleta das espécies é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade, e, às vezes, a natureza dos constituintes químicos não é constante ao longo do ano. Os mesmos autores também ressaltam a importância da idade, desenvolvimento da planta, estrutura, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta e disponibilidade de nutrientes.

Além disso, durante o processo de extração dos compostos vegetais, diversos fatores são determinantes na obtenção dos extratos brutos, como a escolha do solvente, a temperatura de extração e o tamanho das partículas (Wongkittipong et al., 2004). Destaca-se também, a importância da pressão e do tempo para a otimização do processo (Bimakr et al., 2011).

**Tabela 2.** Rendimentos de extratos brutos de solanáceas, por meio do processo de maceração a frio em solvente etanol, na proporção de 1:5 (p/v), das diferentes partes e/ou espécies vegetais estudadas.

| Espécie | Estrutura | Material (g) | Rendimento[1] (g) | Rendimento[1] (%) |
|---|---|---|---|---|
| *Acnistus arborescens* | Folhas | 250,00 | 24,60 | 9,84 |
| | Ramos | 250,00 | 7,05 | 2,82 |
| *Brugmansia suaveolens* | Flores | 75,00 | 12,98 | 17,30 |
| | Folhas | 70,00 | 11,27 | 16,10 |
| | Ramos | 100,00 | 6,53 | 6,53 |
| *Brunfelsia uniflora* | Folhas | 90,00 | 10,24 | 11,38 |
| *Capsicum* sp. | Folhas | 13,00 | 1,34 | 10,31 |
| *Cestrum intermedium* | Folhas | 90,00 | 5,62 | 6,24 |
| *Cestrum nocturnum* | Folhas | 50,00 | 6,35 | 12,70 |
| *Datura stramonium* | Folhas | 100,00 | 16,83 | 16,83 |
| | Frutos | 100,00 | 13,05 | 13,05 |
| | Ramos | 85,00 | 6,75 | 7,94 |
| *Lycianthes asarifolia* | Folhas | 130,00 | 22,05 | 16,96 |
| *Lycianthes rantonnei* | Folhas | 90,00 | 7,35 | 8,17 |
| *Nicandra physaloides* | Folhas | 90,00 | 8,39 | 9,32 |
| *Nicotiana longiflora* | Folhas + ramos | 24,00 | 3,41 | 14,21 |
| *Solanum americanum* | Folhas | 70,00 | 7,75 | 11,07 |
| | Ramos | 190,00 | 9,73 | 5,12 |
| *Solanum cernuum* | Folhas | 170,00 | 9,54 | 5,61 |
| *Solanum guaraniticum* | Folhas | 120,00 | 13,42 | 11,18 |
| | Ramos | 35,00 | 1,50 | 4,29 |

**continua**

| Espécie | Estrutura | Material (g) | Rendimento[1] (g) | Rendimento[1] (%) |
|---|---|---|---|---|
| *Solanum granulosoleprosum* | Folhas | 93,00 | 11,17 | 12,01 |
| | Frutos | 55,00 | 9,98 | 18,15 |
| | Ramos | 100,00 | 5,74 | 5,74 |
| *Solanum lycocarpum* | Folhas | 100,00 | 8,64 | 8,64 |
| *Solanum mauritianum* | Folhas | 122,00 | 13,07 | 10,71 |
| *Solanum palinacanthum* | Folhas + ramos | 100,00 | 14,66 | 14,66 |
| | Frutos | 62,00 | 6,63 | 10,69 |
| *Solanum paniculatum* | Folhas | 90,00 | 7,65 | 8,50 |
| *Solanum pseudocapsicum* | Folhas + ramos | 30,00 | 2,49 | 8,30 |
| *Solanum robustum* | Folhas | 50,00 | 4,53 | 9,06 |
| *Solanum scuticum* | Folhas | 250,00 | 21,76 | 8,70 |
| | Frutos | 30,00 | 4,47 | 14,90 |
| | Ramos | 250,00 | 10,22 | 4,09 |
| *Solanum seaforthianum* | Folhas | 210,00 | 20,70 | 9,86 |
| | Frutos | 80,00 | 7,97 | 9,96 |
| *Solanum sisymbriifolium* | Folhas + ramos | 27,00 | 1,91 | 7,07 |
| *Solanum viarum* | Folhas | 60,00 | 10,54 | 17,57 |
| | Ramos | 120,00 | 2,23 | 1,86 |

[1] Obtido a partir da quantidade (g) do material vegetal moído em um moinho de facas.

### 2.3.2. Triagem para a seleção dos extratos etanólicos brutos mais promissores

Todos os extratos etanólicos testados ocasionaram mortalidades larvais inferiores ao controle positivo, tratamento em que a mortalidade atingiu, ao sétimo dia da infestação, 100% das lagartas (Tabela 3). Por outro lado, apenas os extratos obtidos de ramos de *S. granulosoleprosum* e de folhas de *D. stramonium* ocasionaram mortalidade superior (30,95 e 20,24%, respectivamente) à observada no respectivo controle negativo.

Com exceção dos extratos etanólicos de frutos de *S. palinacanthum* e de ramos de *S. granulosoleprosum*, todos os extratos testados reduziram significativamente o peso das lagartas criadas por sete dias em dieta artificial tratada. Entre estes, os extratos de folhas de *A. arborescens* e de *D. stramonium* proporcionaram os menores pesos larvais (0,94 e 1,86 mg, respectivamente) e, consequentemente, os maiores valores de inibição do ganho de peso (97,85 e 95,72%, respectivamente), com baixa variabilidade dentro dos tratamentos, conforme se observa pelo intervalo de confiança.

Em bioensaios com extrato metanólico de folhas de *Datura metel*, Panneerselvam et al. (2013) observaram altos índices de mortalidade nos ínstares iniciais de lagartas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) expostas por 24 h ao tratamento, de forma que a taxa de mortalidade foi inversamente proporcional ao aumento do ínstar, sendo tal resultado atribuído ao pouco desenvolvimento do aparato bucal.

Os extratos brutos de folhas + ramos de *S. pseudocapsicum*, de folhas + ramos de *S. palinacanthum* e de folhas de *S. seaforthianum* ocasionaram respectivamente 84,07%, 81,19% e 80,14% de inibição da alimentação das lagartas sobreviventes ao sétimo dia. Altas taxas de inibição da alimentação ocasionada por extratos brutos de *S. pseudocapsicum* também já tinham sido observadas, por outros autores, em aplicação sobre discos foliares de tomate. Jeyasankar et al. (2012b), utilizando extrato bruto foliar à base de acetato de etila na concentração de 5%, observaram, em lagartas de quarto ínstar de *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae), inibição da alimentação superior a 68% durante um período de 24 h, enquanto que, nas mesmas condições, o extrato bruto das sementes causou inibição superior a 80%. O extrato bruto com acetato de etila das sementes de *S. pseudocapsicum*, testado sobre lagartas de quarto ínstar de *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) e de *H. armigera*, também acarretou altas taxas de inibição da alimentação (80,30% e 82,10%, respectivamente), bem como altas mortalidades (75,3% e 66,5%, respectivamente), nas condições relatadas anteriormente (Jeyasankar et al., 2012a).

A atividade inibidora de crescimento para lagartas de terceiro ínstar de *S. litura* e de *Achaea janata* (L.) (Lepidoptera: Noctuidae) também foi constatada (valores de 80,4% e 84,2%, respectivamente) quando o extrato bruto de frutos da solanácea *S. melongena* foi aplicado, na concentração de 40 mg 10 $cm^{-2}$, sobre discos de mamona consumidos pelos insetos por um período de sete dias de exposição (Devanand & Rani, 2011).

A análise de agrupamento realizada com base nas variáveis analisadas na triagem inicial mostrou a formação de três grupos ao considerar o Dlink/Dmax*100 de 56 (Figura 1), os quais englobam todos os tratamentos testados, excetuando-se apenas o extrato etanólico de

ramos de *S. granulosoleprosum*. No primeiro grupo estão contidos apenas os extratos foliares de *A. arborescens* e de *D. stramonium*; o segundo grupo inclui os extratos de folhas + ramos de *S. sisymbriifoilum*, folhas de *S. viarum*, folhas + ramos de *N. longiflora* e frutos de *S. granulosoleprosum* e, finalmente, um terceiro grupo que englobou os demais extratos como, por exemplo, o de frutos de *S. palinacanthum*, folhas de *S. lycocarpam* e *L. asarifolia* e de outros 28 tratamentos.

Assim, em função dos efeitos subletais (peso e inibição do ganho de peso) encontrados de maneira pronunciada em *A. arborescens* e em *D. stramonium*, bem como pelo resultado da análise de agrupamento, a qual ressaltou a similaridade entre os efeitos dos tratamentos, essas duas espécies foram selecionadas para as etapas subsequentes de investigações químicas como sendo as espécies mais promissoras, o que não implica descartar os demais extratos para estudos futuros.

**Tabela 3**. Médias (± erro padrão) da mortalidade (%), do peso (mg) e da inibição do ganho de peso (%) de *Spodoptera frugiperda* em dieta artificial contendo extratos etanólicos (4.000 mg $kg^{-1}$) de diferentes espécies de Solanaceae. Temp.: 25±2 ºC; U.R.: 60±10%; fotofase 14 h.

| **Espécie** | **Estrutura Vegetal** | **Mortalidade (%)[1]** | **Peso (mg)** | **Inibição do Ganho de Peso (IGP) (%)[2]** |
|---|---|---|---|---|
| [3]*Solanum palinacanthum* | Folhas + ramos | 17,67 ± 3,98 ab | 11,78 ± 1,11 f | 81,19 ± 1,76 (76,65 - 85,72) a |
| *Brugmansia suaveolens* | Folhas | 7,14 ± 3,19 b | 19,94 ± 2,54 ef | 68,09 ± 4,23 (57,21 - 78,97) ab |
| *Solanum granulosoleprosum* | Frutos | 19,05 ± 3,53 ab | 21,89 ± 2,75 e | 65,22 ± 4,11 (54,66 - 75,77) b |
| *Nicotiana longiflora* | Folhas + ramos | 19,05 ± 4,39 ab | 23,81 ± 1,73 de | 61,90 ± 2,99 (54,21 - 69,59) b |
| *Solanum granulosoleprosum* | Folhas | 16,67 ± 3,98 ab | 35,68 ± 3,77 bcd | 43,17 ± 5,74 (28,41 - 57,92) bc |
| *Solanum lycocarpam* | Folhas | 8,33 ± 2,20 b | 37,82 ± 2,46 bc | 39,34 ± 4,71 (27,22 - 51,46) c |
| *Solanum palinacanthum* | Frutos | 8,33 ± 3,41 b | 46,67 ± 3,73 ab | 27,21 ± 5,62 (12,76 - 41,67) c |
| *Solanum granulosoleprosum* | Ramos | 30,95 ± 9,18 a | 46,89 ± 2,95 ab | 25,13 ± 4,66 (13,15 - 37,12) c |
| Controle negativo (acet.:met., 1:1) | -- | 7,14 ± 3,69 b | 62,67 ± 1,00 a | -- |
| Controle positivo (Azamax® 1,2 EC) | -- | 100,00 ± 0,00* | -- | -- |
| F | | | 27,70 | |
| *p-valor* | | < 0,0001 | < 0,0001 | |
| [4]*Solanum scuticum* | Folhas | 5,95 ± 3,41 a | 13,12 ± 0,95 e | 72,42 ± 1,80 (67,78 - 77,05) a |
| *Solanum cernuum* | Folhas | 4,76 ± 3,53 a | 22,66 ± 0,99 d | 52,23 ± 2,09 (46,86 - 57,59) b |
| *Solanum scuticum* | Ramos | 2,38 ± 2,38 a | 24,40 ± 1,52 d | 48,60 ± 2,99 (40,90 - 56,29) b |
| *Solanum americanum* | Folhas | 7,14 ± 2,61 a | 24,47 ± 1,24 d | 48,38 ± 2,63 (41,61 - 55,15) b |
| *Solanum scuticum* | Frutos | 3,57 ± 2,44 a | 33,21 ± 1,08 c | 29,91 ± 2,66 (23,07 - 36,74) c |
| *Solanum americanum* | Ramos | 10,71 ± 2,44 a | 36,49 ± 1,79 bc | 22,91 ± 4,28 (11,91 - 33,90) c |
| *Lycianthes asarifolia* | Folhas | 11,91 ± 1,60 a | 40,34 ± 1,49 b | 14,82 ± 3,67 (5,38 - 24,25) c |
| Controle negativo (acet.:met., 1:1) | -- | 3,57 ± 2,44 a | 47,43 ± 0,58 a | -- |
| Controle positivo (Azamax® 1,2 EC) | -- | 100,00 ± 0,00* | -- | -- |
| F | | | 78,17 | |
| *p-valor* | | < 0,1104 | < 0,0001 | |

**continua**

| Espécie | Estrutura Vegetal | Mortalidade (%)[1] | Peso (mg) | Inibição do Ganho de Peso (IGP) (%)[2] |
|---|---|---|---|---|
| [5]*Acnistus arborescens* | Folhas | 8,33 ± 3,41 ab | 0,94 ± 0,06 e | 97,85 ± 0,17 (97,00 - 98,29) a |
| *Datura stramonium* | Folhas | 20,24 ± 5,66 a | 1,86 ± 0,17 d | 95,72 ± 0,45 (94,58 - 97,10) a |
| *Acnistus arborescens* | Ramos | 1,19 ± 1,19 b | 14,18 ± 0,48 c | 67,60 ± 1,30 (64,37 - 70,84) b |
| *Datura stramonium* | Ramos | 3,57 ± 1,60 b | 23,86 ± 1,14 b | 45,49 ± 2,75 (38,40 - 52,57) c |
| *Brugmansia suaveolens* | Flores | 8,33 ± 3,41 ab | 27,70 ± 2,02 b | 37,10 ± 3,83 (27,25 - 46,94) cd |
| *Datura stramonium* | Frutos | 4,76 ± 2,38 b | 30,35 ± 1,17 b | 30,84 ± 2,00 (25,68 - 35,99) d |
| *Brugmansia suaveolens* | Ramos | 2,38 ± 2,38 b | 32,93 ± 2,9 b | 24,87 ± 6,45 (8,27 - 41,48) cd |
| Controle negativo (acet.:met., 1:1) | -- | 3,57 ± 2,44 b | 43,88 ± 0,06 a | -- |
| Controle positivo (Azamax® 1,2 EC) | -- | 100,00 ± 0,00* | -- | -- |
| F | | | 315,76 | |
| *p-valor* | | < 0,0001 | < 0,0001 | |
| [3]*Solanum pseudocapsicum* | Folhas + ramos | 11,91 ± 4,39 b | 6,40 ± 0,78 d | 84,07 ± 2,20 (78,41 - 89,74) a |
| *Solanum seaforthianum* | Folhas | 13,10 ± 5,95 ab | 8,04 ± 1,16 d | 80,14 ± 3,08 (72,22 - 88,06) a |
| *Solanum viarum* | Folhas | 22,62 ± 6,50 ab | 17,71 ± 1,80 c | 55,03 ± 6,37 (38,66 - 71,39) b |
| *Solanum sisymbriifolium* | Folhas + ramos | 29,76 ± 7,70 a | 20,65 ± 1,18 bc | 48,23 ± 4,95 (35,51 - 60,95) b |
| *Solanum seaforthianum* | Frutos | 20,24 ± 2,87 ab | 25,04 ± 2,52 bc | 38,26 ± 6,14 (22,48 - 54,05) b |
| *Capsicum* sp. | Folhas | 25 ± 6,59 ab | 25,59 ± 2,24 bc | 36,57 ± 6,62 (19,56 - 53,58) b |
| *Solanum guaraniticum* | Ramos | 15,48 ± 3,88 ab | 26,68 ± 0,74 b | 33,33 ± 4,90 (20,66 - 46,00) b |
| Controle negativo (acet.:met., 1:1) | -- | 14,29 ± 3,69 ab | 40,94 ± 2,67 a | -- |
| Controle positivo (Azamax® 1,2 EC) | -- | 100,00 ± 0,00* | -- | -- |
| F | | | 44,93 | |
| *p-valor* | | 0,0313 | < 0,0001 | |
| [3]*Nicandra physaloides* | Folhas | 4,76 ± 2,38 a | 10,54 ± 0,89 e | 77,66 ± 2,31 (71,73 - 83,60) a |
| *Solanum mauritianum* | Folhas | 5,95 ± 3,88 a | 17,83 ± 1,79 d | 62,55 ± 3,67 (53,12 - 71,98) ab |

**continua**

| Espécie | Estrutura Vegetal | Mortalidade (%)[1] | Peso (mg) | Inibição do Ganho de Peso (IGP) (%)[2] |
|---|---|---|---|---|
| *Brunfelsia uniflora* | Folhas | 8,33 ± 2,19 a | 18,71 ± 1,33 d | 60,29 ± 3,81 (50,49 - 70,08) b |
| *Solanum paniculatum* | Folhas | 8,33 ± 2,19 a | 20,02 ± 1,05 d | 57,90 ± 2,33 (51,90 - 63,90) b |
| *Solanum guaraniticum* | Folhas | 5,95 ± 2,87 a | 23,49 ± 3,34 cd | 50,36 ± 7,47 (31,15 - 69,57) bc |
| *Cestrum intermedium* | Folhas | 9,52 ± 5,73 a | 24,64 ± 1,50 bcd | 47,62 ± 5,10 (34,52 - 60,72) bc |
| *Cestrum nocturnum* | Folhas | 5,95 ± 3,19 a | 25,62 ± 2,22 bcd | 46,21 ± 4,68 (34,19 - 58,23) bc |
| *Lycianthes rantonnei* | Folhas | 2,38 ± 1,51 a | 30,28 ± 2,33 bc | 35,95 ± 5,74 (21,20 - 50,71) bc |
| *Solanum robustum* | Folhas | 2,38 ± 1,51 a | 33,52 ± 2,00 b | 29,99 ± 2,53 (23,48 - 36,51) c |
| Controle negativo (acet.:met., 1:1) | -- | 2,38 ± 1,51 a | 47,83 ± 2,00 a | -- |
| Controle positivo (Azamax® 1,2 EC) | -- | 100,00 ± 0,00* | -- | -- |
| F | | | 26,15 | |
| *p-valor* | | 0,3091 | < 0,0001 | |

* Intervalos de confiança não foram estimados pela falta de variabilidade;

[1] Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, para cada grupo de espécies vegetais (bioensaio), indicam diferença significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição binomial seguido por teste *post hoc* de Tukey $p<0,05$);

[2] IGP: médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pela sobreposição dos intervalos de confiança (IC 95%);

[3] Médias de peso seguidas de letras distintas, nas colunas de cada espécie vegetal (bioensaio), indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p<0,05$) (os dados originais foram transformados mediante o método da potência ótima de BOX-COX);

[4] Médias de peso seguidas de letras distintas, nas colunas de cada espécie vegetal (bioensaio), indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p<0,05$);

[5] Médias de peso seguidas de letras distintas, nas colunas de cada espécie vegetal (bioensaio), indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p<0,05$); o modelo Gamma foi ajustado aos dados utilizando-se a função de ligação do tipo Log.

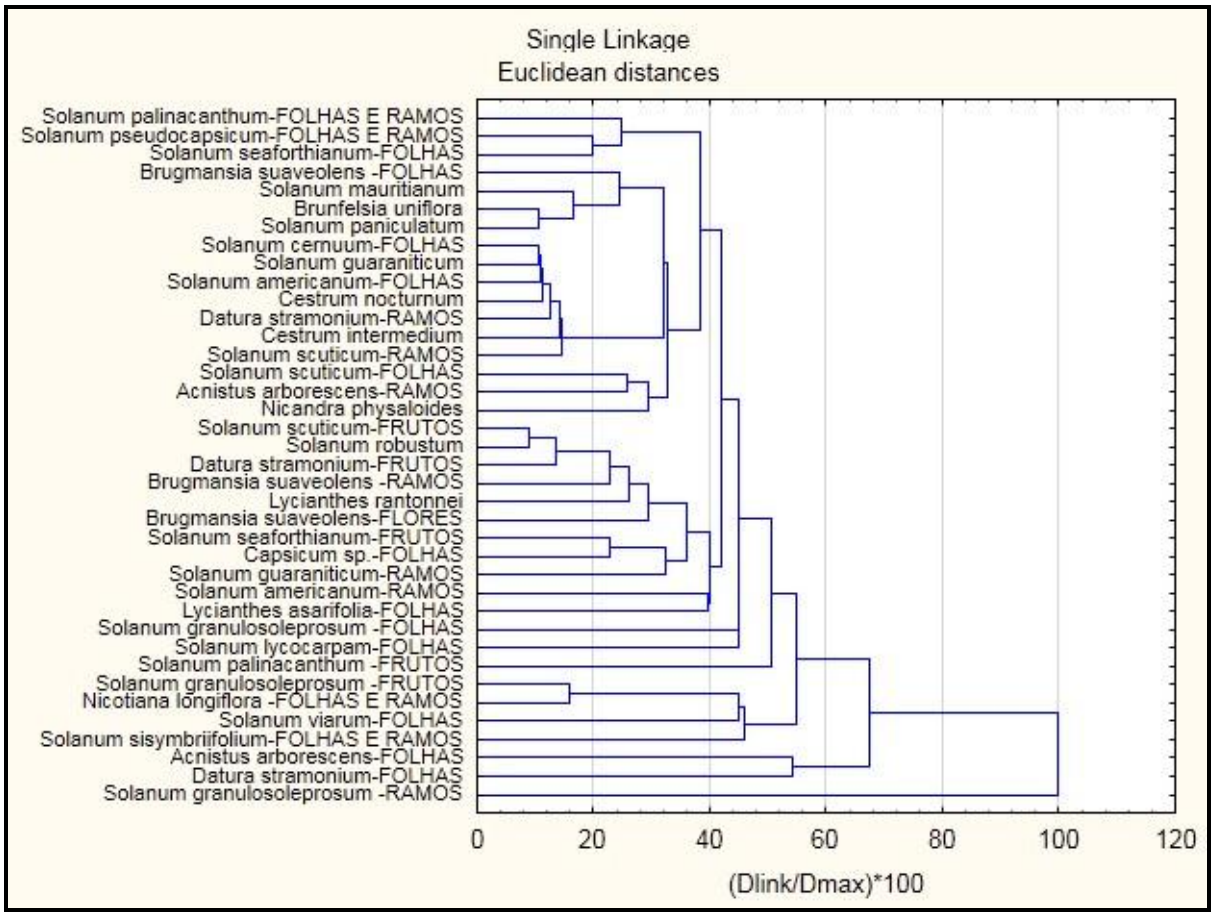



**Figura 1.** Dendograma obtido por meio de análise de Cluster baseado na similaridade da bioatividade ocasionada por extratos etanólicos de Solanaceae sobre *Spodoptera frugiperda* (distância euclidiana média como medida de dissimilaridade) e o método UPGMA (*Unweighted Pair-group Method with Arithmatic Mean*) como estratégia de agrupamento.

### 2.3.3. Partição líquido-líquido dos extratos selecionados e bioatividade das frações obtidas

O rendimento das diferentes frações obtidas a partir da partição líquido-líquido de folhas de *A. arborescens* e de *D. stramonium* foi variável em função da espécie e do solvente utilizado (Tabela 4). O maior rendimento para *D. stramonium* ocorreu na fração diclorometânica (42,53%), enquanto para *A. arborescens* foi proporcionado pela fração hexânica (40,47%). Por outro lado, o menor rendimento ocorreu na fração diclorometânica de *A.arborescens* (18,20%), seguido das frações aquosas de ambas as espécies, com rendimento médio próximo a 21%.

**Tabela 4.** Rendimento das diferentes frações, obtidas por partição líquido-líquido, do extrato etanólico de folhas de *Acnistus arborescens* e *Datura stramonium.*

| Espécie vegetal | Peso extrato (g) | Frações | Rendimento[1] | |
|---|---|---|---|---|
| | | | (g) | (%) |
| *Acnistus arborescens* | 15,00 | Hexânica | 6,07 | 40,47 |
| | | Diclorometânica | 2,73 | 18,20 |
| | | Aquosa | 3,10 | 20,67 |
| *Datura stramonium* | 15,00 | Hexânica | 4,66 | 31,07 |
| | | Diclorometânica | 6,38 | 42,53 |
| | | Aquosa | 3,21 | 21,40 |

[1] Obtido a partir da quantidade (g) do respectivo extrato etanólico especificado que foi submetido ao particionamento.

A bioatividade dos derivados foi incrementada com a adoção de um processo de semi-purificação. Após a exposição das lagartas de *S. frugiperda* por sete dias em dieta artificial contendo as frações obtidas, na concentração de 4.000 mg $kg^{-1}$, a fração diclorometânica foi a mais promissora para ambas as espécies, sendo a de *A. arborescens* mais efetiva, ocasionando mortalidade de 62,96% contra 33,33% em *D. stramonium*, valores estes superiores ao registrado no controle negativo, no qual não foi observada nenhuma lagarta morta, porém inferiores ao controle positivo que provocou 100% de mortalidade (Tabela 5). Já para o peso das lagartas sobreviventes, o maior efeito também foi causado por essas duas frações diclorometânicas, com valores médios de 0,34 e 0,75 mg, respectivamente, para *A. arborescens* e *D. stramonium* (Tabela 5, Figura 2).

**Tabela 5**. Médias (± erro padrão) da mortalidade (%), do peso (mg) e da inibição do ganho de peso (%) de *Spodoptera frugiperda* em dieta artificial contendo diferentes frações dos extratos etanólicos de folhas de *Acnistus arborescens* e *Datura stramonium* na concentração de 4.000 mg $kg^{-1}$. Temp.: 25±2 ºC; U.R.: 60±10%; fotofase 14 h.

| Espécie | Fração | Mortalidade (%)[1] | Peso (mg)[2] | Inibição do ganho de peso (%)[3] |
|---|---|---|---|---|
| *Acnistus arborescens* | Diclorometano | 62,96 ± 9,72 a | 0,34 ± 0,23 e | 99,40 ± 0,06 (99,26 - 99,55) a |
| | Água | 7,14 ± 2,16 c | 19,94 ± 4,30 c | 63,13 ± 9,82 (37,99 - 88,39) c |
| | Hexano | 1,19 ± 1,19 c | 25,34 ± 4,09 bc | 53,54 ± 9,04 (30,30 - 76,77) c |
| *Datura stramonium* | Diclorometano | 33,33 ± 10,52 b | 0,75 ± 0,16 d | 98,75 ± 0,20 (98,24 - 99,25) b |
| | Água | 5,95 ± 2,19 c | 15,95 ± 2,54 c | 71,61 ± 5,12 (58,44 - 84,78) c |
| | Hexano | 0,00 ± 0,00* | 40,71 ± 2,86 ab | 28,43 ± 4,43 (17,04 - 39,83) d |
| Controle negativo (acet.:met., 1:1) | -- | 0,00 ± 0,00* | 57,51 ± 4,06 a | -- |
| Controle positivo (Azamax® 1,2 EC) | -- | 100,00 ± 0,00* | -- | -- |
| F | | | 95,57 | |
| *p-valor* | | < 0,0001 | < 0,0001 | |

* Intervalos de confiança não foram estimados pela falta de variabilidade;
[1] Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, para cada espécie vegetal (bioensaio), indicam diferença significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição binomial seguido por teste *post hoc* de Tukey $p<0,05$);
[2] Médias seguidas de letras distintas, nas colunas de cada espécie vegetal (bioensaio), indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p<0,05$), o modelo Gamma foi ajustado aos dados utilizando-se a função de ligação do tipo Log;
[3] IGP: médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pela sobreposição dos intervalos de confiança (IC 95%).

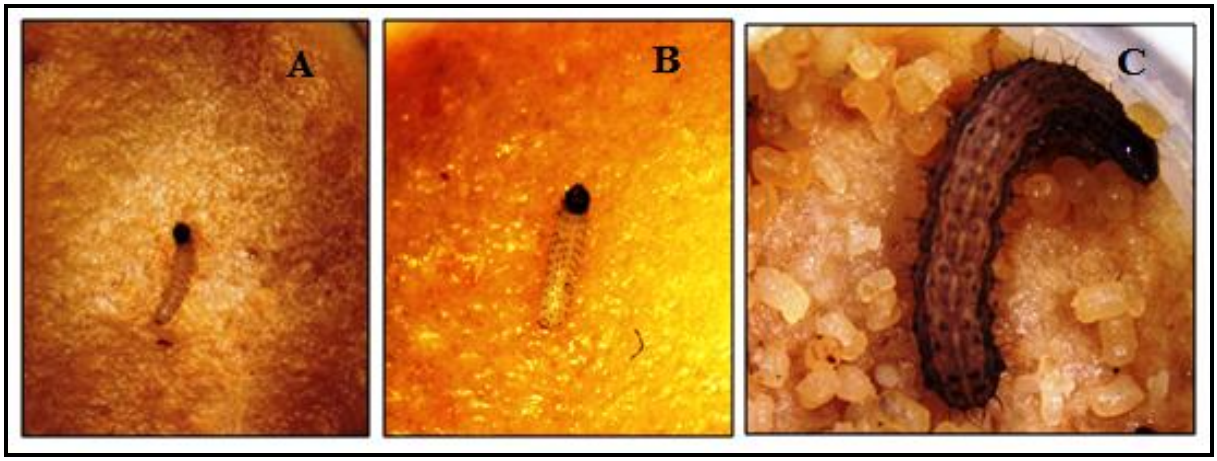



**Figura 2.** Lagartas de *Spodoptera frugiperda* representativas de cada tratamento após sete dias de inoculação em dieta artificial contendo 4.000 mg $kg^{-1}$ das frações diclorometânicas testadas. A- *Acnistus arborescens*, B- *Datura stramonium* e C- Controle negativo (acet.:met., 1:1).

A potencialidade dos compostos bioativos do extrato hexânico de *Trichilia pallida* (Meliaceae), antes e após o fracionamento, foi estudada por Pitta (2010), em relação a ninfas de *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) (Hemiptera: Aphididae). Assim, enquanto o extrato bruto, na concentração de 2%, provocou mortalidade de 24% no quinto dia de exposição, após o fracionamento por Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV) a fração em solvente hexano, a 4%, proporcionou mortalidade de 89%, para o mesmo período de avaliação, inferindo-se assim, o aumento da potencialidade dos compostos ativos após um processo de isolamento.

No presente trabalho foi observado que as frações que ocasionaram maior inibição do ganho de peso também proporcionaram maiores taxas de mortalidade. Ambos os parâmetros podem estar relacionados com uma fagodeterrência primária, uma vez que a alimentação dos insetos é resultante da interação dos quimiorreceptores presentes no aparato bucal e da resposta do sistema nervoso central ao estímulo emitido (Mordue (Luntz) & Nisbet 2000), e períodos sem alimentação impedem o ganho de peso, levando os insetos à morte. Inferência similar também foi feita por Hass et al. (2014), em bioensaio com extrato bruto aquoso a 10% de folhas de *Capsicum baccatum* (Solanaceae) sobre *S. frugiperda*, a qual, durante o período de 10 dias, apresentou peso médio de 19,6 mg e mortalidade de 83%, enquanto no controle o peso médio foi de 40,8 mg com mortalidade de 25%.

Assim, com base nos resultados obtidos dos efeitos letais (mortalidade) e subletais (peso e inibição do ganho de peso), selecionaram-se as frações diclorometânicas de *A. arborescens* e de *D. stramonium* para os testes seguintes de fracionamento biomonitorado.

### 2.3.4. Curvas de concentração-resposta e tempo letal médio para as frações selecionadas

As concentrações letais estimadas das frações diclorometânicas, após 168 h de exposição, para as lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda*, foram distintas para *A. arborescens* e *D. stramonium* (Tabela 6). A fração de *A. arborescens* resultou em menores concentrações, para as $CL_{25}$, $CL_{50}$, $CL_{90}$, com valores de 1.966; 3.694 e 8.739 mg $kg^{-1}$, respectivamente, enquanto que, para a fração diclorometânica de *D. stramonium* os valores foram 2.025 mg $kg^{-1}$ ($CL_{25}$), 4.088 mg $kg^{-1}$ ($CL_{50}$) e 10.670 mg $kg^{-1}$ ($CL_{90}$). Os valores de inclinação da curva ± o erro padrão (*Slop* ± EP) indicam que ocorreu um bom ajuste dos dados obtidos, devendo-se ressaltar que a estimativa desse parâmetro é de grande importância para o estabelecimento de novos bioensaios.

Elango et al. (2011), avaliando a bioatividade de extratos brutos hexânicos da solanácea *Datura metel* sobre larvas de quarto ínstar de *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera:

Culicidae), expostas durante 48 h, constataram valores de 2,11 ppm para a concentração letal média ($CL_{50}$) e 6,22 ppm para a $CL_{90}$. Já Kumar et al. (2012) aferiram as concentrações letais dos extratos de frutos de *Solanum xanthocarpum* para *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), obtendo valores de 170,91; 195,07; 221,45 e 253,18 ppm para larvas de primeiro, segundo, terceiro e quarto ínstar, respectivamente.

Panneerselvam et al. (2013), estimando a concentração média efetiva em função do ínstar larval para *H. armigera*, utilizando extrato bruto em acetato de etila de *D. metel* e período de 24 h de exposição, encontraram os valores de 5,99; 19,32; 31,09; 38,45; 108,78 e 152,64 µg $cm^{-2}$, para o primeiro, segundo, terceiro, quarto, quinto e sexto ínstar, respectivamente, demonstrando a tolerância das lagartas com o aumento do ínstar.

As concentrações letais 50 e 90 também foram estimadas para o extrato bruto de *D. stramonium* sobre adultos de *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) por um período de 24 h, tendo sido encontrados os valores de 3.936 e 15.373 mg $L^{-1}$, respectivamente (Abbasipour et al., 2011). Verifica-se que tais valores se sobrepõem ao intervalo estimado para lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda* do presente estudo.

Observa-se, portanto, diferença na suscetibilidade em função do inseto-modelo, assim como do estágio de desenvolvimento e período de exposição do mesmo, podendo variar também em função da espécie e da estrutura vegetal em estudo.

Na estimativa do tempo letal médio ($TL_{50}$) para a fração diclorometânica nas concentrações 4.000 e 8.000 mg $kg^{-1}$, observou-se pequena variação entre os $TL_{50}$ obtidos a 4.000 mg $kg^{-1}$ para *S. frugiperda* (Tabela 7), com valores de 7,47 e 7,49 dias para *A. arborescens* e *D. stramonium*, respectivamente. Entretanto, com o aumento da concentração e a diminuição do $TL_{50}$, houve aparentemente, maior diferença entre as espécies (3,12 dias para *A. arborescens* e 4,68 dias para *D. stramonium*).

**Tabela 6**. Estimativa da $CL_{25}$, $CL_{50}$ e $CL_{90}$ (em mg $kg^{-1}$) e intervalo de confiança da fração diclorometânica de folhas de *Acnistus arborescens* e *Datura stramonium* (Solanaceae) para lagartas recém-eclodidas de *Spodoptera frugiperda*, durante sete dias de exposição. Temp.: 25±2°C; U.R.: 60±10%; Fotofase: 14 h.

| Espécie | n[1] | *Slop* ± EP (valor de *p*) | $CL_{25}$ (IC 95%)[2] | $CL_{50}$ (IC 95%)[2] | $CL_{90}$ (IC 95%)[2] | $X^2$ [(3)] | g.l. [4] | h.[5] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Acnistus arborescens* | 504 | 3,21 ± 0,54 (*p*<0,0001) | 1.966 (1.128 – 2.662) | 3.694 (2.749 – 4.577) | 8.739 (6.876 – 12.927) | 0,0124 | 5 | 1,69 |
| *Datura stramonium* | 504 | 2,88 ± 0,66 (*p*<0,0001) | 2.025 (793 – 2.976) | 4.088 (2.682 – 5.341) | 10.670 (7.761 – 21.627) | 0,0005 | 5 | 2,11 |

[1]n: número de insetos testados; [2] IC: intervalo de confiança a 95% de probabilidade de erro; [(3)]$\chi^2$: valor de qui-quadrado de Pearson; [4]g.l.: graus de liberdade; [5] h.: fator de heterogeneidade.

**Tabela 7.** Estimativa do tempo letal médio em dias nas concentrações 4.000 e 8.000 mg $kg^{-1}$ para lagartas recém-eclodidas de *Spodoptera frugiperda*. Temp.: 25±2°C; U.R.: 60±10%; Fotofase: 14 h.

| Espécie | Concentração (mg $kg^{-1}$) | n [1] | *Slope* ± EP (*p* valor) | $TL_{50}$ (IC) [2] | $\chi^2$ [(3)] | g.l. [4] | h.[5] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Acnistus arborescens* | 4.000 | 84 | 2,61 ± 0,56 (*p* < 0.0001) | 7,47 (5,30 – 10,83) | 27,06 | 7 | 3,86 |
| | 8.000 | 84 | 2,61 ± 0,32 (*p* < 0.0001) | 3,12 (2,11 – 3,99) | 12,49 | 7 | 1,78 |
| *Datura stramonium* | 4.000 | 84 | 4,42 ± 0,47 (*p* < 0.0001) | 7,49 (6,96 – 8,04) | 3,76 | 7 | 0,54 |
| | 8.000 | 84 | 3,82 ± 0,44 (*p* < 0.0001) | 4,68 (3,96 – 5,24) | 2,76 | 7 | 0,39 |

[1]n: número de insetos testados; [2] IC: intervalo de confiança a 95% de probabilidade de erro; [(3)]$\chi^2$: valor de qui-quadrado de Pearson; [4]g.l.: graus de liberdade; [5] h.: fator de heterogeneidade.

### 2.3.5. Refracionamento das frações mais ativas

Houve diferença no rendimento de extração das frações diclorometânicas do extrato etanólico de folhas de *A. arborescens* e de *D. stramonium* submetidas ao processo de refracionamento, quando comparadas as espécies e os solventes empregados (Tabela 8). Assim, para *A. arborescens* constatou-se alto rendimento com o uso do solvente acetato de etila (52,00%), com valores bem menores nas subfrações metanólica (13,33%) e diclorometânica (17,67%). Já para *D. stramonium*, observaram-se altos rendimentos nas subfrações metanólica (43,33%) e acetato de etila (40,00%) e menor valor na subfração diclorometânica (16,67%).

**Tabela 8.** Rendimento das diferentes subfrações, obtidas através de separação cromatográfica da fração diclorometânica do extrato etanólico de folhas de *Acnistus arborescens* e de *Datura stramonium.*

| Espécie vegetal | Peso inicial (g) | Subfrações | Rendimento | |
|---|---|---|---|---|
| | | | (g) | (%) |
| *Acnistus arborescens* | 3,00 | Diclorometânica | 0,53 | 17,67 |
| | | Acetato de etila | 1,56 | 52,00 |
| | | Metanólica | 0,40 | 13,33 |
| *Datura stramonium* | 3,00 | Diclorometânica | 0,50 | 16,67 |
| | | Acetato de etila | 1,20 | 40,00 |
| | | Metanólica | 1,30 | 43,33 |

[1] Obtido a partir da quantidade (g) da respectiva fração diclorometânica especificada que foi submetida ao refracionamento.

Após o processo de separação cromatográfica, houve redução na bioatividade dos derivados vegetais, constatando-se mortalidade larval variando entre 3,77 e 21,28% para as diferentes subfrações, sem que tenha havido diferença entre os tratamentos e tampouco diferença entre estes e o controle negativo, enquanto no controle positivo a mortalidade foi de 100% das lagartas expostas (Tabela 9).

No que se refere ao peso larval, entretanto, todos os tratamentos suplementados com as subfrações provocaram pesos inferiores em comparação ao controle negativo. O menor peso larval (0,55 mg) foi causado pela subfração metanólica de *D. stramonium*, seguindo-se os tratamentos com a subfração acetato de etila de *A. arborescens* (0,86 mg), acetato de etila de *D. stramonium* (1,10 mg), diclorometânica de *A. arborescens* (1,13) e metanólica de *A. arborescens* (3,30 mg). Ainda que também tenha diferido do controle negativo, o efeito causado pela subfração diclorometânica de *A. arborescens* foi menos acentuado, já que nesse tratamento o peso atingido pelas lagartas (21,87 mg) foi de cerca de 30% do valor atingido no

controle negativo (69,75 mg), enquanto nos demais tratamentos os pesos foram inferiores a 5% do obtido no referido controle (Tabela 9).

Como era de se esperar em razão dos baixos valores de pesos obtidos nas três subfrações de *A. arborescens* e nas subfrações acetato de etila e metanólica de *D. stramonium*, ocorreram, nesses tratamentos, valores de inibição do ganho de peso (94,42 a 99,09%) bem maiores que na subfração diclorometânica de *D. stramonium* (64,84%) (Figura 3).

**Tabela 9**. Médias (± erro padrão) da mortalidade (%), do peso (mg) e da inibição do ganho de peso (%) de *Spodoptera frugiperda* em dieta artificial contendo diferentes subfrações das frações diclorometânica do extrato etanólico de folhas de *Acnistus arborescens* e de *Datura stramonium*, na respectiva concentração letal média ($CL_{50}$) previamente estimada. Temp.: 25±2 ºC; U.R.: 60±10%; fotofase 14 h.

| **Espécie** | **Subfração** | **Mortalidade (%)[1]** | **Peso ± EP (mg)[2]** | **Inibição do ganho de peso (IGP) (%)[3]** |
|---|---|---|---|---|
| *Acnistus arborescens* | Acetato de etila | 18,52 ± 3,21 a | 0,86 ± 0,42 d | 98,60 ± 0,25 (97,96 - 99,25) ab |
| | Metanólica | 5,09 ± 3,42 a | 3,30 ± 0,37 c | 94,42 ± 1,48 (90,62 - 98,22) b |
| | Diclorometânica | 3,77 ± 2,22 a | 1,13 ± 0,09 d | 98,25 ± 0,25 (97,60 - 98,90) ab |
| *Datura stramonium* | Acetato de etila | 14,82 ± 5,59 a | 1,10 ± 0,16 d | 98,30 ± 0,28 (97,60 - 99,01) ab |
| | Metanólica | 21,28 ± 12,27 a | 0,55 ± 0,05 e | 99,09 ± 0,19 (98,59 - 99,59) a |
| | Diclorometânica | 6,67 ± 2,11 a | 21,87 ± 2,5 b | 64,84 ± 6,78 (47,39 - 82,27) c |
| Controle negativo (acet.:met., 1:1) | -- | 5,00 ± 3,42 a | 69,75 ± 9,09 a | -- |
| Controle positivo (Azamax® 1,2 EC) | -- | 100,00 ± 0,00* | -- | -- |
| F | | | 307,51 | |
| *p-valor* | | 0,0073 | < 0,0001 | |

* Intervalos de confiança não foram estimados pela falta de variabilidade;
[1] Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, para cada espécie vegetal (bioensaio), indicam diferença significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição binomial seguido por teste *post hoc* de Tukey $p<0,05$);
[2] Médias seguidas de letras distintas, nas colunas de cada espécie vegetal (bioensaio), indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p<0,05$), o modelo Gamma foi ajustado aos dados utilizando-se a função de ligação do tipo Log;
[3] IGP: médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pela sobreposição dos intervalos de confiança (IC 95%).

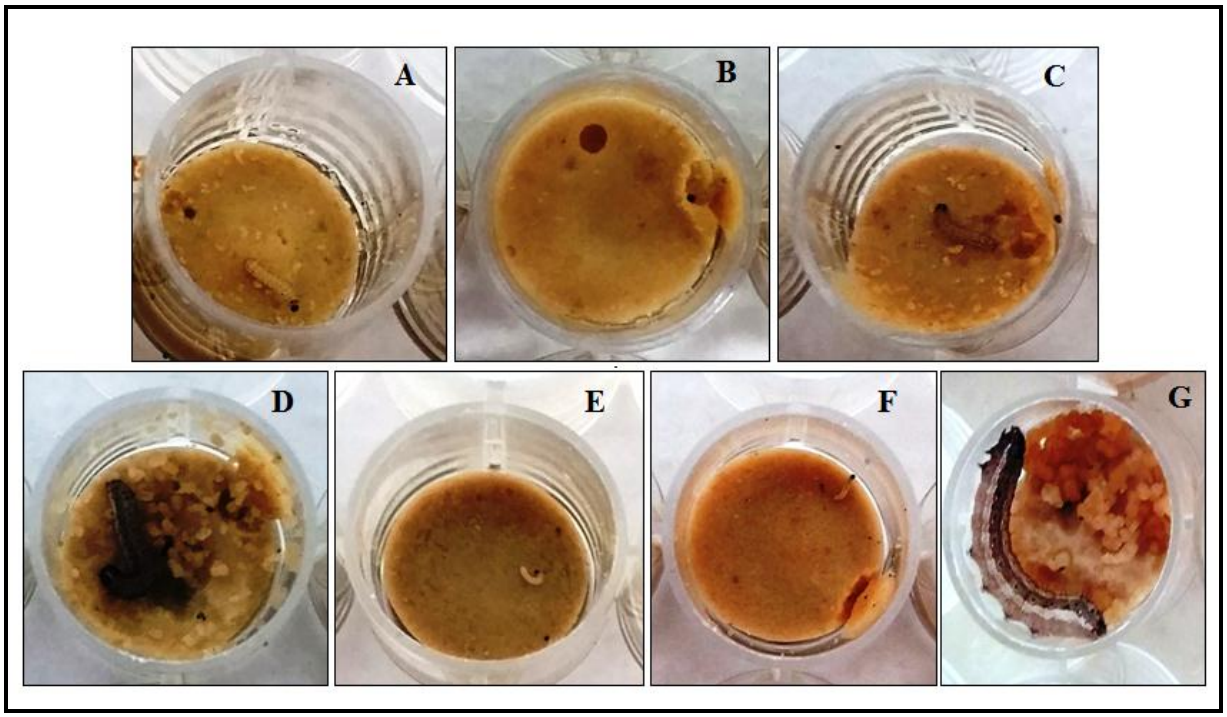



**Figura 3.** Lagartas de *Spodoptera frugiperda* representativa de cada tratamento após sete dias de inoculação em dieta artificial com diferentes subfrações das frações diclorometânica do extrato etanólico de folhas de *Acnistus arborescens* e de *Datura stramonium*, na respectiva concentração letal média ($CL_{50}$). A- Subfração diclorometânica de *A. arborescens*, B- Subfração acetato de etila de *A. arborescens*, C- Subfração metanol de *A. arborescens*, D- Subfração diclorometânica de *D. stramonium*, E- Subfração acetato de etila de *D. stramonium*, F- Subfração metanol de *D. stramonium*, G- Controle negativo (acet.:met., 1:1).

Na Tabela 5 as frações diclorometânicas de *A. arborescens* e *D. stramonium* ocasionaram mortalidades de 62,96 e 33,33%, respectivamente. Entretanto, como observado na Tabela 9, a mortalidade ocasionada pelas subfrações passou a ser similar ao controle negativo após a adoção de um processo de refracionamento. Tal resultado pode estar relacionado a um efeito sinérgico, uma vez que, devido à alta complexidade dos extratos provenientes de plantas, a bioatividade dos compostos pode ser dependente da ação conjunta dos mesmos. Então, à medida que se avança nos processos de semipurificação, ou até mesmo de purificação, pode ocorrer uma redução da bioatividade observada anteriormente.

Smith et al. (2001) relataram ação sinérgica de extratos brutos provenientes da casca de batata, cultivares Majestic e Sharpe's, em caramujos *Helix aspersa* Müller, os quais inibiram a alimentação de forma mais eficiente que os glicoalcaloides puros isolados.

Tak et al. (2015) observaram diferentes interações sinérgicas entre os principais constituintes do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) na avaliação do efeito inseticida e na inibição da alimentação de lagartas de *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Além disso, com o mesmo inseto-modelo, tais efeitos já tinham sido observados por Akhtar et al. (2012), que avaliaram sete óleos essenciais extraídos de diferentes espécies

[*Syzygium aromaticum* (Myrtaceae), *Cinnamomum zeylanicum* (Lauraceae), *Lavendula latifolia*, *Lavendula angustifolia*, *Mentha crispa*, *Mentha arvensis* e *Mentha piperita* (Lamiaceae)].

Com os resultados obtidos no presente bioensaio, é possível, a principio, inferir a ocorrência de sinergismo, porém a comprovação só poderá ser feita por meio de novas investigações químicas, razão pela qual as subfrações metanólicas, diclorometânicas e acetato de etila de *A. arborescens* e de *D. stramonium* foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de ultravioleta e espectrômetro de massas.

### 2.3.6. Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV acoplado ao espectro de massas

Os perfis químicos observados por placas de CCD para *A. arborescens* foram distintos entre as três subfrações (metanólica, acetato de etila e diclorometânica), porém apresentaram um perfil químico muito semelhante quando observados no cromatograma, verificado pela presença de sete bandas cromatográficas nos mesmos tempos de retenção: 15,4; 17,8; 19,3; 20,9; 26,2; 28,4; 29,3 min (Figura 4), indicando presença dos mesmos compostos nas três subfrações, logo, a cromatografia empregada anteriormente para a separação não foi eficiente. A ocorrência dos mesmos compostos nas três subfrações explica os resultados obtidos no item 2.3.5., no qual, os tratamentos de *A. arborescens* não diferiram entre si para os parâmetros mortalidade e inibição do ganho de peso, uma vez que, provavelmente, o(s) composto(s) responsável (is) pela bioatividade estava (m) presente (s) nas três amostras. Ressalta-se ainda, que a fração precursora (no caso, a diclorometânica), havia causado maior efeito letal (mortalidade de 62,96%) em lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda* em comparação com as suas subfrações (18,52, 5,09 e 3,77% para acetato de etila, metanólica e diclorometânica, respectivamente) em igualdade de condições, visto que os compostos ativos estavam em maior concentração na fração diclorometânica, descartando-se dessa forma a ocorrência de ação sinérgica entre os compostos de *A. arborescens.*

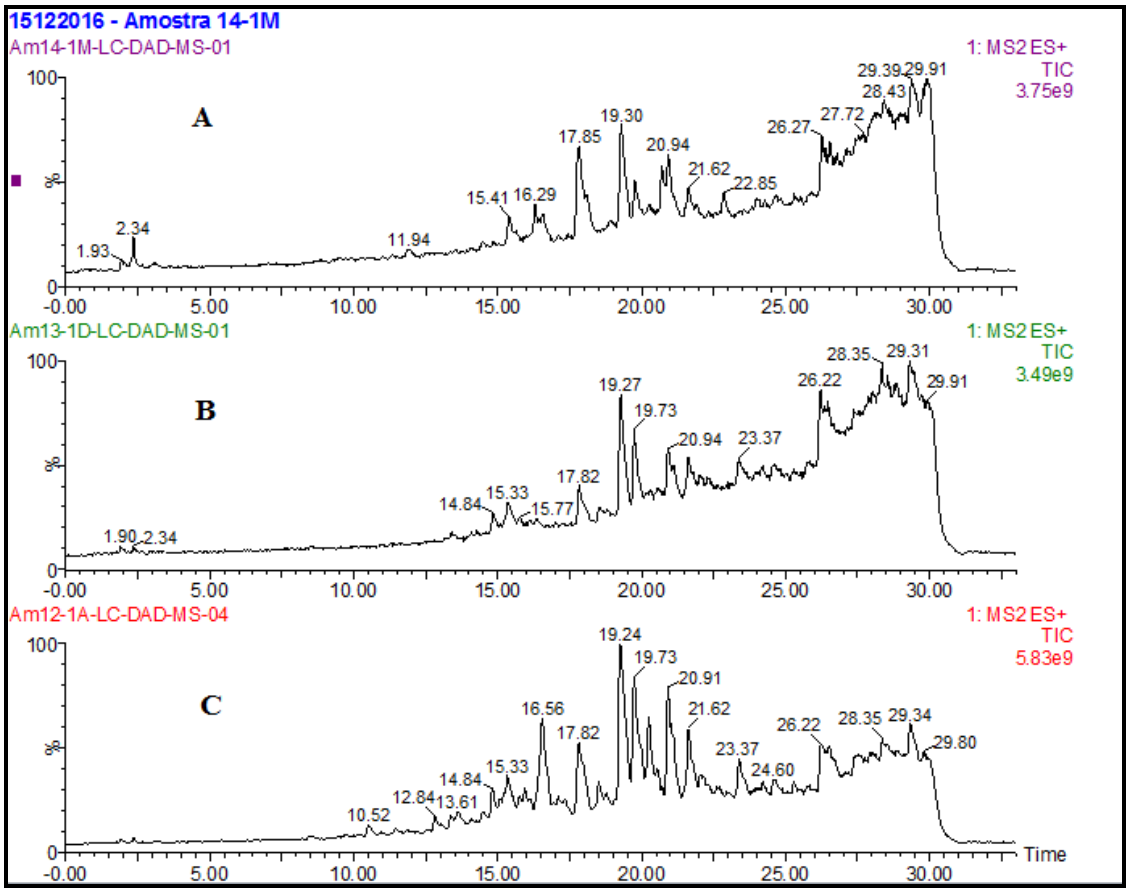



**Figura 4.** Cromatograma das subfrações obtidas da fração diclorometânica de *Acnistus arborescens.* A- Subfração metanólica, B- Subfração diclorometânica, C- Subfração acetato de etila.

Os resultados obtidos para as subfrações de *D. stramonium* foram contrastantes aos citados anteriormente para *A. arborescens*. Para *D. stramonium*, houve presença de muitos compostos minoritários na subfração diclorometânica. Diferente desta, as subfrações de acetato de etila e metanólica apresentaram compostos majoritários e diferentes entre si, sendo que ambas apresentaram duas bandas cromatográficas intensas e majoritárias (Figura 5). Além do mais, pela comparação dos tempos de retenção, os compostos encontrados em *D. stramonium* foram distintos de *A. arborescens.*

A análise do cromatograma elucida os resultados obtidos em bioensaio com as subfrações (item 2.3.5.), uma vez que, a fração diclometânica demonstrou menor bioatividade à espécie-praga em estudo, enquanto que, a subfração metanólica e acetato de etila se mostraram mais ativas para os parâmetros peso e inibição do ganho de peso. Portanto, as discussões serão focadas nas duas subfrações mais promissoras: metanólica e acetato de etila.

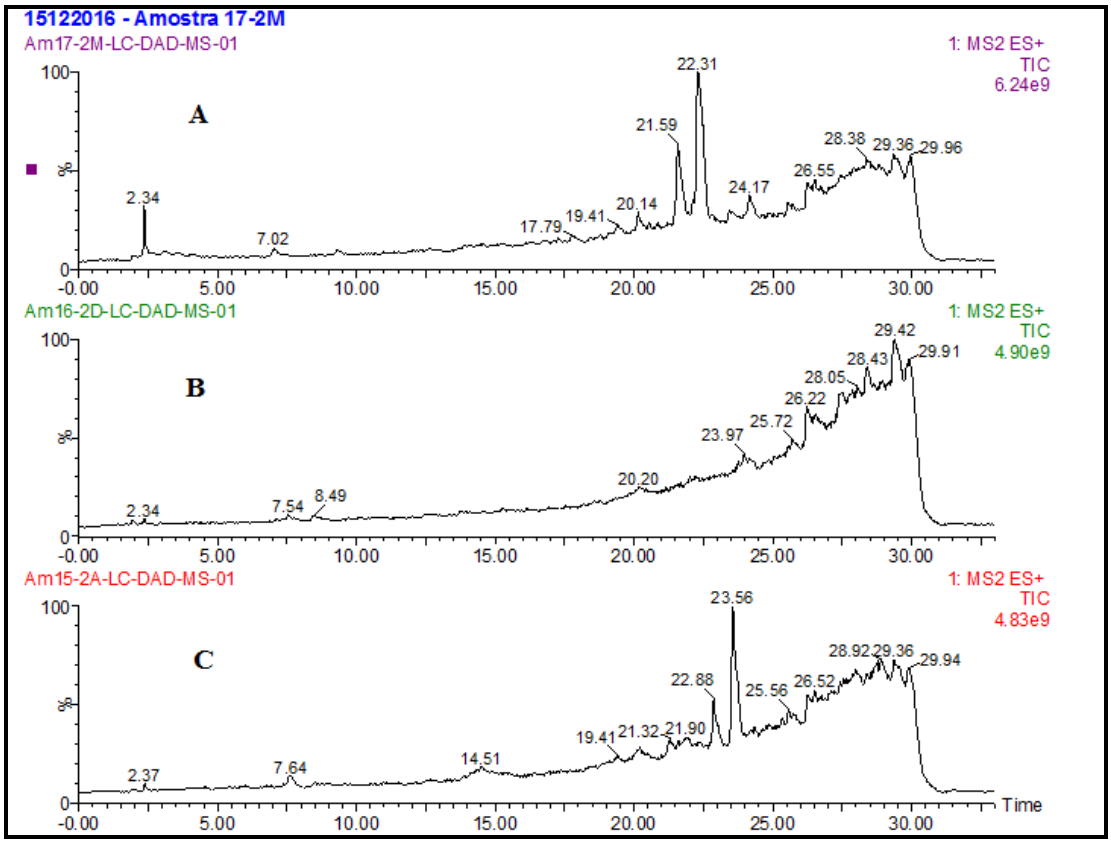



**Figura 5.** Cromatograma das subfrações obtidas da fração diclorometânica de *Datura stramonium.* A- Subfração metanólica, B- Subfração diclorometânica, C- Subfração acetato de etila.

Na subfração metanólica as bandas cromatográficas majoritárias foram as de tempo de retenção ($t_R$) 21,5 e 22,3 min. Observando o cromatograma de arranjo de diodos (Figura 6), observa-se que ambos compostos ($t_R$= 21, 5 min e em $t_R$= 22,3 min) apresentam baixa absorção no UV, com valores de Uv max em 224,4. Isso indica que os compostos nesses tempos de retenção não apresentam cromóforos, ou seja, possuem pouca ou, até mesmo, nenhuma insaturação na sua estrutura molecular.

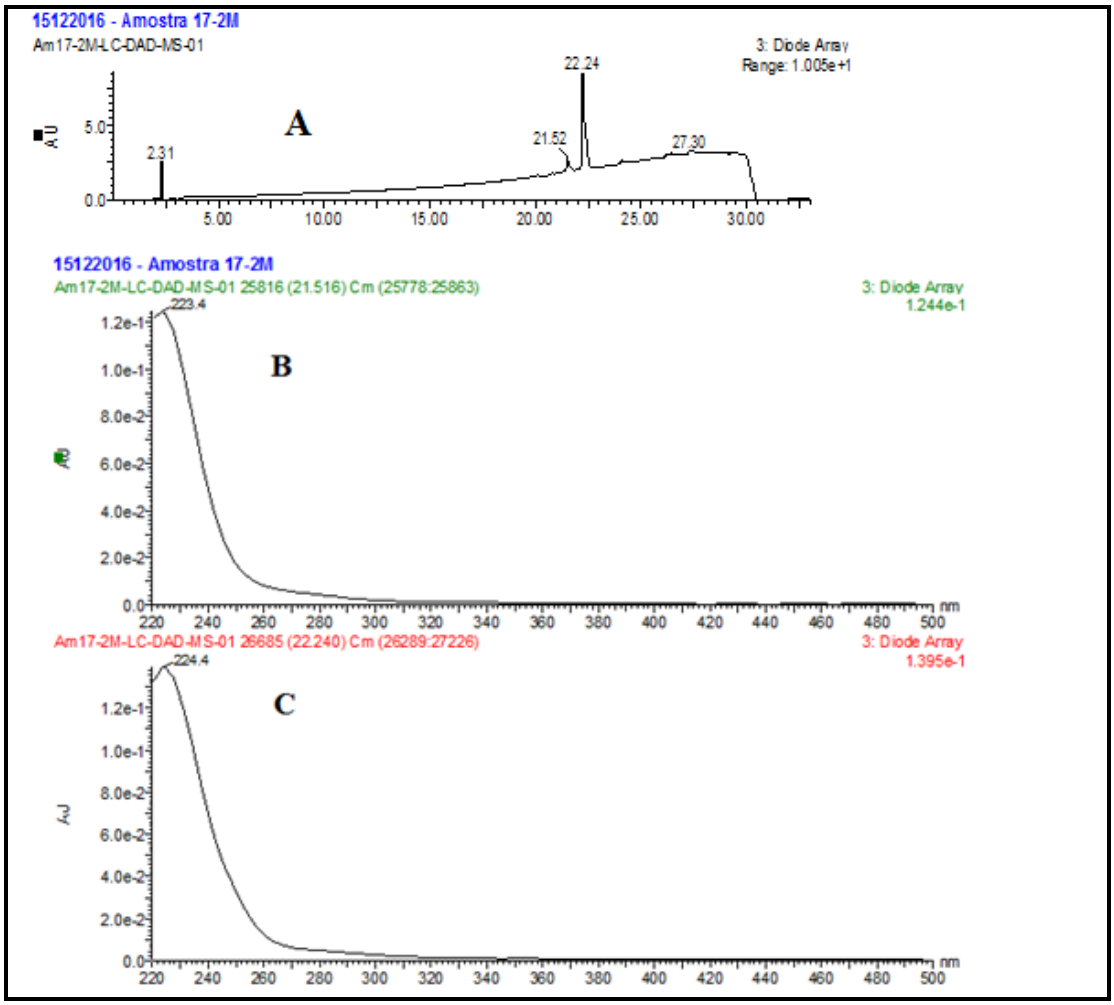



**Figura 6.** Cromatograma da subfração metanólica obtida da fração diclorometânica de *Datura stramonium.* A- Cromatograma, B- Espectro de UV do composto $t_R$= 21 min, C- Espectro de UV do composto $t_R$= 22 min.

Foi realizada ainda análise por espectrometria de massas para os dois compostos majoritários presentes na fração metanólica (Figura 7).

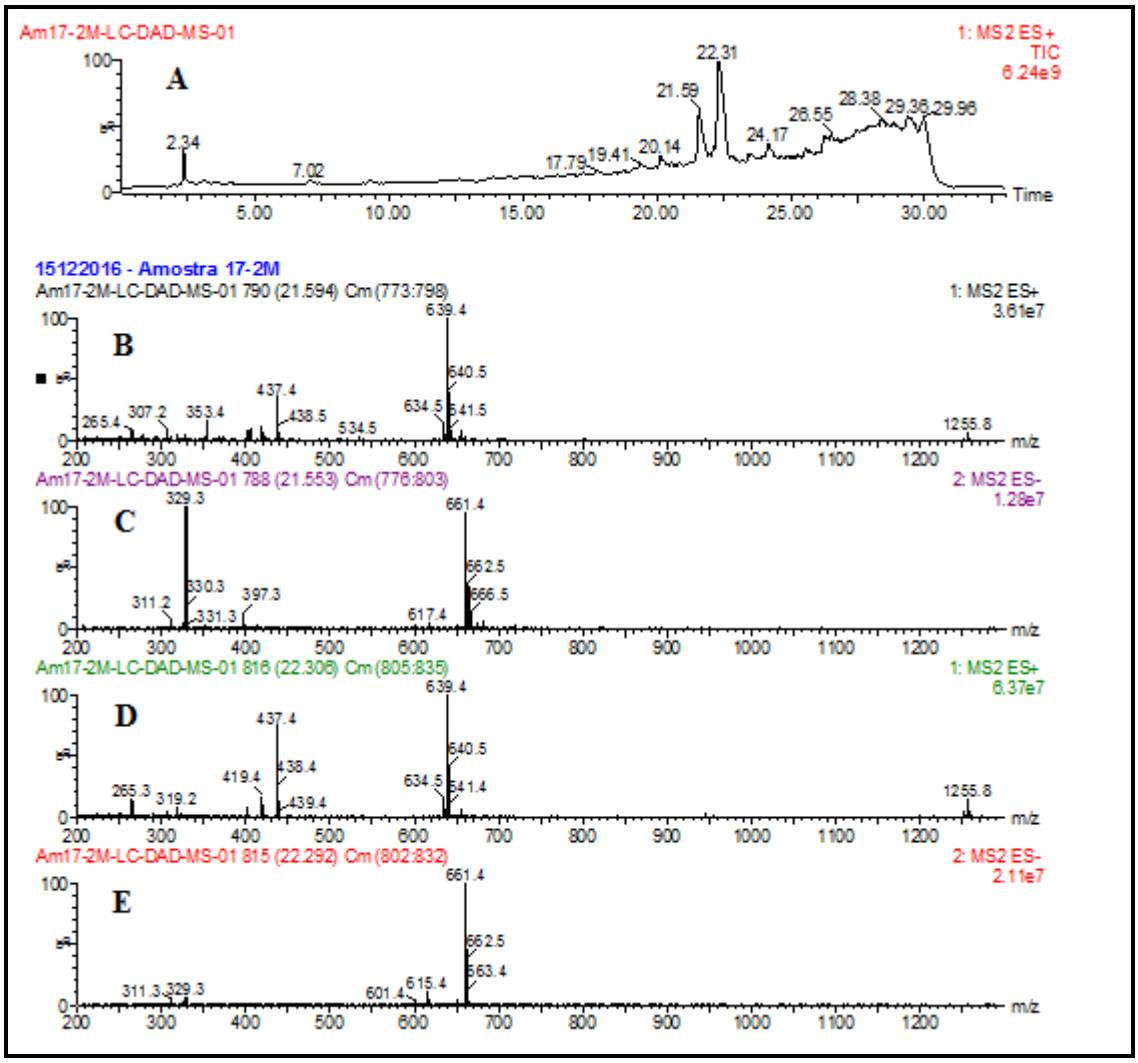



**Figura 7.** Cromatograma de *Datura stramonium* para a subfração metanólica. A- Cromatograma, B- Espectro em modo positivo de massas para o composto $t_R$= 21,5 min, C- Espectro em modo negativo de massas para o composto $t_R$= 21,5 min, D- Espectro em modo positivo de massas para o composto $t_R$= 22,3 min, E- Espectro em modo negativo de massas para o composto $t_R$= 22,3 min.

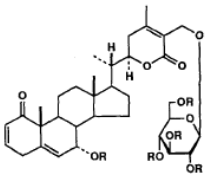
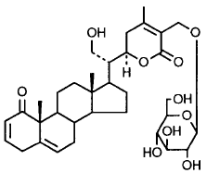
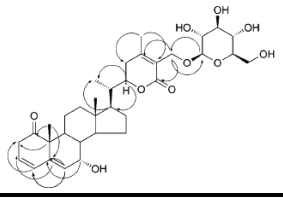
Observa-se que ambos os espectros de massas apresentam os mesmos valores de massa/carga (*m/z*), ou seja, muito provavelmente trata-se de isômeros. No espectro de massas observaram-se os íons moleculares de valores 437,4; 639,4 e 1255,8.

Com base nesses valores, foi realizada uma busca no banco de dados eletrônico *Dictionary of Natural Products* (DNP). Primeiramente, utilizando-se a palavra chave "datura" como fonte biológica e o valor de massa molar de 639 Da, não foi encontrado nenhum composto existente no banco de dados. Já, repetindo a busca com o valor 616 Da, o mesmo foi compatível com quatro compostos citados no banco de dados (Tabela 10), todos de fórmula molecular $C_{34}$ $H_{48}$ $O_{10}$, indicando que o valor *m/z* 639 corresponde $[M+Na]^+$ e o *m/z* 1255 corresponderia ao seu dímero sodiado $[2M+Na]^+$, de modo que a massa molar do

composto corresponderia a 616 Da. Adicionalmente o íon molecular *m/z* 437 corresponderia a $[M\text{-glc- } H_2O + H]^+$.

Entre as possibilidades de compostos, o composto daturametelina I é o único descrito na literatura por apresentar um sinal mais intenso *m/z* 639 $[M+Na]^+$ no modo positivo e um sinal mais intenso no modo negativo *m/z* 661 correspondente a $[M+ COOH]^-$ (Ma et al., 2006). Esses dados são similares aos observados na fração metanólica de *D. stramonium*.

**Tabela 10.** Informações químicas dos compostos compatíveis encontrados no banco de dados.

| Nome do composto e referência na literatura | Número CAS[1] | Fórmula molecular | Fórmula estrutural |
|---|---|---|---|
| daturataturina A (Shingu et al., 1990) | 133360-51-7 | $C_{34}H_{48}O_{10}$ |  R=H |
| daturametelina B (Shingu et al., 1987) | 113683-16-2 | $C_{34}H_{48}O_{10}$ |  |
| daturametelina G (Shingu et al., 1989) | 124853-97-0 | $C_{34}H_{48}O_{10}$ | * |
| daturametelina I (Ma et al., 2006) | 904667-65-8 | $C_{34}H_{48}O_{10}$ |  |

*Não foi localizada a fórmula estrutural do composto.
[1] Número de registro no banco de dados do *Chemical Abstracts Service*.

No que se refere à análise da subfração acetato de etila de *D. stramonium*, as bandas cromatográficas majoritárias foram as de tempo de retenção ($t_R$) 22,8 e 23,5 min. Observando o cromatograma de arranjo de diodos (Figura 8), observa-se que ambos os compostos apresentam baixa absorção no UV, com valores de Uv max em torno de 224. Esse resultado é similar ao da fração metanólica, sugerindo que os compostos nesses tempos de retenção não apresentam cromóforos, ou seja, possuem pouca ou, até mesmo, nenhuma insaturação na sua estrutura molecular.

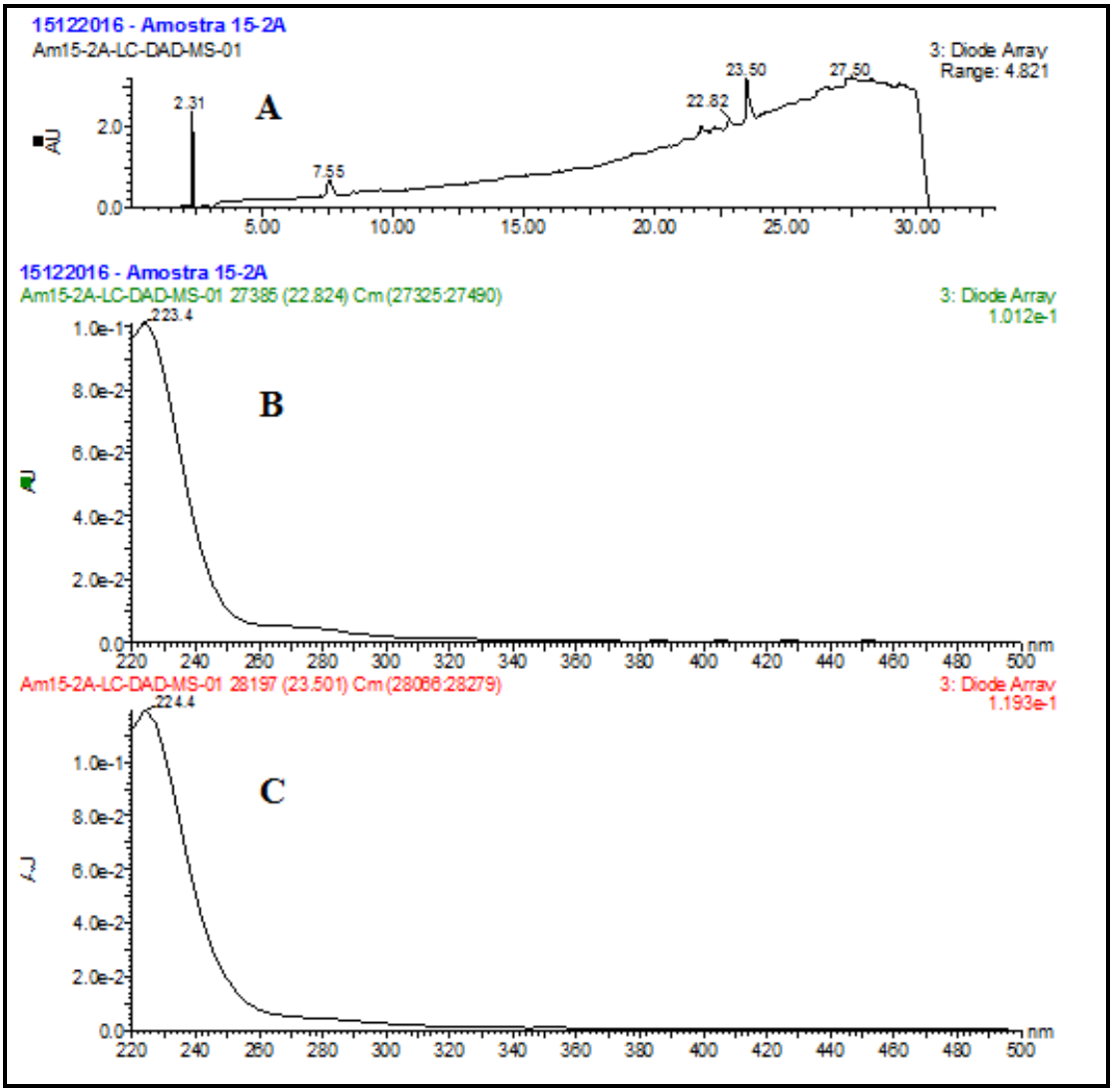



**Figura 8.** Cromatograma da subfração acetato de etila obtida da fração diclorometânica de *Datura stramonium.* A- Cromatograma, B- Espectro de UV do composto $t_R$= 22,8 min, C- Espectro de UV do composto $t_R$= 23,5 min.

Finalmente, foi realizada análise por espectrometria de massas para os dois compostos majoritários presentes na subfração acetato de etila (Figura 9).

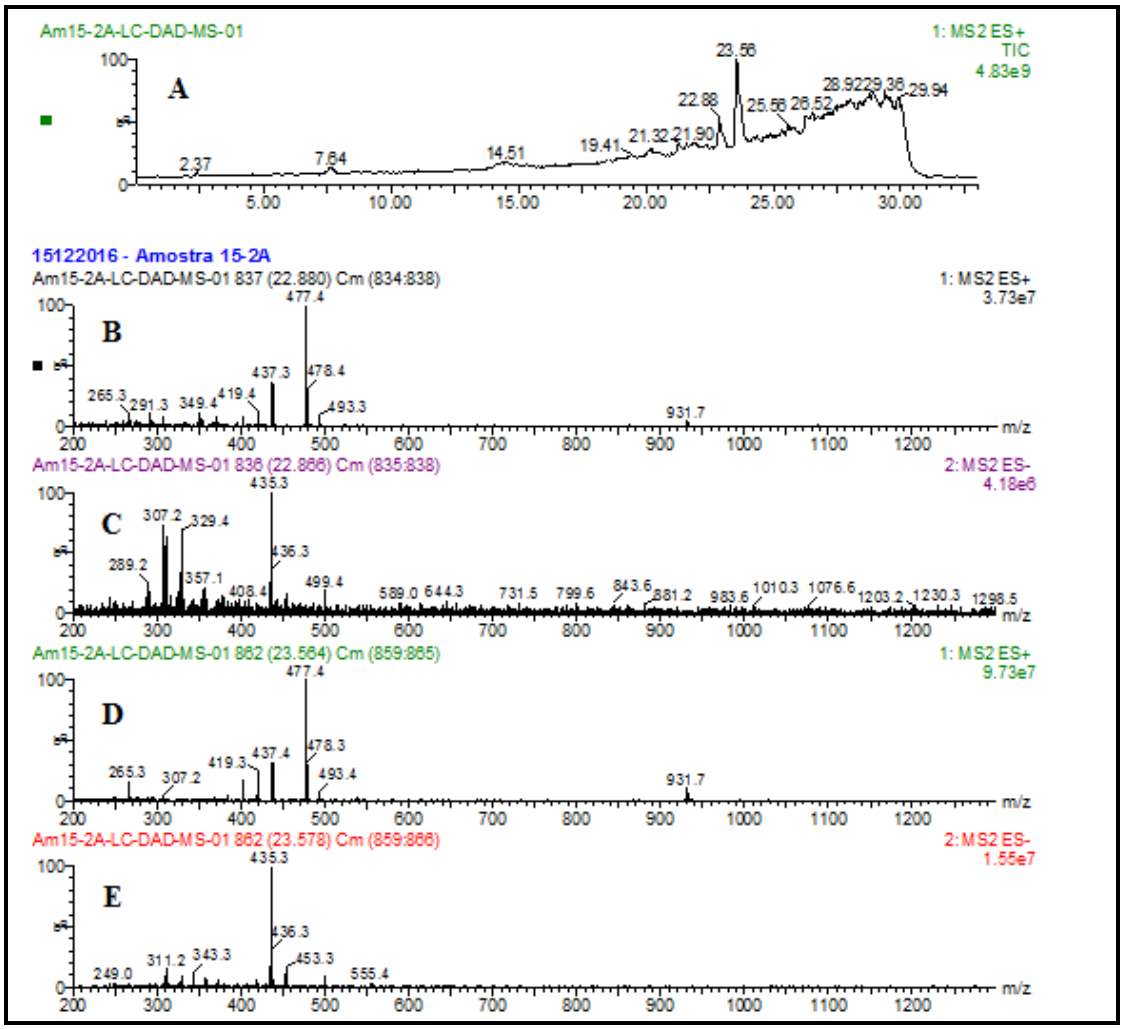
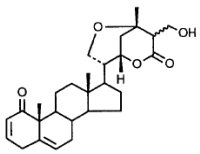
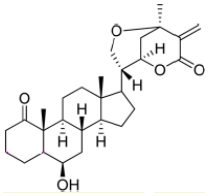



**Figura 9.** Cromatograma de *Datura stramonium* para subfração acetato de etila. A- Cromatograma, B- Espectro em modo positivo de massas para o composto $t_R$= 22,8 min, C- Espectro em modo negativo de massas para o composto $t_R$= 22,8 min, D- Espectro em modo positivo de massas para o composto $t_R$= 23, 5 min, E- Espectro em modo negativo de massas para o composto $t_R$= 23,5 min.

Observa-se que ambos os espectros de massas apresentam os mesmos valores de massa/carga (*m/z*), ou seja, provavelmente trata-se de isômeros. No espectro de massas em modo positivo observaram-se os íons moleculares de valores 437; 477 e 931.

A partir desses resultados foi realizada uma busca, novamente, no banco de dados DNP, utilizando-se a palavra chave "datura" como fonte biológica e o valor de *m/z* de 931, e não foi encontrado nenhum composto compatível com este valor. Porém, com o valor de 454 Da, foram encontrados três compostos compatíveis (Tabela 11), todos de fórmula molecular $C_{28}H_{38}O_5$ , indicando que o valor *m/z* 477 corresponde $[M+Na]^+$ e o *m/z* 931 corresponderia ao seu dímero sodiado $[2M+Na]^+$, caso em que a massa molar do composto corresponderia a 454 Da. Adicionalmente o íon molecular m/z 437 corresponderia a algum fragmento comum à classe dos vitanolidos, como já observado nos compostos presentes na subfração metanólica.

**Tabela 11.** Informações químicas dos compostos compatíveis encontrados no banco de dados.

| Nome do composto e referência na literatura | Número CAS[1] | Fórmula molecular | Fórmula estrutural |
|---|---|---|---|
| daturilinol (Mahmood et al., 1988) | 113706-20-0 | $C_{28}H_{38}O_5$ |  |
| vitatatulina E (Manickam & Ray, 1996) | 185683-93-6 | $C_{28}H_{38}O_5$ | * |
| vitawrightolide (Zhang et al., 2013) | 1416158-08-1 | $C_{28}H_{38}O_5$ |  |

*Não foi localizada a fórmula estrutural do composto.
[1] Número de registro no banco de dados do *Chemical Abstracts Service*.

Todos os compostos compatíveis presentes nas subfrações metanólicas e acetato de etila de *D. stramonium* pertencem à classe química dos vitanolidos, sendo este, um grupo amplamente encontrado na família Solanaceae, principalmente nos gêneros *Acnistus*, *Datura*, *Deprea*, *Dunalis*, *Discopodium*, *Exodeconus*, *Hyoscyamus*, *Iochroma*, *Jaborosa*, *Larnax*, *Lycium*, *Nicandra*, *Physalis*, *Salpichroa*, *Trechonaetes*, *Tubocapsicum*, *Vassobia*, *Withania* e *Witheringia*, sendo todos distribuídos nas regiões temperadas e tropicais (Chen et al., 2011).

Os vitanolidos são compostos pertencentes ao grupo dos vitaesteróides que apresentam um esqueleto ergostano C28 em que os C-26 e C-22 ou C-26 e C-23 são oxidados a fim de formar um δ ou ϒ-lactona e são conhecidos pela diversidade de estruturas envolvendo o núcleo e a cadeia lateral, incluindo a formação de anéis adicionais (Chen et al., 2011)

O primeiro vitanolido isolado, vitaferina A (Figura 10), foi obtido de *Withania somnifera*, e é bastante conhecido por apresentar atividade citotóxica a células cancerígenas (Zhang et al., 2012). Além desse, diversos vitanolidos já foram relatados com atividades citotóxicas (Bellila et al., 2011, Zhang et al., 2013), anti-inflamatória e imunomoduladora (Zhang et al., 2012; Zhang et al., 2013).

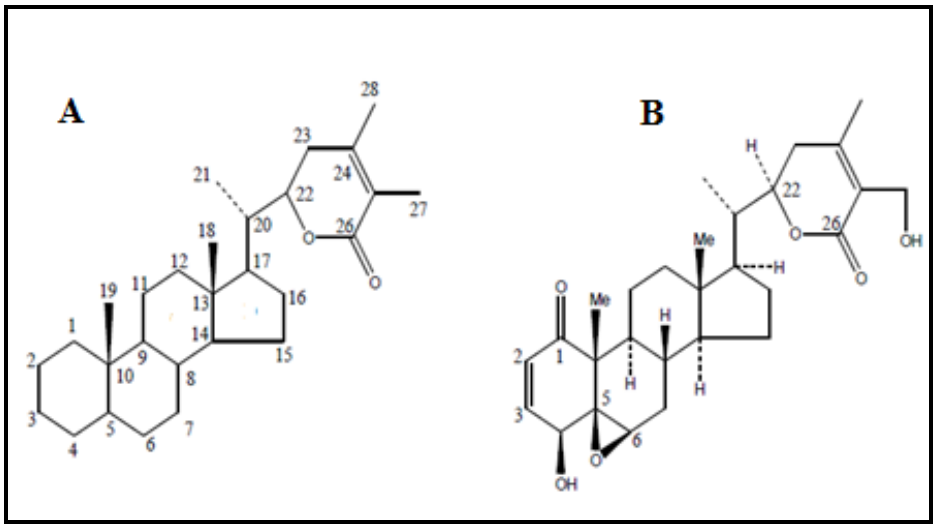



**Figura 10.** A- Estrutura geral da classe dos vitanolidos; B- Estrutura do composto vitaferina A. Fonte: Corrêa, 2015 (Adaptado de Zhang et al., 2012).

Os resultados obtidos nesse trabalho retratam a bioatividade de derivados de *A. arborescens* e *D. stramonium* contra lagartas de *S. frugiperda*, os quais ocasionaram efeitos pronunciado na sobrevivência e ganho de peso no período de sete dias. Com base nos resultados obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV acoplado ao espectro de massas, constatou-se que os compostos responsáveis por esses efeitos pertencem à classe dos vitanolidos. Ainda não havia sido relatada na literatura a bioatividade de derivados de *A. arborescens* e *D. stramonium* em relação a *S. frugiperda*

A partir dessa constatação seria importante a realização de novos estudos com o objetivo de se fazer uma melhor caracterização dos compostos ativos, bem como determinar seu mecanismo de ação sobre o inseto-praga.

## Referências

Abbasipour, H., Mahmoudvand, M., Rastegar, F., Hosseinpour, M.H., 2011. Bioactivities of jimsonweed extract, *Datura stramonium* L. (Solanaceae), against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Turk. J. Agr. Forest. 35, 623-629.

Agrofit, 2016. Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil (acesso 01.03.2016.). Disponível em http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.

Akhtar, Y., Pages, E., Stevens, A., Bradbury, R., Camara, C.A.G., Isman, M.B., 2012. Effect of chemical complexity of essential oils on feeding deterrence in larvae of the cabbage looper. Physiol. Entomol. 37, 81-91.

Ansante, T.F., Ribeiro, L.P., Bicalho, K.U., Fernandes, J.B., Silva, M.F.G.F., Vieira, P.C., Vendramim, J.D., 2015. Secondary metabolites from Neotropical Annonaceae: Screening, bioguided fractionation, and toxicity to *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Ind. Crops Prod. 74, 969-976.

Barros, E.M., Torres, J.B., Bueno, A.F., 2010. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. Neotrop. Entomol. 39, 996-1001.

Bellila, A., Tremblay, C., Pichette, A., Marzouk, B., Mshvildadze, V., Lavoie, S., Legault, J., 2011. Cytotoxic activity of withanolides isolated from Tunisian *Datura metel* L.. Phytochemistry. 72, 2031-2036.

Bimakr, M., Rahman, R.A., Taip, F.S., Ganjloo, A., Salleh, L.M., Selamat, J., Hamid, A., Zaidul, I.S.M., 2011. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. Food. Bioprod. Process .89, 67-72.

Chen, L.X., He, H., Qiu, F., 2011. Natural withanolides: an overview. Nat. Prod. Rep., 28, 705-740.

Chowański, S., Adamski, Z., Marciniak, P., Rosiński, G., Büyükgüzel, E., Büyükgüzel, K., Falabella, P., Scrano, L., Ventrella, E., Lelario F., Bufo, S.A., 2016. A review of bioinsecticidal activity of Solanaceae alkaloids. Toxins. 8, 1-28.

Conab, 2016. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: grãos – Quarto levantamento, safra 2015/2016. Brasília.

Corrêa, J.A.M., 2015. Estudo químico de extratos de plantas da família Solanaceae com atividade a fungos fitopatogênicos. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 164p.

Crombie, L., 1999. Natural product chemistry and its part in the defense against insects and fungi in agriculture. J. Pest. Sci. 55, 761-774.

Devanand, P., Rani, P.U., 2011 Insect growth regulatory activity of the crude and purified fractions from *Solanum melongena* L., *Lycopersicum esculentum* Mill, and *Capsicum annuum* L. J. Biopest. 4, 118-130.

Elango, G., Rahuman, A.A., Kamaraj, C., Bagavan, A., Zahir, A.A., 2011. Efficacy of medicinal plant extracts against malarial vector, *Anopheles subpictus* Grassi. Parasitol. Res. 108, 1437-1445.

Filgueira, F.A.R., 2003. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2. ed. Viçosa: UFV, 412p.

Finney, D.J., 1971. Probit Analysis. Cambridge University Press.

Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Quím. Nova. 30, 374-381.

Greene, G.L., Leppla, N.C., Dickerson, W.A., 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. J. Econ. Entomol. 69, 487-488.

Hardstone, M.C., Scott, J.G., 2010. A review of the interactions between multiple insecticide resistance loci. Pest. Biochem. Phys. 97, 123-128.

Haas, J., Garcia, B.C., Alves, L.F.A., Haida, K.S., 2014. Efeito de extratos aquosos vegetais sobre a lagarta-do-cartucho. Arq. Inst. Biol. 81, 79-82.

Isman, M.B., 2005. Capítulo Seis: Tropical forests as sources of natural insecticides. Recent Adv. Phytochem. 39, 145-161.

Isman, M.B., Miresmailli, S., Machial, C., 2011. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. Phytochem. Rev. 10, 197-204.

Jeyasankar, A., Premalatha, S., Elumalai, K., Krishnappa, K., 2012a. Biological activities of *Solanum pseudocapsicum* (Solanaceae) against cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner and armyworm, *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). Asian. Pac. J. Trop. Biomed. 2, 981-986.

Jeyasankar, A., Premalatha, S., Rani, S.J., 2012b. Bio-efficacy of *Solanum pseudocapsicum*

L. (Solanaceae) against black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae). J. Biol. Sci. 12, 174-179.

Kareru, P., Rotich, Z.K., Maina, E.W., 2013. Capítulo Dez: Use of botanicals and safer insecticides designed in controlling insects: the African case. Insecticides - Development of safer and more effective technologies.

Knapp, S., Bohs, L., Nee, M., Spooner, D.M., 2004. Solanaceae – a model for linking genomics with biodiversity. Comp. Funct. Genomics. 5, 285-291.

Kumar, P.M., Murugan, K., Kovendan, K., Panneerselvam, C., Kumar, K.P., Amerasan, D., Subramaniam, J., Kalimuthu, K., Nataraj, T., 2012. Mosquitocidal activity of *Solanum xanthocarpum* fruit extract and copepod *Mesocyclops thermocyclopoides* for the control of dengue vector *Aedes aegypti*. Parasitol. Res. 111, 609-618.

Ma, L., Xie, C.M., Li, J., Lou, F.C., Hu, L.H., 2006. Daturametelins H, I, and J: three new withanolide glycosides from *Datura metel* L.. Chem. Biodivers. 3, 180-186.

Mahmood, T., Ahmad, S.S., Siddiqui, S., 1988. A new withanolide from the leaves of *Datura metel*. Heterocycl. 27, 101-103.

Manickam, M., Ray, A.B., 1996, Structure of withatatulin E, a minor withanolide of *Datura tatula*. Indian J. Chem. 35, 1311-1313.

Mehrabadi, M., Bandani, A.R., Saadati, F., Mahmudvand, M., 2011. A-amylase activity of stored products insects and its inhibition by medicinal plant extracts. J. Agric. Sci. Technol. 13, 1173-1182.

Mordue (Luntz), A.J., Nisbet, A.J., 2000. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. An. Soc. Entomol. Brasil. 29, 615-632.

Moreira, M.D., Picanço, M.C., Silva, E.M., Moreno, S.C., Martins, J.C., 2006. Capítulo cinco: Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas. Controle alternativo de pragas e doenças. 89-116.

Nelder, J.A., Wedderburn, R.W.M., 1972. Generalized linear models. J. R. Stat. Soc.135, 370-384.

Oliveira, M.S.S., Roel, A.R., Arruda, E.J., Marques, S.A., 2007. Eficiência de produtos vegetais no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda*. Ciênc. Agrotec. 31, 326-331.

Panneerselvam, A., Ramya, S., Gopinath, K., Periyathambi, N., Jayakumararaj, R., Aruna, D., 2013. Biopesticidal effect of ethyl acetate leaf extracts of *Datura metel* L. (Solanaceae) on the larvae of *Helicoverpa armigera* (Hübner). Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res., 18, 150-154.

Pavão, A.R., Filho, J.B.S.F., 2011. Impactos econômicos da introdução do milho *Bt*11 no Brasil: uma abordagem de equilíbrio geral inter-regional. Resr. 49, 81-108.

Pinto, F.C.L., Ucho, D.E.A., Silveira, E.R., Pessoa, O.D.L., Braz-Filho, R., Silva, F.M., Theodoro, P.N. E.T., Espíndola, L.S., 2011. Glicoalcaloides antifúngicos, flavonoides e outros constituintes químicos de *Solanum asperum*. Quím. Nova. 34, 284-288.

Pitta, R.M., 2010. Bioatividade de extratos orgânicos de meliáceae e óleos essenciais de piperáceae sobre *Rhopalosiphum maidis* (Hemiptera: Aphididae). Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 101p.

R Development Core Team, 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.

Sanchez, L.E.C., Osornio, J.J.J., Herrera, M.A.D., 2010. Secondary metabolites of the Annonaceae, Solanaceae and Meliaceae families used as biological control of insects. Trop. Sub. Agro. 12, 445-462.

SAS Institute, 2011. Statistical analysis system: getting started with the SAS learning Version 9.2. NC: SAS Institute.

Shingu, K., Kajimoto, T., Furusawa, Y., Nohara, T., 1987. The structures of daturametelin A and B. Chem. Pharm. Bull. 35, 4359-4361.

Shingu, K., Furusawa, Y., Nohara, T., 1989. New withanolides, daturametelins C, D, E, F, and G-Ac from *Datura metel.* (Solanaceous studies. XIV). Chem. Pharm. Bull. 37, 2132-2135.

Shingu, K., Furusawa, Y., Nohara, T., 1990. New withanolides, daturatatarins A and B from *Datura tatura* L..Chem. Pharm. Bull. 38, 3485-3487.

Silva, T.M.S., Carvalho, M.G., Braz-Filho, R., Agra, M.F., 2003. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). Quím. Nova**.** 26, 517-522.

Smith, D.B., Roddick, J.G., Jones, J.L., 2001. Synergism between the potato glycoalkaloids α-chaconine and α-solanine in inhibition of snail feeding. Phytochemistry. 57, 229-234.

Stehmann, J.R., Mentz, L.A., Agra, M.F., Vignoli-Silca, M.; Giacomin, L., 2015. Solanaceae. Lista de Espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro (acesso 19.12.2015). Disponível em http://floradobrasil.jbrj.gov.br/.

Tak, J.H., Jovel, E., Isman, M.B., 2015. Comparative and synergistic activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil constituents against the larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). Pest Manage. Sci. 72, 474-480.

Throne, J.E., Weaver, D.K., Chew, V.B., James, E., 1995. Probit analysis of correlated data: multiple observations over time at one concentration. J. Econ. Entomol. 88, 1510-1512.

Waquil, J.M., Villela, F.M.F., Foster, J.E., 2002. Resistência do milho (*Zea mays* L.) transgênico (*Bt*) à lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). R. B. M. S. 1, 1-11.

Wongkittipong, R., Prat, L., Damronglerd, S., Gourdon, C., 2004. Solid-liquid extraction of andrographolide from plants - experimental study, kinetic reaction and model. Sep. Purif. Technol. 40, 146-154.

Zhang, H., Motiwala, H., Samadi, A., Day, V., Aubé, J., Cohen, M., Kindscherd, K., Gollapudia, R., Timmermann, B., 2012. Minor withanolides of *Physalis longifolia*: structure and cytotoxicity. Chem. Pharm. Bull. 60, 1234-1239.

Zhang, H., Bazzill, J., Gallagher, R.J., Subramanian, C., Grogan, P.T., Day, V.W., Kindscher, K., Cohen, M.S., Timmermann, B.N., 2013. Antiproliferative withanolides from *Datura wrightii.* J. Nat. Prod. 76, 445-449.

# 3. EFEITO DE DERIVADOS DE *Acnistus arborescens* E *Datura stramonium* (SOLANACEAE) NO DESENVOLVIMENTO E CONSUMO ALIMENTAR DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH)


## Resumo

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma praga de grande importância, principalmente na cultura do milho, em razão dos elevados danos causados e por estar adquirindo resistência às principais táticas de controle. Os inseticidas botânicos são considerados uma alternativa promissora para o manejo dessa espécie-praga. Por isso, por meio de bioensaios de ingestão, foi avaliada a influência dos extratos brutos etanólicos e das frações diclorometânicas das solanáceas *Acnistus arborescens* (L.) Schltdl. e *Datura stramonium* (L.) sobre parâmetros biológicos de *S. frugiperda*, além dos efeitos das frações no consumo alimentar. Os extratos brutos de *D. stramonium* e *A. arborescens*, na concentração de 4.000 mg kg $^{-1}$, aumentaram a mortalidade das fases larval e pupal e a duração da fase larval além reduzirem o peso de pupas e causarem deformação destas em comparação aos controles negativos. No ensaio biológico com as frações diclorometânicas, na concentração letal mediana, ocorreu 100% de mortalidade no tratamento suplementado com *A. arborescens* e 83,19% no tratamento com *D. stramonium*, sendo que, este último diferiu do controle negativo, com valores superiores, para duração da fase larval, deformação de pupas e adultos e com valores inferiores para peso de pupas. Além disso, no teste de consumo alimentar com lagartas de quarto ínstar de *S. frugiperda*, nas concentrações das $CL_{25}$, $CL_{50}$ e $CL_{90}$, constatou-se inibição da alimentação em todos os tratamentos testados, com valores de consumo inferiores aos verificados nos controles negativos, e no caso das $CL_{50}$ e $CL_{90}$ de *A. arborescens*, também inferiores ao registrado com Azamax® 1,2 EC (controle positivo).


**Palavras-chave:** Antibiose; Antixenose; Dieta; Ingestão; Lagarta


## Abstract

The fall armyworm**,** *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), is a pest of great importance, mainly for the corn cultivation, due to the high damage caused and to the resistance to the main control tactics. Botanic insecticides are considered a promising alternative for the management of this pest species. Therefore, by means of ingestion bioassays, the influence of the crude ethanolic extracts and the dichloromethane fractions of the Solanaceae *Acnistus arborescens* (L.) Schltdl and *Datura stramonium* (L.) were evaluated on biological parameters of *S. frugiperda*, in addition to the effects of fractions on food consumption. The crude extracts of *D. stramonium* and *A. arborescens*, at a concentration of 4,000 mg kg$^{-1}$, increased larval and pupal phase mortality and larval stage duration, as well as reducing pupal weight and causing pupal

deformation in comparison to negative controls. In the biological assay with the dichloromethane fractions, applying their $CL_{50}$, 100% mortality occurred in the treatment supplemented with *A. arborescens* and 83.19% in the treatment with *D. stramonium*. The latter differed from the negative control with higher values for the duration of the larval phase, deformation of pupae and adults, and with lower values for pupal weight. In addition, in the test of food consumption of *S. frugiperda* fourth-instar caterpillars, in the $CL_{25}$, $CL_{50}$ and $CL_{90}$ concentrations, feeding inhibition was observed in all tested treatments, with consumption values lower than those observed in the negative controls, and in the case of $CL_{50}$ and $CL_{90}$ of *A. arborescens*, the values were also lower than those observed with Azamax® 1,2 EC (positive control).

**Keywords:** Antibiosis; Antixenosis; Diet; Ingestion; Caterpillars

## 3.1. Introdução

A lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma das mais importantes pragas da cultura no milho, no Brasil (Cruz, 1995), causando prejuízos em relação à produtividade e à qualidade do produto final. A principal tática para seu controle é por meio do uso de inseticidas sintéticos, os quais são mais eficientes quando empregados antecipadamente, ou seja, com baixa infestação da praga (Silva, 1998). Com a aprovação da comercialização do milho *Bt*, que expressa às toxinas da bactéria *Bacilus thuringiensis*, houve, nos primeiros anos, diminuição do uso de inseticidas químicos, porém, atualmente em várias regiões do país podem ocorrer até 15 aplicações de inseticidas sintéticos durante todo o ciclo da cultura (Valicente, 2015), resultando em populações resistentes não só aos inseticidas sintéticos como também às proteínas *Bt* expressas nos genótipos, como foram reportados em campo para *S. frugiperda* (Farias et al., 2014; Omoto et al., 2016).

Diante disso, tem se buscado o emprego de táticas alternativas para o controle de *S. frugiperda* e a utilização de produtos de origem vegetal tem demonstrado ser uma alternativa viável e bastante promissora, principalmente por se enquadrarem em programas de manejo integrado de pragas (Sâmia et al., 2009).

Os produtos de origem vegetal são provenientes do metabolismo secundário de plantas, o qual é responsável, principalmente, pela defesa vegetal. Segundo Castro et al. (2006), as pesquisas sobre utilização dos metabólitos secundários de plantas no controle de pragas, os denominados inseticidas botânicos, vêm crescendo consideravelmente, uma vez que é desejável a utilização de produtos menos persistentes no meio ambiente e nos alimentos, com menor toxicidade a mamíferos e maior seletividade aos organismos benéficos.

No controle de insetos-praga, os produtos botânicos podem ser utilizados diretamente como inseticidas, na forma de extratos, pós ou óleos essenciais, ou ainda para obtenção de compostos ativos. Esses extratos apresentam rápida degradação pela ação da luz e da temperatura, tendo, portanto, baixa permanência no ambiente, e mesmo que exijam um maior número de aplicações é vantajoso já que não deixam resíduos (Vendramim & Castiglioni, 2000).

Diversos estudos já demonstraram que algumas espécies da região tropical produzem uma ampla gama de metabólitos secundários com bioatividade contra insetos-praga (Isman, 2005). Entre as principais famílias botânicas já estudadas, inclui-se Solanaceae, que apresenta extensa distribuição na região tropical e contém espécies ricas em metabólitos secundários (Lee, 2006), alguns dos quais já relatados com bioatividade contra insetos (Kanteh & Norman, 2015). A nicotina, proveniente das solanáceas *Nicotiana tabacum* L. e *Nicotiana rustica* L., foi o primeiro e mais importante alcaloide com atividade inseticida a ser utilizado extensivamente. Outros alcaloides relacionados são encontrados nessas espécies como a nornicotina e a anabasina, os quais atuam como agonistas do neurotransmissor acetilcolina (Isman, 2006).

Diversas espécies de solanáceas têm se demonstrado passíveis de serem incorporadas ao manejo de pragas. Experimentos preliminares deste trabalho permitiram destacar duas espécies: *Acnistus arborescens* (L.) Schltdl e *Datura stramonium* L. Conhecida popularmente como fruto-do-sabiá, *A. arborescens* é um arbusto nativo e com distribuição nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil (Stehmann et al., 2015), sendo abundante em vitanolidos com atividades citotóxicas (Minguzzi et al., 2002; Cordero et al., 2009). Já *D. stramonium* é nativa da América Central e possui uma grande quantidade de alcaloides do tipo tropano distribuídos por toda a planta e, embora a maior concentração esteja nas sementes (Fowler, 2015), há relatos de atividade em insetos tanto com extratos provenientes de sementes, quanto de folhas (Abbasipour et al., 2011; Mehrabadi, 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos de extratos brutos etanólicos e de frações diclorometânicas de *A. arborecens* e de *D. stramonium* em parâmetros biológicos, bem como o comportamento alimentar de *S. frugiperda* em dieta artificial suplementada com as frações, em testes laboratoriais, em comparação a um inseticida comercial de origem natural [Azamax® 1,2 EC (UPL Brasil, Ltd., Campinas, São Paulo, Brasil)].

## 3.2. Material e métodos

### 3.2.1. Manutenção da população de insetos em laboratório

A população de *S. frugiperda* foi mantida em laboratório sob condições controladas (temperatura de 25±1 $^{o}$C, U.R. de 60±10% e fotofase de 14 h). As lagartas foram acondicionadas em copos plásticos e alimentadas com dieta artificial proposta por Greene et al. (1976), enquanto os adultos foram mantidos com solução de mel a 10% (p/v) em tubos de PVC.

### 3.2.2. Obtenção e preparo dos extratos e frações

As folhas de *A. arborescens* foram coletadas no Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP) (22°42'30.2"S 47°38'38.2"W), em Piracicaba, São Paulo, Brasil, enquanto as folhas de *D. stramonium* foram obtidas no Sítio Retiro (21°12'03.5"S 45°09'54.5"W), em Lavras, Minas Gerais, Brasil. Uma exsicata de cada uma das espécies foi depositada no herbário ESA, do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP).

Inicialmente, as folhas foram lavadas em água corrente e secas em estufa com circulação forçada de ar a 40 $^{o}$C por um período de 48-72 h, sendo posteriormente trituradas em um moinho de facas e armazenadas em frascos de vidro hermeticamente fechados.

O processo de extração adotado para a obtenção dos extratos brutos foi o de maceração a frio com solvente etanol. O pó proveniente das folhas secas foi misturado ao solvente e submetido à agitação constante por 3 min, sendo mantido em repouso por três dias e, após esse período, filtrado em papel filtro. Tal procedimento foi repetido por três vezes, totalizando três extrações. A cada extração, os solventes das amostras filtradas eram eliminados utilizando-se um rotaevaporador a 50 ºC e à pressão de -600 mmHg, obtendo-se, assim, o extrato bruto etanólico das duas espécies.

Visando obter frações bioativas dos extratos brutos foi adotado o processo de separação líquido-líquido dos mesmos. Para isso, os extratos foram ressuspendidos em água e metanol (1,5:1,v/v) e particionados em um funil de separação. O processo de separação iniciou-se com 500 mL do solvente apolar hexano, e após três filtragens, a amostra solubilizada do extrato bruto foi submetida ao rotoevaporador até a obtenção da fração aquosa, a qual, posteriormente, foi particionada com solvente diclorometano. Dessa forma, foram obtidas três frações: hexânica, diclorometânica e aquosa. Em testes preliminares a

fração diclorometânica se mostrou mais bioativa a *S. frugiperda*, sendo, por isso, selecionada para estudos posteriores.

### 3.2.3. Bioensaios

Todos os bioensaios foram realizados com as condições laboratoriais controladas citadas no item 3.2.1. e sob delineamento experimental inteiramente aleatorizado.

#### 3.2.3.1. Efeito dos extratos brutos sobre parâmetros biológicos de *S. frugiperda*

O efeito dos extratos brutos de *A. arborescens* e *D. stramonium* foram avaliados na concentração de 4.000 mg $kg^{-1}$. Para isso, os extratos foram solubilizados em 6 mL de uma solução de solventes [acetona: metanol (1:1,v/v)] e incorporados em 600 g da dieta artificial (proposta por Greene et al., 1976), seguindo o procedimento descrito por Ansante et al. (2015). Para evitar a degradação dos compostos termolábeis, os extratos foram incorporados na dieta quando esta se encontrava a 50 $^{o}$C. Foi utilizado como controle positivo um inseticida comercial de origem botânica [Azamax® 1,2 EC (UPL Brasil, Ltd., Campinas, São Paulo, Brasil)], incorporado na concentração recomendada (4.000 mg $kg^{-1}$) para controle de *S. frugiperda* na cultura do milho no Brasil (Agrofit, 2016). Além disso, foram estabelecidos dois controles negativos: água destilada e acetona mais metanol (1:1,v/v), ambos no mesmo volume (6 mL) utilizado para a solubilização do controle positivo e dos extratos, respectivamente, totalizando, assim, cinco tratamentos.

Após a incorporação dos tratamentos ao meio artificial, depositaram-se 6 mL da dieta em tubos de ensaio de vidro com fundo chato (8,5 cm de altura x 2,5 cm de diâmetro), no qual foi infestada uma lagarta recém eclodida (< 24h de idade) de *S. frugiperda*. Foram utilizadas 10 repetições por tratamento, sendo cada repetição representada por 8 tubos (n=80 lagartas).

As avaliações foram realizadas diariamente até a emergência dos adultos. Os parâmetros avaliados foram: mortalidade e duração das fases larval e pupal, peso de pupas com 24 h e porcentagem de pupas e de adultos defeituosos.

#### 3.2.3.2. Efeito das frações diclorometânicas sobre parâmetros biológicos de *S. frugiperda*

Neste bioensaio, as frações diclorometânicas, em suas respectivas concentrações letais medianas ($CL_{50}$), estimadas anteriormente para *A. arborescens* (3.694 mg $kg^{-1}$) e para *D.*

*stramonium* (4.088 mg $kg^{-1}$), foram incorporadas em 600 g de dieta artificial. Para isso, foram adotados os mesmos procedimentos citados no item 3.2.3.1., utilizando-se, entretanto, apenas um controle negativo (acetona: metanol), totalizando três tratamentos, os quais foram constituídos de 12 repetições contendo 10 tubos (n=120 lagartas).

### 3.2.3.3. Efeito das frações diclorometânicas sobre o consumo alimentar de *S. frugiperda*

O efeito das frações diclorometânicas no consumo alimentar de lagartas de quarto ínstar de *S. frugiperda* foi avaliado em um bioensaio sem chance de escolha. Para isso, a dieta artificial foi suplementada com as concentrações letais 25, 50 e 90 (concentrações necessárias para matar 25, 50 e 90% da população, respectivamente). Foram utilizados os valores equivalentes a 1.966, 3.694 e 8.739 mg $kg^{-1}$, respectivamente, para $CL_{25}$, $CL_{50}$ e $CL_{90}$ de *A. arborescens*. Já para *D. stramonium* foram 2.025 mg $kg^{-1}$ ($CL_{25}$), 4.088 mg $kg^{-1}$ ($CL_{50}$) e 10.670 mg $kg^{-1}$ ($CL_{90}$). Neste bioensaio foi adotada a mesma metodologia do item 3.2.3.1., com exceção da quantidade de dieta artificial para a incorporação das frações, que, nesse caso, foi de 150 g.

Todos os tratamentos foram acondicionados em caixas plásticas (11 x 11 x 3,5 cm) do tipo Gerbox (J Prolab® Ind. e Com. de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e, após 24 h da deposição, as dietas referentes aos mesmos foram cortadas em pedaços de 1,5 cm x 1,5 cm a fim de serem oferecidos às lagartas. Posteriormente, os pedaços foram pesados e colocados no centro de placas de Petri (5,5 cm de diâmetro). Lagartas de quarto ínstar de *S. frugiperda* foram mantidas em placas de Petri (15 cm) por 6 a 7 horas sem alimento. Foram selecionadas para o bioensaio as lagartas mais ativas, as quais foram individualizadas no centro de cada placa. O bioensaio foi constituído de nove tratamentos, cada um com 25 repetições.

Após 24 h, o meio artificial remanescente nas amostras foi pesado para se calcular o consumo alimentar das lagartas a partir da diferença entre o peso inicial e o final. Para determinar a perda de água sofrida pela dieta artificial, foi mantida uma alíquota correspondente a 10 pedaços inteiros que foram pesados no início e no final do experimento. A média dos pesos dos 10 pedaços foi considerada como o peso inicial de cada pedaço de dieta artificial oferecida às lagartas.

### 3.2.4. Análise dos dados

Os dados de mortalidade larval e pupal e de pupas e adultos defeituosos referentes aos bioensaios sobre parâmetros biológicos foram analisados através de um modelo linear generalizado (GLM) (Nelder & Wedderburn, 1972) com distribuição do tipo binomial. Por sua vez, para análise dos dados referentes ao peso pupal e à duração das fases larval e pupal, utilizou-se um GLM com distribuição do tipo gaussiana para o bioensaio com extratos brutos. A verificação da qualidade do ajuste dos dados aos modelos foi feita por meio do uso do gráfico meio-normal de probabilidades com envelope de simulação (Hinde & Demétrio, 1998). Havendo diferença significativa entre os tratamentos, foram realizadas comparações múltiplas (teste *pos hoc* de Tukey, $p < 0,05$) por meio da função "glht" do pacote Multicomp com ajuste dos valores de *p*.

Já para comparação das médias do bioensaio suplementado com as frações diclorometânicas foi utilizado o teste *t* de student para avaliação do peso pupal e da duração das fases larval e pupal.

Finalmente, os dados referentes ao consumo alimentar das lagartas foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. Todas essas análises foram realizadas utilizando-se o software estatístico R, versão 2.15.1 (R Development Core Team 2012).

## 3.3. Resultados e discussão

### 3.3.1. Efeito dos extratos brutos sobre parâmetros biológicos de *S.frugiperda*

Não houve diferença significativa entre os tratamentos contendo extratos brutos de *D. stramonium* e de *A. arborescens* para mortalidade e duração da fase larval, porém ambos os parâmetros foram superiores aos controles negativos testados, os quais não diferiram entre si (Tabela 1). Assim, a mortalidade de *S. frugiperda* tratada com extrato bruto de *D. stramonium* foi de 77,50% e de 62,50% com *A. arborescens*, valores 12,4 e 10 vezes, respectivamente, maiores que os encontrados nos controles negativos (6,25%), ressaltando-se que no controle positivo (Azamax) a mortalidade atingiu 100%. Além disso, a duração da fase foi aproximadamente duplicada nas dietas suplementadas com *A. arborescens* (33,89 dias) e *D. stramonium* (32,49 dias) em comparação aos controles negativos (17,93 e 18,02 dias, para acetona mais metanol e água destilada, respectivamente). Os valores obtidos nos referidos controles estão bem próximos dos relatados em literatura (17-20 dias), para a espécie-praga em condições climáticas e substrato alimentar semelhantes (Giongo et al., 2015; Ribeiro et al., 2016), o que indica que o experimento foi realizado em condições adequadas para o normal

desenvolvimento do inseto. Em princípio, o alongamento da fase larval pode ser atribuído à presença de inibidores de crescimento, deterrentes de alimentação e ou substâncias tóxicas existentes nos extratos (Aldaci et al., 2001).

Pascual-Villalobos & Robledo (1998) já haviam relatado toxicidade de extratos brutos da parte área de *D. stramonium*, os quais causaram 70 a 100% de mortalidade em aplicação tópica sobre larvas de *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) na concentração de 2 mg $mL^{-1}$.

**Tabela 1.** Médias (± erro padrão) da mortalidade e da duração da fase larval de *Spodoptera frugiperda* mantida em dieta artificial contendo os extratos brutos de *Acnistus arborescens* e *Datura stramonium* na concentração 4.000 mg $kg^{-1}$.Temp.: 25±2 ºC; U.R.: 60±10%; fotofase 14 h.

| Tratamento | Mortalidade (%)[1] | Duração (dias)[2] |
|---|---|---|
| *Datura stramonium* | 77,50 ± 4,70 a | 32,49 ± 0,75 a |
| *Acnistus arborescens* | 62,50 ± 5,45 a | 33,89 ± 0,54 a |
| Controle negativo (acet.:met., 1:1) | 6,25 ± 2,72 b | 17,93 ± 0,28 b |
| Controle negativo (água destilada) | 6,25 ± 2,72 b | 18,02 ± 0,27 b |
| Controle positivo (Azamax® 1,2 EC)* | 100 ± 0,00 * | -- |
| *p-valor* | < 0,0001 | < 0,0001 |

* Tratamento excluído da análise pela falta de variabilidade;
[1] Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (GLM com distribuição binomial);
[2] Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (GLM com distribuição gaussiana, $p$<0,05).

Na fase pupal, também se observou efeito dos extratos, ocorrendo 44,44% de mortalidade para pupas provenientes de lagartas alimentadas em dieta com *D. stramonium* e 36,66% em dietas com *A. arborescens*, valores bastante superiores aos registrados nos controles negativos (2,67 e 4,00%, para acetona mais metanol e água destilada, respectivamente). Por outro lado, a duração da fase pupal foi maior na dieta com *A. arborescens* (13,95 dias) em comparação a *D. stramonium* (12,79 dias) e aos controles negativos (12,27 e 12,07 dias, para acetona mais metanol e água destilada, respectivamente), ressaltando-se que não houve diferença entre *D. stramonium* e o controle acetona mais metanol (Tabela 2).

O efeito dos extratos brutos de solanáceas em pupas já foi relatado anteriormente, como os de *Withania somnifera* L. que causaram mortalidades de 40, 45 e 65% quando aplicados topicamente nas doses 50, 75 e 100 µg, respectivamente, em pupas de até 10 h de *Spodoptera litura* Fabr. (Lepidoptera: Noctuidae) (Gaur & Kumar, 2010). Já Kumar et al. (2012) relataram mortalidades em pupas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) submetidas ao extrato metanólico dos frutos de *Solanum xanthocarpum* Schrad. & Wendl. de 10, 17, 31, 43 e 54% para as concentrações 100, 150, 250, 300 e 350 ppm, respectivamente.

Diversos extratos vegetais tem sido registrados provocando efeito sobre parâmetros biológicos de *S. frugiperda*, podendo-se citar, como exemplo, a adição de acetogeninas em meio artificial (Colom et al., 2007; Blessing et al., 2010; Ribeiro et al., 2016), assim como o extrato bruto dos frutos de *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae) (Santiago et al., 2008) e frações de meliáceas (Giongo et al., 2015) e por efeito residual em folhas de milho com as meliáceas *Trichilia pallida* e *T. pallens* (Roel et al., 2000; Borgoni & Vendramim, 2003).

**Tabela 2.** Médias (± erro padrão) da mortalidade e da duração da fase pupal de *Spodoptera frugiperda* mantida em dieta artificial contendo os extratos brutos de *Acnistus arborescens* e *Datura stramonium* na concentração 4.000 mg $kg^{-1}$.Temp.: 25±2 ºC; U.R.: 60±10%; fotofase 14 h.

| Tratamento | Mortalidade (%)[1] | Duração (dias)[2] |
|---|---|---|
| *Datura stramonium* | 44,44 ± 12,05 a | 12,79 ± 0,26 b |
| *Acnistus arborescens* | 36,66 ± 8,95 a | 13,95 ± 0,34 a |
| Controle negativo (acet.:met., 1:1) | 2,67 ± 1,87 b | 12,27 ± 0,13 bc |
| Controle negativo (água destilada) | 4,00 ± 2,28 b | 12,07 ± 0,11 c |
| *p-valor* | < 0,0001 | < 0,0001 |

[1] Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (GLM com distribuição binomial);
[2] Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (GLM com distribuição gaussiana, $p<0,05$).

Além dos resultados citados anteriormente, os tratamentos suplementados com os extratos provocaram redução no peso de pupas de forma mais pronunciada para *D. stramonium* (123,99 mg) que para *A. arborescens* (173,92 mg), valores que corresponderam a uma redução de peso de cerca de 40 e 20%, respectivamente, em relação ao peso pupal nos controles negativos (210,82 mg em acetona mais metanol e 211,35 mg em água destilada). A deformação de pupas nos tratamentos com *D. stramonium* e *A. arborescens* foi de 16,67 e 13,33% (Figura 1), respectivamente, contra 0% nos controles. Já no que se refere aos adultos, embora os valores de deformação tenham atingido 20,00 e 17,79% nas dietas com *D. stramonium* e *A. arborescens*, respectivamente, a diferença não foi significativa em comparação aos valores constatados nos controles (cerca de 5%) (Tabela 3). É possível que tais resultados estejam relacionados com uma inibição da alimentação, já que, foram obtidos pesos de pupas inferiores ao controle e alongamento do estágio larval, características de um decréscimo de alimentação no estágio inicial.

Matos et al. (2006) obtiveram conclusões similares em trabalhos com extratos brutos hexânicos e metanólicos de *T. catigua*, na concentração de 1.000 mg Kg $^{-1}$, incorporados em dieta artificial, em que os extratos foram responsáveis pelo alongamento da fase larval, bem como pela redução do peso de pupas de *S. frugiperda*.

**Tabela 3.** Médias (± erro padrão) de peso pupal e da porcentagem de pupas e de adultos deformados de *Spodoptera frugiperda* mantida em dieta artificial contendo os extratos brutos de *Acnistus arborescens* e *Datura stramonium* na concentração 4.000 mg $kg^{-1}$.Temp.: 25±2 ºC; U.R.: 60±10%; fotofase 14 h.

| Tratamento | Peso (mg)[1] | Pupas deformadas (%)[2] | Adultos deformados (%)[2] |
|---|---|---|---|
| *Datura stramonium* | 123,99 ± 9,89 c | 16,67 ± 9,04 a | 20,00 ± 13,33 a |
| *Acnistus arborescens* | 173,92 ± 6,57 b | 13,33 ± 6,31 a | 17,79 ± 8,59 a |
| Controle negativo (acet.:met., 1:1) | 210,82 ± 2,66 a | 0,00 ± 0,00* | 5,48 ± 2,68 a |
| Controle negativo (água destilada) | 211,35 ± 2,50 a | 0,00 ± 0,00* | 5,56 ± 2,72 a |
| *p-valor* | < 0,0001 | 0,7531 | 0,2656 |

* Tratamento excluído da análise pela falta de variabilidade;
[1] Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (GLM com distribuição gaussiana, $p<0,05$);
[2] Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (GLM com distribuição binomial).

Não há relatos na literatura para a influência dos extratos etanólicos de *A. arborescens* sobre parâmetros biológicos, bem como são escassos os estudos de *D. stramonium* sobre *S. frugiperda*. Por isso, visando uma melhor compreensão dos efeitos das espécies de solanáceas em estudo, foi realizado um bioensaio utilizando a fração diclorometânica proveniente da partição líquido-líquido sobre os parâmetros biológicos de *S. frugiperda.*

### 3.3.2. Efeito das frações diclorometânicas sobre parâmetros biológicos de *S.frugiperda*

Os parâmetros biológicos de *S. frugiperda* foram afetados também pela incorporação das frações diclorometânicas na dieta, constatando-se que nenhuma lagarta atingiu a fase de pupa na dieta contendo *A. arborescens*, enquanto na dieta com *D. stramonium* a mortalidade foi de 83,19%, valores bastante superiores aos encontrados no controle negativo (8,33%) (Tabela 4).

As lagartas sobreviventes na dieta com *D. stramonium* gastaram praticamente o dobro do tempo (41,75 dias) para atingir a fase pupa quando comparadas àquelas criadas no controle (21,00 dias).

Os resultados encontrados são importantes quando se considera a possibilidade da incorporação do uso de plantas inseticidas no manejo integrado de pragas, pois a maior duração da fase larval em campo pode deixar o inseto por mais tempo exposto ao ataque de parasitoides, predadores e entomopatógenos. Além disso, os adultos emergidos poderiam estar em assincronia com a população normal e, logo, a cópula tenderia a ser dificultada (Rodríguez & Vendramim, 1996), podendo, assim, causar diminuição do número de gerações e minimizar os riscos de surto da ocorrência da praga (Tanzubil & Mccaffery, 1990).

Colom et al. (2007) avaliaram a ação de um grupo de acetogeninas isoladas a partir de sementes de *Annona cherimolia* (Annonaceae) sobre o desenvolvimento de *S. frugiperda* por meio da incorporação de 50 µg $g^{-1}$ em dieta artificial, e observaram 100% de mortalidade larval na dieta suplementada com esquamocina; além disso, a fase larval foi prolongada nos tratamentos com asimicina (17,3 dias), cherimolina-2 (17,7 dias), motrilina ( 18 dias), itrabina (18,8 dias) e almunequina (19,7 dias) em relação ao controle (12 dias). Os menores valores obtidos por esse autor para a duração da fase larval no tratamento controle, em relação ao registrado no presente trabalho se deve, ao menos em parte, ao fato de as lagartas terem sido infestadas no segundo ínstar e a maior temperatura (27 ºC) do local onde os tubos com dieta foram mantidos.

Kumral et al. (2010), por outro lado, relataram mortalidades de 28,82 e 98,34% das fêmeas de *Tetranychus urticae* (Koch) (Acari: Tetranychidae), após 48 h em contato com folhas pulverizadas com extratos etanólicos de folhas de *D. stramonium* nas concentrações de 27.285 e 167.250 mg $L^{-1}$.

**Tabela 4.** Médias (± erro padrão) da mortalidade e da duração da fase larval de *Spodoptera frugiperda* mantida em dieta artificial contendo as frações diclorometânicas de *Acnistus arborescens* e de *Datura stramonium*, testadas nas respectivas $CL_{50}$. Temp.: 25±2 ºC; U.R.: 60±10%; fotofase 14h.

| Tratamento | Mortalidade (%)[1] | Duração (dias)[2] |
|---|---|---|
| *Acnistus arborescens* | 100 ± 0,00 * | -- |
| *Datura stramonium* | 83,19 ± 3,44 b | 41,75 ± 1,37 a |
| Controle (acet.:met., 1:1) | 8,33 ± 2,53 c | 21,00 ± 0,21 b |
| *p-valor* | < 0,0001 | < 0,0001 |

[*] Tratamento excluído da análise pela falta de variabilidade;
[1] Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (GLM com distribuição binomial);
[2] Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de T-student ($p$<0,05%).

Apesar da ocorrência de efeitos pronunciados de *D. stramonium* na fase larval, o mesmo não foi observado na fase pupal, já que os valores de mortalidade (10,53%) e duração dessa fase, 12,88 dias, não diferiram dos constatados no controle (9,09% e 11,92 dias, respectivamente) (Tabela 5). Os extratos aquosos de *Anona dioica* testados em folhas de milho sobre *S. frugiperda* proporcionaram efeitos semelhantes na concentração de 1%, pois, ocasionaram viabilidade larval inferior ao controle e não influenciaram na viabilidade e duração do estágio pupal (Freitas et al., 2014).

**Tabela 5.** Médias (± erro padrão) da mortalidade e da duração da fase pupal de *Spodoptera frugiperda* mantida em dieta artificial contendo a fração diclorometânica de *Datura stramonium*, testada na respectiva $CL_{50}$. Temp.: 25±2 ºC; U.R.: 60±10%; fotofase 14h.

| Tratamento | Mortalidade (%)[1] | Duração (dias)[2] |
|---|---|---|
| *Datura stramonium* | 10,53 ± 7,23 a | 12,88 ± 0,61 a |
| Controle (acet.:met., 1:1) | 9,09 ± 2,75 a | 11,92 ± 0,19 a |
| *p-valor* | 0,8447 | 0,1700 |

[1] Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (GLM com distribuição binomial);
[2] Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de T-student ($p$<0,05%).

Finalmente, para os demais parâmetros avaliados, peso de pupas e deformidades de pupas e adultos, a incorporação da fração diclorometânica na dieta também afetou a biologia de *S. frugiperda*, tendo sido registrados valores de 158,6 mg, 40,00% e 27,27%, respectivamente, os quais diferiram daqueles encontrados no controle (255,9 mg, 8,26% e 1,83%, respectivamente) (Tabela 6). Ressalte-se que grande parte da deformidade de pupas foi resultante da má formação das asas (Figura 1).

Limonoides isolados de *Cedrela salvadorensis* e *C. dugessi* (Meliaceae) incorporados em meio artificial na concentração de 25 ppm e oferecidos a lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda*, causaram efeitos similares aos relatados, uma vez que o limonoide fotogedunina não diferiu do controle para a variável duração da fase pupal (23 e 22 dias, respectivamente), embora o peso de pupas tenha sido bastante inferior (63,5 e 281,5 mg, respectivamente) (Céspedes et al., 2000).

**Tabela 6.** Médias (± erro padrão) do peso pupal e da porcentagem de pupas e de adultos deformados de *Spodoptera frugiperda* mantida em dieta artificial contendo a fração diclorometânica de *Datura stramonium*, testada na respectiva $CL_{50}$. Temp.: 25±2 ºC; U.R.: 60±10%; fotofase 14h.

| Tratamento | Peso (mg)[1] | Pupas deformadas (%)[2] | Adultos deformados (%)[2] |
|---|---|---|---|
| *Datura stramonium* | 158,60 ± 1,63 b | 40,00 ± 11,24 a | 27,27 ± 14,08 a |
| Controle (acet.:met., 1:1) | 255,90 ± 0,38 a | 8,26 ± 2,65 b | 1,83 ± 1,29 b |
| *p-valor* | < 0,0001 | 0,0007 | 0,0304 |

[1] Diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de T-student ($p$<0,05%);
[2] Diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição binomial).

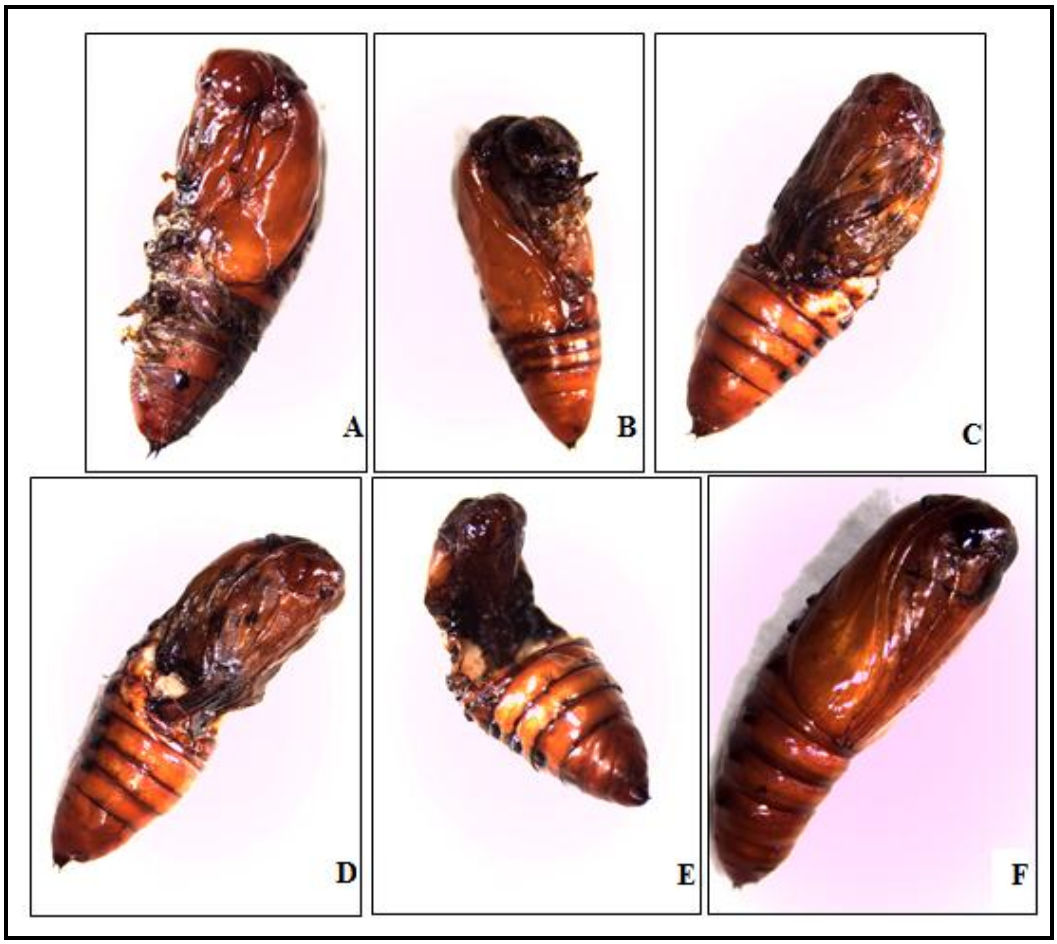



**Figura 1.** Comparação entre pupas com deformações morfológicas provenientes de lagartas alimentadas com: A- Extrato bruto de *Acnistus arborescens*; B- Extrato bruto de *Datura stramonium*; C; D; E- Fração diclorometânica de *Datura stramonium* na $CL_{50}$ e pupa sem deformidade (F).

Em síntese, os resultados obtidos nos dois estudos dos parâmetros biológicos podem estar relacionados a um efeito secundário advindo da baixa alimentação na fase larval ou a efeitos fisiológicos, uma vez que houve mortalidade em todas as lagartas submetidas à fração diclorometânica de *A. arborescens* e altas deformidades de pupas e adultos de *D. stramonium*. São necessários estudos mais aprofundados para compreender o mecanismo de ação dos compostos ativos a *S. frugiperda.*

### 3.3.3. Efeito das frações diclorometânicas sobre o consumo alimentar de *S. frugiperda*

De acordo com os resultados obtidos as três concentrações letais testadas das duas espécies de plantas provocaram diminuição no consumo da dieta pelas lagartas de *S. frugiperda*, em comparação aos dois controles negativos (acetona mais metanol e água destilada), tratamentos em que os consumos médios foram 184,00 mg e 171,80 mg,

respectivamente (Tabela **7**). Os menores consumos foram 53,12 mg ($CL_{90}$) e 64,32 mg ($CL_{50}$) ambos para *A. arborescens*, os quais foram inferiores, inclusive em relação ao controle positivo com a formulação comercial Azamax (103,00 mg). Nas dietas com as concentrações testadas para *D. stramonium* (valores variáveis de 105,90 a 130,50 mg) não houve diferença nos consumos nas três concentrações e nem destas em comparação ao controle positivo.

**Tabela 7.** Médias (± erro padrão) do peso da dieta consumida (mg) por lagartas de quarto ínstar de *Spodoptera frugiperda*, após 24 h de exposição, em teste sem chance de escolha com as concentrações letais das frações diclorometânicas de *Acnistus arborescens* e *Datura stramonium* incorporadas em meio artificial. Temp.: 25±2 ºC; U.R.: 60±10%; fotofase 14h.

| Tratamento | Concentração (mg $kg^{-1}$) | Consumo (mg)[1] |
|---|---|---|
| *Acnistus arborescens* | 8.739 ($CL_{90}$) | 53,12 ± 1,02 e |
| | 3.694 ($CL_{50}$) | 64,32 ± 0,97 de |
| | 1.966 ($CL_{25}$) | 85,14 ± 15,46 cd |
| *Datura stramonium* | 10.670 ($CL_{90}$) | 119,10 ± 17,81 b |
| | 4.088 ($CL_{50}$) | 105,90 ± 5,02 bc |
| | 2.025 ($CL_{25}$) | 130,50 ± 2,03 b |
| Controle negativo: acet.:met., 1:1 | | 184,00 ± 9,03 a |
| Controle negativo: água destilada | | 171,80 ± 3,48 a |
| Controle positivo: (Azamax® 1,2 EC) | 4.000 | 103,00 ± 7,93 bc |
| Valor de *p* | | 0,00 |

[1] Médias seguidas de letras distinta nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Kruskal-Wallis.

Abbasipour et al. (2011), avaliando o efeito do extrato bruto das folhas de *D. stramonoium* nas concentrações de 947, 1.609, 2.254 e 3.007 mg $L^{-1}$ (incorporados em discos de farinha) sobre insetos de 1-3 dias de *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae), durante 72 h, observaram na concentração 3.007 mg $L^{-1}$, índice de deterrência alimentar de 97,27%, o que resultou em baixa taxa relativa de consumo (0,081 mg $mg^{-1}$) e de crescimento (0,022 mg $mg^{-1}$), quando comparadas ao controle (0,255 e 0,143 mg $mg^{-1}$, respectivamente).

Devanand & Rani (2011), no entanto, avaliando a taxa antialimentar das frações em clorofórmio, acetato de etila e metanol, provenientes dos extratos brutos de *Solanum melongena* L., *Lycopersicum esculentum* Mill. (=Solanum lycopersicum L.) e *Capsicum annuum* L., por cromatrografia de coluna em sílica de gel, pulverizados em discos foliares de mamona e oferecidos às lagartas de terceiro ínstar de *Spodoptera litura* (Fabricius) e *Achaea janata* (L.) (Lepidoptera: Noctuidae), na concentração de 10 mg 10 $cm^{-2}$, obtiveram os maiores valores na fração metanólica dos frutos de *S. melongena* (81,6% para *S. litura* e

90,2% para *A. janata*), seguido da fração acetato de etila (67,6 e 71,4%, respectivamente, para *S. litura* e *A. janata*), por um período de 24 h de exposição.

Com os resultados obtidos neste trabalho é possível inferir a ação de antixenose (não preferência alimentar), causando deterrência alimentar, uma vez que as dietas suplementadas com as frações, independentemente da concentração, foram menos utilizadas para alimentação em comparação com os controles negativos em igualdade de condições. Esses efeitos já tinham sido observados na família Solanaceae em espécies do gênero *Lycopersicon* (= *Solanum*), devido aos mecanismos de defesa, como tricomas glandulares e lamelas foliares, os quais influenciam, até mesmo, insetos predadores e fitófagos (Kennedy, 2003), como relatados em bioensaios com e sem chance de escolha para diversos acessos de tomate em lagartas de terceiro ínstar de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (Selvanarayanan & Narayanasamy, 2004) e para o alcaloide tomatina incorporados em dieta artificial e oferecidos a lagartas de *S. frugiperda* (Stamp & Osier, 1998).

A deterrência alimentar ou fagodeterrência foi classificada por Mordue (Luntz) e Blackwell (1993) em primária e secundária. A primária ocorre quando o composto afeta a alimentação agindo nos quimiorreceptores, e a secundária quando o inseto ingere o composto, causando assim efeitos tóxicos secundários. Dessa forma, a fagodeterrência primária causa uma rápida interrupção na alimentação, como foi observada para as frações diclorometânicas de *A. arborescens* e *D. stramonium.* Tal resultado é vantajoso, pois a diminuição da alimentação da espécie-praga tende a reduzir os danos ocasionados às culturas a serem protegidas (Ribeiro et al., 2016) e, é geralmente aferida em testes de laboratório com ou sem chance de escolha com períodos de avaliação variando de 24 a 72 h.

Considerando-se, por outro lado, que nos ensaios de biologia ocorreram efeitos em diversos parâmetros (mortalidade, período de desenvolvimento, peso de pupa, deformação de pupas e adultos), pode-se inferir que, além de efeitos antixenóticos, as partições diclorometânicas de *A. arborescens* e *D. stramonium* também causaram forte efeito antibiótico sobre *S. frugiperda*.

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que os extratos brutos etanólicos de *A. arborescens* e *D. stramonium*, bem como suas frações diclorometânicas ocasionam efeitos letais e subletais promissores para o manejo de sobre *S. frugiperda*. Além disso, as frações diclorometânicas ocasionam efeitos pronunciados no consumo alimentar da mesma. Diante dessa perspectiva, novos estudos devem ser realizados para testar a influência dos extratos em campo visando à proteção de culturas.

**Referências**

Abbasipour, H., Mahmoudvand, M., Rastegar, F., Hosseinpour, M.H., 2011. Bioactivities of jimsonweed extract, *Datura stramonium* L. (Solanaceae), against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Turk. J. Agr. Forest. 35, 623-629.

Adalci, L., Torres, R.B., Olibeira, J.V., 2001. Efeito de Extratos Aquosos de Plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). Neotrop. Entomol. 30, 151-156.

Agrofit, 2016. Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil (acesso 01.03.2016.). Disponível em http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.

Ansante, T.F., Ribeiro, L.P., Bicalho, K.U., Fernandes, J.B., Silva, M.F.G.F., Vieira, P.C., Vendramim, J.D., 2015. Secondary metabolites from Neotropical Annonaceae: Screening, bioguided fractionation, and toxicity to *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Ind. Crops. Prod. 74, 969-976.

Blessing, L.D.T., Colom, A.O., Popich, S., Neske, A., Bardón, A., 2010. Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. J. Pest. Sci. 83, 307-310.

Borgoni, P.C., Vendramim, J.D., 2003. Bioatividade de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. Neotrop. Entomol. 32, 665-669.

Castro, D.P., Cardoso, M.G., Moraes, J.C., Santos, M.N., Baliza, D.P., 2006. Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L.. Rev. Bras. Pl. Med. 8, 27-32.

Céspedes, C.L., Calderón, J.S., Lina, L., Aranda, E., 2000. Growth inhibitory effects on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* of some limonoids isolated from *Cedrela* spp. (Meliaceae). J. Agric. Food Chem. 48, 1903-1908.

Colom, A.O., Neske, A., Popich, S., Bardón, A., 2007. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Pest. Sci. 80, 63-67.

Cordero, C.P., Morantes, S.J., Páez, A., Rincón, J., Aristizábal, F.A., 2009. Cytotoxicity of withanolides isolated from *Acnistus arborescens.* Fitoterapia. 80, 364-368.

Cruz, I., 1995. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho – Circular Técnica n° 21, Sete Lagoas, p. 1-63.

Devanand, P., Rani, P.U., 2011 Insect growth regulatory activity of the crude and purified fractions from *Solanum melongena* L., *Lycopersicum esculentum* Mill, and *Capsicum annuum* L. J. Biopest. 4, 118-130.

Farias, J.R., Andow, D.A., Horikoshi, R.J., Sorgatto, R.J., Fresia, P., Santos, A.C., Omoto, C., 2014. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. Crop Prot. 64, 150-158.

Fowler, C.J., 2015. Plant sources of antimuscarinics. BJU Int. 115, 4-7.

Freitas, A.F., Pereira, F.F., Formagio, A.S.N., Lucchetta, J.T., Vieira, M.C., Mussury, R.M., 2014. Effects of methanolic extracts of Annona Species on the development and reproduction of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Neotrop. Entomol. 43, 446-452.

Gaur, R., Kumar, K., 2010. Insect growth-regulating effects of *Withania somnifera* in a polyphagous pest, *S. litura.* Phytoparasitica. 38, 237-241.

Giongo, A.M.M.; Vendramim, J.D.; Freitas, S.D.L.; Silva, M.F.G.F., 2015. Growth and nutritional physiology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) fed on Meliaceae fractions. Rev. Colomb. Entomol. 41, 33-40.

Greene, G.L., Leppla, N.C., Dickerson, W.A., 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. J. Econ. Entomol. 69, 487-488.

Hinde, J., Demétrio, C.G.B., 1998. Overdispersion: models and estimation. Comput. Stat. Data An. 27, 151-170.

Isman, M.B., 2005.Tropical forests as sources of natural insecticides. Recent Adv. Phytochem. 39, 145-161.

Isman, M.B., 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annu. Rev. Entomol. 51, 45-66.

Kanteh, S.M., Norman, J.E., 2015. Diversity of plants with pesticidal and medicinal properties in southern Sierra Leone. Biol. Agric. Hortic. 31, 18-27.

Kennedy, G.G., 2003. Tomato, pests, parasitoids, and predators: tritrophic interactions involving the genus *Lycopersicon.* Annu. Rev. Entomol. 48, 51 -72.

Kumar, P.M., Murugan, K., Kovendan, K., Panneerselvam, C., Kumar, K.P., Amerasan, D., Subramaniam, J., Kalimuthu, K., Nataraj, T., 2012. Mosquitocidal activity of *Solanum xanthocarpum* fruit extract and copepod *Mesocyclops thermocyclopoides* for the control of dengue vector *Aedes aegypti*. Parasitol. Res. 111, 609-618.

Kumral, N.A., Cobanoglu, S., Yalcin, C., 2010. Acaricidal, repellent and oviposition deterrent activities of *Datura stramonium* L. against adult *Tetranychus urticae* (Koch). J. Pest. Sci. 83, 173-180.

Lee, M.R., 2006. The Solanaceae: Foods and poisons. J. R. Coll. Physicians Edinb. 36, 162-169.

Matos, A.P., Nebo, L., Calegari, E.R., Pereira, L.G.B., Vieira, P.C., Fernandes, J.B., Silva, M.F.G.F., Filho, P.F., Rodrigues, R.R., 2006. Atividade biológica de extratos orgânicos de *Trichilia* spp. (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em dieta artificial. BioAssay. 1, 1-6.

Mehrabadi, M., Bandani, A.R., Saadati, F., Mahmudvand, M., 2011. A-amylase activity of stored products insects and its inhibition by medicinal plant extracts. J. Agric. Sci. Technol. 13, 1173-1182.

Minguzzi, S., Barata, L.E.S., Shin, Y.G., Jonas, P.F., Chai, H.B., Park, E.J., Pezzuto, J.M., Cordell, G.A., 2002. Cytotoxic withanolides from *Acnistus arborescens*. Phytochemistry. 59, 635-641.

Mordue (Luntz), A.J., Blackwell, A., 1993. Azadirachtin: an update. J. Insect Physiol. 39, 903-924.

Nelder, J.A., Wedderburn, R.W.M., 1972. Generalized linear models. J. R. Stat. Soc. 135, 370-384.

Omoto, C., Berndardi, O., Salmeron, E., Sorgatto, R.J., Dourado, P.M., Crivellari, A., Carvalho, R.A., Willse, A., Martinelli, S., Head, G.P., 2016. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil.Pest. Manag. Sci. 72, 1727-1736.

Pascual-Villalobos, M.J., Robledo, A., 1998. Screening for anti-insect activity in Mediterranean plants. Ind. Crops. Prod. 8, 183-194.

R Development Core Team, 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.

Ribeiro, L.P., Ansante, T.F., Vendramim, J.D., 2016. Efeito do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* no desenvolvimento e comportamento alimentar de *Spodoptera frugiperda.* Bragantia. 75, 322-330.

Rodríguez, H.C., Vendramim, J.D., 1996. Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Man. Integ. Plagas. 42, 14-22.

Roel, A.R., Vendramim, J.D., Frighetto, R.T.S., Frighetto, N., 2000. Efeito do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da lagarta-do-cartucho. Bragantia. 59, 53-58.

Sâmia, R.R., Alves, D.S., Vilas Boas, M.A., Carvalho, G.A., Oliveira, D.F., 2009. Efeito de extratos de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae: Caesalpinoideae) sobre diferentes características biológicas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. Bras. Agroeco. 4, 3423-3426.

Santiago, G.P., Pádua, L.E.M., Silva, P.R.R.S., Carvalho, E.M.S., Maia, C.B., 2008. Efeitos de extratos de plantas na biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) mantida em dieta artificial. Ciênc. Agrotec. 32, 792-796.

Selvanarayanan, V., Narayanasamy, P., 2004. Antixenosis resistance in tomato to the fruit borer *Helicoverpa armigera* (Hübner). Int. J. Trop. Insect Sci. 24, 201-206.

Silva, M.T.B., 1999. Fatores que afetam a eficiência de inseticidas sobre *Spodoptera frugiperda* Smith em milho. Ciênc. Rural. 3, 383-387.

Stamp, N.E., Osier, T.L., 1998. Response of five insect herbivores to multiple allelochemicals under fluctuating temperatures. Entomol. Exp. Appl. 88, 81-96.

Stehmann, J.R., Mentz, L.A., Agra, M.F., Vignoli-Silca, M., GIacomin, L., 2015. Solanaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro (acesso 02.01.2017). Disponivel em http://floradobrasil.jbrj.gov.br/.

Tanzubil, P.B., McCaffery, A.R., 1990. Effects of azadirachtin and aqueous neem seed extracts on survival, growth and development of the African armyworm, *Spodoptera exempta*. Crop Prot. 9, 383-386.

Valicente, F.H., 2015. Manejo integrado de pragas na cultura do milho – Circular Técnica n° 208, Sete Lagoas, p. 1-13.

Vendramim, J.D, Castiglioni, E., 2000. Aleloquímicos, resistência e plantas inseticidas. In: Guedes, J.C., Drester da Costa, I., Castiglioni, E. Bases e técnicas do manejo de insetos. Santa Maria: UFSM/CCR/DFS, 2000. p. 113-128.