**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Metabólitos secundários de Annonaceae: triagem, fracionamento
biomonitorado e bioatividade frente a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith,
1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**

Thiago Felipe Ansante

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

**Piracicaba
2014**

Thiago Felipe Ansante
Engenheiro Agrônomo

Metabólitos secundários de Annonaceae: triagem, fracionamento biomonitorado e bioatividade frente a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

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

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

Piracicaba
2014

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

Ansante, Thiago Felipe

Metabólitos secundários de Annonaceae: triagem, fracionamento biomonitorado e bioatividade frente a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) / Thiago Felipe Ansante. - - Piracicaba, 2014.
103 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.
Bibliografia.

1. Aleloquímicos 2. Acetogeninas 3. Bioinseticida 4. Lagarta-do-cartucho
5. Toxicidade I. Título

CDD 632.78
A798m

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICO E OFEREÇO

Aos meus pais, Sueli Conceição Mendes Felipe e Roque Miguel Ansante, e às minhas irmãs, Raphaela Felipe Ansante e Nathália Felipe Ansante, pelo inestimável incentivo, confiança, carinho, compreensão e atenção em todas as etapas de minha vida.

A Bruna Rando, a quem confio meus objetivos, meus planos e alegrias e que, apesar das dificuldades, estamos caminhando lado a lado...

A meu amigo e irmão Rafael Mendes Fehr, pela amizade e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de inspiração, iluminação e proteção em todos os momentos de minha vida.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. José Djair Vendramim, pela oportunidade concedida, pela valiosa orientação, ensinamentos, incentivos, pela amizade e pelo exemplo de comportamento ético e profissional.

Ao Doutorando M.Sc. Leandro do Prado Ribeiro, do Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas, ESALQ/USP, pela amizade, incentivo, apoio, auxílio nos experimentos laboratoriais e análises dos dados, além das sugestões durante todo desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Luis Cônsoli, responsável pelo Laboratório de Interações em Insetos, ESALQ/USP, pelos ensinamentos na disciplina de Fisiologia e Bioquímica de Insetos, pela oportunidade concedida e pela amizade.

Ao Doutorando M.Sc. Odimar Zanuzo Zanardi, do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas, ESALQ/USP, pelo auxílio na elaboração dos gráficos no software Origin versão 9.1 e pela amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao corpo docente e administrativo do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Controle Biorracional de Insetos Pragas, em especial ao Prof. Dr. João Batista Fernandes e à Doutoranda Keylla Bicalho, ambos do Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSCar, pelo apoio na realização das etapas “químicas” do estudo.

Ao Prof. Dr. Fábio Mazzonetto, da Universidade Camilo Castelo Branco (UNICASTELO), Campus de Descalvado, pela amizade e pelas orientações e ensinamentos durante minha graduação e pelo apoio na realização do primeiro contato de estágio junto ao Prof. Dr. José Djair Vendramim.

Aos professores Ronaldo Pavarini e Gláucia Maria Pereira Pavarini, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP, Campus de Registro, pela amizade e pelas orientações, ensinamentos, incentivos e oportunidades concedidas durante a graduação.

Aos meus pais Sueli Conceição Mendes Felipe e Roque Miguel Ansante e às minhas irmãs Raphaela Felipe Ansante e Nathália Felipe Ansante, pela motivação em todas as etapas de minha formação profissional, pelo carinho e atenção dedicados nos momentos de dificuldades e pela compreensão devido à ausência.

A minha namorada, Bruna Rando, Gestora de Recursos Humanos, pelo carinho, companheirismo, compreensão, auxílio prestado na condução dos experimentos laboratoriais e pela confecção do sumário.

Ao meu amigo e irmão, Rafael Mendes Mendes Fehr, pela amizade e companheirismo desde a graduação.

Aos colegas do Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas - ESALQ/USP: Angelina Maria Marcomini, Eliane Grisoto, Gabriel Luiz Padoan Gonçalves, Mônica Silva Santos, Márcio Alves Silva, Marco Aurélio Araújo Lima, Sheila Salles de Carvalho. Agradeço também a todos os colegas e amigos do Programa de Pós-graduação em Entomologia da ESALQ/USP.

A todos que de alguma forma, diretamente ou indiretamente, colaboraram para realização deste trabalho.

“Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde os outros foram”

Alexandre Graham Bell

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 Aspectos taxonômicos e bioecológicos de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith, 1797)	25
2.2 Metabólitos secundários de plantas (aleloquímicos)	26
2.3 Aspectos gerais sobre o uso de plantas inseticidas	29
2.4 Considerações gerais sobre a família Annonaceae	31
2.5 Compostos ativos presentes em anonáceas	32
2.6 Bioatividade de derivados de anonáceas sobre <i>S. frugiperda</i>	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Etapa I	35
3.1.1 Estabelecimento e manutenção da criação de <i>S. frugiperda</i>	35
3.1.2 Obtenção das espécies e preparo dos extratos vegetais	35
3.1.3 Bioensaios	38
3.1.3.1 Avaliação do efeito dos solventes orgânicos sobre <i>S. frugiperda</i>	38
3.1.3.2 Triagem para identificação dos extratos promissores	39
3.1.3.3 Curvas de concentração-resposta do extrato selecionado	40
3.1.3.4 Efeito do extrato selecionado sobre o consumo alimentar de lagartas de <i>S. frugiperda</i>	40
3.1.3.5 Efeito do extrato selecionado sobre parâmetros biológicos de <i>S. frugiperda</i>	42
3.1.3.6 Bioatividade comparada do extrato selecionado com inseticidas comerciais	42
3.1.3.7 Estimativa do tempo letal médio (TL ₅₀) para o extrato selecionado e para os inseticidas comerciais	42
3.2 Etapa II	43
3.2.1 Fracionamento biomonitorado do extrato selecionado	43
3.2.1.1 Partição líquido-líquido do extrato selecionado	43
3.2.1.1.1 Avaliação da atividade inseticida das partições obtidas sobre <i>S. frugiperda</i>	44
3.2.1.2 Fracionamento da partição mais ativa	44
3.2.1.2.1 Avaliação da atividade inseticida das frações mais ativas sobre <i>S. frugiperda</i>	46

3.2.1.3 Purificação, isolamento e determinação estrutural do composto majoritário das frações mais ativas.....	47
3.2.1.3.1 Avaliação da atividade inseticida do composto majoritário das frações mais ativas	48
3.3 Etapa III.....	49
3.3.1 Curva de concentração-resposta da formulação comercial à base de acetogenina	49
3.3.2 Efeito da formulação à base de acetogenina sobre parâmetros biológicos de <i>S. frugiperda</i>	49
3.3.3 Bioatividade comparada de formulação comercial à base de acetogenina com bioinseticida à base de limonoides.....	49
3.3.4 Estimativa do tempo letal médio (TL ₅₀)	50
3.4 Análises dos dados	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1 Etapa I	53
4.1.1 Rendimento de extração.....	53
4.1.2 Bioensaios	54
4.1.2.1 Avaliação do efeito dos solventes orgânicos sobre <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith, 1797)	54
4.1.2.2 Triagem para identificação dos extratos promissores	56
4.1.2.3 Curvas de concentração-resposta do extrato etanólico de sementes de <i>A. mucosa</i>	59
4.1.2.4 Efeito do extrato etanólico de sementes de <i>A. mucosa</i> no consumo alimentar de lagartas de <i>S. frugiperda</i>	62
4.1.2.5 Efeito do extrato etanólico das sementes de <i>A. mucosa</i> sobre parâmetros biológicos de <i>S. frugiperda</i>	65
4.1.2.6 Bioatividade comparada do extrato etanólico das sementes de <i>A. mucosa</i> com inseticidas comerciais	71
4.1.2.7 Estimativa do tempo letal médio (TL ₅₀) para o extrato etanólico das sementes de <i>A. mucosa</i> e para os inseticidas comerciais	73
4.2 Etapa II.....	76
4.2.1 Fracionamento biomonitorado do extrato etanólico das sementes de <i>A. mucosa</i>	76
4.2.2 Fracionamento das partições mais ativas	77
4.3 Etapa III.....	80
4.3.1 Curva de concentração-resposta da formulação comercial à base de acetogenina	80
4.3.2 Efeito da formulação à base de acetogenina sobre parâmetros biológicos de <i>S. frugiperda</i>	82

4.3.3 Atividade inseticida da formulação comercial à base de acetogenina comparada com o bioinseticida de origem natural.....	87
4.3.4 Estimativa do tempo letal médio (TL ₅₀) para os bioinseticidas comerciais	89
5 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	93

RESUMO

Metabólitos secundários de Annonaceae: triagem, fracionamento biomonitorado e bioatividade frente a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

Visando detectar alternativas de manejo para a lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), realizou-se, primeiramente, uma triagem em extratos etanólicos preparados das estruturas (folhas, ramos e sementes) de diferentes espécies de Annonaceae (*Annona cacans*, *A. montana*, *A. mucosa*, *A. reticulata*, *A. sylvatica* e *Duguetia lanceolata*). Com base nessa etapa inicial, constatou-se que o extrato etanólico das sementes de *A. mucosa* (ESAM) foi o mais promissor, causando significativa toxicidade aguda (CL_{50} e CL_{90} de 842,97 e 1.882,00 mg kg⁻¹, respectivamente) e pronunciada inibição do desenvolvimento larval (toxicidade crônica), após sete dias de exposição a dietas tratadas. Na CL_{50} , o ESAM reduziu as viabilidades larval e pupal e o peso de pupas com 24 horas, e aumentou a duração da fase larval. No entanto, o ESAM não ocasionou efeito fagoderrente para larvas de quarto ínstar de *S. frugiperda*, embora tenha reduzido o consumo ao longo do tempo. Feito isso, a eficácia de ESAM foi comparada com inseticidas comerciais de origem natural (Azamax[®] 1,2 EC) e sintética (Premio[®] SC). Nessa comparação, o ESAM (na CL_{90}) apresentou eficácia similar (equitóxico) aos dois produtos comerciais (utilizados na dose registrada para o controle do inseto-praga). A seguir, foi realizado o fracionamento biomonitorado através de diferentes técnicas cromatográficas que conduziu ao isolamento da acetogenina roliniastatina-1, identificada (com base em técnicas espectroscópicas) como componente majoritário da fração mais ativa do extrato etanólico de *A. mucosa*. Roliniastatina-1 foi então novamente ensaiada frente a larvas de *S. frugiperda* e ocasionou significativos efeitos agudos (mortalidade larval) e crônicos (redução do desenvolvimento larval). Por fim, investigou-se a bioatividade de uma formulação à base de acetogeninas (Anosom[®] 1 EC) recentemente registrada, tanto isoladamente quanto em mistura com uma formulação à base de limonoides (Azamax[®] 1,2 EC). Anosom[®] 1 EC, testado na CL_{90} estimada (2.959,00 mg kg⁻¹) e Azamax[®] 1,2 EC, testado na concentração registrada para o controle do inseto-praga (4.000,00 mg kg⁻¹), causaram significativa mortalidade larval, sem ocorrer diferença entre os tratamentos tanto quando testados isoladamente como em mistura binária. Anosom[®] 1 EC (na CL_{50}) provocou ainda aumento significativo das mortalidades larval e pupal e da duração da fase larval, bem como redução do peso pupal do inseto. Dessa forma, derivados de Annonaceae podem constituir um componente útil para o manejo integrado de *S. frugiperda* em condições de campo.

Palavras-chave: Aleloquímicos; Acetogeninas; Bioinseticida; Lagarta-do-cartucho; Toxicidade

ABSTRACT

Secondary metabolites from Annonaceae: screening, bioguided fractionation and bioactivity against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

A screening with ethanolic extracts prepared from structures (leaves, branches and seeds) from different species of Annonaceae (*Annona cacans*, *A. montana*, *A. mucosa*, *A. reticulate*, *A. sylvatica* and *Duguetia lanceolata*) aiming to detect management alternatives for *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) was done. Based on this initial phase, it was verified that the ethanolic extract from seeds of *A. mucosa* (AMSE) was the most promising one, causing significant acute toxicity (LC₅₀ and LC₉₀ of 842.97 and 1,822.00 mg kg⁻¹, respectively) and pronounced inhibition of larval development (chronic toxicity) after a 7-day exposition to treated diets. At LC₅₀, AMSE decreased larval and pupal viabilities and also the pupal weight at 24 hours, and increased the larval phase duration. However, AMSE didn't cause antifeedant effect for 4-instar *S. frugiperda* larvae, though it decreased consumption throughout the time. After that, AMSE efficacy was compared to commercial pesticides from natural (Azamax[®] 1.2 EC) and synthetic (Premio[®] SC) origin. In this confrontation, AMSE (at LC₉₀) showed efficacy similar to that of commercial products (used at registered dose for *S. frugiperda* control). Then, the bioguided fractionation using different chromatographic techniques which led to isolation of acetogenin rolliniastatin-1 identified as the majoritary compound of the most active ethanolic extract from *A. mucosa*. After that, rolliniastatin-1 was again tested against *S. frugiperda* larvae and caused significant acute (larval mortality) and chronic (decrease of larval development) effects. Finally, the bioactivity of a newly-registered acetogenin-based (Anosom[®] 1 EC) formulation was investigated, both separately and mixed with a limonoid-based formulation (Azamax[®] 1.2 EC). Anosom[®] 1 EC, tested at estimated LC₉₀ (2,959.00 mg kg⁻¹) and Azamax[®] 1.2 EC, tested at registered dose for *S. frugiperda* (4,000.00 mg kg⁻¹) led to significant larval mortality, without happening any differences between treatments either tested separately or in a binary mixture. Anosom[®] 1 EC (at LC₅₀) also led to significant increase of larval and pupal mortality and larval phase, as well as insect pupal weight decrease. Thus, Annonaceae derivatives can be a useful component for *S. frugiperda* integrated management under field conditions.

Keywords: Allelochemicals; Acetogenins; Biopesticide; Fall armyworm; Toxicity

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Produção de metabólitos secundários nas plantas, os quais desempenham funções ecológicas importantes ligadas às defesas contra estresses bióticos e abióticos (adaptado de SCHOONHOVEN et al., 2005).....27
- Figura 2 - Procedimento experimental adotado nos bioensaios em placas de Elisa.....39
- Figura 3 - Arenas utilizadas para bioensaio de consumo alimentar. **A** - Arena no início do bioensaio, com lagartas de quarto ínstar de *Spodoptera frugiperda* recém-liberadas no centro da arena; **B** - Bioensaio com arenas aleatorizadas de acordo com os tratamentos.41
- Figura 4 - Esquema da partição líquido-líquido do extrato selecionado44
- Figura 5 - Estrutura geral de acetogeninas.45
- Figura 6 - Esquema do fracionamento da partição mais ativa do extrato selecionado.....46
- Figura 7 - Esquema do isolamento dos possíveis compostos majoritários das frações mais ativas do extrato selecionado48
- Figura 8 - Curva de sobrevivência (Kaplan-Meier) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* mantida em meio artificial contendo extrato etanólico das sementes de *Annona mucosa* (ESAM), na CL₅₀ (842,97 mg kg⁻¹) estimada para o respectivo extrato bruto. Temp.: 25±2 °C; U.R.: 60±10%; fotofase 14h.67
- Figura 9 - Alterações morfológicas em *Spodoptera frugiperda* causadas pela incorporação em meio artificial do extrato etanólico das sementes de *Annona mucosa* (na concentração de 842,97 mg kg⁻¹). As setas indicam as deformações/modificações morfológicas ocorridas. **A**: tamanho das lagartas (maior tamanho, lagartas expostas ao controle e menor tamanho, lagartas expostas ao tratamento); **B**: retenção da exúvia em lagartas expostas ao tratamento; **C**: pupa defeituosa com a exúvia retida ao final da fase larval; **D**: ampliação do efeito encontrado em **C** e diferença entre tamanhos de pupas (menor tamanho, pupa exposta ao tratamento e maior tamanho, pupa exposta ao controle); **E**: adulto defeituoso com retenção de carapaça frontal da pupa e adultos com deformação das asas anteriores e posteriores, ambos expostos ao tratamento; **F**: vista ventral e dorsal de adulto proveniente de lagarta criada no controle..... 70
- Figura 10 - Mortalidade larval de *Spodoptera frugiperda* exposta em meio artificial contendo diferentes tratamentos em distintos tempos de exposição (horas): Azamax[®] 1,2 EC

(▲) $y=98,25-205,33(0,96)^x$, $R^2=0,98$ e $p<0,0001$; ESAM (▼) $y=100,57-234,74(0,95)^x$, $R^2=0,99$ e $p<0,0001$; Premio[®] SC (◆) $y=5,60+94,87/1+10^{(2,10-0,03x)}$, $R^2=0,99$ e $p<0,0001$; Controle (acet.:met. 1:1, v/v) (■) $y=0,03x-0,26$, $R^2=0,85$ e $p=0,0018$ e Água destilada (○) $y=0,02x-0,66$, $R^2=0,42$ e $p=0,0669$ 72

Figura 11 - Estrutura química da roliniastatina-1, acetogenina majoritária isolada da fração mais ativa do extrato etanólico das sementes de *Annona mucosa*..... 78

Figura 12 - Curva de sobrevivência (Kaplan-Meier) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* mantida em meio artificial contendo o bioinseticida à base de acetogeninas (Anosom[®] 1 EC), na CL₅₀ (1.352,00 mg kg⁻¹) previamente estimada. Temp.: 25±2 °C; U.R.: 60±10%; fotofase 14h..... 83

Figura 13 - Alterações morfológicas em *Spodoptera frugiperda* causadas pela incorporação em meio artificial do bioinseticida à base de acetogeninas (Anosom[®] 1 EC) (testado na CL₅₀ = 1.352,00 mg kg⁻¹) As setas indicam as deformações/ modificações morfológicas ocorridas: **A)** lagartas de maior tamanho (controle); **B)** lagartas de menor tamanho (tratamento); **C)** lagarta exposta ao bioinseticida, evidenciando retenção de exúvia; **D)** ampliação da imagem da lagarta com retenção de exúvia; **E:** pupa defeituosa exposta ao bioinseticida; **F:** pupa deformada (melanização deficiente) exposta ao tratamento..... 86

Figura 14 - Mortalidade larval de *Spodoptera frugiperda* exposta a meio artificial contendo diferentes tratamentos em distintos tempos de exposição: Anosom[®] 1 EC na CL₉₀ (•) $y=-4,95+107,70/1+10^{(1,47-0,016x)}$, $R^2=0,99$ e $p<0,0001$; Azamax[®] 1,2 EC na dose recomendada (▲) $y=103,05-188,25(0,97)^x$, $R^2=0,96$ e $p<0,0001$; Anosom[®] 1 EC (metade da CL₉₀) + Azamax[®] 1,2 EC (metade da dose recomendada) (▼) $y=101,30-167,86(0,98)^x$, $R^2=0,98$ e $p<0,0001$ e Água destilada (■) $y=0,06x-1,67$, $R^2=0,91$ e $p<0,0001$ 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de coleta das espécies de Annonaceae estudadas.....	37
Tabela 2 - Rendimentos de extratos brutos de anonáceas, por meio do processo de maceração a frio em solvente etanol, na proporção de 1:5 (p/v), das diferentes estruturas e/ou espécies vegetais utilizadas no estudo com <i>Spodoptera frugiperda</i>	54
Tabela 3 - Médias ($\pm$ erro padrão) de mortalidade e peso larval de <i>Spodoptera frugiperda</i> após o 7º dia de manutenção em meio artificial com os diferentes solventes incorporados (1.000 mg kg ⁻¹). Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h.....	55
Tabela 4 - Médias ($\pm$ erro padrão) de mortalidade e peso larval de <i>Spodoptera frugiperda</i> após o 7º dia de manutenção em meio artificial com os extratos etanólicos de diferentes espécies e/ou estruturas de Annonaceae incorporados (1.000 mg kg ⁻¹). Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h.	58
Tabela 5 - Estimativa da CL ₂₅ , CL ₅₀ e CL ₉₀ (em mg kg ⁻¹) e intervalo de confiança do extrato etanólico de sementes de <i>Annona mucosa</i> (Annonaceae) para lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> , em diferentes tempos de exposição. Temp.: 25 $\pm$ 2°C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; Fotofase: 14h.	61
Tabela 6 - Médias ($\pm$ erro padrão) do peso da dieta consumida (g) por lagartas de quarto ínstar de <i>Spodoptera frugiperda</i> , 24 horas após liberação em arenas contendo no centro, um pedaço (1,5 x 1,5 cm) de meio artificial com uma das respectivas concentrações letais do extrato das sementes de <i>Annona mucosa</i> incorporado. Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h.	63
Tabela 7 - Resumo da análise de variância do peso da dieta consumida (g) por lagartas de quarto ínstar de <i>Spodoptera frugiperda</i> em diferentes tempos ao extrato etanólico das sementes de <i>Annona mucosa</i> , incorporado em meio artificial na respectiva CL ₉₀	64
Tabela 8 - Médias ($\pm$ erro padrão) do peso da dieta consumida (g) por lagartas de quarto ínstar de <i>Spodoptera frugiperda</i> , em diferentes tempos em arenas contendo no centro, um pedaço (1,5 x 1,5 cm) de meio artificial com o extrato etanólico das sementes de <i>Annona mucosa</i> incorporado na respectiva CL ₉₀ . Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h.....	64

Tabela 9 - Médias ($\pm$ erro padrão) da mortalidade e duração da fase larval de <i>Spodoptera frugiperda</i> mantida em meio artificial contendo o extrato etanólico das sementes de <i>Annona mucosa</i> (ESAM), testado na CL_{50} (842,97 mg kg ⁻¹) estimada.....	66
Tabela 10 - Médias ($\pm$ erro padrão) da mortalidade e duração pupal de <i>Spodoptera frugiperda</i> mantida em meio artificial contendo extrato etanólico das sementes de <i>Annona mucosa</i> (ESAM), na CL_{50} (842,97 mg kg ⁻¹) estimada para o respectivo extrato bruto. Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h.....	68
Tabela 11 - Médias ($\pm$ erro padrão) de peso pupal e porcentagens de pupas e adultos defeituosos de <i>Spodoptera frugiperda</i> mantida em meio artificial contendo extrato etanólico das sementes de <i>Annona mucosa</i> (ESAM) na CL_{50} (842,97 mg kg ⁻¹) estimada para o respectivo extrato bruto. Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h.	68
Tabela 12 - Médias ($\pm$ erro padrão) de mortalidade e peso larval de <i>Spodoptera frugiperda</i> após o 7º dia de exposição em meio artificial contendo diferentes produtos comerciais (Azamax [®] 1,2 EC e Premio [®] SC, nas doses recomendadas) e o extrato etanólico das sementes de <i>Annona mucosa</i> [(ESAM) na CL_{90}]. Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h.	71
Tabela 13 - Estimativa do tempo letal médio (TL_{50} , em horas) e intervalo de confiança dos respectivos tratamentos (ESAM na CL_{90} ; Azamax [®] 1,2 EC e Premio [®] SC na dose recomendada) para lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> . Temp.: 25 $\pm$ 2°C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; Fotofase: 14 h.....	75
Tabela 14 - Rendimento das diferentes fases, obtidas por partição líquido-líquido, do extrato etanólico das sementes de <i>Annona mucosa</i>	76
Tabela 15 - Médias ($\pm$ erro padrão) de mortalidade e peso larval de <i>Spodoptera frugiperda</i> após o 7º dia de exposição em meio artificial contendo diferentes partições do extrato etanólico das sementes de <i>Annona mucosa</i> , testadas na CL_{50} (842,97 mg kg ⁻¹) estimada para o respectivo extrato bruto. Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h.	76
Tabela 16 - Médias ($\pm$ erro padrão) de mortalidade e peso larval de <i>Spodoptera frugiperda</i> após o 7º dia de exposição em meio artificial contendo diferentes frações do extrato etanólico das sementes de <i>Annona mucosa</i> , testadas a 20% da CL_{50} (842,97 mg kg ⁻¹) estimada para o respectivo extrato bruto. Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h.	78

- Tabela 17 - Médias ($\pm$ erro padrão) de mortalidade e peso larval de *Spodoptera frugiperda* após o 7º dia de exposição em meio artificial contendo a acetogenina (roliniastatina-1), testada a 10% da CL₅₀ (842,97 mg kg⁻¹) estimada para o respectivo extrato bruto. Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h..... 79
- Tabela 18 - Estimativa da CL₂₅, CL₅₀ e CL₉₀ (em mg kg⁻¹) e intervalo de confiança do bioinseticida Anosom[®] 1 EC para lagartas de *Spodoptera frugiperda*, em diferentes tempos de exposição. Temp.: 25 $\pm$ 2°C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; Fotofase: 14 h. 81
- Tabela 19 - Médias ($\pm$ erro padrão) da mortalidade e duração larval de *Spodoptera frugiperda* criada em meio artificial contendo o bioinseticida Anosom[®] 1 EC, testado na CL₅₀ (1.352,00 mg kg⁻¹). Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h..... 82
- Tabela 20 - Médias ($\pm$ erro padrão) da mortalidade e duração da fase pupal de *Spodoptera frugiperda* mantida, durante a fase larval, em meio artificial contendo o bioinseticida Anosom[®] 1 EC, na CL₅₀ estimada (1.352,00 mg kg⁻¹). Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h. 84
- Tabela 21 - Médias ($\pm$ erro padrão) de peso pupal e porcentagens de pupas defeituosas de *Spodoptera frugiperda* mantidas, durante a fase larval, em meio artificial, contendo o bioinseticida Anosom[®] 1 EC, na CL₅₀ estimada (1.352,00 mg kg⁻¹). Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h. 84
- Tabela 22 - Médias ($\pm$ erro padrão) de mortalidade e peso larval de *Spodoptera frugiperda* após o 7º dia de exposição em meio artificial contendo diferentes produtos comerciais incorporados [(Anosom[®] 1 EC na CL₉₀, Azamax[®] 1,2 EC na dose recomendada e a mistura de ambos (metade da CL₉₀ para o Anosom[®] 1 EC + Azamax[®] 1,2 EC na metade da dose recomendada)]. Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h. 88
- Tabela 23 - Estimativa do tempo letal médio (TL₅₀, em horas) e intervalo de confiança dos respectivos tratamentos (Anosom[®] 1 EC na CL₉₀; Azamax[®] 1,2 EC na dose recomendada e a mistura de ambos com metade da CL₉₀ para o Anosom[®] 1 EC e metade da concentração recomendada para o Azamax[®] 1,2 EC) para lagartas de *Spodoptera frugiperda*. Temp.: 25 $\pm$ 2°C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; Fotofase: 14h..... 90

1 INTRODUÇÃO

O setor primário é um dos principais pilares da economia brasileira devido, principalmente, à expressiva exportação de *commodities* de origem vegetal que auxilia no estabelecimento de uma balança comercial favorável (CASTRO et al., 2006). Entre estas, destaca-se o milho (*Zea mays* L.), terceiro maior produto agrícola do mundo, tanto em consumo como em produção (ZURE et al., 2011). Apesar do alto potencial genético da cultura e da tecnologia empregada, o ataque de insetos-praga, que ocorre desde o plantio até a armazenagem, tem limitado a produtividade da cultura e a rentabilidade dos agricultores (MENDES et al., 2011).

Entre as espécies ocorrentes nos milharais, a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é considerada a praga chave, causando danos em praticamente todas as fases de desenvolvimento da cultura (SILOTO, 2002), sendo referenciada como uma das espécies mais nocivas nas regiões tropicais das Américas, devido sua ampla distribuição geográfica e sua incidência durante todo o ano agrícola (WAQUIL et al., 2008).

O controle de *S. frugiperda* tem sido feito basicamente por meio da aplicação de inseticidas químicos e, mais recentemente, pelo emprego de genótipos resistentes que expressam a proteína *Bt*. Entretanto, a aplicação rotineira de inseticidas sintéticos, apesar da sua relativa eficiência, pode causar uma série de problemas, como a contaminação ambiental, a presença de altos níveis de resíduos nos alimentos, o desequilíbrio biológico devido à eliminação de inimigos naturais e o surgimento de populações de insetos resistentes (RODRÍGUEZ e VENDRAMIM, 1996).

Por outro lado, o seu hábito polífago e a sucessão de culturas anuais hospedeiras são aspectos que estão acelerando a seleção de populações resistentes aos genótipos que expressam as proteínas *Bt* (DENNEHY e OMOTO, 1994), o que pode comprometer a eficiência da tecnologia. Assim, faz-se necessária a busca de novos ingredientes ativos, ambientalmente mais adequados e preferencialmente dotados de novos modos/mecanismos de ação e que sejam passíveis de utilização no manejo integrado dessa espécie-praga (RAGURAMAN e SINGH, 1999).

Compostos inseticidas caracterizados por alta eficácia agrônômica, baixa persistência no meio ambiente e nos alimentos e baixa toxicidade a mamíferos constitui-se uma necessidade eminente dos programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) de diversos cultivos agrícolas, especialmente para aqueles de grande expressão econômica (CASTRO et al., 2006).

Diante desse contexto, o ressurgimento das pesquisas com plantas inseticidas ocorreu em razão da necessidade de novas estratégias biorracionalis mais adequadas ambientalmente. O emprego de derivados botânicos (bioinseticidas) tem ganhado importância, em especial, nos sistemas orgânicos, cujo mercado vem se expandindo rapidamente nos últimos anos em todo o mundo (MENDES et al., 2011). Entretanto, para o emprego de tal tecnologia ainda há necessidade de elucidar aspectos relacionados à composição química, toxicidade a organismos não alvos, estabelecimento de formulações mais adequadas e um controle de qualidade mais adequado (MENDES, 2012).

Entre as principais famílias botânicas com sucesso como fonte de substâncias inseticidas, destaca-se a Annonaceae que se destaca pela grande diversidade apresentando 2.500 espécies e 135 gêneros descritos até o momento no mundo (CHATROU et al., 2004), tendo já sido registrados no Brasil, 29 gêneros, compreendendo cerca de 388 espécies (MAAS et al., 2013). Economicamente, a família é apreciada como uma fonte de frutos comestíveis, tais como a pinha e a graviola. Além disso, das sementes de algumas espécies são obtidos óleos comestíveis (CHATROU et al., 2004), enquanto que a madeira de algumas espécies tem sido utilizada para a produção de carvão (SAVARD e ESPIL, 1951).

Estudos fitoquímicos têm identificado uma série de produtos naturais em espécies de Annonaceae, com destaque para as acetogeninas (ACG), até então isoladas de um pequeno número de gêneros (*Annona*, *Asimina*, *Xilopia*, *Goniothalamus* e *Uvaria*). As ACGs possuem estruturas diversificadas e poderosas propriedades citotóxicas, com aplicações potenciais na geração de fármacos (compostos antitumorais) e de inseticidas agrícolas (COLOM et al., 2007a; 2008; BLESSING et al., 2010).

Dessa forma, neste estudo, realizou-se, primeiramente, uma triagem com 18 extratos etanólicos de diferentes estruturas e/ou espécies de Annonaceae visando detectar possíveis fontes de compostos com toxicidade aguda e crônica para lagartas de *S. frugiperda*. Feito isso, a atividade do extrato mais promissor foi comparada com inseticidas comerciais de origem natural e sintética. Em virtude dos promissores resultados obtidos, o fracionamento biomonitorado foi conduzido visando isolar e caracterizar o composto ativo majoritário (acetogenina) responsável pela bioatividade observada. Por fim, avaliou-se a eficácia, sob condições laboratoriais, de uma formulação comercial à base de acetogeninas recentemente registrada, de forma isolada e em associação (mistura) com um bioinseticida à base de limonoides.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos taxonômicos e bioecológicos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797)

A espécie *Spodoptera frugiperda*, comumente reconhecida no Brasil por diferentes nomes populares (lagarta-do-cartucho, lagarta-dos-milharais, lagarta-dos-capinzais, lagarta-dos-pastos e lagarta-dos-arrozais) foi classificada por J.E. Smith em 1797. Essa espécie encontra-se incluída no Reino Animal, Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Lepidoptera, Família Noctuidae e Gênero *Spodoptera* (anteriormente *Laphygma*) (CARVALHO, 1970).

Esse inseto apresenta metamorfose completa, sendo que os adultos acasalam-se três dias após a emergência e se caracterizam por apresentar hábitos noturnos (CRUZ et al., 1997). As fêmeas ovipositam tanto de dia quanto à noite e os ovos encontram-se dispostos em massas sobrepostas entre si, podendo ocorrer, em média, 300 ovos por postura. O período de incubação varia de acordo com as condições de temperatura, sendo que para os meses relacionados ao inverno a duração é de três dias (FERRAZ, 1982). Próximo do fim do período embrionário, os ovos mostram-se escurecidos devido à coloração preta referente à cabeça da lagarta quando observada através da superfície semitransparente dos mesmos. No intervalo de dois a três dias as lagartas começam a eclodir (FERRAZ, 1982). A primeira alimentação das lagartas recém-eclodidas é a própria casca do ovo, permanecendo as larvas em repouso por um período de duas a 10 horas (SCHMIDT et al., 2001). A coloração das lagartas varia de pardo-escuro até quase preta, apresentando três finas linhas longitudinais branco-amareladas na parte dorsal do corpo. Durante a fase larval, esse inseto-praga pode apresentar de quatro a sete instares, variando conforme a fonte de alimento (artificial ou natural), temperatura, sexo e características genéticas (PARRA e HADDAD, 1989; NALIM 1991), podendo ainda apresentar canibalismo a partir do segundo ínstar (SCHMIDT et al., 2001).

As lagartas completamente desenvolvidas medem aproximadamente 35-40 mm de comprimento e apresentam um “y” invertido na parte frontal da cabeça (CRUZ et al., 1997; CRUZ et al., 1999). A duração desse período varia em média de 18 a 20 dias, fase em que a lagarta se alimenta basicamente de folhas mais tenras. Após esse período, as lagartas migram da planta para o solo, penetrando de 2 a 2,5 cm de profundidade, onde passam para a fase pupal, cuja duração varia de 8 a 25 dias (GALLO et al., 2002; CRUZ et al., 2009).

Por sua vez, os adultos emergem à noite e apresentam um acentuado dimorfismo sexual, medindo em torno de 35 a 40 mm de envergadura com comprimento corporal de aproximadamente 15 mm. O dimorfismo sexual pode ser observado na coloração do primeiro par de asas, sendo este escuro e com manchas nos machos e parda com coloração palha nas

fêmeas (ZENKER et al., 2007). O abdome das fêmeas é caracteristicamente mais largo na porção mediana com abertura anal apresentando-se como um traço reto longitudinal, enquanto nos machos, ocorrem ainda curvas laterais circundantes (ZENKER et al., 2007).

No Brasil, esse lepidóptero-praga destaca-se pela sua importância na cultura do milho (*Zea mays* L.), causando perdas de 34 a 39% dependendo das condições climáticas e do estágio de desenvolvimento das plantas atacadas (MENDES et al., 2011). Nos últimos anos, a severidade do ataque dessa praga vem aumentando em várias áreas cultivadas devido ao desequilíbrio biológico causado pela eliminação dos inimigos naturais, bem como pelo aumento na exploração indevida de culturas das quais a espécie se alimenta (CRUZ e MONTEIRO, 2004). Nesse contexto, a grande disponibilidade de hospedeiros alternativos [mais de 80 espécies-vegetais (incluindo algodão, soja e arroz)] é um dos principais fatores que afetam a dinâmica populacional de *S. frugiperda* (CRUZ et al., 2009), intensificando os níveis de danos. Apesar da amplitude hospedeira, esse inseto é considerado como uma importante praga de plantas da família Poaceae (gramíneas) (CAPINERA 2008).

Murúa et al. (2004) constataram que a planta hospedeira tem efeito significativo sobre parâmetros biológicos dessa espécie, entre eles a biomassa larval e pupal e a duração do período larval. Com base em estudos genéticos, Pashley et al. (1987) sugeriu a divisão em dois biótipos (“milho” e “arroz”), visto que estudos sobre a compatibilidade reprodutiva indicou a existência de isolamento unidirecional e a análise da composição do feromônio evidenciou variação quantitativa dos principais componentes presentes nos dois biótipos (LIMA e McNEIL, 1995). Segundo Drès e Mallet (2002), tais biótipos representam espécies crípticas associadas às plantas hospedeiras. No Brasil, estudos evidenciaram a presença dos dois biótipos de *S. frugiperda* (BUSATO et al., 2002). Posteriormente, Busato et al. (2003) confirmaram tal hipótese através de análises moleculares, detectando diferenças fenotípicas e genotípicas entre os biótipos associados ao milho e ao arroz. Tal constatação tem fundamental importância na atual concepção da entomologia econômica, pois pode haver um comportamento diferenciado na suscetibilidade a inseticidas (PASHLEY et al., 1987) e na resistência de plantas, especialmente na seleção da planta hospedeira para oviposição (PASHLEY et al., 1987).

2.2 Metabólitos secundários de plantas (aleloquímicos)

Uma variedade de compostos orgânicos é produzida pelo metabolismo secundário de plantas, os quais são denominados de metabólitos secundários ou aleloquímicos e não exercem, de modo direto, qualquer influência no crescimento e desenvolvimento dos vegetais

(TAIZ e ZEIGER, 2009). No entanto, os metabólitos secundários desempenham funções ecológicas importantes como a defesa contra herbivoria (Figura 1) (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Figura 1 - Produção de metabólitos secundários nas plantas, os quais desempenham funções ecológicas importantes ligadas às defesas contra estresses bióticos e abióticos (adaptado de SCHOONHOVEN et al., 2005)

As defesas expressas pelas plantas podem ser classificadas como constitutivas ou induzidas. As defesas constitutivas estão sempre presentes nos vegetais, independentemente do ataque e incluem inibidores de alimentação, toxinas e defesas mecânicas. Já as defesas induzidas desencadeiam-se em resposta ao ataque e incluem a modificação e o acúmulo dos metabólitos secundários nas plantas (LEVIN, 1973).

Tais compostos são produzidos e distribuídos de forma relativamente restrita no ecossistema, sendo em alguns casos limitados a espécies ou subespécies (MALHEIROS e PERES, 2001). Apresentando raras exceções, os metabólitos secundários têm em comum a biossíntese originária da rota acetato ou chiquimato, ou ainda da combinação dessas duas rotas (TAIZ e ZEIGER, 2009; MALHEIROS e PERES, 2001).

Considerados anteriormente como resíduos metabólitos, eles foram essenciais na evolução das plantas devido às funções desempenhadas na proteção contra a herbivoria, entre

as quais se destaca a redução da palatibilidade das espécies vegetais, (RAVEN et al., 2001). Sua ação pode ser efetivada por meio da ingestão (aparelho digestivo) ou ainda por contato (atravessando o tegumento) ou mesmo pelas vias respiratórias (compostos voláteis) (GALLO et al., 2002).

Relacionadas à defesa da espécie contra a herbivoria, as substâncias do metabolismo secundário pertencem majoritariamente à classe dos aminoácidos não proteicos, alcaloides, fenóis, saponinas, lectinas, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), quitinases, glucanases, flavonoides, inibidores de proteases, entre outros (BOWLES, 1990). Tais substâncias são enquadradas quimicamente nas classes de compostos nitrogenados, terpenoides e fenólicos (LARA, 1991). Os terpenoides ou terpenos representam o maior grupo dos produtos secundários sendo geralmente insolúveis em água (TAIZ e ZEIGER, 2009) e sintetizados nos plasmídeos e no citosol (LANGE et al., 1998).

De acordo com o número de unidades isoprênicas (C₅), os terpenoides são classificados como: monoterpenos com 10 carbonos (duas unidades C₅), sesquiterpenos com 15 carbonos (três unidades C₅), diterpenos com 20 carbonos (quatro unidades C₅), ainda a existência dos triterpenos (30 carbonos), tetraterpenos (40 carbonos) e os politerpenoides (acima de 40 carbonos) (TAIZ e ZEIGER, 2009).

A importância dos terpenos como substâncias de defesa de plantas é bem elucidada na literatura, sendo que alguns monoterpenos como alfa-pineno, beta-pineno, 3-careno, limoneno, mirceno, alfa-terpineno e cafeno, foram isolados e apresentaram atividade inseticida comprovada sobre vários insetos-praga (VIEGAS Jr., 2003). Entretanto, outros compostos podem apresentar efeitos no comportamento de insetos-praga e normalmente são mistura de mono e sesquiterpenos voláteis, denominados de óleos essenciais, os quais conferem aroma característico às folhas, apresentando reconhecidas propriedades repelentes aos insetos (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Dessa forma, muitos compostos importantes que constituem a base de diversos agroquímicos comerciais têm origem de terpenoides e embora o avanço na engenharia genética esteja concretizada como uma poderosa ferramenta para direcionar a produção de metabólitos primários e secundários nos vegetais, somente uma pequena parcela das rotas envolvidas na biossíntese de seus precursores disponível é bem conhecida (RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN e BORONAT, 2002).

Outro grupo de produtos naturais encontrados nas espécies vegetais são os compostos fenólicos, os quais pertencem a um grupo quimicamente heterogêneo, com uma estrutura composta por um agrupamento fenol, uma hidroxila funcional e um anel aromático (LARA,

1991). Em virtude de sua diversidade química, apresentam várias funções nos vegetais, sendo que muitos estão relacionados à defesa contra herbívoros, podendo ainda atuar no suporte mecânico, na atração de polinizadores, na proteção contra radiação solar ou ainda estarem relacionados com a alelopatia. Em contrapartida, os compostos fenólicos simples denominados de fenilpropanoides [ligados à classe dos fenilpropenos (eugenol, chavicol e seus derivados)] (TAIZ e ZEIGER, 2009) são encontrados em determinadas plantas, as quais são reconhecidas desde a antiguidade como temperos aromáticos para o consumo humano, apresentando expressivo valor comercial (GANG et al., 2001)

Outra classe de metabólitos secundários importantes são os compostos nitrogenados, incluindo nessa categoria os alcaloides, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos, aminoácidos não protéicos entre outros. Os alcaloides constituem uma grande família com mais de 15.000 compostos encontrados em aproximadamente 20% das espécies vegetais. São exemplos de alcaloides a nicotina, a atropina, a cocaína, a estricnina, entre outros (TAIZ e ZENGEIR, 2009). Alguns alcaloides são conhecidos por apresentarem ação deterrente contra diversas espécies de insetos-praga (PETROSKI e STANLEY, 2009). Nesse sentido, certas substâncias oriundas do metabolismo secundário das plantas podem ainda afetar a biologia, o desenvolvimento e a reprodução dos insetos, sendo que algumas destas já são amplamente utilizadas inclusive como (bio)inseticidas (HOLTZ et al., 2004).

Dessa forma, a diversidade de espécies vegetais encontradas nos diferentes ecossistemas destaca-se como uma expressiva fonte a ser explorada na busca de novas moléculas-modelos passíveis de uso na síntese de novos inseticidas, por meio da bioprospecção de extratos vegetais (BARREIRO, 2001).

2.3 Aspectos gerais sobre o uso de plantas inseticidas

A percepção da opinião pública em relação ao fato de os produtos naturais serem mais seguros, quando comparados aos sintéticos, tem gerado grandes incentivos para o desenvolvimento e síntese de novos bioinseticidas. De tal forma, apesar dessa afirmação não ser amplamente elucidada em estudos científicos, o mercado permite preços especiais para produtos com certificação “orgânica” ou “naturalmente produzidos” (VILELA et al., 2001).

Diante desse nicho de mercado e entre outras preocupações ligadas de forma direta ou indireta ao homem, muito tem se discutido a respeito do uso indiscriminado dos inseticidas sintéticos visando diminuir os efeitos negativos causados por esses xenobióticos. Alternativamente, os produtos de origem vegetal têm se mostrado como uma fonte viável e

bastante promissora para o controle de insetos-pragas, além de se enquadrarem aos preceitos dos programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (RIBEIRO et al., 2009).

Segundo Castro (2006), o interesse em pesquisas por espécies vegetais com atividade inseticida vêm crescendo consideravelmente devido à presença de compostos promissores em tais espécies. Esses compostos são decorrentes da produção ligada ao metabolismo secundário das plantas e apresentam vantagens quando comparados com aqueles presentes nos inseticidas sintéticos, pois são renováveis e facilmente degradáveis, ou seja, não contaminam o meio ambiente. Além disso, o desenvolvimento de resistência dos insetos-pragas a tais compostos é lento e não deixam resíduos nos alimentos, nem apresentam riscos aos operadores e são de baixo custo, tornando-se acessível aos pequenos produtores (OLIVEIRA et al., 2007).

Contudo, deve ser enfatizado que para o uso em grande escala de tais produtos (compostos) de origem vegetal tem-se a necessidade de elucidar aspectos relacionados à composição química, toxicidade ao homem e animais, preparo de formulações, custo em relação aos inseticidas sintéticos, uma melhor padronização da bioatividade e o estabelecimento de um controle de qualidade efetivo (GALLO et al., 2002). Não obstante, uma das principais limitações ao uso dos produtos de origem vegetal no campo talvez seja a disponibilidade de matéria-prima, uma vez que, experimentos em laboratório são realizados com pequenas quantidades de extratos vegetais, diferentemente do que ocorre em áreas cultivadas, onde grandes quantidades de matéria-prima são necessárias (COSTA et al., 2009).

Devido às pequenas quantidades disponíveis normalmente para realização de bioensaios em laboratório, os extratos provenientes de diversas espécies vegetais são testados e selecionados em doses únicas por meio de testes preliminares e triagens sobre os insetos-modelo em diferentes estudos (MAIRESSE, 2005). Dessa forma, após a realização de tais testes, os extratos mais promissores passam a ser avaliados separadamente em diversas doses, por meio de experimentos mais “refinados” ou ainda servindo como preparativo para a elaboração de testes com compostos fracionados (MAIRESSE, 2005), para depois então, serem submetidos a uma análise do mecanismo de ação biológica, sendo essa etapa a mais complexa, pois exige a combinação de técnicas avançadas de biologia molecular, bioquímica e eletrofisiológica (CALIXTO, 2001).

Ressalta-se, ainda, que a dificuldade em trabalhar com extratos vegetais reside principalmente na grande quantidade de compostos presentes nos diferentes extratos, aumentando o tempo necessário para purificação, além da complexidade das moléculas naturais, o que na verdade se constitui na riqueza do potencial de tais estruturas complexas

(YUNES e CECHINEL FILHO, 2001), pelas inúmeras possibilidades na busca de novos protótipos-modelo (MONGE, 2001; YUNES e CECHINEL FILHO, 2001).

Diante desse contexto, estudos monitorados por bioensaios (*in vivo* ou *in vitro*) são de extrema importância nas fases iniciais de seleção de novos compostos inseticidas, os quais serão a base para determinar se a espécie vegetal alvo de estudo apresenta ou não atividade biológica (YUNES e CECHINEL FILHO, 2001). Além do uso de doses adequadas, determinadas por parâmetros toxicológicos (curvas de dose/concentração-resposta), é recomendável a utilização de insetos-modelo mais sensíveis aos testes (BLUM, 1999). Como exemplificado anteriormente, chegar a uma molécula inseticida significa percorrer um longo e árduo caminho (MAIRESSE, 2005).

2.4 Considerações gerais sobre a família Annonaceae

A família Annonaceae é encontrada principalmente nas regiões tropicais em diversos ambientes (matas primárias e secundárias de terra firme, matas alagadas, restingas, regiões montanhosas, caatinga, savana entre outros) (OLIVEIRA, 2007), nas Américas, África e Sudeste Asiático, constituindo-se em importantes fontes de frutos comestíveis, óleos perfumados e drogas empregadas na medicina popular para vários fins (JOSSANG et al., 1991). Compreendida por inúmeros gêneros e espécies de árvores e arbustos, essa família encontra-se sistematicamente agrupada na classe Magnoliopsida e subclasse Magnolidae (MAAS et al., 2001).

Até o momento, são descritos 135 gêneros e 2.500 espécies no mundo (CHATROU et al. 2004), sendo que no Brasil, foram registrados 29 gêneros, compreendendo cerca de 388 espécies (MAAS et al., 2013), com destaque para o gênero *Annona* de maior importância econômica em virtude de seus frutos comestíveis de amplo mercado comercial (CHATROU et al., 2004). Ressalta-se ainda que, em diversos países, algumas anonáceas são utilizadas, pelas populações rurais, como controladoras da fertilidade, para produzir esterilidade temporária, sendo muito comum, inclusive no Brasil, o uso do extrato de sementes de *A. squamosa* como abortivo (DAMASCENO et al., 2002).

O interesse no potencial farmacológico da família Annonaceae tem crescido bastante nos últimos anos e, segundo Martins (1996) e Moreira et al. (2003), estudos químicos relacionados a algumas espécies de anonáceas, demonstraram que as mesmas acumulam diferentes metabólitos secundários com importantes atividades farmacológicas tais como efeitos citotóxicos (acetogeninas e flavanonas), antitumoral (diterpenos, alcaloides), bactericida (alcaloides) e antifúngico (terpenos).

Até o momento, já foram isolados cerca de 400 compostos relacionados a essa família, entre os quais, destacam-se as acetogeninas, potentes inibidores do Complexo I (NADH: ubiquinona oxiredutase) do sistema de transporte de elétrons mitocondrial e da NADH: oxidase da membrana plasmática (JOHNSON et al., 2000). As acetogeninas induzem apoptose (morte programada da célula), de certa forma pela privação de ATP.

Por outro lado, apesar dos esforços realizados na busca de novas moléculas-modelo direcionadas à síntese de inibidores do Complexo I, problemas toxicológicos relacionados a esse mecanismo de ação, frente a mamíferos e peixes, ainda é um fator a ser superado, pois tais efeitos têm dificultado a introdução desses produtos no mercado de defensivos agrícolas (JOHNSON et al., 2000).

2.5 Compostos ativos presentes em anonáceas

Entre as famílias botânicas de ocorrência em regiões tropicais, Annonaceae é uma das mais promissoras fontes de moléculas bioativas em virtude de sua grande diversidade de metabólitos secundários com atividade biológica (PINHEIRO et al., 2009).

De acordo com a revisão realizada por Leboeuf et al. (1982), alcaloides são os compostos secundários predominantes em Annonaceae. Além destes, polifenóis, óleos essenciais, terpenos, substâncias aromáticas e acetogeninas são também frequentemente encontradas em estudos fitoquímicos (ALALI; LIU; MCLAUGHLIN, 1999).

Entre as principais classes de aleloquímicos, as acetogeninas têm despertado, ultimamente, um intenso interesse devido ao seu potencial bioativo, tais como ação antitumoral, antimalárica, antimicrobiana, antiprotozoária e pesticida (ALALI; LIU; MCLAUGHLIN, 1999). A uvaricina foi a primeira acetogenina isolada das raízes de *Uvaria acuminata* (JOLAD et al., 1982), sendo que, até o momento, mais de 400 acetogeninas (ACGs) já foram identificadas e, alguma delas testadas em diversas áreas das ciências, inclusive na agrônoma (PIMENTA et al., 2003 ; BERMEJO et al., 2005). Nesse campo, as pesquisas vêm sendo direcionadas ao desenvolvimento de novos bioinseticidas para uso no controle de insetos-praga.

2.6 Bioatividade de derivados de anonáceas sobre *S. frugiperda*

Colom et al. (2007a) avaliaram a ação de um grupo de acetogeninas (almunequina, motrilina, esquamocina, itrabina, tucumanina, cherimolina-1, cherimolina-2, neoanonina e asimicina) isoladas a partir de sementes de *A. cherimolia* (Annonaceae) sobre o ciclo biológico de *S. frugiperda*, por meio da incorporação em dieta artificial (50 µg de composto

g⁻¹ de dieta). Os autores verificaram que todos os compostos ocasionaram altas taxas de mortalidade durante o estágio de pupa, sendo que os mais tóxicos foram esquamocina, itrabina, cherimolina-1, neoanonina e asimicina, ocasionando 100% de mortalidade pupal. Além disso, os autores verificaram que a esquamocina ocasionou 100% de mortalidade de lagartas de segundo ínstar de *S. frugiperda*. No mesmo estudo, os autores constataram má formação da região do abdome e das asas e, sobretudo, um aumento significativo na duração da fase larval e na ocorrência de malformações em pupas com a aplicação de cherimolina-2, itrabina, asimicina, motrilina e almunequina.

Por sua vez, estudo realizado por Blessing et al. (2010) comprovou que a inibição do Complexo mitocondrial I não é o único e exclusivo mecanismo de ação das acetogeninas sobre os insetos. Tal estudo baseou-se na investigação de uma possível correlação entre a toxicidade das acetogeninas (por eles isoladas a partir de folhas de *A. montana*) sobre larvas de *S. frugiperda* e a conhecida capacidade destas em inibir a oxidação da mesma enzima isolada. De acordo com os mesmos autores, compostos isolados de folhas de *A. montana* aplicados em meio artificial na concentração de 100 mg kg⁻¹ podem produzir alterações morfológicas em larvas e pupas de *S. frugiperda*, verificando-se assim que as larvas expostas ao composto cis-anonacina-10-(1) retinham, após a ecdise, a parte de exúvia que recobria a cabeça, e que o composto gigantetronenina ocasionava alta frequência de retenção de exúvia em larvas e deformação de pupas de *S. frugiperda*, aspectos que podem estar relacionados com uma possível interferência hormonal.

Mais recentemente, Tolosa et al. (2012) avaliaram o efeito da acetogenina (roliniastatina-1), incorporada em meio artificial, sobre lagartas de segundo ínstar de *S. frugiperda*. Os autores constataram (após 120 horas) mortalidades de 90 e 100%, respectivamente, nas concentrações de 50 e 100 mg kg⁻¹.

Em virtude dos relatos do potencial de acetogeninas sobre *S. frugiperda* ou de outras espécies de Lepidoptera, faz-se necessária a intensificação dos estudos relacionados a essa classe de compostos, possibilitando, dessa forma, a descoberta de possíveis moléculas novas que possam ser utilizadas na síntese de compostos inseticidas com qualidades superiores (CASIDA e QUIATAD, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado por meio da parceria do Laboratório de Plantas Inseticidas do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), com o Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), como parte das atividades do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Controle Biorracional de Insetos Pragas, sediado na UFSCar.

3.1 Etapa I

3.1.1 Estabelecimento e manutenção da criação de *S. frugiperda*

A criação foi estabelecida a partir de exemplares de quatro populações de campo (áreas de refúgio) (Rio Verde, GO; Campo Verde, MT; Campo Novo dos Parecis, MT e Sabáudia, PR), que foram multiplicadas no Laboratório de Plantas Inseticidas. A criação, em todas as suas fases do desenvolvimento, permaneceu em sala climatizada (temp.: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, U.R.: $60\pm 10\%$ e fotofase: 14 h) sendo as lagartas mantidas em dieta artificial (GREENE, 1976) e os adultos alimentados com solução de água + mel a 10% (p/p).

3.1.2 Obtenção das espécies e preparo dos extratos vegetais

Os dados de coleta das espécies utilizadas neste estudo encontram-se detalhados na Tabela 1. Todas as espécies foram coletadas entre os meses de março e abril de 2011, sendo que uma exsicata de cada espécimen coletado foi confeccionada e encaminhada para o Prof. Dr. Renato Mello-Silva (Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da USP) visando à identificação específica. *Voucher specimens* encontram-se depositados no herbário ESA do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP.

Após a coleta, o material vegetal foi separado em suas diferentes estruturas (folhas, sementes e ramos) e secado em estufa com circulação forçada de ar, regulada a 40°C por um período de 48 a 72 h. Feito isso, estes foram moídos em um moinho de facas até a obtenção de um pó fino, que foi armazenado em recipientes de vidro hermeticamente fechados até sua utilização.

Para obtenção dos extratos orgânicos das diferentes estruturas de cada espécie, os pós foram acondicionados em tubos de vidro revestidos por papel alumínio. Em seguida, foi feita a maceração a frio em solvente etanol (polaridade: 5,2) na proporção de 5:1 (p/v). A cada três dias foi feita a filtração dos materiais com auxílio de papel filtro, repetindo-se esse

procedimento por três vezes. O solvente das soluções extraídas foi retirado em rotaevaporador a 50°C e à pressão de -600 mmHg.

Tabela 1 - Dados de coleta das espécies de Annonaceae estudadas

Espécies	Estruturas coletadas	Local de coleta	Data de coleta	Número de voucher*
<i>Annona cacans</i> (Warming, 1873)	Folhas, ramos e sementes	IAC/APTA Frutas, Jundiaí, SP (23°06'56,6" S; 46°55'58,3" O; elevação: 537 m)	04/03/11	124270
<i>Annona montana</i> (Macfadyen, 1837)	Folhas, ramos e sementes	Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°42'28,2" S; 47°37'59,4" O; elevação: 537 m)	21/03/11	121203
<i>Annona mucosa</i> (Jacquin, 1764)	Folhas, ramos e sementes	Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°42'28,5" S; 47°37'59,6" O; elevação: 534 m)	17/03/11	120985
<i>Annona reticulata</i> (Linnaeus, 1753)	Folhas, ramos e sementes	Sítio São Luís, Descalvado, SP (21°52'58,0" S; 47°40'38,0" O; elevação: 679 m)	02/04/11	123318
<i>Annona sylvatica</i> (A. St.-Hil., 1825)	Folhas, ramos e sementes	Av. Emilio Falcão, Erval Seco, RS (27°25'41,8" S; 53°34'11,2" O; elevação: 466 m)	25/04/11	121205
<i>Duguetia lanceolata</i> (A. St.-Hil., 1825)	Folhas, ramos e sementes	Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°42'41,5" S; 47°38'0,2" O; elevação: 556 m)	23/03/11	121204

*Voucher specimens foram depositados no Herbário ESA do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP, Brasil

3.1.3 Bioensaios

Todos os bioensaios foram conduzidos em condições controladas (temp.: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$ e fotofase: 14h) sob delineamento inteiramente aleatorizado.

3.1.3.1 Avaliação do efeito dos solventes orgânicos sobre *S. frugiperda*

Visando determinar possíveis efeitos letais ou subletais dos solventes passíveis de serem utilizados na ressuspensão dos extratos vegetais, foi conduzido um teste preliminar de modo a avaliar o efeito de diferentes solventes orgânicos [acetato de etila, acetona, diclorometano, dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol], além da água deionizada, sobre lagartas de primeiro ínstar (<24 horas de idade) de *S. frugiperda*. Para isso, cada solvente foi incorporado (5 mL por cada 300 g de dieta) (adaptado de ISMAN e RODRIGUEZ, 1983) ao meio artificial (GREENE, 1976) fornecido ao referido inseto-praga. A incorporação do solvente ao meio artificial foi feita ao final do seu preparo, quando este apresentava temperatura de 50°C . Na realização deste bioensaio, foram utilizadas placas de Elisa (TPP[®] Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Cantão Schaffhausen, Switzerland) com 24 células cada, onde foi estabelecido um volume de 1,5 mL de meio artificial por célula o qual foi depositado com auxílio de um pipetador (Boeco Germany[®], Hamburg, Germany) (Figura 2).

Para cada tratamento foram estabelecidas seis repetições, cada qual constituída por uma placa de Elisa (24 células), totalizando 144 lagartas. Decorridas 24 horas da deposição do meio artificial nas placas, cada célula foi infestada com uma lagarta neonata (<24 horas de idade) de *S. frugiperda*. Diariamente, por um período de sete dias, a mortalidade das lagartas expostas aos diferentes tratamentos foi avaliada. Além disso, após o sétimo dia de exposição também foi avaliado o peso larval das lagartas sobreviventes.

Figura 2 - Procedimento experimental adotado nos bioensaios em placas de Elisa

3.1.3.2 Triagem para identificação dos extratos promissores

Para execução da triagem foi adotada a mesma metodologia descrita no bioensaio anterior (item 3.1.3.1), sendo que os tratamentos foram constituídos pelos extratos etanólicos de folhas, de ramos e de sementes de *A. cacans*, *A. montana*, *A. mucosa*, *A. reticulata*, *A. sylvatica* e *D. lanceolata* (totalizando 18 extratos), os quais foram incorporados no referido meio artificial na proporção de 300 mg de extrato para 300 g de meio artificial (concentração final de 1.000 mg kg⁻¹) (ISMAN e RODRIGUEZ, 1983). A incorporação de cada extrato foi feita ao final do preparo do meio artificial quando este apresentava temperatura de 50°C, evitando-se assim, a degradação dos possíveis compostos presentes nos extratos. Além do meio artificial correspondente a cada extrato, foi também preparado um meio artificial (controle), sem extrato, porém utilizando os solventes que foram usados na ressuspensão dos respectivos extratos [acetona:metanol (acet:met), 1:1, v/v].

3.1.3.3 Curvas de concentração-resposta do extrato selecionado

Com base nos resultados obtidos na triagem (item 3.1.3.2), foi selecionado apenas um extrato promissor que ocasionou efeito letal significativo em lagartas de *S. frugiperda*. Em seguida, esse extrato foi testado para estimativa da CL₂₅ (concentração letal média necessária para matar 25% da população de lagartas), da CL₅₀ (concentração letal média necessária para matar 50% da população de lagartas) e da CL₉₀ (concentração necessária para matar 90% da população de lagartas). Para isso, foram estabelecidas as concentrações testadas por meio da fórmula (FINNEY, 1971):

$$q = {}^{n+1}\sqrt{\frac{a_n}{a_1}},$$

onde: q = razão de progressão geométrica (p.g.); n = número de concentrações a extrapolar; a_n = limite superior da p.g. (concentração que provoca mortalidade de cerca de 95%, estimada por meio de teste preliminar); a₁ = limite inferior da p.g. (concentração que provoca mortalidade semelhante ao controle, estimada por meio de teste preliminar). Os mesmos procedimentos experimentais descritos no item 3.1.3.1 foram adotados para este bioensaio, porém, foram estabelecidas quatro repetições por concentração cada qual consistindo de uma placa de Elisa, totalizando 96 lagartas por concentração.

3.1.3.4 Efeito do extrato selecionado sobre o consumo alimentar de lagartas de *S. frugiperda*

Bioensaio 1: Com base na CL₂₅, na CL₅₀ e na CL₉₀ estimadas no teste anterior (item 3.1.3.3) para o extrato promissor selecionado, realizou-se este bioensaio avaliando-se o efeito das três concentrações do referido extrato no consumo alimentar de lagartas de quarto ínstar de *S. frugiperda*. Para isso, o extrato foi incorporado em meio artificial (em 300 g) nas respectivas concentrações 468,00; 842,97 e 1.882,00 mg kg⁻¹, adotando-se os mesmos procedimentos detalhados no item 3.1.3.1.

Além do meio artificial correspondente ao extrato, foi também preparado um meio artificial (controle), sem extrato, utilizando os solventes (acetona e metanol) nos quais foram ressuspensos os extratos orgânicos (acet.:met., 1:1, v/v). Tanto o meio artificial contendo o extrato quanto o controle foram acondicionados em caixas plásticas (11 x 11 x 3,5 cm) (J Prolab[®] Ind. e Com. de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, Paraná, Brasil)

e, após 24 horas da deposição, os mesmos foram cortados em pedaços de 1,5 cm x 1,5 cm a fim de serem oferecidas às lagartas.

Posteriormente a esses procedimentos, os pedaços referentes a cada meio artificial [com extrato e sem extrato (controle)], foram pesados antes do fornecimento e colocados no centro de placas de Petri de 15 cm de diâmetro com o fundo coberto por gesso e recoberto por papel filtro, as quais foram previamente umedecidas. No centro de cada placa foram liberadas três lagartas de quarto ínstar de *S. frugiperda*, sendo que para cada tratamento foram adotadas 15 repetições, sempre em comparação com o controle (acet.:met., 1:1, v/v) (Figura 3).

Figura 3 - Arenas utilizadas para bioensaio de consumo alimentar. **A** - Arena no início do bioensaio, com lagartas de quarto ínstar de *Spodoptera frugiperda* recém-liberadas no centro da arena; **B** - Bioensaio com arenas aleatorizadas de acordo com os tratamentos

Após 24 horas, foram pesados os restos dos pedaços de cada meio artificial oferecidos às lagartas, sendo que o consumo alimentar foi calculado pela diferença entre o peso inicial e final. Para determinar a perda de água sofrida pelo meio 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 meio artificial oferecido às lagartas.

Bioensaio 2: De acordo com os resultados obtidos no teste preliminar (bioensaio 1), realizou-se este teste utilizando-se os mesmos procedimentos experimentais do bioensaio anterior, porém foi incorporado o extrato selecionado somente na CL₉₀ estimada, oferecendo às lagartas de quarto ínstar de *S. frugiperda* e avaliando-se o consumo após diferentes tempos de exposição (24, 48 e 72 horas).

3.1.3.5 Efeito do extrato selecionado sobre parâmetros biológicos de *S. frugiperda*

Este bioensaio foi realizado com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos do extrato selecionado (item 3.1.3.2) sobre parâmetros biológicos de *S. frugiperda*. Para isso, o extrato foi incorporado em 300 g do meio artificial na CL₅₀ estimada previamente (item 3.1.3.3), adotando-se a mesma temperatura de incorporação utilizada no item 3.1.3.1. Dessa forma, foi estabelecido um volume de 4 mL de meio artificial (GREENE, 1976) a ser depositado em cada tubo de ensaio de vidro (8,5 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro), no qual foi infestada uma lagarta de *S. frugiperda* de primeiro ínstar (<24 horas de idade).

Assim, para cada tratamento, foram utilizadas 10 repetições sendo que para cada repetição foram usados 12 tubos (n=120). As avaliações foram feitas diariamente até a emergência dos adultos, sendo que os parâmetros avaliados foram a viabilidade e a duração das fases larval e pupal, o peso de pupas com 24 horas e a porcentagem de pupas e de adultos defeituosos.

3.1.3.6 Bioatividade comparada do extrato selecionado com inseticidas comerciais

Realizou-se este bioensaio a fim de comparar a atividade inseticida do extrato selecionado com inseticidas comerciais de origem natural [Azamax[®] 1,2 EC (UPL Brasil, Ltd., Campinas, São Paulo, Brasil)] e de origem sintética [Premio[®] SC (Du Pont do Brasil S.A., Barueri, São Paulo, Brasil)]. Para isso, adotaram-se os mesmos procedimentos experimentais apresentados no item 3.1.3.1. O extrato foi incorporado na CL₉₀ (estimada para o extrato etanólico bruto) e os inseticidas comerciais nas respectivas concentrações recomendadas para controle de *S. frugiperda* na cultura do milho (AGROFIT, 2014), ambos em 300 g de meio artificial cada.

Desse modo, além dos meios artificiais correspondentes ao extrato e aos inseticidas, foram também preparados dois meios artificiais correspondentes aos controles (acet.:met., 1:1, v/v) e água deionizada, utilizadas na solubilização dos extratos etanólicos e dos inseticidas comerciais, respectivamente. Para cada tratamento, foram utilizadas seis repetições, cada qual consistindo de uma placa de Elisa (com 18 lagartas cada), totalizando 108 lagartas por tratamento.

3.1.3.7 Estimativa do tempo letal médio (TL₅₀) para o extrato selecionado e para os inseticidas comerciais

Utilizaram-se, neste bioensaio, os mesmos procedimentos experimentais descritos no item 3.1.3.6, onde o TL₅₀ (tempo necessário para matar 50% da população de *S. frugiperda*)

para o extrato selecionado foi estimado na CL_{90} (estimada para o extrato etanólico bruto) e para os inseticidas comerciais (natural e sintético) nas doses recomendadas para controle de *S. frugiperda* na cultura do milho (AGROFIT, 2014), ambos em 300 g de meio artificial cada. Para cada tratamento, foram utilizadas seis repetições, cada qual consistindo de uma placa de Elisa (com 18 lagartas cada), totalizando 108 lagartas por tratamento. Diariamente, por um período de sete dias, a mortalidade das lagartas expostas aos diferentes tratamentos foi avaliada.

3.2 Etapa II

3.2.1 Fracionamento biomonitorado do extrato selecionado

Com base nos resultados obtidos nos bioensaios realizados na etapa I, o extrato promissor (selecionado no item 3.1.3.2) foi submetido ao fracionamento biomonitorado com a finalidade de isolar e caracterizar o composto majoritário responsável pela bioatividade observada.

3.2.1.1 Partição líquido-líquido do extrato selecionado

Com a intenção de separar possíveis compostos com diferentes afinidades químicas (cromatografia de partição) presentes no extrato promissor (selecionado no item 3.1.3.2), foi realizada a partição líquido-líquido de tal extrato. Para isso, o extrato selecionado foi ressuspenso em metanol:água (8:2, v/v) e particionado com auxílio de um funil de separação e solventes orgânicos de polaridades crescentes (hexano e hidroálcool), conforme ilustrado na Figura 4. O procedimento de separação inicial somente com solvente apolar foi adotado com vistas à separação da fase oleosa (em maior quantidade no referido extrato), facilitando-se, assim, o subsequente uso de técnicas de separação por cromatografia de adsorção. As partições obtidas foram concentradas em rotaevaporador sob as mesmas condições de temperatura e pressão já mencionadas no item 3.1.2. O rendimento foi determinado com base na massa do respectivo extrato submetido ao particionamento.

Figura 4 - Esquema da partição líquido-líquido do extrato selecionado

3.2.1.1.1 Avaliação da atividade inseticida das partições obtidas sobre *S. frugiperda*

Obtidas as partições, testes foram conduzidos visando avaliar o efeito de cada partição na mortalidade e no peso larval de *S. frugiperda*, utilizando os mesmos procedimentos descritos no item 3.1.3.1. A concentração utilizada de cada partição foi a CL_{50} estimada para o extrato promissor selecionado. Para cada tratamento, foram utilizadas oito repetições, cada qual consistindo de uma placa de Elisa com 12 células contendo meio artificial, totalizando 96 lagartas por tratamento. Além do meio artificial com as partições incorporadas, foi também preparado um meio artificial (controle), sem partição, utilizando os solventes (acetona e metanol) nos quais foram ressuspensas as partições (acet.:met., 1:1, v/v).

3.2.1.2 Fracionamento da partição mais ativa

Mediante os resultados obtidos no bioensaio anterior (item 3.2.1.1.1), a partição mais ativa do extrato selecionado, obtida no processo de partição líquido-líquido, foi submetida, primeiramente, ao refractionamento por cromatografia por adsorção (coluna), utilizando sílica-gel como fase estacionária e eluição gradiente (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol) (Figura 6). Após tal procedimento, as frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de 1H). Com base nos resultados, as frações foram reunidas pelas semelhanças

apresentadas nessas técnicas, resultando num total de seis frações. Em virtude da quantidade limitada obtida de cada fração, apenas aquelas ricas em acetogeninas foram submetidas à avaliação da atividade inseticida sobre *S. frugiperda*.

De acordo com a estrutura geral de acetogeninas (Figura 5), a presença dessa classe de compostos nas frações obtidas foi indicada pela observação dos seguintes sinais nos espectros de RMN de ^1H : hidrogênios da insaturação do anel lactônico em deslocamento químico δ 7,38 ppm; diversos sinais em torno de δ 5,04-5,32 ppm característicos de hidrogênio do carbono saturado do anel lactônico; sinais em torno de δ 3,22-3,70 ppm característicos de hidrogênios de grupos metínicos (CH) da cadeia alquílica ligados diretamente a grupos hidroxilas ou a grupos epóxido; sinais na faixa de δ 2,11-2,40 ppm característicos de hidrogênios α -lactônicos e/ou α -carbonílicos no caso de moléculas com grupos cetonas nas cadeias alquílicas e sinais em torno de δ 0,8 ppm característicos de metilas terminais de cadeias alquílicas longas.

Figura 5 - Estrutura geral de acetogeninas

Figura 6 - Esquema do fracionamento da partição mais ativa do extrato selecionado

3.2.1.2.1 Avaliação da atividade inseticida das frações mais ativas sobre *S. frugiperda*

Após o refracionamento, as frações mais ativas foram avaliadas quanto aos seus efeitos sobre a mortalidade e peso larval de *S. frugiperda*. Para isso, adotaram-se os mesmos procedimentos experimentais descritos no item 3.2.1.1.1. A concentração utilizada foi a correspondente a 20% da CL_{50} estimada para o extrato bruto selecionado. Para cada tratamento, foram utilizadas oito repetições, cada qual consistindo de uma placa de Elisa com 12 células contendo meio artificial, totalizando 96 lagartas por tratamento.

3.2.1.3 Purificação, isolamento e determinação estrutural do composto majoritário das frações mais ativas

Com base nos resultados obtidos no bioensaio do item 3.2.1.2.1, as frações que apresentaram resultados mais promissores foram submetidas a procedimentos de purificação, isolamento e determinação estrutural do composto majoritário.

A purificação e o isolamento do componente majoritário da fração mais ativa foram realizados por meio de diferentes técnicas cromatográficas (Figura 7), tais como cromatografia por adsorção em camada delgada analítica (CCDA), usando folhas de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄ com 0,2 mm de espessura, cromatografia por adsorção em coluna (CC), utilizando como fase estacionária sílica-gel 70-230 *mesh* e 230-400 *mesh* e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para esse último procedimento, utilizou-se um cromatógrafo modelo 1200 (Agilent Technologies), equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, amostrador automático G1329A e detector de ultravioleta G1314B. O equipamento foi acoplado a uma interface G1369A e os cromatogramas foram registrados por meio do *software* EZCrom Ellite. A fase estacionária utilizada foi a fase reversa Phenomenex Luna C-18, em modo analítico (10 µm, 25,0 x 0,46 cm) e preparativo (10 µm, 25,0 x 1,0 cm) com válvula de reciclo e *loop* de 200 µL.

Por sua vez, a caracterização do composto isolado foi realizada por meio de técnicas espectroscópicas [ressonância magnética nuclear unidimensional (RMN de ¹H e ¹³C) e bidimensional (COSY, HSQC, HMBC)] e pela espectrometria de massas. Para tais caracterizações, utilizaram-se os espectrômetros BRUKER AVANCE™ III NanoBay 9,4T (400 MHz para RMN de ¹H e 100 MHz para RMN de ¹³C) e MICROMASS QUATTRO LC, em método de inserção direta e modo de ionização por captura de elétron (modo negativo).

Figura 7 - Esquema do isolamento dos possíveis compostos majoritários das frações mais ativas do extrato selecionado

3.2.1.3.1 Avaliação da atividade inseticida do composto majoritário das frações mais ativas

Posteriormente aos processos de isolamento e caracterização, o composto majoritário presente nas frações mais ativas foi testado visando avaliar o seu efeito sobre a mortalidade e o peso larval de *S. frugiperda*, utilizando-se, para isso, o mesmo procedimento descrito no item 3.1.3.1.

O composto foi ensaiado na concentração de 10% da CL_{50} estimada para o extrato bruto mais promissor. Para cada tratamento, foram utilizadas oito repetições, cada qual consistindo de uma placa de Elisa (oito células), totalizando 64 lagartas expostas por tratamento. Além do meio artificial contendo o composto puro, foi também preparado um

controle [meio artificial contendo apenas o solvente (acetona) empregado na solubilização do composto].

3.3 Etapa III

3.3.1 Curva de concentração-resposta da formulação comercial à base de acetogenina

Este bioensaio foi realizado com o objetivo de estimarem-se as concentrações letais CL_{50} e CL_{90} para o bioinseticida Anosom[®] 1 EC [à base de extrato de *Annona squamosa* L. e *Annona reticulata* L., com a acetogenina (anonina) como principal ingrediente ativo (10.000 mg L^{-1}) (AgriLife Biosolutions Ltd., Hyderabad, Andhra Pradesh, Índia)], as quais foram utilizadas nos bioensaios subsequentes. Para isso, adotaram-se os mesmos procedimentos experimentais do item 3.1.3.3 (etapa I).

3.3.2 Efeito da formulação à base de acetogenina sobre parâmetros biológicos de *S. frugiperda*

Este bioensaio foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da formulação à base de acetogeninas (Anosom[®] 1 EC) sobre aspectos biológicos de *S. frugiperda*. Para isso, adotaram-se os mesmos procedimentos experimentais descritos no item 3.1.3.5 (etapa I), com a CL_{50} estimada previamente para a formulação (item 3.3.1).

3.3.3 Bioatividade comparada de formulação comercial à base de acetogenina com bioinseticida à base de limonoides

Realizou-se este bioensaio com o objetivo de verificar a eficácia do inseticida Anosom[®] 1 EC em comparação com outro bioinseticida à base de limonoides (Azamax[®] 1,2 EC), de forma isolada e em associação (mistura: Anosom[®] 1 EC + Azamax[®] 1,2 EC) sobre lagartas de *S. frugiperda*.

Para isso, adotaram-se os mesmos procedimentos experimentais apresentados no item 3.1.3.1, porém o bioinseticida Anosom[®] 1 EC foi incorporado na respectiva CL_{90} estimada no bioensaio anterior (item 3.3.1) e o bioinseticida Azamax[®] 1,2 EC na dose registrada para controle de *S. frugiperda* na cultura do milho. Ainda, para o tratamento referente à associação, estabeleceu-se a mistura da metade da CL_{90} do Anosom[®] 1 EC com metade da dose registrada para o bioinseticida Azamax[®] 1,2 EC (incorporados em 300 g de meio artificial). Como controle, foi preparado um meio artificial sem os bioinseticidas, utilizando água deionizada, nas mesmas proporções utilizadas na solubilização dos produtos. Para cada tratamento

(bioinseticida/mistura) e controle, foram estabelecidas seis repetições, cada qual consistindo de uma placa de Elisa (com 20 lagartas cada), totalizando 120 lagartas por tratamento.

3.3.4 Estimativa do tempo letal médio (TL₅₀)

Para realização deste bioensaio, foram adotados os mesmos procedimentos experimentais do item 3.3.3, onde o TL₅₀ (tempo necessário para matar 50% da população de *S. frugiperda*) para os bioinseticidas comerciais e para a mistura (Anosom[®] 1 EC + Azamax[®] 1,2 EC) foi estimado nas suas respectivas concentrações e doses [Anosom[®] 1 EC na CL₉₀ estimada no bioensaio anterior (item 3.3.1), Azamax[®] 1,2 EC na dose registrada para controle de *S. frugiperda* na cultura do milho e a associação na mistura da metade da CL₉₀ do Anosom[®] 1 EC com metade da dose registrada para o bioinseticida Azamax[®] 1,2 EC (incorporados em 300 g de meio artificial)].

Para cada tratamento, foram utilizadas seis repetições, cada qual consistindo de uma placa de Elisa (com 20 lagartas cada), totalizando 120 lagartas por tratamento. Diariamente, por um período de sete dias, a mortalidade das lagartas expostas aos diferentes tratamentos foi avaliada.

3.4 Análises dos dados

Para análise dos dados de proporções de mortalidade (larval e pupal) de *S. frugiperda*, bem como para as proporções de pupas e adultos defeituosos foi utilizado o modelo linear generalizado (GLM) (NELDER e WEDDERBURN, 1972) com distribuição do tipo quase-binomial. Já para análise dos dados referentes ao peso larval, peso pupal e duração das fases larval e pupal, utilizou-se um GLM com distribuição do tipo gaussiana. 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 e 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 *multcomp* com ajuste dos valores de p .

As curvas de sobrevivência larval de *S. frugiperda*, foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier seguindo o modelo de regressão paramétrico com distribuição de Weibull (variável resposta), sendo posteriormente realizado o teste de log-rank para comparação entre os grupos (tratamentos). Ainda, para análise dos dados referentes ao consumo alimentar de lagartas de *S. frugiperda* em diferentes tempos de exposição, foi realizada análise fatorial confirmatória, para os fatores tratamento e tempo. Todas as análises foram realizadas

utilizando-se o software estatístico “R”, versão 2.15.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012).

Para estimativa das concentrações (CL_{50} e CL_{90}) 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. Já para os tempos (TL_{50}) letais, foi utilizado um modelo normal com função de ligação complemento log-log (modelo de gompit), utilizando-se o Probit Procedure do mesmo software mencionado anteriormente para estimativa das concentrações letais.

Para a estimativa da concentração efetiva média CE_{50} , foi utilizado um modelo logístico não linear adaptado de Sims et al. (1996), por meio do Nlim Procedure do mesmo software estatístico (SAS INSTITUTE, 2011).

Os gráficos de regressão referente à mortalidade larval de *S. frugiperda* em função do tempo de exposição, foram obtidos por meio do software Origin versão 9.1 (OriginLab, 2013).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Etapa I

4.1.1 Rendimento de extração

Houve variação (0,99 a 27,85%) no rendimento de extração quando comparadas as diferentes espécies e estruturas vegetais (Tabela 2). Os maiores rendimentos (superiores a 20%) foram obtidos a partir de sementes de *Annona reticulata* (27,85%), folhas de *Annona cacans* (20,62%) e sementes de *Annona montana* (20,23%). Na comparação entre as diferentes estruturas estudadas (considerando-se as diferentes espécies), o maior rendimento ocorreu com as sementes, seguindo-se as folhas e, finalmente, os ramos que apresentaram os menores rendimentos (Tabela 2).

De modo geral, o rendimento de extração varia de acordo com o método de extração e com o solvente empregado (WEINHOLD et al., 2008; BIMAKRA et al., 2011), podendo ainda ser afetado pelos estágios fenológicos das espécies (CHERICONI et al., 2004; BLANK et al., 2007) e pelas características fisiológicas sazonais no acúmulo e síntese de compostos orgânicos (STEFANELLO et al., 2010). Entretanto, ocorrem casos onde uma determinada espécie pode apresentar quimiotipos (polimorfismo químico) que afeta o rendimento de extração e o perfil químico dos derivados obtidos (THOMPSON et al., 2003).

Outro fator que afeta o rendimento é o tamanho das partículas do material vegetal processado, de tal modo que a diminuição do seu tamanho gera um aumento do rendimento de extração devido ao aumento da área superficial em contato com o solvente (LAROZE et al., 2010). Assim, Mendes (2012) ressalta que a otimização das condições de extração está intimamente relacionada ao máximo rendimento de extração, evidenciando-se que o comportamento dessa variável assume difícil comparação entre os estudos disponíveis na literatura.

Tabela 2 - Rendimentos de extratos brutos de anonáceas, por meio do processo de maceração a frio em solvente etanol, na proporção de 1:5 (p/v), das diferentes estruturas e/ou espécies vegetais utilizadas no estudo com *Spodoptera frugiperda*

Espécie vegetal	Estrutura vegetal	Material vegetal (g)	Rendimento ¹	
			(g)	(%)
<i>Annona cacans</i>	Folhas	200,00	41,24	20,62
	Ramos	200,00	10,06	5,03
	Sementes	105,00	15,84	15,09
<i>Annona montana</i>	Folhas	100,00	11,79	11,79
	Ramos	100,00	3,59	3,59
	Sementes	95,60	19,33	20,23
<i>Annona mucosa</i>	Folhas	100,00	9,96	9,96
	Ramos	100,00	0,99	0,99
	Sementes	106,21	19,95	18,79
<i>Annona reticulata</i>	Folhas	200,00	19,84	9,92
	Ramos	200,00	6,66	3,33
	Sementes	100,00	27,85	27,85
<i>Annona sylvatica</i>	Folhas	100,00	7,18	7,18
	Ramos	100,00	5,01	5,01
	Sementes	100,00	11,00	11,00
<i>Duguetia lanceolata</i>	Folhas	100,00	17,32	17,32
	Ramos	100,00	6,27	6,27
	Sementes	106,00	10,31	9,73

¹Obtido a partir da quantidade (g) do material vegetal especificado após trituração em moinho de facas.

4.1.2 Bioensaios

4.1.2.1 Avaliação do efeito dos solventes orgânicos sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797)

Verificou-se, com base nos resultados obtidos, que o solvente acetato de etila ocasionou significativa mortalidade (42,70%) de larvas de *S. frugiperda* e reduziu significativamente o peso das larvas sobreviventes (Tabela 3), aspecto mensurado ao sétimo dia de exposição, o que indica precaução na utilização desse solvente orgânico na solubilização dos derivados em teste. Os demais solventes (acetona, diclorometano, dimetilsulfóxido e metanol) mostraram-se adequados para utilização nos bioensaios, pois não ocasionaram efeitos significativos sobre as variáveis analisadas (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias ($\pm$ erro padrão) de mortalidade e peso larval de *Spodoptera frugiperda* após o 7º dia de manutenção em meio artificial com os diferentes solventes incorporados (1.000 mg kg^{-1}). Temp.: $25 \pm 2^\circ \text{C}$; U.R.: $60 \pm 10\%$; fotofase 14h

Solvente	Mortalidade (%) ¹	Peso (mg) ²
Acetato de etila	42,70 $\pm$ 14,37 a	22,18 $\pm$ 7,57 b
Diclorometano	7,29 $\pm$ 1,04 b	37,87 $\pm$ 0,98 a
Dimetilsulfóxido	7,29 $\pm$ 4,29 b	25,31 $\pm$ 1,29 ab
Metanol	4,21 $\pm$ 1,70 b	29,06 $\pm$ 1,12 ab
Acetona	3,12 $\pm$ 3,12 b	37,10 $\pm$ 1,64 a
Controle (água deionizada)	1,04 $\pm$ 1,04 b	33,69 $\pm$ 1,85 ab
F	7,70	3,65
Valor de <i>p</i>	0,0005	0,0186

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os solventes (GLM com distribuição quase-binomial seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$);

²Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os solventes (GLM com distribuição gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$).

Sanada-Morimura e Matsumura (2011), avaliando o efeito da acetona sobre fêmeas adultas de três espécies de cigarrinhas [*Nilaparvata lugens* (Stal), *Sogatella furcifera* (Horvath) e *Laodelphax striatellus* (Fallén) (Hemiptera: Delphacidae)], em aplicação tópica ($24 \mu\text{L inseto}^{-1}$) na região do dorso abdominal, observaram mortalidades significativas de 7,1; 4,9 e 18,2% para *S. furcifera*, *N. lugens* e *L. striatellus*, respectivamente, em comparação ao controle (sem acetona). Resultados semelhantes aos encontrados pelos referidos autores foram obtidos neste estudo com lagartas de *S. frugiperda*, com mortalidades de 7,29% para os solventes diclorometano e dimetilsulfóxido e 4,21% para o metanol, corroborando assim o efeito não significativo de tais solventes na sobrevivência dos insetos testados. Ainda para *L. striatellus*, Sanada-Morimura e Matsumura (2011) observaram sob as mesmas condições experimentais, porém com o uso do metanol, mortalidades próximas ao encontrado com a acetona.

Também não foi observada mortalidade significativa dos adultos de *Stenotus rubrovittatus* (Matsumura) (Hemiptera: Miridae), expostos por 72 horas à acetona via aplicação tópica ($0,04$ a $0,20 \mu\text{L inseto}^{-1}$) (KASHIN e WATANABE, 2012) e nem dos adultos machos de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) expostos ao mesmo solvente pela mesma via de aplicação ($1 \mu\text{L inseto}^{-1}$) (SEGURA et al., 2013).

Nesse sentido, entre os diferentes estudos disponíveis na literatura, Decio et al. (2013) avaliaram o efeito da hidrometilnona [incorporada à dieta à base de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ (inibidor da respiração celular)] sobre a mortalidade de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) quando expostas aos tratamentos hidrometilnona e

hidrometilnona + óleo de soja. Após dois dias de exposição, os autores observaram mortalidades de 12 e 18% para os respectivos tratamentos em comparação a 8% no controle acetona (em que foi diluída a hidrometilnona), demonstrando assim o efeito não significativo do solvente sobre o inseto-praga.

Os valores obtidos por Decio et al. (2013) foram muito próximos ao encontrado neste estudo para os solventes diclorometano e dimetilsulfóxido (7,29%), bem como no estudo realizado por Sanada-Morimura e Matsumura (2011) para acetona e metanol.

Por outro lado, em termos de efeito subletal relacionado à aplicação de solventes sobre insetos, pode-se constatar por meio do estudo realizado por Chacón-Benavente et al. (2013), o efeito não significativo da acetona ($1 \mu\text{L inseto}^{-1}$) sobre a maturação sexual e o comportamento reprodutivo de adultos machos de *Anastrepha obliqua* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae).

Vários são os estudos do efeito de solventes (acetona, água deionizada, diclorometano, dimetilsulfóxido, metanol e etanol) utilizados na ressuspensão de extratos vegetais sobre os diferentes táxons de insetos (CASTILLO-SÁNCHEZ et al. , 2010). No que se refere à acetona e ao metanol, tem se verificado que tais solventes, utilizados em diferentes modos de aplicação, têm se mostrado inócuos aos insetos estudados.

Ainda com base nesses aspectos, e levando-se em consideração os resultados obtidos neste teste preliminar, optou-se pelo uso dos solventes acetona e metanol (1:1, v/v) para a ressuspensão dos extratos etanólicos das diferentes estruturas de cada uma das espécies de Annonaceae envolvidas no estudo.

4.1.2.2 Triagem para identificação dos extratos promissores

De acordo com a triagem realizada, o extrato etanólico mais promissor foi o obtido de sementes de *A. mucosa*, o qual ocasionou significativa mortalidade (83,36%) de *S. frugiperda* (Tabela 4). Por sua vez, os extratos das demais espécies (*A. cacans*, *A. montana*, *A. mucosa* e *Annona sylvatica* e *D. lanceolata*) não ocasionaram significativa toxicidade aguda (Tabela 4).

Em relação aos efeitos subletais, os extratos etanólicos provenientes das sementes de *A. cacans*, *A. montana*, *A. mucosa* e *A. sylvatica*, bem como com os extratos de folhas de *A. mucosa*, *Annona reticulata* e *D. lanceolata* e com os extratos de ramos de *A. reticulata* reduziram significativamente os pesos larvais das lagartas sobreviventes (Tabela 4). Em contrapartida, constatou-se significativo ganho de peso das lagartas nas dietas contendo extratos etanólicos de ramos e de sementes de *D. lanceolata*, indicando que tais extratos ocasionam efeito estimulante de desenvolvimento para *S. frugiperda*.

Trindade et al. (2011) observaram mortalidades de 100; 58; 53; 35% de lagartas de primeiro ínstar (<24 horas de idade) de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) com o emprego das concentrações de 5, 4, 3 e 2 mg mL⁻¹, respectivamente, do extrato etanólico proveniente de folhas de *A. muricata*, avaliado via contato residual por 12 dias.

Trabalhando com lagartas de segundo ínstar de *S. frugiperda*, mantidas por 72 horas ingerindo folhas de milho tratadas com o composto isoespintanol, isolado a partir do extrato etílico de folhas de *Oxandra* cf. *xylopioides* (Annonaceae), Rojano et al. (2007) encontraram mortalidade de no mínimo 80% na concentração de 900 mg kg⁻¹, valor próximo ao obtido neste estudo para o ESAM, a 1.000 mg kg⁻¹, sobre a mesma espécie-praga.

Deshmukhe et al. (2010), avaliando o efeito do extrato etanólico de sementes de *A. squamosa* sobre lagartas de quarto ínstar de *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae), via aplicação tópica [0,10 mL inseto⁻¹ (da solução contendo o extrato etanólico na concentração de 25 %)], obtiveram 61,66% de mortalidade em comparação ao controle (0%).

A potencialidade do extrato vegetal de *Annona squamosa* foi também observada por Madhumitha et al. (2012) no controle de três espécies de dípteros [*Hippobosca maculata* Leach (Diptera: Hippoboscidae); *Anopheles subpictus* (Grassi) e *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae)] e de duas espécies de ácaro [*Haemaphysalis bispinosa* (Neumann) (Acarina: Ixodidae) e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrinni) (Acari: Ixodidae)]. Com o uso do extrato aquoso da casca dos frutos dessa anonácea, na concentração de 1.000 mg kg⁻¹, os valores de mortalidade, após 24 horas de tratamento, variaram de 66 a 100%.

Esses resultados variáveis condizem com aqueles registrados por Deshmukhe et al. (2010) e Rojano et al. (2007) com *S. litura* e *S. frugiperda*, respectivamente, bem como com a mortalidade de 83,36% constatada, no presente estudo, com o uso do ESAM sobre lagartas de primeiro ínstar de *S. frugiperda*.

Neste sentido, várias espécies de anonáceas vêm sendo amplamente utilizadas na etnofarmacologia como compostos antitumorais e imunossupressores, propriedades que são geralmente atribuídas aos alcaloides e principalmente às acetogeninas (FAGUNDES et al., 2005). As acetogninas ocasionam, ainda, outras atividades biológicas, incluindo ação antiprotozoária, anti-helmíntica, antimicrobiana e pesticida, propriedades que direcionam inúmeras linhas de pesquisa (ALALI et al., 1999).

Tabela 4 - Médias ($\pm$ erro padrão) de mortalidade e peso larval de *Spodoptera frugiperda* após o 7º dia de manutenção em meio artificial com os extratos etanólicos de diferentes espécies e/ou estruturas de Annonaceae incorporados (1.000 mg kg⁻¹). Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h

Espécie	Estrutura vegetal	Mortalidade (%) ¹	E.C. (%) ²	Peso (mg) ³	Peso relativo ⁴
<i>Annona cacans</i>	Folhas	6,73 $\pm$ 1,91	4,75	9,27 $\pm$ 0,39 a	88,36
	Ramos	9,46 $\pm$ 2,39	7,54	10,89 $\pm$ 0,71 a	103,81
	Sementes	12,05 $\pm$ 4,68	10,18	5,99 $\pm$ 0,17 b	57,10
Controle (acet.:met., 1:1)	--	2,08 $\pm$ 1,42	--	10,49 $\pm$ 0,71a	100,00
F		3,04 ^{ns}		16,39	
Valor de p		0,0525		<0,0001	
<i>Annona montana</i>	Folhas	11,21 $\pm$ 2,50	-4,94	12,92 $\pm$ 1,11 ab	91,17
	Ramos	7,06 $\pm$ 2,86	-9,85	15,30 $\pm$ 0,97 a	107,97
	Sementes	12,74 $\pm$ 5,06	-3,13	10,74 $\pm$ 0,96 b	75,79
Controle (acet.:met., 1:1)	--	15,39 $\pm$ 2,57	--	14,17 $\pm$ 0,68 a	100,00
F		2,74 ^{ns}		4,28	
Valor de p		0,0703		0,0173	
<i>Annona mucosa</i>	Folhas	16,66 $\pm$ 3,04 b	5,77	7,42 $\pm$ 0,25 b	86,17
	Ramos	17,09 $\pm$ 1,75 b	6,25	10,59 $\pm$ 0,66 a	122,99
	Sementes	83,36 $\pm$ 6,12 a	81,18	1,21 $\pm$ 0,40 c	14,05
Controle (acet.:met., 1:1)	--	11,56 $\pm$ 2,16 b	--	8,61 $\pm$ 1,55 ab	100,00
F		56,40		21,28	
Valor de p		<0,0001		<0,0001	
<i>Annona reticulata</i>	Folhas	2,14 $\pm$ 0,95	1,46	16,08 $\pm$ 1,49 c	58,60
	Ramos	2,97 $\pm$ 1,88	2,30	18,14 $\pm$ 1,25 bc	66,10
	Sementes	1,41 $\pm$ 0,89	0,73	24,16 $\pm$ 2,40 ab	88,04
Controle (acet.:met., 1:1)	--	0,69 $\pm$ 0,69	--	27,44 $\pm$ 2,58 a	100,00
F		0,75 ^{ns}		6,79	
Valor de p		0,5351		0,0024	
<i>Annona sylvatica</i>	Folhas	6,34 $\pm$ 2,83	2,27	12,63 $\pm$ 0,67 a	86,09
	Ramos	4,16 $\pm$ 2,15	0,00	13,71 $\pm$ 1,41 a	93,45
	Sementes	6,24 $\pm$ 2,75	2,17	6,96 $\pm$ 0,55 b	47,44
Controle (acet.:met., 1:1)	--	4,16 $\pm$ 2,63	--	14,67 $\pm$ 1,82 a	100,00
F		0,20 ^{ns}		6,63	
Valor de p		0,8937		0,0029	
<i>Duguetia lanceolata</i>	Folhas	7,15 $\pm$ 4,85	3,62	7,34 $\pm$ 1,00 c	73,84
	Ramos	2,08 $\pm$ 1,42	-1,64	14,27 $\pm$ 0,44 a	143,56
	Sementes	2,77 $\pm$ 2,06	-0,92	15,11 $\pm$ 0,50 a	152,01
Controle (acet.:met., 1:1)	--	3,66 $\pm$ 1,38	--	9,94 $\pm$ 0,73 b	100,00
F		0,80 ^{ns}		26,80	
Valor de p		0,5076		<0,0001	

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas de cada espécie vegetal (bioensaio), indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p<0,05$);

²E.C.: Eficácia de controle calculada pela fórmula de Henderson-Tilton (1955);

³Médias seguidas de letras distintas, nas colunas de cada espécie vegetal (bioensaio), indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p<0,05$);

⁴Calculada com base na comparação relativa do tratamento (extrato orgânico) com seu respectivo controle.

Assim, no presente estudo verificaram-se diferenças na atividade das estruturas vegetais das anonáceas estudadas, tanto para o efeito letal (mortalidade) quanto para o efeito subletal [inibição do crescimento larval (peso)], sendo que uma das hipóteses a ser levantada é a variação da quantidade dos compostos bioativos presentes nas diferentes estruturas vegetais, além das possíveis interações químicas ocorridas entre compostos orgânicos.

Por outro lado, em termos de efeito subletal (inibição do crescimento larval), Leatemia e Isman (2004) avaliaram o efeito inibidor de vários extratos etanólicos de sementes de *A. squamosa* e *A. muricata*, proveniente de diferentes regiões de Maluku (Indonésia), incorporados à dieta (250 e 5.000 mg kg⁻¹) e oferecidos às lagartas de primeiro ínstar (<24 horas de idade) de *S. litura*. Após 10 dias de exposição das lagartas aos diferentes tratamentos, os autores obtiveram valores de redução do crescimento larval de 8 a 67% para os extratos etanólicos de *A. squamosa* e de 18 a 96% para os extratos etanólicos de *A. muricata*, ambos em relação a seus respectivos controles. Ainda, segundo os autores, os extratos das sementes de *A. squamosa*, coletadas em diferentes anos na região de Namlea (Maluku-Indonésia), inibiram mais fortemente o crescimento larval de *S. litura*, provavelmente em razão de maiores concentrações de acetogeninas, as quais possivelmente apresentam propriedades deterrentes de alimentação a insetos (GONZÁLEZ-COLOMA et al., 2002).

O fato constatado por Leatemia e Isman (2004) em relação às acetogeninas presentes nos extratos orgânicos por eles avaliados condiz com o observado neste estudo, quanto ao efeito subletal do ESAM sobre o peso larval de *S. frugiperda*. Assim, os resultados obtidos nesta triagem sugerem que o extrato promissor (ESAM) deverá ser investigado quimicamente, bem como monitorado por meio de bioensaios visando à detecção de moléculas-modelo passíveis de uso na síntese de inseticidas ambientalmente mais adequados e munidos de novos modos/mecanismos de ação para utilização em programas de controle de *S. frugiperda*.

4.1.2.3 Curvas de concentração-resposta do extrato etanólico de sementes de *A. mucosa*

Verificou-se, com base nas curvas de concentração-resposta estimadas, uma tendência de aumento da mortalidade no decorrer do tempo, embora alguns intervalos de confiança estimados tenham se sobreposto (Tabela 5). Após 168 horas de exposição, estabelecido como ponto final do bioensaio (mortalidade estável), a concentração letal média (CL₅₀) estimada foi de 842,97 mg kg⁻¹, enquanto que a CL₉₀ foi de 1.882,00 mg kg⁻¹, ambos os valores apresentando um bom ajuste ao modelo (log-log complementar) utilizado na análise (Tabela

5). Dessa forma, os valores ajustados foram utilizados como referência para determinação das concentrações utilizadas nos bioensaios posteriores.

Além da modelagem dos efeitos tóxicos agudos do extrato etanólico de *A. mucosa*, também foi possível estimar o valor de concentração efetiva média (CE_{50} , concentração que inibe em 50% o desenvolvimento larval) de tal extrato para as lagartas sobreviventes após o sétimo dia de exposição em dietas tratadas com diferentes concentrações do extrato. Assim, a CE_{50} estimada foi de $580,40 \text{ mg kg}^{-1}$ com intervalo de confiança (IC 95%) de $326,20\text{-}834,70 \text{ mg kg}^{-1}$ [(n=469) e $p<0,0021$].

Seffrin et al. (2010), avaliando a atividade inseticida dos extratos metanólicos provenientes de sementes de duas espécies de anonáceas (*Annona atemoya* e *A. squamosa*) e por meio da incorporação em meio artificial (ingestão), para lagartas de terceiro ínstar de *Trichoplusia ni* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), estimaram valores de concentrações letal média (CL_{50}) de $167,50 \text{ mg kg}^{-1}$ para *A. squamosa* e $382,40 \text{ mg kg}^{-1}$ para *A. atemoya*. Na avaliação do efeito do extrato etanólico de sementes de *A. squamosa* sobre lagartas de quarto ínstar de *S. litura*, tanto via aplicação tópica quanto via ingestão, foram estimados os valores de CL_{50} de $21,5 \text{ mg L}^{-1}$ via tópica e de $25,75 \text{ mg L}^{-1}$ via ingestão (DESHMUKHE et al. 2010).

Ainda, Kamaraj et al. (2011), avaliando a atividade inseticida (via contato residual) do extrato metanólico de cascas do tronco de *A. squamosa* sobre larvas de quarto ínstar de duas espécies de dípteros [*Anopheles subpictus* (Grassi) e *Culex tritaeniorhynchus* (Giles) (Diptera: Culicidae)], ambas importantes vetores de graves doenças em seres humanos, estimaram a CL_{50} de $93,80 \text{ mg L}^{-1}$ para *A. subpictus* e de $104,94 \text{ mg L}^{-1}$ para *C. tritaeniorhynchus*.

Em contrapartida, para a mesma espécie vegetal, porém com o uso de extrato orgânico de sementes obtido a partir da mistura de água:etanol (1:1), Senthilkumar et al. (2009) avaliaram a atividade inseticida (via contato residual) sobre *Anopheles stephensi* (Liston) (Diptera: Culicidae) e estimaram valores de CL_{50} de 2,65 e $6,48 \text{ mg L}^{-1}$ para larvas de terceiro ínstar e adultos, respectivamente.

Aciole et al. (2011), por sua vez, avaliando a atividade inseticida do óleo essencial obtido a partir das folhas de três espécies de Annonaceae (*Guatteria hispida*, *G. blepharophylla* e *G. friesiana*) sobre larvas de quarto ínstar de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), estimaram as concentrações letais médias (CL_{50}) em $85,74 \text{ mg mL}^{-1}$ para *Guatteria hispida*; $58,72 \text{ mg mL}^{-1}$ para *G. blepharophylla* e $52,60 \text{ mg mL}^{-1}$ para *G. friesiana*.

Tabela 5 - Estimativa da CL₂₅, CL₅₀ e CL₉₀ (em mg kg⁻¹) e intervalo de confiança do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* (Annonaceae) para lagartas de *Spodoptera frugiperda*, em diferentes tempos de exposição. Temp.: 25±2°C; U.R.: 60±10%; Fotofase: 14h

Tempo de exposição (horas)	n ¹	Slope ± EP (valor de p)	CL ₂₅ (IC 95%) ²	CL ₅₀ (IC 95%) ²	CL ₉₀ (IC 95%) ²	χ ²⁽³⁾	g.l. ⁴	h. ⁵
24	672	--	--	> 1.600,00	--	--	--	--
48	672	--	--	> 1.600,00	--	--	--	--
72	672	4,13±0,63 (p<0,0001)	877,09 (701,78 – 1.019,00)	1.431,00 (1.251,00 – 1.675,00)	2.792,00 (2.248,00 – 4.045,00)	5,88	4	1,47
96	672	3,75±0,77 (p<0,0001)	689,95 (294,22 – 941,09)	1.183,00 (836,71 – 1.643,00)	2.469,00 (1.744,00 – 7.025,00)	8,67	4	2,16
120	672	3,65±0,47 (p<0,0001)	603,63 (459,20 – 722,80)	1.050,00 (907,43 – 1.197,00)	2.238,00 (1.873,00 – 2.928,00)	6,56	4	1,64
144	672	3,65±0,45 (p<0,0001)	528,63 (396,01 – 639,14)	920,51 (788,26 – 1.046,00)	1.963,00 (1.675,00 – 2.469,00)	6,62	4	1,65
168	672	3,44±0,64 (p<0,0001)	468,00 (172,23 – 679,55)	842,97 (526,07 – 1.116,00)	1.882,00 (1.386,00 – 3.830,00)	9,24	4	2,31

¹n: número de insetos testados; ²IC: intervalo de confiança a 95% de probabilidade de erro; ^{(3),2}χ: valor de qui-quadrado de Person; ⁴g.l.: graus de liberdade;

⁵h.: fator de heterogeneidade.

Madhumitha et al. (2012), utilizando o extrato aquoso das cascas dos frutos de *A. squamosa*, na os concentração de 1.000 mg kg^{-1} , obtiveram para diferentes táxons de insetos [*Anopheles subpictus* e *Culex quinquefasciatus*] os seguintes valores de CL_{50} : 327,27 e 456,29 mg kg^{-1} , respectivamente.

Observa-se, portanto, a diferença na suscetibilidade entre os insetos-modelo utilizados nos diversos trabalhos com os diferentes derivados (óleo essencial e os extratos orgânicos de diferentes espécies e/ou estruturas) de Annonaceae, bem como para o presente estudo, constatando-se assim a dependência das concentrações letais, da relação entre a espécie-alvo envolvida, do estágio de desenvolvimento dos insetos-praga, além dos diferentes modos e tempos de exposição.

Avaliando a inibição do crescimento larval de *S. litura*, após 10 dias de exposição em meio artificial ao qual foi incorporado o extrato etanólico de sementes de *A. squamosa*, Leatemia e Isman (2004) estimaram as concentrações efetivas médias (CE_{50}) para cada instar larval, obtendo os valores de CE_{50} foram 191,70; 202,00; 533,10; 704,90 e 1.707,50 mg kg^{-1} , para o primeiro, segundo, terceiro, quarto e quinto ínstaes, respectivamente, demonstrando-se dessa forma certa tolerância das lagartas com o aumento da idade.

Assim, no estudo realizado por Seffrin et al. (2010), valores de CE_{50} de 38,00 e 117,00 mg kg^{-1} foram obtidos para os extratos metanólicos provenientes de sementes de *A. squamosa* e *A. atemoya*, respectivamente, frente a lagartas de *T. ni*.

4.1.2.4 Efeito do extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* no consumo alimentar de lagartas de *S. frugiperda*

Após 24 horas, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no consumo de lagartas de quarto instar expostas em dietas tratadas com diferentes concentrações do extrato etanólico de sementes de *A. mucosa*, em comparação ao controle (Tabela 6), o que indica que esse tratamento não ocasiona efeito fagodeterrente.

Tolosa et al. (2012), avaliando o efeito do extrato metanólico das sementes de *Rollinia occidentalis* Fries (Annonaceae) nas concentrações de 50; 100 e 250 mg kg^{-1} (incorporado em meio artificial) sobre lagartas de segundo instar de *S. frugiperda*, durante 10 dias, não observaram efeito sobre o consumo alimentar, porém para os índices nutricionais [eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) e digerido (ECD)] estudados foram constatadas significativa redução do crescimento larval. Isso também ocorreu quando os autores testaram o efeito da acetogenina silvaticina (isolada a partir do referido extrato).

Tabela 6 - Médias ($\pm$ erro padrão) do peso da dieta consumida (g) por lagartas de quarto ínstar de *Spodoptera frugiperda*, 24 horas após liberação em arenas contendo no centro, um pedaço (1,5 x 1,5 cm) de meio artificial com uma das respectivas concentrações letais do extrato das sementes de *Annona mucosa* incorporado. Temp.: 25 ± 2 °C; U.R.: $60 \pm 10\%$; fotofase 14h

Concentrações	Peso dieta consumida (g) ¹
CL ₂₅	0,65 $\pm$ 0,05
CL ₅₀	0,63 $\pm$ 0,06
CL ₉₀	0,68 $\pm$ 0,05
Controle (acet.:met., 1:1)	0,71 $\pm$ 0,04
F	2,1432 ^{ns}
Valor de <i>p</i>	0,6826

¹Médias seguidas de letras distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre as concentrações (GLM com distribuição gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$).

A mesma constatação de Tolosa et al. (2012) foi relatada por Colom et al. (2007a) na avaliação do efeito das acetogeninas almunequina, asimicina, cherimolina-1, cherimolina-2, itrabina, laherradurina, molvizarina, motrilina, roliniastatina-2 e esquamocina, isoladas a partir do extrato metanólico das sementes de *A. cherimolia* (Annonaceae) sobre o consumo alimentar de lagartas de segundo ínstar de *S. frugiperda*, quando expostas por 10 dias aos diferentes meios contendo as referidas acetogeninas incorporadas no meio na concentração de $50 \mu\text{g g}^{-1}$.

Colom et al. (2007b), no entanto, avaliando o efeito do extrato etanólico da parte aérea (folhas e ramos) de *Rollinia emarginata* Schldl (Annonaceae), incorporado em meio artificial (250 mg kg^{-1}) e oferecido a lagartas de segundo ínstar de *S. frugiperda* por um período de 24 a 48 horas, constataram que houve redução significativa do consumo alimentar, em testes com e sem chance de escolha, indicando que o extrato avaliado causa deterrence alimentar ou mesmo fisiológica (pós-ingestão e absorção) sobre o lepidóptero-praga.

Diante dos resultados obtidos, estabeleceu-se um novo bioensaio de modo a verificar a ação do extrato ao longo do tempo. Do ponto de vista aplicado, embora um derivado botânico não seja fagodeterrente (efeito geralmente estimado pelo consumo alimentar em até 24 horas), ele pode afetar a alimentação da espécie-praga pela interferência na fisiologia desta, reduzindo os danos ocasionados à área foliar das culturas a serem protegidas.

Com base nos resultados obtidos em um bioensaio conduzido em esquema fatorial (2 tratamentos x 3 tempos de exposição), observou-se interação significativa entre tratamentos e tempos de exposição. Em geral, a incorporação do extrato em meio artificial afetou o consumo de lagartas de quarto ínstar de *S. frugiperda* após 24 horas (Tabela 7).

Após esse período, não se verificou um aumento significativo no consumo das lagartas expostas em meio artificial contendo o extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* (Tabela 8).

Tabela 7 - Resumo da análise de variância do peso da dieta consumida (g) por lagartas de quarto ínstar de *Spodoptera frugiperda* em diferentes tempos ao extrato etanólico das sementes de *Annona mucosa*, incorporado em meio artificial na respectiva CL₉₀

FV ¹	GL ²	SQ ³	QM ⁴	F	Valor de <i>p</i>
Tratamento	1	1,8147	1,8147	57,13	<0,0001
Tempo	2	1,6657	0,8328	26,22	<0,0001
Tratamento x Tempo	2	1,0845	0,5422	17,07	<0,0001
Tratamentos	5	4,5651	0,9130	28,74	<0,0001
Resíduo	84	2,6680	0,0317		
Total	89	7,2331			

¹FV = Fonte de variação; ²GL = Graus de liberdade; ³SQ = Soma de quadrado; ⁴QM = quadrado médio.

Assim, analisando-se o fator tratamento (ESAM na CL₉₀), não houve diferença significativa para os diferentes tempos de exposição (24; 48 e 72 horas) no consumo alimentar das lagartas de quarto ínstar. Já, no controle (acet.:met., 1:1, v/v) houve diferença significativa, com aumento da dieta consumida pelas lagartas em função do tempo de exposição. Na comparação entre o tratamento e o controle, por outro lado, não houve diferença significativa em relação ao peso da dieta consumida nas primeiras 24 horas, porém para os tempos de 48 e 72 horas, observou-se consumo significativamente menor no tratamento (Tabela 8), do que se presume que o ESAM esteja atuando na fisiologia (pós-ingestão e absorção) do inseto.

Tabela 8 - Médias (± erro padrão) do peso da dieta consumida (g) por lagartas de quarto ínstar de *Spodoptera frugiperda*, em diferentes tempos em arenas contendo no centro, um pedaço (1,5 x 1,5 cm) de meio artificial com o extrato etanólico das sementes de *Annona mucosa* incorporado na respectiva CL₉₀. Temp.: 25±2 °C; U.R.: 60±10%; fotofase 14h

Tratamento	Peso dieta consumida (g) ¹		
	24 horas	48 horas	72 horas
CL ₉₀	0,68±0,05 aA	0,68±0,06 bA	0,75±0,04 bA
Controle (acet.:met., 1:1)	0,71±0,04 aC	0,94±0,03 aB	1,31±0,05 aA

¹Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, indicam diferenças significativas entre o tratamento e o controle (análise fatorial confirmatória seguido por teste *post hoc* de Tukey, *p*<0,05).

Segundo Isman et al. (1996), uma substância com ação fagodeterrente) apresenta efeito direto sobre as sensilas periféricas (órgãos gustativos) dos insetos, excluindo-se, nesse caso, os produtos químicos que suprimem a alimentação por meio da ação sobre o sistema nervoso central (seguido da ingestão e absorção), ou até mesmo as substâncias que possuem toxicidade subletal para esses indivíduos. Além disso, Kusari et al. (2012) reportam que os compostos de origem natural com ação fagodeterrente produzem estimulações específicas nos quimiorreceptores gustativos de tais indivíduos, desencadeando interferência da percepção fagoestimulante de outros quimiorreceptores também presentes na região periférica do aparelho bucal.

Cabe salientar, no entanto, que a atividade fagodeterrente sobre insetos é geralmente demonstrada por meio de bioensaios laboratoriais, com ou sem chance de escolha, realizados em curto período de tempo (inferiores a 24 horas), e não por meio de bioensaios realizados em períodos de tempo maiores, o que poderia acarretar a redução da alimentação por meio da toxicidade pós-ingestão, justificando-se assim um possível efeito na fisiologia do inseto, ao invés de um efeito comportamental (ISMAN, 2002). Dessa forma, é possível inferir, com base nos resultados, que o extrato de sementes de *A. mucosa* não ocasiona efeito fagodeterrente para lagartas de quarto ínstar de *S. frugiperda*, porém o consumo alimentar em decorrência de seu efeito tóxico pós-ingestão. Presume-se ainda que, para tal efeito, o ESAM estaria atuando na atividade enzimática do mesêntero do inseto (MARTINEZ e VAN EMDEN, 1999), bem como diretamente nas células dos músculos do canal alimentar, diminuindo a frequência de contrações e aumentando a flacidez muscular (MORDUE e NISBET, 2000).

4.1.2.5 Efeito do extrato etanólico das sementes de *A. mucosa* sobre parâmetros biológicos de *S. frugiperda*

Houve efeito significativo do ESAM, testado na CL₅₀, sobre a mortalidade e a duração da fase larval de *S. frugiperda* (Tabela 9). Assim, enquanto com o ESAM a mortalidade larval foi de 72,08% e a duração média da fase atingiu 26,25 dias, no controle tais valores foram, respectivamente, 28,75% e 18,92 dias. Acredita-se que essa maior duração constatada no tratamento seja decorrente da possível ação fisiológica (pós-ingestão) dos componentes ativos do extrato sobre as lagartas (Tabela 9).

Colom et al. (2007a), avaliando o efeito da acetogenina esquamocina, isolada a partir das sementes de *Annona cherimolia* Mill sobre *S. frugiperda* por meio da incorporação em meio artificial (50 µg g⁻¹), constataram mortalidade total das lagartas. Para as demais acetogeninas (almunequina, motrilina, itrabina, tucumanina, cherimolina-1, cherimolina-2,

neoanonina e asimicina) as mortalidades larvais atingiram no máximo 30%. Ainda, na avaliação do efeito das acetogeninas anonacina, *cis*-anonacina-10-1, densicomacina-1, gigantetronenina, murihexocina-b e tucupentol, isoladas a partir das folhas e dos ramos de *A. montana* e incorporadas em meio artificial (100 µg g⁻¹) ingerido por *S. frugiperda*, Blessing et al. (2010) constataram mortalidade larval entre 30 e 60%, e prolongamento dessa fase que atingiu valores entre 45 e 60 dias.

Tabela 9 - Médias (± erro padrão) da mortalidade e duração da fase larval de *Spodoptera frugiperda* mantida em meio artificial contendo o extrato etanólico das sementes de *Annona mucosa* (ESAM), testado na CL₅₀ (842,97 mg kg⁻¹) estimada

Tratamento	Mortalidade (%) ¹	Duração (dias) ²
ESAM	72,08±2,35	26,25±0,88
Controle (acet.:met., 1:1)	28,75±2,02	18,92±0,91
F	132,18	23,29
Valor de <i>p</i>	<0,0001	<0,0001

¹Diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial, *p*<0,05);

²Diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana, *p*<0,05).

De forma similar aos resultados apresentados, Trindade et al. (2011), avaliando o efeito do extrato etanólico proveniente de folhas de *A. muricata* (em diferentes concentrações 5, 4, 3 e 2 mg mL⁻¹) sobre *P. xylostella*, observaram significativo aumento da mortalidade larval, variável entre 35 e 100%, quando comparado ao controle (1,6%).

No presente estudo, verifica-se que houve redução significativa (*p*=0,0214) na sobrevivência larval de *S. frugiperda* no tratamento com o ESAM (testado na CL₅₀). Essa redução inicia-se a partir do 6º dia após a instalação do bioensaio, seguindo-se drasticamente até o 12º dia, ocorrendo, a partir de então, estabilização da sobrevivência até o 30º dia de experimento. Diferentemente, observa-se que no controle a redução na sobrevivência larval ocorre entre o 14º e 16º dia, com estabilização desta a partir de então e até o 23º dia, quando todos os insetos sobreviventes já tinham atingido a fase pupal (Figura 8).

Figura 8 - Curva de sobrevivência (Kaplan-Meier) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* mantida em meio artificial contendo extrato etanólico das sementes de *Annona mucosa* (ESAM), na CL_{50} (842,97 mg kg⁻¹) estimada para o respectivo extrato bruto. Temp.: 25±2 °C; U.R.: 60±10%; fotofase 14h

O ESAM também reduziu significativamente a sobrevivência pupal de *S. frugiperda*, constatando-se mortalidade de cerca de 70% com o extrato, em comparação ao controle (cerca de 30%). Por outro lado, o referido extrato não afetou significativamente a duração da fase pupal, cujo valor foi de cerca de 11 dias tanto no referido tratamento quanto no controle (Tabela 10).

Colom et al. (2007a), avaliando o efeito de nove acetogeninas incorporadas em meio artificial (50 µg g⁻¹) também constataram aumento na mortalidade da fase pupal (80 a 100%) em comparação ao controle (20%).

Em outra pesquisa envolvendo acetogeninas, Blessing et al. (2010) constataram que os compostos anonacina, *cis*-anonacina-10-1, densicomacina-1, gigantetronenina, murihexocina-b e tucupentol incorporados em meio artificial (100 µg g⁻¹) oferecido a lagartas, afetaram a sobrevivência pupal de *S. frugiperda*, registrando-se mortalidades variando de 30 a 70% contra 10% no controle.

Tabela 10 - Médias ($\pm$ erro padrão) da mortalidade e duração pupal de *Spodoptera frugiperda* mantida em meio artificial contendo extrato etanólico das sementes de *Annona mucosa* (ESAM), na CL_{50} (842,97 mg kg⁻¹) estimada para o respectivo extrato bruto. Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h

Tratamento	Mortalidade (%) ¹	Duração (dias) ²
ESAM	70,41 $\pm$ 2,78	11,45 $\pm$ 0,40
Controle (acet.:met., 1:1)	30,00 $\pm$ 1,94	11,44 $\pm$ 0,40
F	107,06	3,00 ^{ns}
Valor de <i>p</i>	<0,0001	0,0833

¹Diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial, $p<0,05$);

²Diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana, $p<0,05$).

Na avaliação do peso das pupas provenientes de lagartas alimentadas em dietas contendo ESAM, constatou-se que elas apresentaram peso significativamente menor (181,64 mg) que no controle (224,49 mg) (Tabela 11), além de originarem uma maior porcentagem de pupas defeituosas (14,16% no tratamento e 2,67% no controle). Em relação aos adultos, 6% deles apresentaram deformação com o uso do extrato e nenhum deles no controle (Tabela 11).

Em estudo realizado com nove acetogeninas, Colom et al. (2007a) obtiveram de 10 a 20% de adultos malformados de *S. frugiperda* quando em comparação a controle (nenhuma deformação observada). O valor de 6% de adultos defeituosos para essa mesma praga no presente estudo, portanto, condiz com a variação média constatada pelos referidos autores.

Tabela 11 - Médias ($\pm$ erro padrão) de peso pupal e porcentagens de pupas e adultos defeituosos de *Spodoptera frugiperda* mantida em meio artificial contendo extrato etanólico das sementes de *Annona mucosa* (ESAM) na CL_{50} (842,97 mg kg⁻¹) estimada para o respectivo extrato bruto. Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h

Tratamento	Peso 24h (mg) ¹	Pupas defeituosas (%) ²	Adultos defeituosos (%) ³
ESAM	181,64 $\pm$ 3,53	14,16 $\pm$ 6,90	6,66 $\pm$ 4,05
Controle (acet.:met., 1:1)	224,49 $\pm$ 4,15	2,67 $\pm$ 1,63	0,00 $\pm$ 0,00*
F	61,82	7,72	--
Valor de <i>p</i>	<0,0001	0,0123	--

¹Diferenças significativas entre o tratamento e o controle (GLM com distribuição gaussiana, $p<0,05$);

²Diferenças significativas entre o tratamento e o controle (GLM com distribuição quase-binomial, $p<0,05$);

³Não analisado (variância nula).

Além dos efeitos sobre pupas e adultos, o ESAM também ocasionou deformação em lagartas de *S. frugiperda*, as quais apresentaram retenção de exúvia (Figura 9B), além de redução do tamanho em relação a lagartas expostas ao controle (Figura 9A). No que se refere às pupas, a malformação foi caracterizada pela retenção da exúvia remanescente da fase larval

(Figura 9C à esquerda), bem como pela diferença de tamanho entre as pupas expostas ao tratamento e ao controle (Figura 9D à direita).

Conforme as constatações de Blessing et al. (2010) e Colom et al. (2007a) e mediante os resultados obtidos neste bioensaio com o ESAM, presume-se que mesmo as lagartas consumindo regularmente a dieta contendo o referido extrato incorporado, houve redução do tamanho destas quando comparadas às lagartas criadas no controle (Figura 9A) em razão da presença de acetogeninas em tal extrato, as quais estariam reduzindo a eficiência de conversão alimentar do inseto com comprometimento do ganho de biomassa corpórea. Como consequência, tal constatação explica também a significativa redução de peso das pupas com 24 horas quando expostas ao extrato orgânico. Além disso, as alterações morfológicas (Figura 9) observadas para larvas, pupas e adultos, são normalmente ocasionadas por compostos que interferem nas atividades hormonais do inseto.

Assim, surge a hipótese de que a atividade biológica das acetogeninas em diferentes insetos seja devida à possível ação destas em diferentes sítios-alvo conforme relatado em diversos trabalhos que envolvem o limonoide azadiractina, isolado a partir das sementes de *Azadirachta indica* (Meliaceae). Tal hipótese torna-se aceitável em relação às moléculas que em suas formas estruturais possuem grande número de átomos de carbono além de vários grupos funcionais (RIBEIRO et al., 2013).

Figura 9 - Alterações morfológicas em *Spodoptera frugiperda* causadas pela incorporação em meio artificial do extrato etanólico das sementes de *Annona mucosa* (na concentração de 842,97 mg kg⁻¹). As setas indicam as deformações/modificações morfológicas ocorridas. **A**: tamanho das lagartas (maior tamanho, lagartas expostas ao controle e menor tamanho, lagartas expostas ao tratamento); **B**: retenção da exúvia em lagartas expostas ao tratamento; **C**: pupa defeituosa com a exúvia retida ao final da fase larval; **D**: ampliação do efeito encontrado em **C** e diferença entre tamanhos de pupas (menor tamanho, pupa exposta ao tratamento e maior tamanho, pupa exposta ao controle); **E**: adulto defeituoso com retenção de carapaça frontal da pupa e adultos com deformação das asas anteriores e posteriores, ambos expostos ao tratamento; **F**: vista ventral e dorsal de adulto proveniente de lagarta criada no controle

4.1.2.6 Bioatividade comparada do extrato etanólico das sementes de *A. mucosa* com inseticidas comerciais

O ESAM (testado na CL₉₀) causou mortalidade larval de 99%, valor significativamente superior aos obtidos nos controles [água deionizada (4,62%) e acet.:met., 1:1, v/v (5,55%)] e similar aos inseticidas comerciais (Azamax[®] 1,2 EC e Premio[®] SC), os quais provocaram 100% de mortalidade (Tabela 12).

Tabela 12 - Médias ($\pm$ erro padrão) de mortalidade e peso larval de *Spodoptera frugiperda* após o 7º dia de exposição em meio artificial contendo diferentes produtos comerciais (Azamax[®] 1,2 EC e Premio[®] SC, nas doses recomendadas) e o extrato etanólico das sementes de *Annona mucosa* [(ESAM) na CL₉₀]. Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h

Tratamentos	Mortalidade (%) ¹	Peso (mg) ²
Azamax [®] 1,2 EC	100,00 $\pm$ 0,00*	--
Premio [®] SC	100,00 $\pm$ 0,00*	--
ESAM	99,07 $\pm$ 0,92 a	0,30 (1)**
Controle (acet.:met., 1:1)	5,55 $\pm$ 2,02 b	18,58 $\pm$ 0,42
Controle (água deionizada)	4,62 $\pm$ 1,70 b	18,97 $\pm$ 1,72
F	133,25	0,04 ^{ns}
Valor de p	<0,0001	<0,8329

¹Médias seguidas de letras distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$);

²Médias seguidas de letras distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$);

* Não incluído na análise estatística (variância nula);

** Número insuficiente para realização da análise estatística, o número entre parênteses representa o número de lagartas sobreviventes.

Niculau et al. (2013), avaliando a atividade inseticida dos compostos terpênicos geraniol, linalol, 1,8-cineol, limoneno, carvona e citral e do bioinseticida Azamax[®] 1,2 EC sobre lagartas de terceiro ínstar de *S. frugiperda* via aplicação tópica (3 μ g/mg de inseto), durante 24 horas de exposição, obtiveram mortalidade variável de 2 a 90%, em comparação ao bioinseticida (Azamax[®] 1,2 EC) de origem natural que provocou 14% de mortalidade.

Nesse sentido, Bernardi et al. (2012), avaliando a atividade inseticida do Azamax[®] 1,2 EC (100; 200 e 300 ml 100 L⁻¹) sobre ninfas e adultos de *Chaetosiphon fragaefolli* (Cockerell, 1901) (Hemiptera: Aphididae), expostos a plantas de morangueiro (cv. Aromas) (tratadas com o bioinseticida) por 7 dias, tanto em laboratório como em semi-campo, obtiveram valores de mortalidade variável de 71,7 a 74,5% em laboratório e de 65% em semi-campo.

Ainda, diferentes concentrações (0,01; 0,03; 0,06; 0,16; 0,40 e 1%) de Azamax[®] 1,2 EC foram avaliadas por Ribeiro et al. (2012a) sobre lagartas de primeiro ínstar (<24 horas de

idade) de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae), em folhas de feijão (*Phaseolus vulgaris* cv. Pérola) tratadas com o produto e mantidas em placa de Petri. Após 7 dias os autores constatarem valores médios de eficiência de controle de 63 a 100%. As mesmas concentrações e procedimentos experimentais para avaliar a eficiência de controle sobre *S. frugiperda* provocaram mortalidade de 33 a 90% (RIBEIRO et al., 2012b).

Por outro lado, trabalhos como o de Cessa et al. (2013), no qual os autores avaliaram o efeito do inseticida comercial (Premio® SC) (0,10 mL L⁻¹) sobre lagartas de primeiro ínstar (<24 horas de idade) de *S. frugiperda*, apontaram 100% de mortalidade larval quando estas foram mantidas em seções de folhas de milho (*Zea mays*) (tratadas com o referido inseticida) por 72 horas, valor semelhante ao encontrado neste bioensaio para o ESAM (em torno de 96%) com o mesmo inseto-modelo (Figura 10).

Figura 10 - Mortalidade larval de *Spodoptera frugiperda* exposta em meio artificial contendo diferentes tratamentos em distintos tempos de exposição (horas): Azamax® 1,2 EC (▲) $y=98,25-205,33(0,96)^x$, $R^2=0,98$ e $p<0,0001$; ESAM (▼) $y=100,57-234,74(0,95)^x$, $R^2=0,99$ e $p<0,0001$; Premio® SC (◆) $y=5,60+94,87/1+10^{(2,10-0,03x)}$, $R^2=0,99$ e $p<0,0001$; Controle (acet.:met. 1:1, v/v) (■) $y=0,03x-0,26$, $R^2=0,85$ e $p=0,0018$ e Água destilada (○) $y=0,02x-0,66$, $R^2=0,42$ e $p=0,0669$

Para justificar a significativa diferença encontrada entre as curvas de resposta dos distintos produtos ao longo do tempo no controle de *S. frugiperda* (Figura 10), devem ser ressaltados os diferentes modos/mecanismo de ação presente em cada produto comercial, bem como no ESAM, uma vez que, o inseticida Premio® SC (cujo ingrediente ativo é o clorantraniliprole da classe química das diamidas antranílicas) atua como antagonista nos receptores de rianodina, liberando o Ca^{2+} interno da organela para o citoplasma o que causa a contração muscular no inseto e, como consequência, a inibição da alimentação (minutos a algumas horas após a ingestão), letargia, regurgitação e paralisia muscular (LAHM et al., 2007; CESSA et al., 2013). Já o Azamax® 1,2 EC (cujo ingrediente ativo é a azadiractina A/B da classe química dos tetranortriterpenoides), apresenta estrutura química similar aos hormônios presentes em insetos atuando na metamorfose como um bloqueador dos hormônios envolvidos em tal processo e, consequentemente, o inseto não realiza a ecdise. Além disso, tal produto pode afetar a alimentação desses indivíduos (BERNARDI et al., 2012). Por fim, tem-se como hipótese que os possíveis compostos majoritários (acetogeninas) presentes no ESAM estariam atuando como potentes inibidores do Complexo I (NADH: ubiquinona oxiredutase) do sistema de transporte de elétrons mitocondrial e da NADH: oxidase da membrana plasmática, que induzem apoptose (morte programada da célula) em insetos, de certa forma pela privação de ATP.

Assim, a diferença significativa encontrada entre as curvas de resposta dos distintos produtos apresentadas na Figura 10, condiz com os diferentes mecanismos de ação presentes em cada produto comercial avaliado bem como para o extrato etanólico estudado. Dessa forma, o ESAM apresentou, sob condições laboratoriais, eficácia similar aos produtos comerciais de origem sintética e natural empregados como controles positivos. Cabe ressaltar ainda que, a implicação desses resultados no manejo do lepidóptero-praga encontra-se relacionado à bioquímica envolvida no manejo da resistência de artrópodes aos distintos modos de ação dos diferentes inseticidas comerciais disponíveis no mercado, uma vez que, por meio desse conhecimento torna-se possível o delineamento das técnicas de monitoramento para o desenvolvimento de programas direcionados às estratégias de manejo (por moderção, saturação e múltiplo ataque) da resistência de *S. frugiperda* (SCOTT, 1990).

4.1.2.7 Estimativa do tempo letal médio (TL_{50}) para o extrato etanólico das sementes de *A. mucosa* e para os inseticidas comerciais

Na estimativa do tempo letal médio (TL_{50}) do ESAM, bem como dos diferentes produtos comerciais (Azamax® 1,2 EC e Premio® SC) para lagartas de *S. frugiperda* observa-

se pequena variação entre os TL_{50} obtidos para o ESAM (32,72 dias) e para o Azamax[®] 1,2 EC (37,25 dias), os quais, entretanto, foram cerca de 2,5 vezes menor que o valor obtido para o produto sintético (Premio[®] SC) (77,98 dias) (Tabela 13). Dessa forma, os resultados constatados neste bioensaio condizem com o observado na Figura 10 (bioensaio anterior). Assim, com base nos resultados promissores obtidos nesta etapa, submeteu-se o extrato etanólico das sementes de *A. mucosa* ao fracionamento biomonitorado.

Tabela 13 - Estimativa do tempo letal médio (TL₅₀, em horas) e intervalo de confiança dos respectivos tratamentos (ESAM na CL₉₀; Azamax[®] 1,2 EC e Premio[®] SC na dose recomendada) para lagartas de *Spodoptera frugiperda*. Temp.: 25±2°C; U.R.: 60±10%; Fotofase: 14 h

Tratamentos	n ¹	Slope ± EP (valor de <i>p</i>)	TL ₅₀ (IC 95%) ²	χ ² (3) ³	g.l. ⁴	h. ⁵
ESAM	756	3,51±0,32 (<i>p</i> <0,0001)	32,72 (25,36 – 39,66)	6,30	4	1,57
Azamax [®] 1,2 EC	756	6,18±1,45 (<i>p</i> <0,0001)	37,25 (22,05 – 45,96)	1,20	4	0,30
Premio [®] SC	756	8,08±0,89 (<i>p</i> <0,0001)	77,98 (71,61 – 83,05)	1,85	4	0,46

¹n: número de insetos testados; ² IC: intervalo de confiança a 95% de probabilidade de erro; ³χ²: valor de qui-quadrado de Person; ⁴g.l.: graus de liberdade; ⁵ h.: fator de heterogeneidade.

4.2 Etapa II

4.2.1 Fracionamento biomonitorado do extrato etanólico das sementes de *A. mucosa*

O rendimento das diferentes fases obtidas a partir da partição líquido-líquido do extrato etanólico das sementes de *A. mucosa* (ESAM) foi de 63,71 e 27,81%, respectivamente, para as partições hexânica e hidroalcoólica (Tabela 14), tais valores são decorrentes da alta concentração de óleo (apolar) nas sementes de Annonaceae.

Tabela 14 - Rendimento das diferentes fases, obtidas por partição líquido-líquido, do extrato etanólico das sementes de *Annona mucosa*

Peso extrato (g)	Partições	Rendimento ¹	
		(g)	(%)
105,00	Hexânica	66,90	63,71
	Hidroalcoólica	29,20	27,81

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

Expostas por sete dias em meio artificial contendo ambas as partições do ESAM, as lagartas de *S. frugiperda* apresentaram significativa mortalidade (100% na partição hidroalcoólica e 63,54% na partição hexânica) (Tabela 15). O peso das lagartas sobreviventes aos 7 dias na partição hexânica (7,43 mg) não diferiu do controle (7,86 mg), ressaltando-se que na partição hidroalcoólica nenhuma lagarta sobreviveu após esse período (Tabela 15).

Tabela 15 - Médias ($\pm$ erro padrão) de mortalidade e peso larval de *Spodoptera frugiperda* após o 7º dia de exposição em meio artificial contendo diferentes partições do extrato etanólico das sementes de *Annona mucosa*, testadas na CL₅₀ (842,97 mg kg⁻¹) estimada para o respectivo extrato bruto. Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h

Partições	Mortalidade (%) ¹	Peso (mg) ²
Hidroalcoólica	100,00 $\pm$ 0,00*	--
Hexânica	63,54 $\pm$ 4,70 a	7,43 $\pm$ 4,27
Controle (acet.:met., 1:1)	24,37 $\pm$ 3,57 b	7,86 $\pm$ 0,47
F	40,03	0,01 ^{ns}
Valor de <i>p</i>	<0,0001	0,9214

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre as partições (GLM com distribuição quase-binomial seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$);

^{ns}Diferença não significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana, $p < 0,05$);

* Não incluído na análise estatística (variância nula).

Com base em análise de RMN de ^1H , verificou-se a presença majoritária de acetogeninas na partição hidroalcoólica, o qual possivelmente constitui a principal classe ativa de compostos no respectivo extrato.

Por outro lado, também foi verificada ação inseticida da partição hexânica (63,54%), a qual é constituída majoritariamente por triglicerídeos sem, contudo, ocasionar efeito no desenvolvimento larval da espécie-praga (Tabela 15). Os triglicerídeos são os principais constituintes dos óleos das sementes de diversas espécies vegetais e estudos já realizados em relação à atividade inseticida de triglicerídeos e de ácidos graxos livres indicaram que estes apresentaram maior atividade inseticida em relação aos triglicerídeos, porém a ação de tais ácidos foi mais expressiva na presença de triglicerídeos, os quais possivelmente estariam atuando na maior absorção do ácido graxo (MORINI et al., 1999).

Ainda, ressalta-se a importância de alguns compostos que, quando testados de forma isolada, apresentam alta eficácia, sugerindo dessa forma a hipótese de antagonismo entre as substâncias presente no extrato avaliado (SHAALAN et al., 2005).

4.2.2 Fracionamento das partições mais ativas

Com base nos resultados do ensaio realizado com as partições e na análise de RMN de ^1H , as frações que apresentaram a presença de acetogeninas foram novamente ensaiadas frente a *S. frugiperda*. Assim, verifica-se diferença significativa para as frações 4 e 5 em relação à mortalidade e ao peso larval do inseto. Dessa forma, enquanto nas duas frações as mortalidades foram, respectivamente, de 32,95 e 30,21%, para os controles acetona e metanol a mortalidade foi inferior a 9% (Tabela 16). No que se refere ao peso, os valores nas frações (1,85 e 1,07 mg) também foram significativamente menores que nos controles (cerca de 4 a 8 vezes) (Tabela 16).

Tabela 16 - Médias ($\pm$ erro padrão) de mortalidade e peso larval de *Spodoptera frugiperda* após o 7º dia de exposição em meio artificial contendo diferentes frações do extrato etanólico das sementes de *Annona mucosa*, testadas a 20% da CL_{50} ($842,97 \text{ mg kg}^{-1}$) estimada para o respectivo extrato bruto. Temp.: $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$; U.R.: $60 \pm 10\%$; fotofase 14h

Tratamentos	Mortalidade (%) ¹	Peso (mg) ²
Fração 4	$32,95 \pm 4,80 \text{ a}$	$1,85 \pm 0,25 \text{ c}$
Fração 5	$30,21 \pm 4,70 \text{ a}$	$1,07 \pm 0,07 \text{ c}$
Controle (metanol)	$8,52 \pm 3,22 \text{ b}$	$7,13 \pm 0,25 \text{ b}$
Controle (acetona)	$6,53 \pm 2,73 \text{ b}$	$8,94 \pm 0,46 \text{ a}$
F	33,72	24,99
Valor de <i>p</i>	<0,0001	<0,0001

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$);

²Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$).

Diante dos resultados promissores obtidos para as frações 4 e 5 e com base nas análises de ressonância magnética nuclear unidimensional (RMN de ^1H e ^{13}C) e bidimensional (COSY, HSQC, HMBC), a acetogenina majoritária roliniastatina-1 (Figura 11) purificada e isolada da fração mais ativa (fração 4) do extrato etanólico de sementes de *A. mucosa*, foi ensaiada frente a *S. frugiperda*.

Figura 11 - Estrutura química da roliniastatina-1, acetogenina majoritária isolada da fração mais ativa do extrato etanólico das sementes de *Annona mucosa*

Os resultados evidenciaram que a roliniastatina-1 provocou 87,50% de mortalidade (contra 8,25% no controle acetona) e drástica redução do peso das larvas sobreviventes (cerca de 97%), registrando-se 0,89 mg com roliniastatina-1 e 32,64 mg com o controle (Tabela 17). Ressalte-se ainda que, apesar dessa acetogenina (roliniastatina-1) ter sido já isolada por Pettit et al. (1987), a partir dessa mesma espécie (*A. mucosa*) de Annonaceae, este é o primeiro relato no qual tal acetogenina é isolada de forma biomonitorada.

Tabela 17 - Médias ($\pm$ erro padrão) de mortalidade e peso larval de *Spodoptera frugiperda* após o 7º dia de exposição em meio artificial contendo a acetogenina (roliniastatina-1), testada a 10% da CL_{50} (842,97 mg kg⁻¹) estimada para o respectivo extrato bruto. Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h

Composto	Mortalidade (%) ¹	Peso (mg) ²
Roliniastatina-1	87,50 $\pm$ 3,34	0,89 $\pm$ 0,35
Controle (acetona)	8,25 $\pm$ 3,63	32,64 $\pm$ 3,08
F	77,89	31,01
Valor de p	0,001	0,001

¹Diferença significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial, $p < 0,05$);

²Diferença significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana, $p < 0,05$).

De modo análogo, Tolosa et al. (2012), avaliando o efeito da roliniastatina-1, incorporada em meio artificial (50 e 100 mg kg⁻¹) sobre lagartas de segundo ínstar de *S. frugiperda*, constataram mortalidade de 90 e 100%, respectivamente, após 120 horas de exposição. Condizente com o trabalho realizado por Tolosa et al. (2012), González-Coloma et al. (2002), avaliando esse mesmo composto sobre adultos de *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Crisomelidae), expostos por 24 horas ao tratamento (50 μ g cm⁻²), constataram mortalidade de 97%.

Os mesmos autores (GONZÁLEZ-COLOMA et al., 2002), também trabalhando com a roliniastatina-1, verificaram que houve redução significativa no consumo alimentar de lagartas de quinto ínstar de *S. littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) quando mantidas por 24 horas em meio artificial contendo o referido composto incorporado (50 μ g cm⁻²). Os autores relataram que tal efeito foi ocasionado por uma ação do composto na fisiologia do inseto (pós-ingestão), refletindo, conseqüentemente, na inibição do crescimento larval e no ganho de biomassa corpórea. No mesmo estudo, os autores não verificaram ação fagoderrente da roliniastatina-1 para adultos de *L. decemlineata*, para lagartas de quinto ínstar de *S. littoralis* e para adultos de *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), em dose de 50 μ g cm⁻².

Colom et al. (2007a) também obtiveram efeitos significativos de redução de consumo alimentar e aumento de mortalidades larval e pupal de *S. frugiperda* com o uso de 10 acetogeninas incorporadas em meio artificial (50 μ g g⁻¹). Entre os compostos testados o maior efeito foi o ocasionado pela esquamocina que causou 100% de mortalidade larval, enquanto no controle esta atingiu 10%.

Outros autores como Blessing et al. (2010) constataram mortalidade larval entre 30 e 60% em média para lagartas de *S. frugiperda* mantidas em meio artificial contendo as

acetogeninas anonacina, *cis*-anonacina-10-1, densicomacina-1, gigantetronenina, murihexocina-b e tucupentol também incorporadas em dieta ($100 \mu\text{g g}^{-1}$).

Dessa forma, ressalta-se que o valor obtido neste bioensaio para a mortalidade larval (87,5%) de *S. frugiperda* com o emprego de roliniastatina-1 (na concentração de 84 mg kg^{-1}) condiz com trabalho realizado por Tolosa et al. (2012), que ensaiando o mesmo composto a 50 e 100 mg kg^{-1} , encontraram valores de 90 e 100%, respectivamente.

4.3 Etapa III

4.3.1 Curva de concentração-resposta da formulação comercial à base de acetogenina

Nesta etapa, estimaram-se as concentrações letais de um bioinseticida à base de acetogeninas (Anosom[®] 1 EC) para lagartas de *S. frugiperda* de modo a avaliar o potencial bioativo. Após 168 horas de exposição, as CL_{25} , CL_{50} e CL_{90} foram de 762,07, 1.352,00 e 2.959,00 mg kg^{-1} , respectivamente (Tabela 18).

A comparação da CL_{50} estimada para o ESAM ($842,97 \text{ mg kg}^{-1}$) com a estimada para o bioinseticida Anosom[®] 1 EC ($1.352,00 \text{ mg kg}^{-1}$), indicou que o primeiro é mais ativo (~1,6 vezes) do que o produto comercial recentemente registrado na Índia. Tal aspecto pode ser decorrente, em hipótese, das variações no perfil químico das acetogeninas presentes em ambos os derivados, aspecto a ser mais bem investigado em futuros estudos.

Com base em tais resultados foram estabelecidos os limiares utilizados nos ensaios subsequentes, nos quais avaliaram o efeito do produto sobre alguns aspectos biológicos de *S. frugiperda* bem como da ação comparativa desse produto com uma formulação à base de limonoides, tanto testados isoladamente quanto em mistura.

Tabela 18 - Estimativa da CL₂₅, CL₅₀ e CL₉₀ (em mg kg⁻¹) e intervalo de confiança do bioinseticida Anosom[®] 1 EC para lagartas de *Spodoptera frugiperda*, em diferentes tempos de exposição. Temp.: 25±2°C; U.R.: 60±10%; Fotofase: 14 h

Tempo de exposição (horas)	n ¹	Slope ± EP (valor de p)	CL ₂₅ (IC) ²	CL ₅₀ (IC) ²	CL ₉₀ (IC) ²	χ ²⁽³⁾	g.l. ⁴	h. ⁵
24	480	--	--	> 8.000,00	--	--	--	--
48	480	--	--	> 8.000,00	--	--	--	--
72	480	5,19±1,12 (p<0,0001)	5.255,00 (4.005,00 – 6.028,00)	7.759,00 (6.895,00 – 9.051,00)	13.208,00 (10.725,00 – 21.280,00)	1,28	2	0,64
96	480	3,27±0,37 (p<0,0001)	2.338,00 (1.776,00 – 2.825,00)	4.337,00 (3.733,00 – 4.945,00)	10.080,00 (8.480,00 – 12.889,00)	0,77	2	0,38
120	480	2,59±0,27 (p<0,0001)	1.254,00 (888,62 – 1.593,00)	2.740,00 (2.275,00 – 3.188,00)	7.966,00 (6.663,00 – 10.133,00)	0,35	2	0,17
144	480	2,65±0,27 (p<0,0001)	732,54 (500,67 – 952,94)	1.571,00 (1.265,00 – 1.852,00)	4.450,00 (3.822,00 – 5.386,00)	2,48	2	1,24
168	480	3,53±0,41 (p<0,0001)	762,07 (544,12 – 950,53)	1.352,00 (1.118,00 – 1.556,00)	2.959,00 (2.596,00 – 3.504,00)	0,78	2	0,39

¹n: número de insetos testados; ² IC: intervalo de confiança a 95% de probabilidade de erro; ⁽³⁾χ²: valor de qui-quadrado de Person; ⁴g.l.: graus de liberdade; ⁵ h.: fator de heterogeneidade.

4.3.2 Efeito da formulação à base de acetogenina sobre parâmetros biológicos de *S. frugiperda*

Verificou-se, com base nos resultados obtidos, efeito significativo do Anosom[®] 1 EC (testado na CL₅₀) na mortalidade e na duração da fase larval de *S. frugiperda* (Tabela 19), constatando-se 84,16% de mortalidade e 22,84 dias de duração da fase larval em comparação ao controle, onde tais valores foram 4,16% e 16,98 dias, respectivamente. A maior duração constatada no tratamento com o Anosom[®] 1 EC está relacionada a uma possível ação fisiológica (pós-ingestão) do bioinseticida sobre as lagartas de *S. frugiperda*, fato também constatado neste estudo com o extrato etanólico das sementes de *A. mucosa* (ESAM).

Tabela 19 - Médias ($\pm$ erro padrão) da mortalidade e duração larval de *Spodoptera frugiperda* criada em meio artificial contendo o bioinseticida Anosom[®] 1 EC, testado na CL₅₀ (1.352,00 mg kg⁻¹). Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h

Tratamento	Mortalidade (%) ¹	Duração (dias) ²
Anosom [®] 1 EC	84,16 $\pm$ 3,09	22,84 $\pm$ 1,63
Controle (acet.:met., 1:1)	4,16 $\pm$ 1,26	16,98 $\pm$ 0,84
F	255,68	7,20
Valor de <i>p</i>	<0,0001	0,0072

¹Diferença significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial, $p < 0,05$);

²Diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana, $p < 0,05$).

A redução significativa da sobrevivência larval de *S. frugiperda* (Figura 12) indica potenciais efeitos crônicos do Anosom[®] 1 EC (na CL₅₀ estimada), já que tal redução foi bastante acentuada do 12º até o 16º dia, não havendo, a partir de então, um incremento na mortalidade.

Figura 12 - Curva de sobrevivência (Kaplan-Meier) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* mantida em meio artificial contendo o bioinseticida à base de acetogeninas (Anosom[®] 1 EC), na CL_{50} ($1.352,00 \text{ mg kg}^{-1}$) previamente estimada. Temp.: 25 ± 2 °C; U.R.: $60 \pm 10\%$; fotofase 14h

Constatou-se, ainda, que o Anosom[®] 1 EC ocasionou mortalidade total das pupas que foram produzidas sob influência do produto durante sua fase larval (Tabela 20). Pelo fato de nenhuma pupa ter atingido a fase adulta no tratamento com Anosom[®] 1 EC, não foi possível avaliar o efeito do referido produto sobre a duração dessa fase. Já o peso das pupas foi significativamente menor com Anosom[®] 1 EC em comparação ao controle (166,40 e 227,29 mg, respectivamente), ocorrendo ainda 20,83% de pupas defeituosas no tratamento e 2,50% no controle (Tabela 21).

Tabela 20 - Médias ($\pm$ erro padrão) da mortalidade e duração da fase pupal de *Spodoptera frugiperda* mantida, durante a fase larval, em meio artificial contendo o bioinseticida Anosom[®] 1 EC, na CL₅₀ estimada (1.352,00 mg kg⁻¹). Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h

Tratamento	Mortalidade (%)	Duração (dias)
Anosom [®] 1 EC	100,00 $\pm$ 0,00*	0,00 $\pm$ 0,00*
Controle (acet.:met., 1:1)	16,96 $\pm$ 4,36	13,32 $\pm$ 1,15

* Não analisado (variância nula).

Tabela 21 - Médias ($\pm$ erro padrão) de peso pupal e porcentagens de pupas defeituosas de *Spodoptera frugiperda* mantidas, durante a fase larval, em meio artificial, contendo o bioinseticida Anosom[®] 1 EC, na CL₅₀ estimada (1.352,00 mg kg⁻¹). Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h

Tratamento	Peso 24h (mg) ¹	Pupas defeituosas (%) ²
Anosom [®] 1 EC	166,40 $\pm$ 4,14	20,83 $\pm$ 11,18
Controle (acet.:met., 1:1)	227,29 $\pm$ 3,26	2,50 $\pm$ 1,27
F	77,1051	6,6875
Valor de <i>p</i>	<0,0001	0,0188

¹Diferença significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana, $p < 0,05$);

²Diferença significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial, $p < 0,05$);

Além do efeito observado do Anosom[®] 1 EC sobre a deformação de pupas (Figura 13E; 13F), observa-se ainda a ocorrência de retenção de exúvia sobre as lagartas expostas a esse tratamento (Figura 13D), bem como a redução do tamanho destas quando comparadas às lagartas expostas ao controle (Figura 13A; 13B) devido à presença da acetogenina (anonina) em tal bioinseticida, a qual estaria reduzindo a eficiência de conversão alimentar (efeito pós-ingestão) do inseto-praga com comprometimento do ganho de biomassa corpórea, acarretando na significativa redução do peso das pupas com 24 horas, fato também observado neste estudo com o ESAM bem como nos estudos de Blessing et al. (2010) e Colom et al. (2007a).

Assim, condizente com os resultados obtidos neste bioensaio, observou-se significativa diferença do ESAM avaliado no bioensaio 4.1.2.5 sobre o peso pupal de *S. frugiperda* com valor médio de 181,64 mg em comparação com o controle (224,49 mg). No entanto, para porcentagem de pupas defeituosas, verificou-se significativo valor de 14,16% para o tratamento (ESAM) quando comparado com o controle (2,67%). Porém, para o mesmo tratamento, não se pôde constatar diferença significativa da porcentagem de adultos malformados devido à ocorrência de variação nula observada no controle. Por outro lado, em relação aos adultos que não emergiram das pupas sobreviventes ao tratamento (Anosom[®] 1 EC), presume-se a hipótese de que a anonina (principal acetogenina presente nesse

bioinseticida) estaria comprometendo o gasto de energia para que os adultos pudessem emergir, em razão da ação inibidora do Complexo I (NADH: ubiquinona oxiredutase) do sistema de transporte de elétrons mitocondrial e da NADH: oxidase da membrana plasmática, que induzem apoptose (morte programada da célula) em insetos, de certa forma pela privação de ATP, comprometendo a respiração celular e, conseqüentemente, o gasto de energia nesses indivíduos.

Figura 13 - Alterações morfológicas em *Spodopetra frugiperda* causadas pela incorporação em meio artificial do bioinseticida à base de acetogeninas (Anosom[®] 1 EC) (testado na $CL_{50} = 1.352,00 \text{ mg kg}^{-1}$) As setas indicam as deformações/modificações morfológicas ocorridas: **A)** lagartas de maior tamanho (controle); **B)** lagartas de menor tamanho (tratamento); **C)** lagarta exposta ao bioinseticida, evidenciando retenção de exúvia; **D)** ampliação da imagem da lagarta com retenção de exúvia; **E:** pupa defeituosa exposta ao bioinseticida; **F:** pupa deformada (melanização deficiente) exposta ao tratamento

4.3.3 Atividade inseticida da formulação comercial à base de acetogenina comparada com o bioinseticida de origem natural

Nas concentrações utilizadas (CL₉₀ estimada e concentrada registrada, respectivamente para Anosom[®] 1 EC e Azamax[®] 1,2 EC), ambos os produtos foram eficazes, causando elevada mortalidade larval de *S. frugiperda* e reduzindo significativamente o peso das larvas sobreviventes, tanto quando testados isoladamente quanto em mistura binária (Tabela 22).

Desse modo, assim como discutido para o ESAM em comparação aos produtos comerciais (Anosom[®] 1 EC e Azamax[®] 1,2 EC), ressalta-se a importância dos diferentes modos/mecanismos de ação presente em cada bioinseticida comercial. Com base nesses aspectos, torna-se indiscutível a presença de indivíduos resistentes nas populações de insetos e ácaros em baixas frequências, onde o aumento de tais indivíduos é dado pela pressão de seleção sobre suas populações, desencadeando dessa forma em falhas na ação de diferentes agentes de controle.

Assim, é de extrema importância definir o uso correto de um determinado produto para que a resistência não se torne um problema e, assim, com a intenção de evitar efeitos indesejáveis, a instabilidade da resistência tem sido explorada em estratégias de manejo por múltiplo ataque (GEORGHIOU, 1983; DENNEHY e OMOTO, 1994).

Com base no mencionado anteriormente e por meio da diferença observada entre as curvas de resposta dos distintos produtos ao longo do tempo para o controle do inseto-praga (mortalidades larvais de 100,00; 95,83 e 94,16%, respectivamente para o Azamax[®] 1,2 EC, Anosom[®] 1 EC e para a mistura binária) (Figura 14), é possível o uso de tais produtos comerciais (Anosom[®] 1 EC e Azamax[®] 1,2 EC) no manejo da resistência de *S. frugiperda* por múltiplo ataque, além de ser viável manter o nível de ação inseticida constatado na mistura Anosom[®] 1 EC + Azamax[®] 1,2 EC.

Tabela 22 - Médias ($\pm$ erro padrão) de mortalidade e peso larval de *Spodoptera frugiperda* após o 7º dia de exposição em meio artificial contendo diferentes produtos comerciais incorporados [(Anosom[®] 1 EC na CL₉₀, Azamax[®] 1,2 EC na dose recomendada e a mistura de ambos (metade da CL₉₀ para o Anosom[®] 1 EC + Azamax[®] 1,2 EC na metade da dose recomendada)]. Temp.: 25 $\pm$ 2 °C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase 14h

Tratamentos	Concentração (μ L/L)	Mortalidade (%) ¹	Peso (mg)
Azamax [®] 1,2 EC	4.000,00	100,00 $\pm$ 0,00*	--
Anosom [®] 1 EC	2.959,00	95,83 $\pm$ 1,53 a	0,50 $\pm$ 0,07 (3)**
Anosom [®] 1 EC + Azamax [®] 1,2 EC	1.479,50 + 2.000,00	94,16 $\pm$ 5,83 a	2,10 $\pm$ 0,01 (1)**
Controle (água deionizada)	--	7,50 $\pm$ 4,60 b	20,41 $\pm$ 1,18
F		43,55	--
Valor de p		<0,0001	--

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$);

* Não incluído na análise estatística (variância nula);

** Número insuficiente para realização da análise estatística, o número entre parênteses representa o número de lagartas sobreviventes.

Figura 14 - Mortalidade larval de *Spodoptera frugiperda* exposta a meio artificial contendo diferentes tratamentos em distintos tempos de exposição: Anosom® 1 EC na CL₉₀ (•) $y = -4,95 + 107,70/1 + 10^{(1,47 - 0,016x)}$, $R^2 = 0,99$ e $p < 0,0001$; Azamax® 1,2 EC na dose recomendada (▲) $y = 103,05 - 188,25(0,97)^x$, $R^2 = 0,96$ e $p < 0,0001$; Anosom® 1 EC (metade da CL₉₀) + Azamax® 1,2 EC (metade da dose recomendada) (▼) $y = 101,30 - 167,86(0,98)^x$, $R^2 = 0,98$ e $p < 0,0001$ e água destilada (■) $y = 0,06x - 1,67$, $R^2 = 0,91$ e $p < 0,0001$

4.3.4 Estimativa do tempo letal médio (TL₅₀) para os bioinseticidas comerciais

Na estimativa do tempo letal médio (TL₅₀) dos bioinseticidas Anosom® 1 EC e Azamax® 1,2 EC para lagartas de *S. frugiperda* observa-se pequena variação entre os TL₅₀ obtidos para o Azamax® 1,2 EC (48,19 horas) e para a mistura Anosom® 1 EC + Azamax® 1,2 EC (52,01 horas), com maior valor, entretanto, para o bioinseticida Anosom® 1 EC (90,08 horas) (Tabela 23).

Já, no biensaio da estimativa do TL₅₀ do extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* (ESAM), bem como dos diferentes produtos comerciais (Azamax® 1,2 EC e Premio® SC), para lagartas de *S. frugiperda*, observou-se pequena variação entre os TL₅₀ obtidos para o ESAM e para o Azamax® 1,2 EC, com maior valor para o inseticida de origem sintética (Premio® SC). As variações nos diferentes tempos letais observados para os dois bioensaios condizem com os diferentes modos/mecanismos de ação dos distintos produtos avaliados, bem como com o observado na Figura 14.

Tabela 23 - Estimativa do tempo letal médio (TL₅₀, em horas) e intervalo de confiança dos respectivos tratamentos (Anosom[®] 1 EC na CL₉₀; Azamax[®] 1,2 EC na dose recomendada e a mistura de ambos com metade da CL₉₀ para o Anosom[®] 1 EC e metade da concentração recomendada para o Azamax[®] 1,2 EC) para lagartas de *Spodoptera frugiperda*. Temp.: 25±2°C; U.R.: 60±10%; Fotofase: 14h

Tratamentos	n ¹	Slope ± EP (valor de p)	TL ₅₀ (IC 95%) ²	χ ² (3) ³	g.l. ⁴	h. ⁵
Anosom [®] 1 EC + Azamax [®] 1,2 EC	840	3,72±0,44 (p<0,0001)	52,01 (35,72 – 65,97)	11,95	4	2,98
Anosom [®] 1 EC	840	5,58±0,53 (p<0,0001)	90,08 (83,03 – 96,05)	7,39	4	1,84
Azamax [®] 1,2 EC	840	7,64±0,98 (p<0,0001)	48,19 (42,90 – 52,29)	1,37	4	0,34

¹n: número de insetos testados; ² IC: intervalo de confiança a 95% de probabilidade de erro; ³χ²: valor de qui-quadrado de Person; ⁴g.l.: graus de liberdade; ⁵ h.: fator de heterogeneidade.

5 CONCLUSÕES

Para as condições em que os bioensaios foram conduzidos é possível concluir que:

- O extrato etanólico das sementes de *A. mucosa* (ESAM) apresenta efeitos bioativos promissores (agudos e crônicos) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797), porém não apresenta efeito fagodeterrente para lagartas de quarto ínstar;
- O ESAM apresenta eficácia similar a inseticidas comerciais de origem sintética (Premio[®] SC) e natural (Azamax[®] 1,2 EC);
- Roliniastatina-1, acetogenina majoritária isolada da fração mais ativa do ESAM, apresenta efeitos bioativos (agudos e crônicos) promissores sobre *S. frugiperda*;
- A formulação à base de acetogeninas (Anosom[®] 1 EC) apresenta efeitos bioativos sobre *S. frugiperda*;
- Anosom[®] 1 EC associado ao Azamax[®] 1,2 EC, é promissor para emprego no manejo da resistência de *S. frugiperda* a inseticidas.

REFERÊNCIAS

- ACIOLE, S.D.G.; PICCOLI, C.F.; DUQUE, J.E.L.; COSTA, E.V.; NAVARRO-SILVA, M.A.; MARQUES, F.A.; SALES MAIA, B.H.L.N.S.; PINHEIRO, M.L.B.; REBELO, M.T. Insecticidal activity of three species of *Guatteria* (Annonaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, Bogotá, v. 37, p. 262-268, 2011.
- ALALI, F.Q.; LIU, X.X.; MCLAUGHLIN, E.J.L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 62, p. 504-540, 1999.
- BERNARDI, D.; GARCIA, M.S.; BOTTON, M.; CUNHA, U.S. Efeito da azadiractina sobre *Chaetosiphon fragaefolli* (Cockerell, 1901) (Hemiptera: Aphididae) na cultura do morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 34, n. 1, p. 93-101, 2012.
- BIMAKRA, M.; RAHMANA, R.A.; TAIPA, F.S.; GANJLOOB, A.; SALLEHA, L.M.; SELAMATC, J.; HAMIDC, A.; ZAIDULC, I.S.M. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 89, p. 67-72, 2011.
- BLESSING, L.T.; COLOM, O.A.; POPICH, S.; NESKE, A.; BARDÓN, A. Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Pest Science**, Berlin, v. 83, p. 307-310, 2010.
- BLANK, A.F.; COSTA, A.G.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; CAVALCANTI, S.C.H.; ALVES, P.B.; INNECCO, R.; EHLERT, P.A.D.; SOUSA, I.F. Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, p. 557-564, 2007.
- BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M.C.; BARRACHINA, E.E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**, London, v. 22, p. 269-303, 2005.
- BUSATO, G.R.; GRÜTZMACHER, A.D.; GARCIA, M.S. Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, das culturas do milho e do arroz irrigado. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 525-529, 2002.
- BUSATO, G.R.; GRÜTZMACHER, A.D.; OLIVEIRA, A.C. Caracterização genética de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) provenientes das culturas do arroz irrigado e milho no Rio Grande do Sul através da técnica de AFLP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 2003. Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2003. p. 377-379.
- BARREIRO, E.J. Desenho de fármacos a partir de produtos naturais. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (Ed.). Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. **Argos**, Chapecó, v. 14, n. 3, p. 237-296, 2001.

BLUM, U. Designing laboratory plant debris-soil bioassays: some reflections. In: DAKHINI, K.M.N.; FOY, C.L. (Ed.). **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton: CRC Press LLC, 1999. p. 17-23.

BOWLES, D.J. Defense related proteins in higher plants. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 59, p. 837-907, 1990.

CHACÓN-BENAVENTE, R.; LÓPEZ-GUILLEN, G.; HERNÁNDEZ, E.; ROJAS, J.C.; MALO, E.A. Juvenile hormone analog enhances calling behavior, mating success, and quantity of volatiles released by *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 42, p. 262-269, 2013.

CESSA, R.M.A.; MELO, E.P.; JUNIOR, I.S.L. Mortalidade de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas de milho e feijoeiro imersas em soluções contendo inseticidas. **Revista Agrogeoambiental**, Inconfidentes, v. 5, n. 1, p. 85-92, 2013.

CASTILLO-SÁNCHEZ, L.E.; JIMÉNEZ-OSORNIO, J.J.; DELGADO-HERRERA, M.A. Secondary metabolites of the Annonaceae, Solanaceae and Meliaceae families used as biological control of insects. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, Mérida, v.12, p. 445-462, 2010.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M.L.C.; SILVA, R.B.; SARTO, M.L.D.; PENTEADO-DIAS, A.M. Monitoramento de parasitoides de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em municípios de Minas Gerais, Brasil., Sete Lagoas, 2009. p. 24-32. (Embrapa Milho e Sorgo (Documentos, 92)

COSTA, M.C.A.; MENDES, A.M.; RODRIGUES, V.G.S. Avaliação da não-preferência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) entre híbridos de milho *Bt* e não *Bt*. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 9., 2009. São Lourenço. **Anais...** São Lourenço, 2009. p. 1-3

CAPINERA, J.L. Encyclopedia of Entomology. **The Netherlands**, Assen, v. 1, p. 346, 2008.

COLOM, O.A.; POPICH, S.; BARDÓN, A. Bioactive constituents from *Rollinia emarginata* (Annonaceae). **Natural Product Research**, Abingdon, v. 21, p. 254-259, 2007b

COLOM, O.A.; NESKE, A.; POPICH, S.; BARDÓN, A. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Pest Science**, Berlin, v. 80, p. 63-67, 2007a.

COLOM, O.A.; BARRACHINA, I.; MINGOL, I.A.; GONZALEZ MAS, M.C.; SANZ, P.M.; NESKE, A.; BARDON, A. Toxic effects of annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. **Journal of Pest Science**, Berlin, v. 81, p. 85-89, 2008.

CASTRO, D.P.; CARDOSO, M.G.; MORAES, J.C.; SANTOS, N.M.; BALIZA, D.P. Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L.. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 8, p. 27-32, 2006.

CHERICONI, S.; FLAMINI, G.; CAMPEOL, E.; CIONI, P.L.; MORELLI, I. GC-MS analyses of the essential oil from the aerial parts of *Artemisia verlotiorum*: variability during the year. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 32, p. 423-429, 2004.

CRUZ, I.; MONTEIRO, M.A.R. **Controle biológico da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, utilizando o parasitoide *Trichogramma pretiosum***. Sete Lagoas, 2004. 4p. (Embrapa Milho e Sorgo Comunicado técnico, 98).

CHATROU, L.W.; RAINER, H.; MAAS, P.J.M. Annonaceae (Soursop Family). In: SMITH, N. **Flowering plants of the Neotropics**, Birmingham, v. 25, n. 4, p. 18-20, 2004.

CALIXTO, J.B. Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (Ed.). Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. **Argos**, Chapecó, v. 12, n. 3, p. 77-99, 2001.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M.L.C.; OLIVEIRA, A.C.; VASCONCELOS, C.A. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. **International Journal of Pest Management**, London, v. 45, p. 293-296, 1999.

CASIDA, J.E.; QUISTAD, G.B. Gold age of insecticide research: past, present or future. **Annual Reviews Entomology**, Palo Alto, v. 43, p. 1-16, 1998.

CRUZ, I.; OLIVEIRA, A.C. Flutuação populacional do predador *Doru luteipes* Scudder em plantas de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 363-368, 1997.

CARVALHO, R.P.L. **Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho em condições de campo**. 1970. 170p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1970.

DECIO, P.; SILVA-ZACARINB, E.C.M.; BUENO, F.C.; BUENO, O.C. Toxicological and histopathological effects of hydramethylnon on *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers. **Micron**, New York, v. 45, p. 22-31, 2013.

DESHMUKHE, P.V.; HOOLI, A.A.; HOLIHOSUR, S.N. Bioefficacy of cold ethyl alcohol extract of *Annona squamosa* against *Spodoptera litura* Fabricius. **Journal of Biopesticides**, Westlake, v. 3, p. 271-274, 2010.

DRÈS, M.; MALLET, J. Host races in plant-feeding insects and their importance sympatric speciation. **Philosophical Transactions: Biological Sciences**, London, v. 357, n. 1420, p. 471-492, 2002.

DAMASCENO, D.C.; VOLPATO, G.T.; SARTORI, T.C.F.; RODRIGUES, P.F.; PERIN, E.A.; CALDERON, I.M.P.; RUDGE, M.V.C. Effects of *Annona squamosa* extract on early pregnancy in rats. **International Journal of Phytotherapy e Phytopharmacology**, Jena, v. 9, p. 667, 2002.

DENNEHY, T.J.; OMOTO, C. Sustaining the efficacy of dicofol against citrus rust mite (*Phyllocoptruta oleivora*): a case-history of industrial and academic collaboration. In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE-PESTS AND DISEASES, 1994. Brighton. **Proceedings...** Brighton.,1994. p. 955-962,

FAGUNDES; F.A; OLIVEIRA; L.B. de; CUNHA; L.C; VALADARES; M.C; *Annona coriacea* induz o efeito genotóxico em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 2, p. 24-29, 2005.

FERRAZ, M.C.V.D. **Determinação das exigências térmicas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em cultura de milho.** 1982. 81p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1982.

FINNEY, D.J. **Probit analysis**, Cambridge, England: Cambridge University Press, 1971.

GONZÁLEZ-COLOMA, A.; GUADAÑO, A.; INÉS, C.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R.; CORTES, D. Selective action of acetogenin mitochondrial complex I Inhibitors. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 57, p. 1028-1034, 2002.

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. **Manual de Entomologia Agrícola**. 2 ed. Piracicaba:Ed. Agronômica Ceres, 2002. 920p.

GANG, D.R.; WANG, J.; DUDAREVA, N.; NAM, K.H.; SIMON, J.E.; LEWINSOHN, E.; PICHERSKY, E. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. **Plant Physiology**, Washington, v. 125, p. 539-555, 2001.

GEORGHIOU, G.P. Management of resistance in arthropods. In: GEORGHIOU, G.P.; SAITO, T. (Ed.). **Pest resistance to pesticides**, New York, 1983. p. 769-792.

GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

HOLTZ, A.M.; OLIVEIRA, H.G.; ZANUNCIO, J.C.; SARMENTO, R.A.; RIBEIRO, A.N.; OLIVEIRA, C.L.; MARINHO, J.S. Ação de plantas por meio de infoquímicos sobre o segundo e terceiro níveis tróficos. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 20, n. 1, p. 53-60, 2004.

HINDE, J.; DEMÉTRIO, C.G.B. Overdispersion: model and estimation. **Computational Statistics and Data Analysis**, Amsterdam, v. 27, p. 151-170, 1998.

HENDERSON, C.F.; TILTON, E.W. Tests with acaricides against the brow wheat mite. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 48, p. 157-161, 1955.

ISMAN, M.B. Insect antifeedants. **The Royal Society of Chemistry**, Cambridge, p. 152-157, 2002.

ISMAN, M.B.; RODRIGUEZ, E. Larval growth inhibitors from species of *Parthenium* (Asteraceae). **Recent Advances in Phytochemistry**, New York, v. 22, p. 2709-2713, 1983.

ISMAN, M.B.; MATSUURA, H.; MACKINNON, S.; DURST, T.; TOWERS, G.H.N.; ARNASON, J.T. Phytochemistry of the Meliaceae: So many terpenoids, so few insecticides. **Recent Advances in Phytochemistry**, New York, v. 30, p. 155-178, 1996.

JOHNSON, H.A; ORBELIES, N.H.; ALALI, F.Q.; McLAUGHLIN, J.L. Thwarting resistance: Annonaceae acetogenins as new pesticidal and antitumor agents. In: COUTLER, S.J.; CUTLER, H.G.(Ed.). **Biologically active natural products: pharmaceuticals**. New York: CRC Press, 2000. p.173-184.

JOSSANG, A.; DUBAELE, B.; CAVE, A.; BARTOLI, M.; BERIEL, H. Annonomontacine: une nouvelle acétogénine γ lactone monotetra hydrofurannique cytotoxique de l' *Annona montana*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 54, p. 967-971, 1991.

JOLAD, S.D.; HOFFMANN, K.H.S.; COLE, J.R. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 47, p. 3151-3153, 1982.

KASHIN, J.; WATANABE, T. Method of testing insecticide susceptibility of *Stenotus rubrovittatus* (Hemiptera: Miridae) by topical application. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 47, p. 467-473, 2012.

KAMARAJ, C.; BAGAVAN, A.; ELANGO, G.; ABDUZ ZAHIR, A.; RAJAKUMAR, G.; MARIMUTHU, S.; SANTHOSHKUMAR, T.; ABDUL RAHUMAN, A. Larvicidal activity of medicinal plant extracts against *Anopheles subpictus* and *Culex tritaeniorhynchus*. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 134, p. 101-106, 2011.

KUSARI, S.; VERMA, V.C.; LAMSHOEFT, M. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces Azadirachtin. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, n. 28, p.1287-1294, 2012.

LAROZE, L.E.; DÍAZ-REINOSO, B; MOURE, A.; ZÚÑIGA, M.E.; DOMÍNGUEZ, H. Extraction of antioxidants from several berries pressing wastes using conventional and supercritical solvents. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 231, p. 669-677, 2010.

LAHM, G.P; STEVENSON, T.M.; SELBY, T.P.; FREUDENBERGER, J.H.; CORDOVA, D.; FLEXNER, L.; BELLIN, C.A.; DUBAS, C.M.; SMITH, B.K.; HUGHES, K.A; HOLLINGSHAUS, J.G; CLARK, C.E.; BENNER, E.A. RynaxypyrTM: A new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, New York, v. 17, p. 6274-6279, 2007.

LEATEMIA, J.A.; ISMAN, M.B. Insecticidal activity of crude seed extracts of *Annona* spp., *Lansium domesticum* and *Sandoricum koetjape* against lepidopteran larvae. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 31, n. 1, p. 30-37, 2004.

LANGE, B.M.; WILDUNG, M.R.; McCASKILL, D.; CROTEAU, R. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, p. 2100-2104, 1998.

LIMA, E.R.; McNEIL, J.N. Mecanismos de isolamento reprodutivo em *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 1995. Caxambu. **Resumos...** Caxambu, 1995. 164p.

LARA, F.M. **Princípio de resistência de plantas a insetos**. São Paulo: Ícone, 1991. 336p.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P.K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, New York, v. 21, p. 2783-2813, 1982.

LEVIN, D. The role of trichomes in plant defense. **The Quarterly Review of Biology**, New York, v. 48, p. 3-15, 1973.

MAAS, P.J.M.; LOBÃO, A.; RAINER, H. Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110219>> Acesso em: 23 Jan. 2014.

MENDES, C.S.O. **Caracterização da composição química e atividade biológica de extratos de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze Amaranthaceae**. 2012. 36p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

MADHUMITHA, G.; RAJAKUMAR, G.; ROOPAN, S.M.; RAHUMAN, A.A.; PRIYA, K.M.; SARAL, A.M.; KHAN, F.R.N.; KHANNA, V.G.; VELAYUTHAM, K.; JAYASEELAN, C.; KAMARAJ, C.; ELANGO, G. Acaricidal, insecticidal, and larvicidal efficacy of fruit peel aqueous extract of *Annona squamosa* and its compounds against blood-feeding parasites. **Parasitology Research**, Berlin, v. 111, p. 2189-2199, 2012.

MENDES, S.M.; BOREGAS, K.G.B.; LOPES, M.E.; WAQUIL, M.S.; WAQUIL, J.M. Fall armyworm responses to genetically modified maize expressing the toxin Cry 1A(b). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília v. 46, p. 239-244, 2011.

MAIRESSE, L.A.S. **Avaliação da bioatividade de extratos de espécies vegetais, enquanto excipientes de aleloquímicos**. 2005. 258p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

MURÚA, G.; VIRLA, E. Population parameters of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lep.: Noctuidae) fed on corn and two predominant grass in Tucuman (Argentina). **Acta Zoologica Mexicana**, Xalapa, v. 20, p. 199-210, 2004.

MOREIRA, I.C.; LAGO, J.H.G.; ROQUE, N.F. Alkaloid, flavonoids and terpenoids from leaves and fruits of *Xylopia emarginata* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 31, p. 535-537, 2003.

MAAS, P.J.M.; KAMER, H.M.; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R.; RAINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 52, n. 80, p. 65-98, 2001.

MALHEIROS, A.; PERES, M.T.L.P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (Ed.). Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. **Argos**, Chapecó, v. 12, n. 3, p. 503-523, 2001.

MONGE, A. Patentes e contratos no desenvolvimento de medicamentos nos países em desenvolvimento: uma reflexão da perspectiva do investigador. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (Ed.) Plantas Medicinais Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna. **Argos**, Chapecó, v. 12, n. 3, p. 335-349, 2001.

MORDUE, A.J.; NISBET, A.J. Azadirachtin from the neem tree. *Azadirachta indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, p. 615-632, 2000.

MORINI, M.S.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A.; PAGNOCCA, F.C.; BACCI JR.; FERNANDES, J.B.; VIERIA, P.C. Ação tóxica de ácidos graxos misturados a um triglicerídeo, sobre operárias de *Atta sexdens* L. (Hymenoptera, Formicidae). **Naturalia**, São Paulo, v. 24, p. 327-330, 1999.

MARTINEZ, S.S.; VAN ENDEM, H.F. Sublethal concentrations of azadirachtin affect food intake, conversion efficiency and feeding behaviour of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 89, p. 65-71, 1999.

MARTINS, D. **Alcaloides, flavonoides e terpenoides de *Xylopia aromatica***. 1996. 134p. Tese (Doutorado na área de Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

NICULAU, E.S.; ALVES, P. B.; NOGUEIRA, P.C.L.; MORAES, V.R.S.; MATOS, A.P.; BERNARDO, A.R.; VOLANTE, A.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, F.G.F.M.; CORRÊA, A.G.; BLANK, A.F.; SILVA, A.C.; RIBEIRO, L.P. Atividade inseticida de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Herit e *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 9, p. 1391-1394, 2013.

NALIM, D.M. **Biologia, nutrição quantitativa e controle de qualidade das populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera Noctuidae) em duas dietas artificiais**. 1991. 150p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991.

NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society: Series A: General Statistics**, London, v. 135, p. 370-384, 1972.

ORIGIN LAB Corporation, data analysis and graphing software, **Origin versão 9.1**, Guangzhou, 2013.

OLIVEIRA, M.S.S.; ROEL, A.R.; ARRUDA, E.J.; MARQUES, S.A. eficiência de produtos vegetais no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 326-331, 2007.

PETROSKI, R.J.; STANLEY, D.W. Natural compounds for pest and weed control. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n.18, p. 8171-8179, 2009.

PINHEIRO, M.L.B.; XAVIER, C.M.; SOUZA, A.D.L.; RABELO, D.M.; BATISTA, C.L.; BATISTA, R.L.; COSTA, E.V.; CAMPOS, F.R.; BARISON, A.; VALDEZ, R.H.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V. Acanthoic acid and other constituents from the stem of *Annona amazonica* (Annonaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 1095-117, 2009.

PIMENTA, L.P.S.; PINTO, G.B.; TAKAHASHI, J.A.; SILVA, L.G.F.; BOAVENTURA, M. A.D. Biological screening of Annonaceous Brazilian medicinal plants using *Artemia salina*. **Phytomedicine**, Jena, v. 10, p. 209-212, 2003.

PARRA, J.R.P.; HADDAD, M.L. **Determinação do número de ínstaes de insetos**, Piracicaba: FEALQ, 1989. 49p.

PASHLEY, D.P.; MARTIN, J.A. Reproductive incompatibility between host strains of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 80, n. 6, p. 731-733, 1987.

PETTIT, G.R.; CRAGG, G.M.; POLONSKY, J.; HERALD, D.L.; GOSWAMI, A.; SMITH C.R.; MORETTI, C.; SCHMIDT, J.M.; WEISLEDER, D. Isolation and structure of rolliniastatin-1 from the South American tree *Rollinia mucosa*. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, Ottawa, v. 65, p. 1433-1435, 1987.

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

RIBEIRO, L.P.; VENDRAMIM, J.D.; BICALHO, K.U.; ANDRADE, M.S.; FERNANDES, J.B.; MORAL, R.A.; DEMÉTRIO, C.G.B. *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): A promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 55, p. 6-14, 2013.

RIBEIRO, Z.A.; COSTA, E.N.; SOUZA, B.H.S.; BOIÇA JUNIOR, A.L. Effect of doses of azadirachtin on *Anticarsia gemmatilis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae, applied on *Phaseolus vulgaris* L. leaves. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 55, p. 191-192, 2012a.

RIBEIRO, Z.A.; COSTA, E.N.; SOUZA, B.H.S.; BOIÇA JUNIOR, A.L. Efficiency of azadirachtin 1.2 EC on the control of *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) on *Phaseolus vulgaris* L. leaves. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 55, p. 213-214, 2012b.

RIBEIRO, S.R.; ALVES, D.S.; VILAS BOAS, M.A.; CARVALHO, G.A.; OLIVEIRA, D.F. Efeito de extratos de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae: Caesalpinoideae) sobre diferentes características biológicas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 4, n. 2, p. 35-42, 2009.

ROJANO, B.A.; MARTÍNEZ, S.A.M.; RODRÍGUEZ, F.Y.; VEGA, J.S. Evaluación de isoespintanol aislado de *Oxandra* cf. *xylopioides* (Annonaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, Medellín, v. 60, p. 3691-3702, 2007.

- RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; BORONAT, A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. **Plant Physiology**, Washington, v. 130, p. 1079-1089, 2002.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro:Editora Guanabara Koogan, 2001. 906p.
- RAGURAMAN, S.; SINGH, R.P. Biological effects of neem (*Azadirachta indica*) seed oil on an egg parasitoid, *Trichogramma chilonis*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, p. 1274-1280, 1999.
- RODRÍGUEZ H.C.; VENDRAMIM, J.D. Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Manejo Integrado de Plagas**, Turrialba, v. 4, n. 2, p. 14-22, 1996.
- SEGURA, D.F.; UTGÉS, M.E.; LIENDO, M.C.; RODRÍGUEZ, M.F.; DEVESCOVI, F.; VERA, M.T.; TEAL, P.E.A.; CLADERA, J.L. Methoprene treatment reduces the pre-copulatory period in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) sterile males. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 137, p. 19-29, 2013.
- SANADA-MORIMURA, S.; MATSUMURA, M. Effect of acetone solution in a topical application method on mortality of rice planthoppers, *Nilaparvata lugens*, *Sogatella furcifera*, and *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae). **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 46, p. 443-447, 2011.
- SAS Institute, Statistical analysis system: getting started with the SAS learning. Version 9.2. Cary, NC: **SAS Institute**, U.S.A., 2011.
- SEFFRIN, R.C.; SHIKANO, I.; AKHTAR, Y.; ISMAN, M.B. Effects of crude seed extracts of *Annona atemoya* and *Annona squamosa* L. against the cabbage looper, *Trichoplusia ni* in the laboratory and greenhouse. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, p. 20-24, 2010.
- STEFANELLO, M.E.A.; CERVI, A.C.; WISNIEWSKI JR, A.; SIMIONATTO, E.L. Composição e variação sazonal do óleo essencial de *Myrcia obtecta* (O. Berg) Kiaersk. var. *obtecta*, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 82-86, 2010.
- SENTHILKUMAR, N.; VARMA, P.; GURUSUBRAMANIAN, G. Larvicidal and adulticidal activities of some medicinal plants against the malarial vector, *Anopheles stephensi* (Liston). **Parasitology Research**, Berlin, v. 104, p. 237-244, 2009.
- SCHOONHOVEN, L.M.; VAN LOON, J.J.A.; DICKE, M. Plant chemistry: endless variety. In: SCHOONHOVEN, L.M.; VAN LOON, J.J.A.; DICKE, M. **Insect-Plant Biology**. 2nd ed. Oxford: Ed. Oxford University Press, 2005. p. 80-86.
- SHAALAN, E.A.S.; CANYON, D.; YOUNES, M.W.F.; ABDEL-WAHAB, H.; MANSOUR, A.H. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. **Environment International**, New York, v. 31, n.8, p. 1149-1166, 2005.

SILOTO, R.C. **Danos e biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797)**

(**Lepidoptera: Noctuidae**) em genótipos de milho. Piracicaba:FEALQ, 2002.p. 12-18.

SCHMIDT, F.G.V.; MONNERAT, R.; BORGES, M.; CARVALHO, R. **Criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos e semioquímicos**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Brasília, 2001. p. 20-29 (Circular técnica, 11)

SIMS, S.R.; BERBERICH, S.A.; NIDA, D.L.; SEGALINI, L.L.; LEACH, J.N.; EBERT, C.C.; FUCHS, R.L. Analysis of expressed proteins in fiber fraction from insect-protected and glyphosate-tolerant cotton varieties. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 1212-1216, 1996.

SCOTT, J.C. Investigating mechanisms of insecticide resistance: methods, strategies, and pitfalls. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E. **Pesticide resistance in arthropods**. London, :Chapman and Hall, 1990. p.39-57.

SAVARD, J.; ESPIL, L. **Centre Technique Forestier Tropical**, Nogent, v. 3, p. 7, 1951.

TOLOSA, D.; COLOM, O.A.; BARDÓN, A.; NESKE, A. Insecticidal effects of acetogenins from *Rollinia occidentalis* seed extract. **Natural Product Communication**, Westerville, v. 7, p. 1645-1646, 2012.

TRINDADE, R.C.P.; LUNA, J.S.; LIMA, M.R.F.; SILVA, P.P.; SANT'ANA, A.E.G. Larvicidal activity and seasonal variation of *Annona muricata* (Annonaceae) extract on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Revista Colombiana de Entomología**, Santafe de Bogota, v. 37, p. 223-227, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

THOMPSON, J.D.; CHALCHAT, J.C.; MICHET, A.; LINHART, Y.B.; EHLERS, B. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 29, p. 859-880, 2003.

VIEGAS JR., C. Terpenos com atividade inseticida: Uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. Introdução aos semioquímicos e terminologia. In: VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. (Org.). **Feromônios de insetos. Biologia, química e emprego no manejo de pragas**. 2 ed. Ribeirão Preto:Editora HOLOS, 2001. p. 9-23.

WEINHOLD, T.S.; BRESCIANI, L.F.V.; TRIDAPALLI, C.W.; YUNES, R.A.; HENSE, H.; FERREIRA, S.R.S. *Polygala cyparissias* oleoresin: comparing CO₂ and classical organic solvent extractions. **Chemical Engineering and Processing**, Lausanne, v. 47, p. 109-117, 2008.

WAQUIL, J.M.; BOREGAS, K.G.B.; MENDES, S.M. **Viabilidade do uso de hospedeiros alternativos como área de refúgio para o manejo da resistência da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no cultivo do milho-Bt**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. 10p. (Comunicado técnico),

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (Ed.). *Planta Medicinais Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna*. **Argos**, Chapecó, v. 12, n. 3, p.17-46, 2001.

ZURE, G.E.O.; OLIVEIRA, V.M.; GOTARDO, M.; SANTOS, F.M. Produtividade de milho verde híbrido BM 3061 sob diferentes tipos de adubação no plantio. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Madrid, v. 6, n. 2, p. 184-188, 2011.

ZENKER, M.M.; SPECHT, A.; CORSEUIL, E. Estágios imaturos de *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 99-107, 2007.