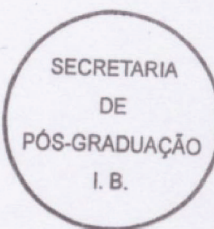


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA



**Carlos Henrique Zanini Martins**

“Atividade tóxica e deterrente de *Koelreuteria paniculata* (Laxm.) e seus extratos no desenvolvimento de *Anticarsia gemmatalis* (Huebner) (Lepidoptera: Noctuidae)”

Este exemplar corresponde à redação  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Carlos Henrique Zanini Martins  
Manoel Ruy de F. Neto  
e aprovada pela Comissão Julgadora

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, área de Bioquímica.*

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo  
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Machado Freire

CAMPINAS – SP  
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

M366a

Martins, Carlos Henrique Zanini, 1982-  
Atividade tóxica e deterrente de *Koelreuteria  
paniculata* (Laxm.) e seus extratos no desenvolvimento de  
*Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) / Carlos  
Henrique Zanini Martins. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Maria Lígia Rodrigues Macedo.  
Coorientador: Maria das Graças Machado Freire.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Anticarsia gemmatilis*. 2. *Koelreuteria paniculata*.  
3. Tripsina. 4. Inseticidas vegetais. I. Macedo, Maria  
Lígia Rodrigues. II. Freire, Maria das Graças Machado.  
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de  
Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Antifeedant and toxic activity of *Koelreuteria paniculata* (Laxm.) and its extracts on development of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae)

**Palavras-chave em Inglês:**

*Anticarsia gemmatilis*

*Koelreuteria paniculata*

Trypsin

Botanical insecticides

**Área de concentração:** Bioquímica

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

Maria Lígia Rodrigues Macedo [Orientador]

Sérgio Marangoni

Valdirene Moreira Gomes

**Data da defesa:** 27-02-2007

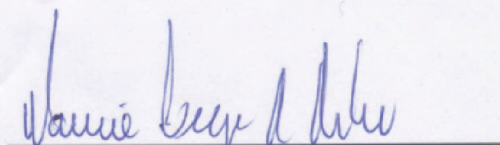
**Programa de Pós Graduação:** Biologia Funcional e Molecular



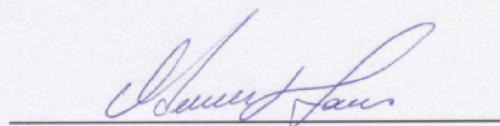
Data da Defesa: 27/02/2007

BANCA EXAMINADORA

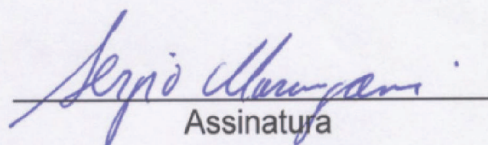
Profa.Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo  
(Orientadora)

  
Assinatura

Profa.Dra. Valdirene Moreira Gomes

  
Assinatura

Prof.Dr. Sérgio Marangoni

  
Assinatura

Profa.Dra. Marilvia Dansa de Alencar Petretski

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof.Dr. Stephen Hyslop

\_\_\_\_\_  
Assinatura

*Aos meus pais, José Carlos e Teresa, pelo exemplo de vida e apoio...*

**DEDICO.**

*Ao povo brasileiro, que possibilitou um ensino gratuito e de qualidade...*

**OFEREÇO.**

Campinas, fevereiro de 2007



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que já me deixaram a maior herança que se pode esperar, o conhecimento e a moral.

A toda a minha família pelo apoio e confiança.

A Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Lígia Rodrigues Macedo pela iniciação na Bioquímica, orientação e amizade durante quatro anos de trabalho juntos.

A todos os amigos do LPPFB – UFMS, MS e do Departamento de Bioquímica – Unicamp, SP, pela troca de informações e apoio.

Aos amigos da República Interlagos, Três Lagoas-MS, pela convivência.

A todos meus amigos da Moradia da Unicamp, pela sabedoria transmitida, contribuição na vida pessoal e profissional.

A Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria da Graça Machado Freire, Coordenadora de Pesquisa do ISE-CENSA, Campos dos Goytacazes, RJ, pelo apoio na análise fitoquímica do extrato de *K. paniculata*.

Ao Prof. Dr<sup>o</sup>. José Roberto Postali Parra e a Técnica de Laboratório Nereida G. Zério - Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALq/USP, Piracicaba (SP) - pelo fornecimento dos ovos de *A. gemmatilis*.

A CAPES, pela concessão da bolsa de pesquisa.

A PINEP e FUNDECT, pelo apoio financeiro.

Aos professores e demais funcionários do Instituto de Biologia.

Aos professores da banca examinadora que gentilmente aceitaram o convite para esta defesa.

*Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino. Esses que fazeres se encontram um no corpo do outro. Enquanto ensino continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar, constatando, intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a novidade... (Paulo Freire).*

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                                | Página |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| LISTA DE FIGURAS.....                                                                                                                                                                          | x      |
| LISTA DE TABELAS .....                                                                                                                                                                         | xi     |
| RESUMO.....                                                                                                                                                                                    | xii    |
| ABSTRACT.....                                                                                                                                                                                  | xiii   |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                                                                                                             | 01     |
| 1.1 Material Vegetal.....                                                                                                                                                                      | 01     |
| 1.2 Aspectos da biologia e controle de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....                                                                                                                      | 03     |
| 1.2.1 Ciclo de vida e descrição.....                                                                                                                                                           | 03     |
| 1.2.2 Danos à cultura de soja.....                                                                                                                                                             | 05     |
| 1.2.3 Medidas de controle e Manejo.....                                                                                                                                                        | 05     |
| 1.3 Inseticidas Botânicos.....                                                                                                                                                                 | 07     |
| 1.4 Substâncias químicas secundárias das plantas: aspectos co-evolutivos com insetos herbívoros e um mecanismo de defesa aplicável à agricultura na forma de extratos aquosos e orgânicos..... | 09     |
| 1.5 Estratégias para obtenção de compostos inseticidas vegetais.....                                                                                                                           | 13     |



|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.6 Ecologia Nutricional de Insetos: aspectos enzimáticos da digestão.....                                             | 18 |
| 1.7 Morfofisiologia da digestão de insetos.....                                                                        | 20 |
| 1.8 Objetivos.....                                                                                                     | 23 |
| 2.. MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                            | 24 |
| 2.1 Obtenção dos ovos de <i>Anticarsia gemmatalis</i> Equipamentos.....                                                | 24 |
| 2.2 Obtenção do extrato aquoso.....                                                                                    | 24 |
| 2.3 Bioensaios.....                                                                                                    | 24 |
| 2.4 Ovoposição.....                                                                                                    | 25 |
| 2.5 Análise dos parâmetros fisiológicos relativos ao consumo e utilização de alimento.....                             | 26 |
| 2.6 Obtenção de homogenatos do intestino médio (IM) de <i>A. gemmatalis</i> .....                                      | 26 |
| 2.7 Obtenção de homogenatos das fezes de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....                                            | 26 |
| 2.8 Determinação da quantidade de proteína.....                                                                        | 26 |
| 2.09 Atividade Triptica.....                                                                                           | 27 |
| 2.10 Atividade Triptica de homogenatos de <i>A. gemmatalis</i> em Gel de Poliacrilamida contendo 0,1% de gelatina..... | 27 |
| 2.11 Análise Estatística.....                                                                                          | 27 |

|                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.12 Obtenção dos extratos orgânicos de <i>Koelreuteria paniculata</i> .....                                                                         | 28 |
| 2.12.1 Testes de bioatividade.....                                                                                                                   | 30 |
| 3. RESULTADOS.....                                                                                                                                   | 31 |
| 3.1 Efeito de KPE 0,15% no desenvolvimento de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentadas em folhas de soja IAC-19.....                                 | 31 |
| 3.1.1 Fase Larval.....                                                                                                                               | 31 |
| 3.1.2 Fase Pupal.....                                                                                                                                | 31 |
| 3.1.3 Fase adulta.....                                                                                                                               | 34 |
| 3.2 Análise dos parâmetros fisiológicos relativos ao consumo e utilização de alimento de <i>A. gemmatalis</i> tratadas com KPE 0,15%.....            | 35 |
| 3.2.1 Consumo de dieta e Resíduos de excreção.....                                                                                                   | 35 |
| 3.2.2 Determinação dos índices nutricionais quantitativos da fase larval relativa ao consumo e utilização do alimento.....                           | 37 |
| 3.3 Efeito de KPE 0,15% na Atividade Trípica de <i>A. gemmatalis</i> .....                                                                           | 38 |
| 3.4 Análise do Efeito de KPE 0,15% na Atividade Trípica dos Homogenatos de <i>A. gemmatalis</i> em Gel de Poliacrilamida contendo Gelatina 0,1%..... | 39 |
| 3.5 Efeito dos extratos orgânicos no desenvolvimento de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentadas em folhas de soja IAC-19.....                       | 40 |
| 4. DISCUSSÃO.....                                                                                                                                    | 42 |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 5. CONCLUSÕES.....                 | 51 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 52 |

## LISTA DE FIGURAS

Página

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1-A- árvore; B- frutos e C- sementes de <i>Koelreuteria paniculata</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 02 |
| 2-Estágios de desenvolvimento de <i>A. gemmatilis</i> : A- larva; B- pupa e C- inseto adulto.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 04 |
| 3- Esquema geral de partição e separação provável dos principais metabólitos secundários presentes em plantas.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 17 |
| 4-Diagrama geral do intestino de inseto (adaptado de Terra & Ferreira,1994).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 22 |
| 5- Fluxograma geral de partição química líquido-líquido de sementes de <i>Koelreuteria paniculata</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 29 |
| 6- Variação no tamanho de <i>A. gemmatilis</i> após o término do bioensaio com KPE 0,15%. A- larva testemunha e B- larva KPE 0,15%.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 33 |
| 7- Dieta consumida por larvas de 4º instar de <i>A. gemmatilis</i> . A: folhas testemunha e B: folhas KPE 0,15%.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 36 |
| 8- Perfil da atividade enzimática em SDS-PAGE contendo gelatina 0,1% de homogenatos do intestino medido (IM) e fezes de <i>A. gemmatilis</i> após o término do bioensaio com KPE 0,15%. <b>1.</b> Homogenato IM testemunha; <b>2.</b> Homogenato IM KPE 0,15%; <b>3.</b> Homogenato IM testemunha com TLCK; <b>4.</b> Homogenato IM KPE 0,15% com TLCK; <b>5.</b> Homogenato Fezes testemunha; <b>6.</b> Homogenato Fezes KPE 0,15%; <b>7.</b> Homogenato Fezes testemunha com TLCK; <b>8.</b> Homogenato Fezes KPE 0,15% com TLCK..... | 40 |

## LISTA DE TABELAS

Página

|                                                                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1- Peso, duração e viabilidade (Médias $\pm$ SD) correspondentes à fase larval e pupal de <i>A. gemmatalis</i> no término do bioensaio com KPE 0,15%.....                                          | 32 |
| 2- Emergência, fecundidade e fertilidade (Médias $\pm$ SD) correspondente à fase adulta de <i>A. gemmatalis</i> no término do bioensaio com KPE 0,15%.....                                         | 34 |
| 3- Dieta consumida e resíduos de excreção (Médias $\pm$ SD) de <i>A. gemmatalis</i> no término do bioensaio com KPE 0,15%.....                                                                     | 35 |
| 4- Índices Nutricionais (Médias $\pm$ SD) relativos ao consumo e utilização do alimento por <i>A. gemmatalis</i> após o término do bioensaio com KPE 0,15%.....                                    | 37 |
| 5- Atividade Trípica (média $\pm$ SD) de homogenatos do intestino médio (IM) e fezes de <i>A. gemmatalis</i> após o término do bioensaio com KPE 0,15%. expressa em pMol BapNA/ $\mu$ g P/min..... | 38 |
| 6- Peso e viabilidade (Médias $\pm$ SD) correspondentes à fase larval de <i>A. gemmatalis</i> no término do bioensaio com os extratos orgânicos de <i>K paniculata</i> .....                       | 41 |



**RESUMO:** As plantas têm surgido como uma fonte de material alternativo no controle de insetos praga, pois possuem uma grande variedade de compostos químicos bioativos e são apropriadas para a utilização no manejo integrado de pragas. Portanto, muito esforço está sendo realizado na busca de plantas e seus compostos químicos com potencial inseticida e existe uma necessidade de pesticidas seguros, mas efetivos, biodegradáveis e sem toxicidade a organismo não alvos. Este trabalho descreve os efeitos fisiológicos do (KPE) extrato aquoso de sementes de *Koeleria paniculata* no desenvolvimento larval, fecundidade e fertilidade de *Anticarsia gemmatilis*. Nós estudamos o efeito bioquímico de KPE no sistema digestivo de larvas de 4º instar de *A. gemmatilis* para fornecer informações sobre a interação de inseticidas botânicos no desenvolvimento de insetos fitófagos e sua interação com enzimas digestivas para se investigar em detalhes o mecanismo de ação do mesmo. Bioensaios foram realizados com folhas de soja tratadas com KPE a 0,15% (g/mL). Os resultados indicam que KPE 0,15% afeta a fisiologia de *A. gemmatilis*, ocasionado um aumento significativo na mortalidade larval (68,3%), uma redução de 52,4% no peso larval, bem como na emergência (60%), fecundidade (49%) e fertilidade (48,4%) dos insetos adultos quando comparado ao tratamento testemunha. Para separar o efeito deterrente do efeito mediado pela toxicidade, o consumo e utilização do alimento foram sujeitos a análises nutricionais e foi observado que KPE 0,15% reduz o consumo de alimento (37%) mostrando um efeito deterrente e diminui tanto a eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) como a eficiência de conversão do alimento digerido (ECD) indicando uma atividade tóxica. Posteriormente, nós investigamos o modo de ação desta toxicidade do extrato por meio de ensaios enzimáticos e foi possível verificar que a atividade trípica do homogenato das fezes de *A. gemmatilis* foi significativamente maior em KPE 0,15%, que exibiu uma atividade trípica 46% maior do que o tratamento testemunha. A pequena atividade trípica das fezes dos insetos testemunha foi reflexo de níveis elevados desta variável no intestino médio, que exibiu 57,7% mais atividade do que as larvas tratadas com KPE 0,15%. Portanto, nós sugerimos que como toxina KPE está agindo no trato digestivo do inseto, interferindo com a digestão, afetando deste modo o mecanismo de reciclagem de enzimas do tipo tripsina.

Palavras chave: *Anticarsia gemmatilis*, *Koeleria paniculata*, Inseticidas Botânicos, Índices Nutricionais, Tripsina.

**ABSTRACT:** Plants have been suggested as alternative sources of materials for insect control because they contain a range of bioactive chemicals and are potentially suitable for use in integrated pest management. Due to that, much effort has been focused on plants or their constituents as potential sources of pest control and there is an urgent need for safe but effective, biodegradable pesticides with no toxic effects on non-target organisms. This work describes the physiological effects on larval development, fecundity and fertility of (KPE) aqueous extract from *Koelreuteria paniculata* seeds against the *Anticarsia gemmatilis*, we studied its biochemical effect on the digestive system of fourth instar larvae to prompt investigations of the interplay of enzymes and botanicals pesticides with plant breeding and biotechnology implications. Bioassays were carried out with soybean leaves treated with the aqueous extract at 0,15% (g/mL). The results indicate that KPE 0,15% affected the physiology of the velvetbean, causing a significant increase in the larval mortality (68,3%), a reduction in weight of 52,4%, as well in emergency (60%), fertility (48,4%) and fecundity (49%) of adults when compared with treatment control. To segregate antifeedant effects from toxicity-mediated effects, the consumption and utilization of food were subjected to nutritional analysis, and we observed that KPE 0,15% reduced the food consumption (37%) showed a antifeedant effect and decrease both Efficiency of conversion of ingested food (ECI) and Efficiency of conversion of digested food (ECD) indicating toxicity. Next, we investigate what is the extract's toxic mode-of-action assayed by enzymatic assays. We observed that proteinase activity of faecal homogenates of *A. gemmatilis* was significantly higher in KPE 0,15%, which exhibited significantly more mean trypsin-like activity (46%) than control. The lower faecal tryptic activity of insects in control was reflected in higher midgut levels of trypsin activity in control, which exhibited 57,7 % more activity than midgut larvae of KPE. Therefore, we suggest that as toxin KPE is acting on insect's intestinal tract, interfering with digestion, affecting this way the recycling mechanisms for trypsin.

Key words: *Anticarsia gemmatilis*, *Koelreuteria paniculata*, Botanic Insecticides, Nutritional Indices, Trypsin.

## 1. Introdução

### 1.1 Material Vegetal

*Koelreuteria paniculata* Laxm., conhecida popularmente como Flor-da-China, é uma espécie pertencente à família Sapindaceae. É uma planta decídua, capaz de se adaptar à secas, requer pouca água e apresenta um crescimento rápido, tolera solos com baixa fertilidade, calor e poluição. (Gilman & Watson, 1993).

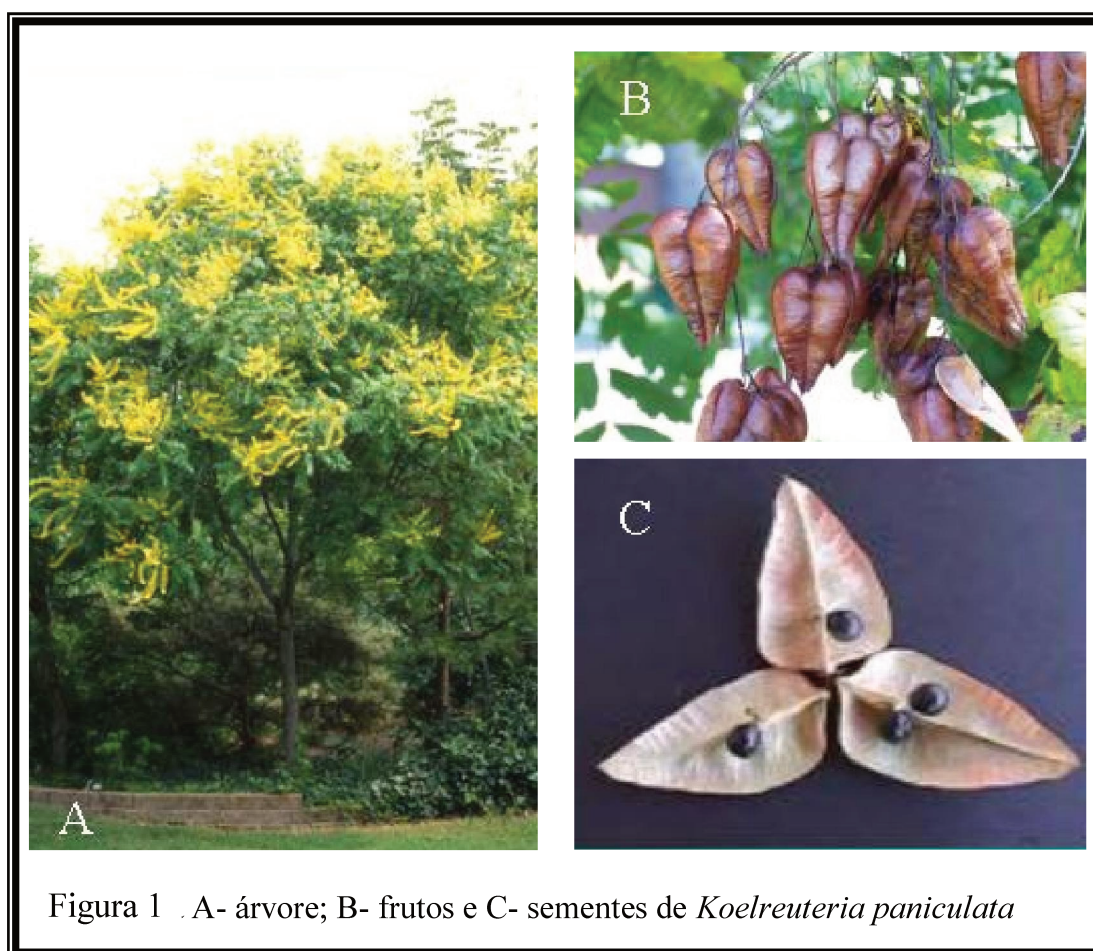
*K. paniculata* é de origem oriental, sendo encontrada em abundância nos países como China, Coreia e Japão. Por suas características de fácil adaptação, é amplamente empregada em vários países do mundo, inclusive no Brasil, como uma árvore ornamental urbana. A árvore pode atingir entre 6 a 12 metros de altura, apresenta folhas alternas bipinadas e sua madeira não é considerada muito resistente. Sua florescência normalmente se inicia em junho e prolonga-se até agosto. As vagens das sementes se assemelham à lanternas de coloração marrom-dourado. As sementes são pequenas, arredondadas, revestidas por uma casca de coloração marrom e são encontradas em número de seis por fruto (Figura 1). (Gilman & Watson, 1993). Neste trabalho foram utilizadas sementes de *K. paniculata*, coletadas na cidade de Campinas - São Paulo.

Estudos anteriores desenvolvidos no Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB), no Departamento de Ciências Naturais (DCN), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) identificaram e caracterizam uma lectina, proteína de defesa vegetal sintetizada naturalmente como um mecanismo de defesa, presente em sementes de *Koelreuteria paniculata*, denominada KpLec e observaram a sua atividade inseticida utilizando bioensaios com dieta artificial contra *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) e *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:Bruchidae) sendo possível observar a inibição do crescimento e redução da sobrevivência larval em ambas as espécies (Macedo et al., 2003).

Outro aspecto considerado refere-se a pesquisas onde compostos secundários como Saponina B e pseudo sesquiterpenóides foram isolados de sementes de *K. paniculata* (SUTIASHVILI, 2000; LIN et al., 2002).

Nesse sentido este trabalho foi desenvolvido, objetivando-se identificar as frações inseticidas presentes em KPE (Extrato aquoso de *Koelreuteria paniculata*), contra um inseto

praga desfolhadora de soja, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), uma vez que vários estudos recentes têm demonstrado que extratos vegetais pertencentes à família Sapindaceae possuem atividade biológica contra vários insetos praga (MEDEIROS & BOIÇA JÚNIOR 2005; ARRUDA et al. 2003; MEDEIROS et al. 2005; BOIÇA JUNIOR et al. 2005; PÉREZ & IANNAcone 2004; FERNANDES et al. 2005) e nenhum trabalho foi realizado no sentido de se analisar o efeito de extratos vegetais contra a lagarta da soja, principalmente relacionado a aspectos bioquímicos.



Fonte: (<http://www.floridata.com/ref/K/koel.p.cfm>)

## 1.2 Aspectos da biologia e controle de *Anticarsia gemmatalis*.

### 1.2.1 Ciclo de vida e descrição

As larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecidas como lagarta da soja, são consideradas pragas-chave da sojicultura, destaca-se como o principal inseto desfolheador sendo economicamente importantes em função das grandes perdas que ocasionam a esta lavoura (GALLO et al., 2002).

A lagarta da soja apresenta desenvolvimento do tipo holometábolo e sua ocorrência varia de novembro a março, atingindo picos populacionais a partir de janeiro (DIEHL & JUNQUETTI, 2002; SAVOLDI, 2002). O período larval pode durar até 25 dias, podendo ocorrer 6 instares. A lagarta pode atingir 48 mm de comprimento e sua coloração é variável, apresentando listras longitudinais verde escuras proeminentes e listras estreitas nas cores branca, amarela ou rosa. No estágio de pré-pupa que dura em média 2 dias às larvas encolhem atingindo um comprimento médio de 25 mm e adquirem cor marrom escura com poucas listras longitudinais. O estágio pupal dura em média 7 dias. As pupas podem apresentar cor verde ou marrom, são lisas e medem de 18 a 20 mm no comprimento e 4 a 6 mm na largura, são encontradas abaixo da superfície do solo a uma profundidade de aproximadamente 2 cm (BARBARA, 2003) (Figura 2).

Na fase adulta de *A. gemmatalis*, que dura em média 15 dias, a mariposa apresenta envergadura de 30 a 38 mm e coloração variando de cinza, marrom avermelhado ou amarelado sem dimorfismo sexual (Figura 2). A ovoposição ocorre na face inferior das folhas, podendo durar até 3 dias. Os ovos são arredondados e achatados na superfície inferior, medem de 1 a 2 mm no diâmetro e apresentam cor branca até a eclosão, após a qual adquirem coloração rosa. Como característico de insetos da família Noctuidae, os adultos de *A. gemmatalis* necessitam de um suplemento alimentar (WEI et al., 1998). A fonte primária de alimento para Lepidópteros adultos é o néctar floral.





Figura 2. Estágios de desenvolvimento  
adulto

*A. gemmatilis*: A - larva; B - pupa e C - inseto

Fonte: ([www.agroconnection.com.ar/S016A04701](http://www.agroconnection.com.ar/S016A04701.htm))htm).

### **1.2.2 Danos à cultura de soja.**

Os principais danos causados à cultura da soja ocorrem na fase larval de *A. gemmatilis*, quando as lagartas inicialmente raspam as folhas da soja e causam prejuízos consideráveis à medida que crescem. Larvas neonatas iniciam o consumo na epiderme inferior e mesófilo foliar até o final do segundo instar quando começam a esqueletizar a folha, restando somente as nervuras principais. Após o segundo instar as lagartas consomem tanto o limbo como as nervuras, podendo ocasionar 100% de desfolhamento até atingir o seu desenvolvimento máximo, para tornar-se pupa. Até completar o seu desenvolvimento larval, cada lagarta pode consumir em média 90 cm<sup>2</sup> de folhas, ou seja, o equivalente a 2,1 vezes a sua própria massa a cada 24h (GALLO et al., 2002).

### **1.2.3 Medidas de controle e Manejo.**

A cultura de soja esta sujeita, durante todo seu ciclo, ao ataque de diferentes espécies de insetos. Embora estes insetos tenham suas populações reduzidas por predadores, parasitóides e doenças, em níveis dependentes das condições ambientais e do manejo de pragas que se pratica, quando atingem populações elevadas, capazes de causar perdas significativas no rendimento da cultura, precisam ser controlados. Apesar dos danos a cultura de soja serem alarmantes em alguns casos, não se recomenda à aplicação preventiva de produtos químicos, pois além do grave problema da contaminação ambiental, a aplicação desnecessária eleva os custos de produção e contribui para o desequilíbrio populacional dos insetos (FUGI et al., 2005)

As estratégias utilizadas para o controle de *A. gemmatilis* devem ser feitas com base nos princípios do Manejo Integrado de Pragas (MIP). Consistem em tomada de decisões de controle com base no nível de ataque, no número e tamanho das larvas e no estágio de desenvolvimento da soja, informações essas obtidas em inspeções regulares na lavoura. As amostragens devem ser efetuadas com um pano-de-batida, de cor branca, preso em duas varas, com 1 metro de comprimento, o qual deve ser estendido entre duas fileiras de soja. As plantas das duas fileiras devem ser sacudidas fortemente sobre o mesmo, promovendo a queda dos insetos que deverão ser contados e controlados quando forem encontradas em média, 40 lagartas grandes (> 1,5 cm) por pano de batida, ou com menor número se a desfolha atingir 30% antes da floração, e 15% tão logo aparecem às primeiras flores (EMBRAPA SOJA 2004).



Diversas espécies de parasitóides atacam a lagarta da soja, dentre os quais se destaca *Winthemia rufopicta* (Díptera: Tachinidae) (DAIGLE et al., 1990) além de predadores generalistas como *Calosoma sayi*, *Calleida decora*, *Poecilus chalcites* (todos Coleoptera: Carabidae). Pássaros, sapos e roedores também atuam como inimigos naturais de *A. gemmatilis* (LEE et al., 1990). Vários patógenos, principalmente fungos, têm sido associados à lagarta da soja, dentre os quais se destacam: *Nomurea rileyi* e *Entomophthora* sp.

As estratégias utilizadas para o controle biológico consistem na regulação do número de vegetais e animais por seus inimigos naturais, sendo realizado através da utilização racional de patógenos, visando à manutenção da população de pragas a níveis abaixo dos níveis de dano econômico (ALVES, 1998). Dentre os métodos de controle biológico, destaca-se o uso de produtos à base de vírus, principalmente os baculovírus (MOSCARDI, & SOSA-GOMEZ, 1992), e o uso do *Bacillus thuringiensis* (GLASER & MATTEN, 2003). O Brasil possui o maior programa mundial de uso de baculovírus para o controle de insetos, implantado no início da década de 1980 pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), através do emprego do *Baculovirus anticarsia* para o controle da lagarta da soja (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

A utilização de variedades de soja com alguma resistência (FUGI et al., 2005) associada a práticas de Técnicas de Cultura, como a antecipação do plantio ou a utilização de espécies que amadurecem mais rapidamente, permitindo a maturação da planta antes que a população de insetos torne-se elevada (MCPHERSON & BONDARI, 1991) constituem ferramentas alternativas no controle da lagarta da soja.

Atualmente, vários esforços estão sendo realizados por pesquisadores no sentido de minimizar a utilização de produtos químicos no controle de insetos-praga aliado ao crescimento do interesse público em produtos mais saudáveis e em práticas econômicas ecologicamente compatíveis com o meio ambiente. Deste modo estão sendo estudadas formas alternativas de controle de pragas, dentre as quais se destaca a utilização de produtos de origem vegetal, os inseticidas naturais (SCHMUTTERER & SINGH 2002; SUTHERLAND 2002; HAN et al. 2006).

### **1.3 Inseticidas botânicos.**

Com um aumento na população mundial projetado em 10 bilhões de pessoas nas próximas quatro décadas, uma prioridade imediata para a agricultura mundial é alcançar a máxima produtividade em alimentos e outros produtos de uma maneira sustentável, voltada à preservação e conservação ambiental resultando na busca pelo setor produtivo de tecnologias para a implantação de sistemas de produção agrícola com enfoques ecológicos, rentáveis e socialmente justos. Perdas devidas ao ataque de insetos herbívoros, estimadas em 10-20%, são um fator significativo na limitação da produção agrícola (HAQ et al., 2004).

O controle de pragas resulta no aumento do custo de produção, trazendo problemas tanto para o produtor quanto para o consumidor e o ambiente. O mercado mundial de defensivos agrícolas chega a valores próximos de US\$ 1,8 bilhões, sendo os inseticidas e os acaricidas responsáveis por 30% do total. O custo para o desenvolvimento de inseticidas químicos é alto e tem aumentado ao longo dos anos, devido à necessidade de novas formulações mais adequadas às pragas, que se tornam mais resistentes ao seu uso, o que tem feito crescer o interesse pela pesquisa de inseticidas alternativos, como os bioinseticidas (MENEZES & LIMA, 2005).

Algumas plantas, ao longo de sua evolução, desenvolveram suas próprias defesas químicas contra os insetos herbívoros, sintetizando metabólitos secundários com propriedades inseticidas; isto é, com atividade tóxica contra os insetos ou que causem sua morte por outros modos de ação, ou mesmo sua repelência. Os inseticidas botânicos são produtos derivados dessas plantas ou partes das mesmas, podendo ser o próprio material vegetal, normalmente moído até ser reduzido a pó, ou seus produtos derivados por extração aquosa ou com solventes orgânicos, tais como álcool, éter, acetona, clorofórmio, etc. ou destilação (WIESBROOK, 2004).

Desde a década de 60, com a chamada Revolução Verde, os sistemas de produção agrícola caracterizam-se pelas monoculturas extensivas, e, portanto, com baixo nível de diversidade biológica e alto aporte de insumos externos, especialmente os fertilizantes químicos sintéticos e os agrotóxicos. Apesar da utilização desses inseticidas sintéticos ter contribuído para um incremento significativo na produção de alimentos (FLINT & VAN DEN BOSCH, 1981), a falta de conhecimento ou acompanhamento técnico sobre o seu manuseio adequado, com conseqüente aumento no número de pulverizações, doses acima das

recomendadas e não obedecendo ao período de carência, tem contribuído para proporcionar efeitos maléficos sobre o meio ambiente e ao próprio homem, tais como o ressurgimento das pragas-alvo, o surgimento de pragas secundárias em função dos efeitos tóxicos sobre os inimigos naturais dessas pragas, desenvolvimento de resistências das pragas a esses produtos, intoxicação dos produtores rurais, contaminação da água e do solo, impactos negativos sobre os organismos não-alvo e presença de resíduos tóxicos nos alimentos (VAN DEN BOSCH, 1978; FLINT & VAN DEN BOSCH, 1981). Outro aspecto não menos importante é a dependência econômica que esses insumos externos trazem para o país e para os produtores rurais, gerando perdas de divisas, descapitalização dos produtores e afetando a auto-sustentabilidade.

Os bioinseticidas apresentam custo menor que os inseticidas químicos e maior tempo de vida útil dado à dificuldade da praga se tornar resistente ao seu uso, além de serem mais específicos e menos poluentes. Porém, em contrapartida exigem estudos mais aprofundados, tanto no isolamento de novos compostos como nos testes de seleção, produção e formulação.

Na primeira metade do século 20, o Brasil foi um grande produtor e exportador de inseticidas botânicos, como piretro, rotenona e nicotina, que apresentam maior segurança em seu uso agrícola e de menor impacto ambiental. Os inseticidas botânicos foram muito populares e importantes entre as décadas de 30 e 40 para o controle de pragas. A importação de materiais botânicos ou derivados para uso como inseticidas representou um empreendimento comercial considerável.

Quando se adotou o pacote tecnológico da Revolução Verde (KATHRINA & ANTONIO, 2004) o volume de agrotóxicos usados no mundo chegou a ultrapassar 20.000 toneladas de ingredientes ativos na década de 90. Isto reflete a extensão pela qual os inseticidas botânicos foram substituídos pelos inseticidas químicos sintéticos, dentre eles, os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, produzidos pelos países industrializados nas décadas de 50 e 60.

Afortunadamente, o interesse em desenvolver e usar produtos botânicos para o manejo de pragas está novamente aumentando nos últimos anos, estimando-se um crescimento anual na ordem de 10 a 15% (ISMAN, 1997). Vários países utilizam bioinseticidas para o controle de pragas da lavoura, sendo que esses agentes, atualmente representam mais de 2% do mercado de inseticida do mundo (MENEZES & LIMA, 2005).

Esse interesse vem ao encontro da necessidade de buscar métodos alternativos de menor impacto ou riscos à saúde humana e ao meio ambiente, bem como pela crescente demanda por produtos alimentícios saudáveis e isentos de resíduos de agrotóxicos. São inúmeras as plantas possuidoras de poderes inseticidas, que deveriam não apenas ser estudadas em profundidade como também introduzidas nas propriedades agrícolas como fonte alternativa no controle de pragas, especialmente em sistemas orgânicos de produção. Hoje existe um mercado promissor para os bioinseticidas e inseticidas naturais. A produção de compostos químicos naturais representa 7,5% do mercado de produtos químicos, farmacêuticos, veterinários e de proteção de plantas. (MENEZES & LIMA, 2005)

De um modo geral, podem ser reconhecidas duas abordagens quanto à utilização de plantas e substâncias com atividades sobre os insetos. Na primeira delas, a atividade é reconhecida, os compostos são isolados, identificados e posteriormente sintetizados em larga escala. Nesse processo há a possibilidade de alterações químicas de forma a acentuar os efeitos desejados ou diminuir a toxicidade, quando houver. No segundo caso, uma vez identificada a atividade inseticida em alguma espécie vegetal, sua utilização se dá na forma de extrato vegetal bruto. A escolha da melhor abordagem está relacionada à complexidade das estruturas químicas das substâncias envolvidas que viabilizará sua síntese ou não, bem como a considerações de ordem econômica e tecnológica.

Outro aspecto importante é que com a seleção de compostos passíveis de serem elaborados a partir de extrações simplificadas (alcoólica ou aquosa) realizadas no próprio local, isto é, na propriedade rural, haverá economia de recursos para o pequeno produtor, reduzindo sua dependência da aquisição de fórmulas industrializadas, que oneram os custos e a produção.

#### **1.4 Substâncias químicas secundárias das plantas: aspectos co-evolutivos com insetos-herbívoros e um mecanismo de defesa aplicável à agricultura na forma de extratos aquosos e orgânicos.**

O estudo da co-evolução-evolução recíproca em espécies que interagem entre si dirigidas pela seleção natural- especificamente insetos fitófagos e plantas foi um dos primeiros pontos a serem abordados em estudos co-evolucionários nos últimos anos.

O foco de várias pesquisas recentes no campo da biologia envolve o conceito da interação entre plantas e seus insetos herbívoros de uma maneira multidisciplinar, uma vez que

os avanços mais significativos neste campo resultam da combinação aplicada de pesquisadores na área de ecologia com as modernas ferramentas e modelos moleculares (PICHERSKY & GANG., 2000). Há um interesse crescente para se estudar os caminhos pelos quais as plantas têm influenciado ou se ajustado à evolução de insetos em relação aos processos de adaptação e seleção. Em adição, estas relações podem ser vistas através de uma perspectiva oposta: como os insetos herbívoros se ajustaram com a evolução das plantas?

A associação entre plantas e insetos nos leva ao tempo de suas origens evolucionárias. Insetos alados estão entre os primeiros colonizadores da Terra à aproximadamente 320 a 250 milhões de anos atrás durante o período Carbonífero da era Paleozóica, quando as gimnospermas primitivas já haviam se estabelecido na ambiente terrestre. Cinco ordens de insetos que se originaram no período Permiano (280 a 240 milhões de anos atrás) e têm muitas espécies sobreviventes que são ainda especializados nas plantas chamadas de primitivas.

Um dos mais importantes eventos da evolução dos insetos foi à origem das Angiospermas, plantas que produzem sementes abrigadas no interior dos frutos (WEIS & BERENBAUM, 1986).

Essas plantas evoluíram no período Cretáceo (110 milhões de anos atrás), quando os dinossauros atingiram seu apogeu. Novas famílias de insetos inteiramente fitófagos surgem nessa época, incluindo as dos pulgões (Hemiptera: Aphididae) e das vespas cecidógenas (formadoras de galhas) (Hymenoptera: Cynipidae). Em adição, outras ordens surgem como quase que exclusivamente fitófagas, tal como a ordem Lepidoptera, cujos adultos (mariposas e borboletas) e lagartas contam exclusivamente com as plantas para sua sobrevivência, isto é, as mariposas e borboletas coletam pólen e néctar e as lagartas são conhecidas por alimentarem-se em várias partes da planta (EDWARDS & WRATTEN, 1981; WEIS & BERENBAUM, 1986; PRICE, 1997).

Deste modo, plantas, que não podem se locomover, fugir ou lutar e freqüentemente possuem um longo período de geração e taxas pequenas de recombinação, parecem estar em desvantagem quando comparadas aos herbívoros que as consomem. Já os insetos, podem adaptar-se rapidamente a mudanças ambientais e outros fatores, em função de seu pequeno tamanho e concomitantemente um período curto de geração, combinado a uma elevada capacidade reprodutiva. Além disso, eles possuem a capacidade de se dispersarem e invadirem

fontes potenciais de alimentos até mesmo a uma distância considerável do lugar de origem do mesmo.

Diferentes grupos de insetos têm desenvolvido através de um longo período de co-evolução e co-adaptação com suas plantas hospedeiras diferentes padrões de associação com plantas hospedeiras acoplados a estratégias diferenciais de ciclo de vida e mecanismos alimentares necessários para a exploração da planta.

Uma das razões pelas quais as interações entre planta e inseto têm recebido mais atenção de pesquisadores é o fator quantitativo, visto que ocorrem aproximadamente 308.000 espécies de plantas terrestres conhecidas no mundo, o que consiste em 22% de todas as espécies do reino Animal e Vegetal. Insetos herbívoros são responsáveis por cerca de 360.000 espécies, ou seja, 26% de todas as espécies. A maioria desses insetos se distribui entre oito das 29 ordens de insetos atualmente conhecidas, a saber: Orthoptera (grilos, gafanhotos, paquinhos etc.), Phasmatodea (bicho-pau), Thysanoptera (tripes), Hemiptera (percevejos, pulgão, cochonilha etc.), Coleoptera (besouros), Diptera (moscas, mosquitos e simuliídeos), Lepidoptera (mariposas e borboletas) e Hymenoptera (vespas, abelhas, formigas etc.) (EDWARDS & WRATTEN, 1981; PRICE, 1997).

Outro aspecto é o estudo, caracterização, isolamento de substância vegetais que possuem atividade inseticida, farmacológica, entre outras procurando aproveitar a enorme diversidade de compostos produzidos pelas plantas. Embora a estrutura de aproximadamente 50.000 compostos tenha sido elucidada, provavelmente há centenas de milhares de tais substâncias dentre as quais poucas fazem parte do metabolismo primário (DE LUCA & PIERRE, 2000). O restante destas substâncias é denominado de compostos secundários (CS). Estima-se que o genoma de plantas possua cerca de 20.000-60.000 genes, e talvez 15-25% destes genes codificam enzimas do metabolismo secundário (SOMERVILLE & SOMERVILLE, 1999).

Compostos secundários podem estar na planta no estado ativo ou em estado latente, que se torna ativo após injúria por herbivoria e/ou patógenos (WINK 2003). Há mais de cem anos Ernst Stahl têm evidenciado experimentalmente que CS atuam como defesa contra herbívoros (STAHL, 1888). Uma grande variedade de evidências experimentais suportam a idéia de que muitos alcalóides, glicosídeos cianogênicos, terpenos, saponinas e taninos são substâncias aleloquímicas.. Eles representam traços adaptativos que tem se diversificado



durante a evolução por meio da seleção natural no sentido de proteger contra o ataque de bactérias, fungos, vírus, plantas competidoras e insetos herbívoros (WINK, 2003).

Por outro lado, as plantas necessitam de animais para a polinização ou dispersores de sementes. Neste caso, CS podem servir como atrativos, sinais (monoterpenos com aroma, antocianinas coloridas ou carotenóides em flores) e como recompensa a estes animais a planta provê alimento. No entanto, em várias situações atividades atrativas e de defesa são exercidas pelos mesmos CS: antocianinas e monoterpenos podem atuar como atrativos nas flores, mas são inseticidas e antimicrobianos (WINK, 2003).

O acervo bibliográfico a respeito de plantas inseticidas praticamente ficou estacionado desde os anos 40, época em que era bastante desenvolvido o comércio e a pesquisa da rotenona e de outras plantas com propriedades inseticidas. Vários pesquisadores e institutos vêm trabalhando para desenvolver fórmulas e métodos que permitam a utilização crescente dos inseticidas de origem vegetal. O botânico Salen Ahmed coordenou um projeto pelo qual catalogou e iniciou o estudo sistemático de mais de duas mil plantas com atividade inseticida contra diversas espécies de insetos (NEVES et al., 2003). As plantas inseticidas mais promissoras encontram-se nas famílias Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Annonaceae, Labiatae e Canellaceae (ESCALONA et al., 2001; FERNANDES et al., 2005).

No passado, o mercado de inseticidas botânicos era dominado por dois compostos orgânicos: as piretrinas e a rotenona. As piretrinas naturais, derivadas de *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. (Asteraceae), sempre mantiveram um mercado estável, embora pequeno. A rotenona, derivada de *Derris* spp. e *Lonchocarpus* spp. (Leguminosae, Fabaceae), tem sido utilizada para controle de insetos em pequena escala. Outros inseticidas botânicos usados em pequena escala são os alcalóides, como a nicotina de *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae), quassin de *Quassia amara* L. (Simaroubaceae), rianodina de *Ryania speciosa* Vahl (Flacourtiaceae) e sabadila de *Schoenocaulon officinale* (Schltdl. & Cham.) (Liliaceae) (ISMAN, 1997; VENDRAMIM & CASTIGLIONI, 2000; KATHRINA & ANTONIO, 2004; WIESBROOK, 2004).

Nesse sentido, a família Meliácea tem se destacado por possuir espécies com alta atividade biológica sobre diversos insetos. Dentre estas, destaca-se a *Azadirachta indica*, conhecida como nim e *Melia azedarach*, comumente denominada de cinamomo ou pára-raios, sendo a primeira considerada uma das mais eficientes plantas inseticidas já estudadas. (NEVES

et al., 2003; BOEKE et al., 2004). No que se refere a sua atividade inseticida estudos revelaram que nim e seus derivados chegam a afetar mais de 200 espécies de insetos pertencentes às ordens Coleoptera, Deptera, Heteroptera, Homoptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Orthoptera, Thysanoptera, Neuroptera e alguns fungos (SAXENA, 1989). Entretanto, a complexidade da molécula de azadiractina, o limonóide mais inseticida de nim, é muito complexa impedindo sua síntese purificada em escala comercial.

Desse modo, justifica-se a pesquisa de outras espécies vegetais em substituição do nim. Além das plantas mencionadas, vários pesquisadores têm isolado limonóides de diferentes espécies do gênero *Trichilia* e demonstrando a atividade desses compostos contra insetos, incluindo efeito fagodeterrente e regulador de crescimento (RAMIREZ et al., 2000; SIMMONDS et al., 2001).

Vários estudos estão sendo realizados nesse sentido, com destaque a *Trichilia pallida* e *Melia azedarach*, na forma de extrato aquoso comparando o efeito de diversas estruturas da planta para *Spodoptera frugiperda* (BORGONI, 2003) e *Tuta absoluta* (THOMAZINI et al., 2000; BRUNHEROTTO & VENDRAMIM, 2001). A eficiência de extratos aquosos de seis espécies de *Trichilia*, em comparação com o extrato aquoso de nim sobre *S. frugiperda* foi avaliada por BORGONI (2003).

ROEL et al. (2000a) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de extratos orgânicos de folhas e ramos de *T. pallida* na sobrevivência larval de *S. frugiperda*. GONÇALES-GERVÁSIO (2003) avaliou a atividade de extratos aquosos e orgânicos de folhas de *T. pallida* e aquoso de sementes de nim sobre a traça-do-tomateiro.

Pesquisas atuais têm demonstrado que extratos de plantas da família Sapindaceae afetam a fisiologia e metabolismo de um número considerável de insetos praga (MEDEIROS & BOIÇA JÚNIOR 2005; ARRUDA et al., 2003; MEDEIROS et al., 2005; BOIÇA JUNIOR et al., 2005; PÉREZ & IANNACONE 2004; FERNADES et al., 2005).

### **1.5 Estratégias para obtenção de compostos inseticidas vegetais.**

O processo envolvido na busca de substâncias vegetais com atividade inseticida constitui-se de várias etapas, podendo, segundo MATOS (1988), ser classificadas da seguinte maneira: 1- escolha da planta a ser estudada; 2- identificação botânica; 3- avaliação prévia da composição química; 4- isolamento e purificação dos compostos inseticidas e 5-

esclarecimento da estrutura molecular dos compostos puros e isolados, isto é, a determinação estrutural.

Quando se procura obter substâncias ativas em plantas, um dos principais aspectos que deve ser observado consiste nas informações da medicina popular, é importante neste sentido a análise de dados botânico-taxnômicos e químico-taxonômicos visto que durante o processo de evolução das plantas várias modificações filogenéticas ocorreram possibilitando desta forma a determinação de compostos químicos entre espécies correlacionadas.

Visando orientar pesquisadores a respeito dos pontos básicos no processo de extração de substância naturais, FERRI (1996) fez uma revisão sobre a metodologia empregada na obtenção de compostos vegetais. Os cuidados devem se iniciar na coleta do material. Segundo o autor o material vegetal deve ser identificado por um taxonomista e mantido sua identidade botânica em função do local de coleta. Exsicatas devem ser depositadas em herbário a fim de evitar possíveis dúvidas a cerca da origem correta das substâncias isoladas e identificadas (HOSTETTEMANN, et al 2003a). O material vegetal deve ser limpo e se possível imerso em álcool etílico em ebulição, logo após a coleta, prevenindo oxidações e hidrólise enzimática ou dependendo do material pode-se fazer a secagem imediata do mesmo a sombra e em local arejado ou em estufa, entre 40° e 60 °C.

A escolha por um determinado método de extração para a obtenção do extrato bruto vai depender da textura e do conteúdo de água presente, bem como tipo de substância que se deseja isolar. O procedimento básico para a obtenção de extratos orgânicos de material vegetal seco e triturado é a extração por solventes de crescente polaridade, sendo os principais, o hexano, clorofórmio e etanol ou metanol. Com uma extração inicial que utiliza solventes de baixa polaridade obtêm-se compostos mais lipofílicos, de outra forma, com solventes mais alcoólicos obtêm-se um amplo espectro de material polar e apolar. Entretanto, é importante ressaltar que o processo de extração a frio por percolação, apesar de requerer mais solvente, apresenta menor risco de reações químicas (FERRI, 1996).

É comum numa extração de compostos vegetais serem obtidos três extratos, utilizando-se como principais solventes: hexano, clorofórmio ou éter (para compostos mais apolares) etanol ou metanol (para compostos mais polares). Algumas vezes se obtém um extrato alcoólico exaustivo (etanol 95%) que, após a evaporação do solvente, é submetido à extração com os solventes apolares, mas quando se pretende retirar inicialmente os lipídeos

inicia-se a extração com um solvente apolar, passando para um polar (FERRI, 1996). A figura 3 ilustra os procedimentos descritos e indica as prováveis classes de compostos separados.

Nesse sentido, a avaliação prévia da constituição química, além de facilitar a escolha do material a ser estudado, permite melhor adaptação das técnicas de fracionamento de extratos e isolamento e caracterização química de substâncias puras, de acordo com a natureza dos constituintes previamente detectados, facilitando assim o subsequente trabalho de purificação e isolamento do material de interesse.

Após a obtenção do extrato orgânico outro problema deve ser solucionado para sua utilização em bioensaios com insetos. Quando o extrato for misturado a dietas artificiais, ele deve ser dissolvido em água ou solvente para facilitar a homogeneização da mistura. É importante que na utilização de um solvente orgânico, seja aguardada a evaporação antes de a dieta ser oferecida ao inseto. Por outro lado, quando se deseja fazer aplicação tópica, foliar ou líquida no solo, o resíduo precisa ser diluído em água ou um solvente que não seja tóxico a planta e ao inseto.

A diluição é mais fácil quanto maior a afinidade química do solvente com a água. Extratos etanólicos, metanólicos ou hidroalcólicos podem ser dissolvidos diretamente na água (HAMMAD et al., 2000). Extratos mais apolares têm maior dificuldade de se diluído diretamente na água e nesse caso, faz-se uma diluição com um solvente semelhante a ambos para se fazer uma aproximação do extrato com a água, facilitando a diluição. Numa pesquisa que são comparados extratos orgânicos de diferentes polaridades, é importante que se use apenas um solvente preliminar para todos os extratos o que possibilita o uso de apenas um tratamento como testemunha (água mais solvente preliminar).

Em geral, extratos altamente apolares ou altamente polares têm menor bioatividade em comparação com extratos de polaridade intermediária (etanólicos, acetônicos e hidroalcólicos). (CUBILLO et al, 1999; ROEL et al 2000a, 2000b.). Considerando que solventes de polaridade intermediária podem extrair compostos bioativos mais eficientemente, alguns autores já testam extratos botânicos com solventes nessa especificação, dispensando extratos apolares (GÓMES et al., 1997B; CUBILLO et al., 1999).

A análise de substâncias ativas é muito mais complexa e longa, já que geralmente os compostos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos. Deste modo, torna-se indispensável à análise da potência das frações e das

substâncias puras em relação à sua concentração. Esta avaliação permite predizer se o principal componente químico responsável pela atividade biológica foi realmente determinado.

A separação e caracterização dos constituintes químicos de interesse, a partir de um extrato de planta, são feitas através de diversas técnicas cromatográficas. Dentre as disponíveis estão a cromatografia em camada delgada (CCD), caracterizada pela versatilidade, rapidez de desenvolvimento e sensibilidade; CCD centrífuga; cromatografia em coluna, a qual pela sua simplicidade de operação é universalmente utilizada; cromatografia líquida (CL) preparativa sob pressão e cromatografia de partição centrífuga (FERRI, 1996; HOSTETTMANN, et al., 2003b).

Além das diversas técnicas de cromatografias citadas, também estão disponíveis técnicas acopladas, as quais permitem a economia de tempo, evitando o isolamento de compostos já conhecidos e que podem ser utilizadas antes do procedimento de fracionamento do extrato. As técnicas são CL/UV (ultravioleta), que é o emprego da cromatografia líquida juntamente com um detector de UV; CL/ES (espectrometria de massas), a qual se caracteriza pela grande sensibilidade; CL/RMN (ressonância magnética nuclear) que é a técnica capaz de complementar as anteriores, proporcionando informações adicionais para a completa identificação de uma nova substância (HOSTETTMANN, et al., 2003c). Uma ferramenta que seria importante para a identificação rápida e eficiente de misturas, consiste no uso de cromatografia gasosa ou cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa, onde grande parte dos componentes de uma mistura pode ser identificada e quantificada (BONATO, 1988).

Uma vez isolados os compostos ativos, deve-se proceder à elucidação estrutural dos mesmos. Para isso, faz-se necessário o uso de vários métodos, isolados ou, em geral, acoplados e da interpretação de espectros obtidos principalmente em espectrômetros de UV; IV (infravermelho); (EM); (RMN) que pode ser de próton ou de carbono (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) (Ferri, 1996).

Entretanto, a necessidade de se chegar aos compostos puros responsáveis pelos efeitos biológicos apresentados pelos extratos, leva a uma obrigatória integração multidisciplinar, cujo elo pode levar à obtenção de substâncias naturais ou sintéticas de grande interesse inseticida no combate a pragas da agricultura.

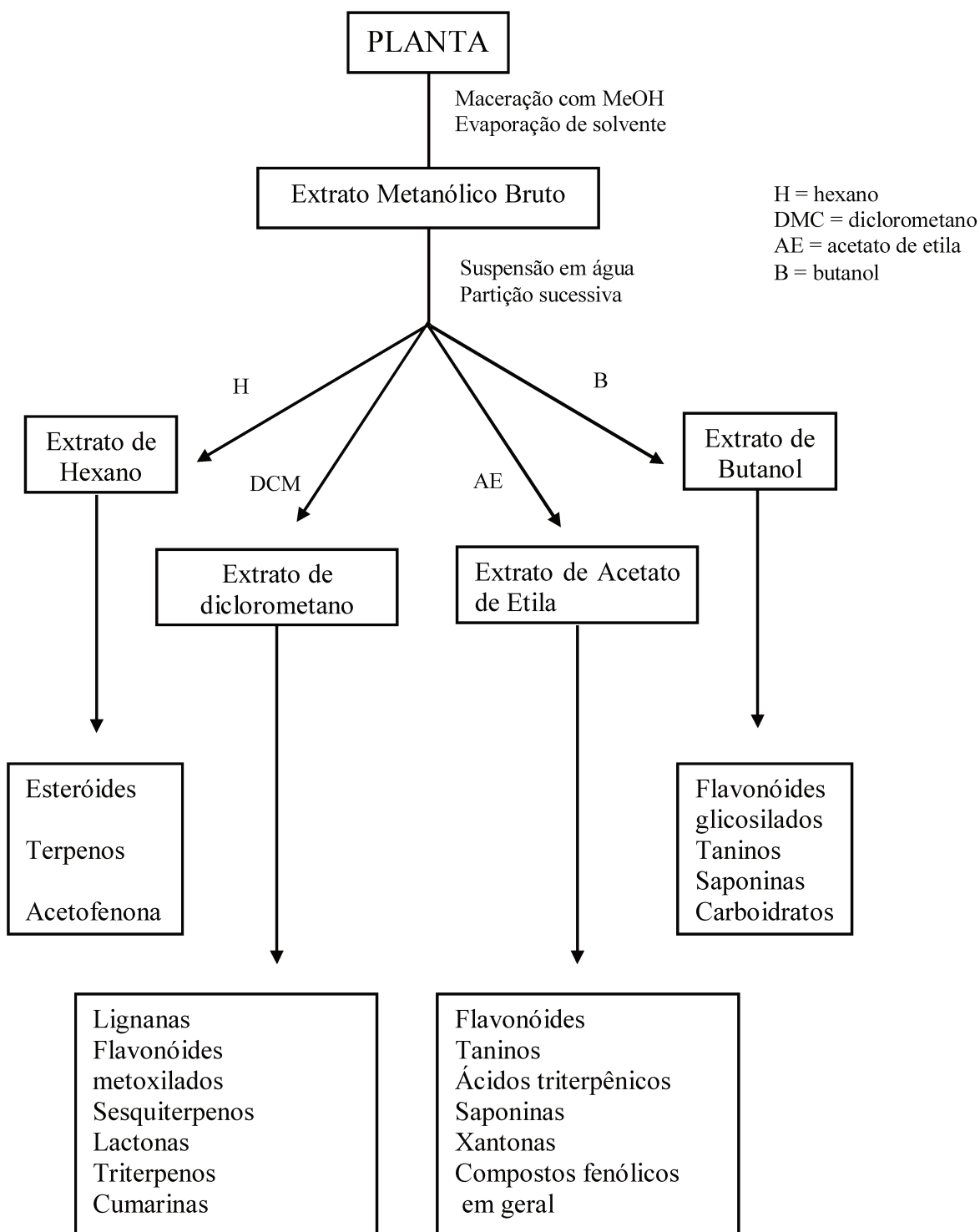


Figura 3. Esquema geral de partição e separação provável dos principais metabólitos secundários presentes em plantas (Adaptado de Cechinel Filho, 1998).

### **1.6 Ecologia Nutricional de Insetos: aspectos enzimáticos da digestão.**

O estudo dos insetos sob a ótica da ecologia nutricional envolve a integração do conhecimento bioquímico, fisiológico e comportamental dentro do contexto ecológico e evolucionário (PARRA, 1991). Acredita-se que a manipulação da nutrição dos insetos num sentido amplo, incluindo aspectos comportamentais e metabólicos, possui grande potencial de aplicação em sistemas de manejo de pragas (LONN, 2005). Para se entender os mecanismos que governam as relações tróficas entre os organismos, medidas quantitativas do consumo e utilização do alimento são indispensáveis (SOUTHWOOD & HENDERSON, 2000).

A quantificação da eficiência de utilização do alimento em insetos foi formalizado por WALDBAUER (1968) que propôs um número de índices derivados de determinações gravimétricas da biomassa do inseto, alimento consumido e excretas produzidas que vem sendo empregado até os dias atuais.

As interações entre insetos e plantas compreendem um importante fluxo de matéria e energia do maior grupo de seres autotróficos para o maior grupo de seres heterotróficos (SCHOONHOVEN et al. 1998). O termo ecologia nutricional enfatiza a importância de fatores nutricionais no entendimento de estratégias comportamentais de insetos herbívoros, na otimização da aquisição, utilização e alocação de nutrientes (LONN, 2005).

Publicações neste campo de pesquisa durante 1992-2003 aumentaram três vezes comparado aos números de 1982-1991 (LONN, 2005).

Os insetos têm como exigências nutricionais básicas aminoácidos, vitaminas e sais minerais (nutrientes essenciais) e carboidratos, lipídeos e esteróides (nutrientes não essenciais), os quais devem ser adequadamente balanceados, especialmente na relação proteína/carboidratos. O consumo e a utilização de alimento constituem condição básica para o crescimento, desenvolvimento e reprodução do inseto. Desta forma, a quantidade e a qualidade do alimento consumido durante a fase larval afetam a taxa de crescimento, o tempo de desenvolvimento, peso do corpo, sobrevivência, bem como influenciam a fecundidade, longevidade, movimentação e capacidade de competição de adultos.

Talvez um fator significativo do sucesso dos insetos na representatividade de espécies no mundo seja a habilidade destes em explorar uma extensiva gama de material orgânico em sua nutrição. Estes materiais estendem-se de pedaços de madeiras, húmus, lã e cera aos microorganismos mais digestivos, tecidos e animais de plantas e finalmente dietas como seiva



de planta ou sangue. A capacidade digestiva depende das enzimas presentes e como elas estão compartimentalizadas no intestino do inseto.

Adicionalmente a habilidade de digestão dos insetos de vários tipos de materiais, os mesmos têm explorado recursos alimentares não disponíveis para outros animais por serem tóxicos. Algumas espécies de insetos fitófagos têm evitado o efeito de inibidores de proteinases e de compostos secundários das plantas que se tornam tóxicos depois da ação de enzimas digestivas (HARBONE,1993). Assim os insetos se expandiram em nichos ecológicos inexplorados por outros organismos e isto oferece uma oportunidade única para enzimologistas estudarem a fisiologia digestiva dos organismos associados com uma gama de dieta mais ampla.

A digestão é realizada por uma série de enzimas que atuam em seqüência e vão reduzindo os polímeros presentes no alimento (principalmente amido e proteínas) a fragmentos de tamanho cada vez menor. As enzimas que atuam primeiro sobre os polímeros são denominadas de enzimas de digestão inicial, ou polímero-hidrolase. Dentre essas, encontra-se a amilase, que quebra o amido, principal carboidrato dos alimentos e a tripsina (peptidase), enzima que quebra proteínas sendo a mais difundida no reino animal (TERRA & FERREIRA, 1994).

O desempenho de cada estágio da vida do inseto depende basicamente do sucesso obtido em fases anteriores em sintetizar e acumular substâncias nutricionais em quantidades apropriadas (PARRA, 1991).

As proteases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas. Elas podem ser divididas em três grandes grupos: as proteinases, que clivam ligações peptídicas internas em proteínas; as peptidases, que atacam seqüencialmente sobre as ligações de oligopeptídeos a partir do resíduo N-terminal (aminopeptidases) ou C-terminal (carboxipeptidases) e as dipeptidases que hidrolisam dipeptídeos.

As proteinases: são subdivididas em subclasses de acordo com os mecanismos catalíticos, comparando os sítios ativos e estrutura tridimensional das proteínas. Estas subclasses são: serino-proteinases, apresentam uma serina e uma histidina no sítio ativo; cisteíno-proteinases, possuem uma cisteína no sítio ativo e são inibidas por componentes de mercúrio; aspártico-proteinases, tem um pH ótimo em torno de 5, devido ao enovelamento de

um resíduo carboxil na catálise e metaloproteinases, necessitam de um íon de metal no processo catalítico.

As glicosidases: são classificadas de acordo com a especificidade do substrato, mas distinguem-se em duas categorias amplas. Uma inclui a das depolimerases, isto é, enzimas que clivam ligações internas de polissacarídeos, e estas são nomeadas por seus substratos, exemplificados por amilase, celulase, pectinase e quitinase. A segunda categoria inclui enzimas de hidrólise de oligossacarídeos e dissacarídeos.

A maior parte dos insetos da ordem Lepidoptera possui proteinases do tipo serínicas, tais como enzimas do tipo tripsina e quimiotripsina, para a proteólise das enzimas digeridas (Bown et al., 2004).

### **1.7 Morfofisiologia da digestão de insetos**

De acordo com a figura 4, que apresenta um diagrama geral do canal alimentar proposto por TERRA & FERREIRA (1994), o Intestino Anterior (IA) é constituído pela boca onde encontramos as glândulas salivares quando presentes em sua cavidade; faringe; esôfago e o papo. O proventrículo é um órgão de trituração em alguns insetos e em muitos deles, atua como uma válvula que controla a entrada do alimento na porção do intestino médio, principal local da digestão e absorção de nutrientes.

O Intestino Médio (IM) consiste de um tubo simples (ventrículo) que pode sofrer ramificações, dando origem ao ceco gástrico. Na maioria dos insetos, o IM é revestido por uma estrutura quitinosa, a membrana peritrófica, que separa o conteúdo luminal em dois compartimentos o espaço endoperitrófico e o espaço ectoperitrófico. Na região do esfíncter, separando o IM do posterior, os órgãos de excreção que se ramificam lateralmente são os túbulos de Malpighi. O Intestino Posterior (IP) inclui o íleo e o reto, envolvido na absorção de água e íons, terminando no ânus.

A membrana peritrófica é um finíssimo envelope membranoso que cobre o bolo alimentar no intestino dos membros da maioria dos filos animais, incluindo o dos insetos. Ela está organizada num arranjo de quitina (4-13%) em uma matriz de proteína (21-51%) e carboidrato (RICHARDS & RICHARDS, 1997). Poucas ordens não possuem esta membrana e muitas vezes, sua presença está associada com a idade do inseto como nos Siphonoptera, onde sua ocorrência é apenas no estágio larval (PETERS, 1992). Nos coleópteros da família

Bruchidae, não existe uma membrana peritrófica bem definida. Acredita-se que esta família apresente estruturas quitinosas (FIRMINO et al. 1996). Nos lepidópteros a membrana peritrófica é do tipo I, ou seja, formada pelo intestino médio, ou por parte dele (região posterior ou anterior). Durante a formação da membrana do tipo I, precursores de quitina são secretados pelas células do IM, sendo depois organizados em forma de fibras intercaladas por moléculas de proteínas (TELLMAM et al., 1999). As principais funções atribuídas a esta estrutura são: proteção mecânica contra injúrias as células do IM; barreira física contra microorganismos; barreira de seletividade para enzimas digestivas e produtos da digestão; e atuação no mecanismo de conservação das enzimas digestivas (TERRA, 2001.).

Segundo TERRA & FERREIRA (1994), vários estudos vêm sendo realizados na ânsia de determinar os valores de pH nas diferentes regiões da estrutura digestiva, confirmando a relação entre o pH ótimo da enzima e pH do lúmen de insetos, pois as variações de pH afetam a atividade das enzimas digestivas.

A compartimentalização das enzimas é outra propriedade importante. Aquelas envolvidas na digestão inicial são encontradas no espaço endoperitrófico, o qual é envolvido pela membrana peritrófica, cuja capacidade em compartimentalizar as enzimas digestivas depende de sua permeabilidade (TERRA & FERREIRA, 1994).

Portanto, a integridade desta membrana quando afetada pode interferir no processo de digestão e absorção de nutrientes e, conseqüentemente, causar danos no desenvolvimento do inseto (HABIB et al., 2000; PAES et al., 2000)

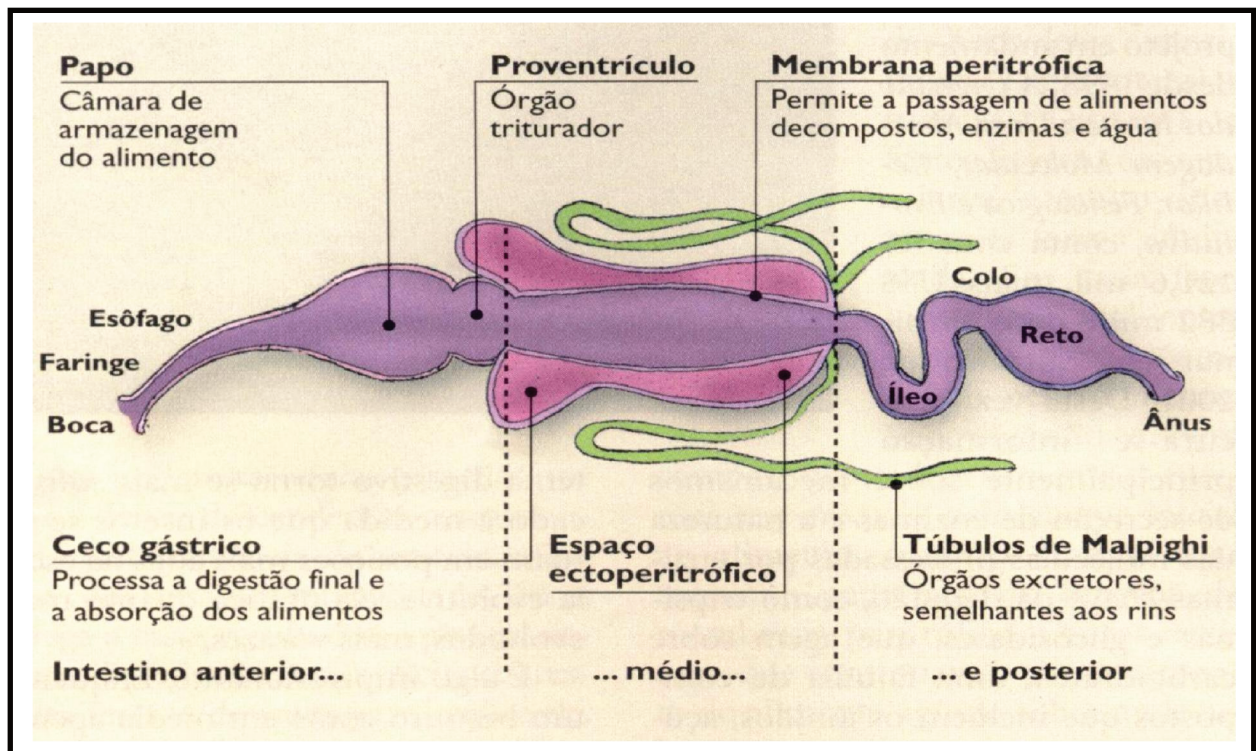


Figura 4. Diagrama geral do intestino de inseto (adaptado de Terra & Ferreira, 1994).

## 1.8 Objetivos

- ◆ Analisar os efeitos biológicos no desenvolvimento larval, fecundidade e fertilidade do extrato aquoso de sementes de *K. paniculata* (KPE) sobre *Anticarsia gemmatalis*.
- ◆ Verificar o efeito de KPE sobre os parâmetros fisiológicos referente ao consumo e utilização do alimento por *Anticarsia gemmatalis*.
- ◆ O mesmo extrato foi utilizado para provar seu efeito bioquímico no sistema digestivo de *Anticarsia gemmatalis* com o objetivo de investigar em detalhes o mecanismo de ação do mesmo para se ter maiores informações sobre o efeito de inseticidas naturais no desenvolvimento de insetos fitófagos e sua interação com enzimas digestivas para fornecer dados sobre a relação entre enzimas e pesticida botânicos.
- ◆ Uma vez verificado o efeito inseticida sobre o inseto, procedeu-se a partição química do extrato com solventes de crescente polaridade para realização de bioensaios com larvas de *Anticarsia gemmatalis* objetivando se realizar uma análise da fração inseticida mais promissora.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Obtenção dos ovos de *Anticarsia gemmatalis***

Os ovos de *A. gemmatalis* utilizados neste estudo foram obtidos através do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALq/USP, Piracicaba (SP). Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Purificação de Proteínas e Suas Funções Biológicas (LPPFB), Departamento de Ciências Naturais, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Três Lagoas (MS) a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $65\% \pm 75\%$  (14 h fotofase).

### **2.2 Obtenção do extrato aquoso**

Sementes de *K. paniculata* foram trituradas em moinho elétrico e a farinha resultante foi misturada à água destilada na proporção de 0,225 g por 150 mL sendo a suspensão mantida em frascos de plástico escuros a temperatura ambiente por 24 h para a extração dos compostos hidrossolúveis. A seguir, a mistura foi filtrada através de um tecido fino (voile), obtendo-se o extrato aquoso à concentração de 0,15% (peso/volume) (KPE 0,15%) que foi armazenado a  $4^\circ\text{C}$  e a cada três dias um novo extrato era preparado.

### **2.3 Bioensaios**

Para a análise do desenvolvimento de *A. gemmatalis* foram utilizadas um conjunto de 15 placas de petri (15,0 x 1,0 cm), forradas com papel filtro (11 cm) contendo as folhas de soja do genótipo IAC-19, oferecidas como substrato alimentar para 5 lagartas recém-eclodidas ( $n = 75$ ). No momento da utilização as folhas de soja do genótipo IAC-19 foram tratadas com KPE 0,15%, de modo que cada face era mergulhada por 2 segundos em recipientes contendo o extrato. Após este procedimento, as folhas foram distribuídas em papel filtro sobre uma superfície plana, onde permaneceram ao ar livre até a evaporação do excesso de água e tiveram seus pecíolos envolvidos por algodão umedecido para a manutenção da turgescência. O mesmo procedimento foi efetuado para o tratamento testemunha, no qual as folhas de soja foram tratadas apenas com água destilada. Este procedimento foi efetuado diariamente, momentos antes da troca das folhas utilizadas para

a alimentação das lagartas, que foram transferidas e manipuladas com o auxílio de um pincel fino.

As seguintes variáveis biológicas foram avaliadas:

- Fase larval: peso, duração e viabilidade;
- Fase pupal: peso (após 24h), duração e viabilidade;
- Fase adulta: emergência, fecundidade e fertilidade.

## **2.4 Ovoposição**

Após a emergência, cinco casais de insetos adultos para o tratamento testemunha e KPE 0,15% foram acondicionados em recipientes de vidro separados (24 x 34 x 19,5 cm) durante 48 h para estimular a ovoposição; uma solução de mel 10% foi utilizada como alimento. Após este período as fêmeas foram transferidas para o interior de um tudo PVC (24 x 10 cm) forrado com uma folha de papel sulfite para permitir a ovoposição. A fecundidade foi determinada contando-se o número de ovos depositados na folha após 48 h. Posteriormente, o papel foi recortado em quadrados, mergulhado em solução Sulfato de Cobre 1% para higienização e colocado em placa de petri para a análise da eclosão dos ovos (fertilidade).

## **2.5 Análise dos parâmetros fisiológicos relativos ao consumo e utilização de alimento.**

Para a determinação dos índices nutricionais quantitativos da fase larval, adotou-se a metodologia proposta por WALDBAUER (1968) e modificada por SCRIBER & SLANSKY JR. (1981). Para o cálculo desses índices, foram utilizadas as seguintes variáveis:

- T= duração do período de alimentação;
- F= peso das fezes produzidas durante T;
- B= peso médio das larvas durante T;
- I= peso do alimento ingerido durante T.

Foram determinados os índices nutricionais relativos ao consumo e utilização do alimento para cada tratamento para as larvas de 4º instar, através das seguintes fórmulas:



- Eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI);

$$ECI = \frac{B}{I} \times 100 (\%)$$

- Eficiência de conversão do alimento digerido (ECD);

$$ECD = \frac{B}{I-F} \times 100 (\%)$$

- Digestibilidade aproximada (AD);

$$AD = \frac{I-F}{I} \times 100 (\%)$$

- Custo metabólico (CM);

$$CM = 100 - ECD (\%)$$

Os dados obtidos foram submetidos a análise da variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

## **2.6 Obtenção de homogenatos do intestino médio (IM) de *A. gemmatalis*.**

Larvas de 4º instar foram imobilizadas em gelo e o IM com seu conteúdo foi removido cirurgicamente com o auxílio de pinças em 150 mM NaCl e armazenados (-20°C) até sua utilização. Posteriormente, os IM foram homogeneizados em 150 mM NaCl, centrifugados a 6000 x durante 5 min, o sobrenadante foi retirado e armazenado em gelo para ensaios enzimáticos.

## **2.7 Obtenção de homogenatos das fezes de *Anticarsia gemmatalis*.**

As fezes produzidas por larvas de 4º instar foram coletadas e armazenadas (-20°C) até sua utilização. Posteriormente, as fezes foram homogeneizadas em 150 mM NaCl, centrifugadas a 6000 x durante 5 min, o sobrenadante foi retirado e armazenado em gelo para ensaios enzimáticos.

## **2.8 Determinação da quantidade de proteína**

A concentração de proteína foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), com albumina sérica bovina como padrão.

## **2.9 Atividade Tríptica**

A atividade tríptica foi determinada utilizando-se BApNA 1mM (N-benzoyl-DL-arginyl-p-nitroanilide) como substrato. Os homogenatos do IM e fezes produzidas foram incubados em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, em um volume final de 0,1 mL por 10 min antes da adição de 1 mL do substrato. A reação ocorreu a 37°C durante 20 min e então foi parada com a adição de 0,2 mL de ácido acético 30% (v/v). A absorbância resultante foi lida a 410 nm. As incubações foram feitas em triplicatas, e a taxa inicial de hidrólise foi calculada.

## **2.10 Atividade Tríptica de homogenatos de *A. gemmatalis* em Gel de Poliacrilamida contendo 0,1% de gelatina.**

Amostras protéicas (2 µg) extraídas do IM e fezes das larvas de 4º instar de *A. gemmatalis* do tratamento testemunha e KPE 0,15% dissolvidas em tampão Tris-HCL 0,05 M, pH 8,0 foram insubadas por 30 min a 37°C. Para a análise da inibição da atividade tríptica de homogenatos do IM e fezes de *A. gemmatalis*, as amostras foram pré-incubadas com TLCK (2 µl) (L-1-chloro-3-[4-tosylamido]-7-amino-2-heptanone ) nas mesmas condições descritas acima. Posteriormente, estas amostras foram para a corrida em SDS-PAGE contendo 0,1% de gelatina. Terminada a eletroforese a 5°C, o gel foi lavado com solução 2,5% Triton X-100 durante 30 min sob agitação em Shake Orbital para remover o SDS, incubado com 100 mL de solução de ativação (Tris-HCL 100 mM, pH 6,5, contendo 40 uL de β-mercaptoetanol e 200 uL de 95% Triton X-100) por 2-3 h. O gel foi subseqüentemente corado com Coomassie brilliant blue R-250.

## **2.11 Análise Estatística**

Para o bioensaio com o extrato aquoso de semente de *K. paniculata* o delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com 2 tratamentos (níveis de concentração dos extratos) e 15 repetições. Cada unidade experimental (repetição) foi composta por 5

lagartas, totalizando 75 indivíduos por tratamento. A análise de variância dos dados obtidos foi realizada aplicando-se o teste T de Tukey (ANOVA  $p < 0,05$ ).

### **2.12 Obtenção dos extratos orgânicos de *Koeleria paniculata*.**

Inicialmente, 500g de sementes de *K. paniculata* foram trituradas em liquidificador na presença de 1 L de etanol 98%, sendo a seguir transferidas para um becher e deixadas em infusão por uma semana, sob agitação ocasional. Posteriormente, por sifonagem, foi separado o sobrenadante e o solvente evaporado em rota-evaporador obtendo-se deste modo o extrato bruto etanólico. Para a obtenção dos demais extratos orgânicos, procedeu-se de acordo com o fluxograma de partição mostrado na Figura 5, através de partição líquido-líquido, no qual o extrato bruto etanólico foi submetido a uma mistura de solventes composta de etanol e água (1:3, respectivamente) mais uma parte de diclorometano sob agitação com um bastão de vidro em um becher. A seguir esta mistura foi transferida para um funil de decantação sob agitação vigorosa e deixada em repouso para a separação espontânea das fases. Após este procedimento, abriu-se a torneira e foram retiradas separadamente as frações etanol/água e diclorometano que foram levadas ao rota-evaporador para evaporação do solvente. O procedimento acima foi repetido para a obtenção das demais frações obedecendo-se às proporções descritas de acordo com o fluxograma de partição.

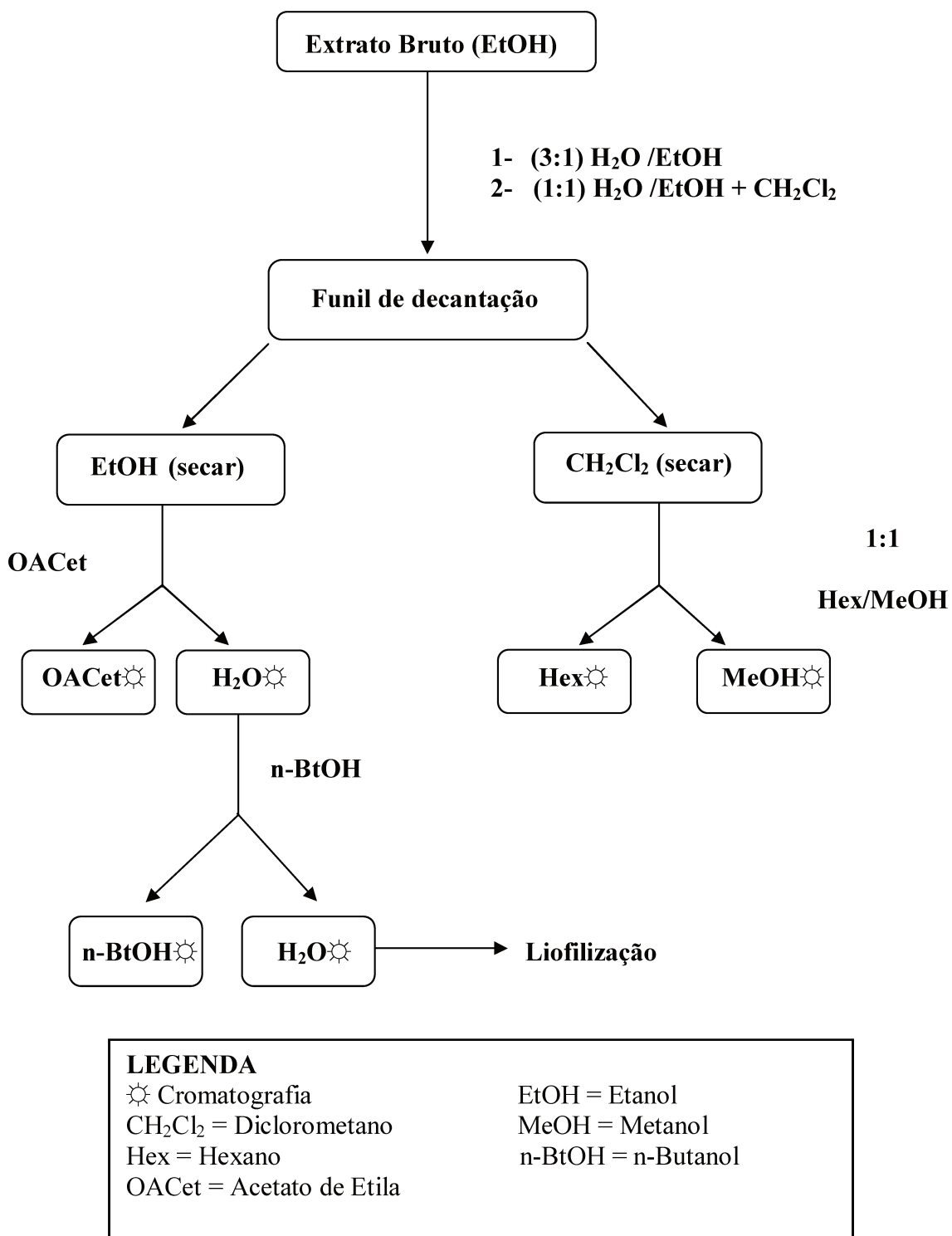


Figura 5. Fluxograma geral de partição química líquido-líquido de sementes de *Koeleria paniculata*.

### 2.12.1 Testes de bioatividade.

Para a análise da bioatividade dos extratos orgânicos de *K. paniculata* foram realizados testes pilotos com o objetivo de verificar a viabilidade e o peso larval de *A. gemmatalis* utilizando-se as frações iniciais - etanol, diclorometano e metanol - de acordo com o fluxograma de partição mostrado na figura 5, no sentido de selecionar a partir da polaridade do solvente utilizado a fração mais inseticida para posterior estudo fitoquímico, onde através de processos cromatográficos, serão isoladas e caracterizadas as substâncias bioativas presentes. Para a verificação do efeito destes extratos no desenvolvimento de *A. gemmatalis* foram utilizadas um conjunto de 6 placas plásticas (15,0 x 1,0 cm), forradas com papel filtro (11 cm) contendo as folhas de soja do genótipo IAC-19, oferecidas como substrato alimentar para 5 lagartas neonatas ( $n = 30$ ). No momento da utilização as folhas de soja do genótipo IAC-19 foram pinceladas com as frações descritas acima. Posteriormente, as folhas foram distribuídas em papel filtro sobre uma superfície plana, onde permaneceram ao ar livre até a evaporação do excesso de água e tiveram seus pecíolos envolvidos por algodão umedecido para a manutenção da turgescência. O mesmo procedimento foi efetuado para o tratamento testemunha, no qual as placas plásticas foram pinceladas com os respectivos solventes utilizados para solubilização das frações (diclorometano-testemunha A; metanol-testemunha B e etanol-testemunha C) para verificar se os mesmos poderiam interferir nos resultados. Este procedimento foi efetuado diariamente, momentos antes da troca das folhas utilizadas para a alimentação das lagartas, que foram transferidas e manipuladas com o auxílio de um pincel fino. A mortalidade foi avaliada diariamente até o décimo dia, no qual foi determinado o peso das larvas.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com 6 tratamentos (três extratos orgânicos e respectivas testemunhas) e 6 repetições. Cada unidade experimental (repetição) foi composta por 5 lagartas, totalizando 30 indivíduos por tratamento. A análise de variância dos dados obtidos foi realizada aplicando-se o teste T de Tukey (ANOVA  $p < 0,05$ ).

### **3. Resultados**

#### **3.1 Efeito de KPE 0,15% no desenvolvimento de *Anticarsia gemmatalis* alimentadas em folhas de soja IAC-19.**

##### **3.1.1 Fase Larval**

O efeito de KPE 0,15% no desenvolvimento larval de *A. gemmatalis* pode ser observado na Tabela 1.

KPE 0,15% apresentou uma forte atividade inseticida, reduzindo significativamente à viabilidade larval de *A. gemmatalis*, ocasionando um decréscimo de cerca de 70 % nesse parâmetro quando comparado ao tratamento testemunha, que apresentou uma viabilidade larval de 80,3%.

O peso médio das larvas do tratamento testemunha foi de 165,4 mg, enquanto KPE 0,15% produziu 52,4% de diminuição nesta variável. Nenhuma deformação foi observada nas larvas tratadas com KPE 0,15% quando comparadas ao tratamento testemunha (Figura 6).

Verificou-se que KPE 0,15% provoca o alongamento do período de desenvolvimento das lagartas sobreviventes (2 dias) em relação ao tratamento testemunha.

##### **3.1.2 Fase Pupal**

O efeito de KPE 0,15% na fase pupal de *A. gemmatalis* pode ser observado na Tabela 1.

Em termos de viabilidade, peso e duração da fase pupal foi observado que KPE 0,15% não provoca alterações significativas nesses parâmetros quando comparado ao tratamento testemunha.

Tabela 1. Peso, duração e viabilidade (Médias  $\pm$  SD) correspondentes à fase larval e pupal de *A. gemmatalis* no término do bioensaio com KPE 0,15%.

| Variáveis       | Tratamentos*       |                    |
|-----------------|--------------------|--------------------|
|                 | Testemunha         | KPE 0,15%          |
| Fase Larval     |                    |                    |
| Peso (mg)       | 165,4 $\pm$ 41,0 a | 86,7 $\pm$ 25,7 b  |
| Duração (d)     | 18,3 $\pm$ 1,3 a   | 20,3 $\pm$ 2,2 b   |
| Viabilidade (%) | 80,3 $\pm$ 16,5 a  | 32,7 $\pm$ 23,3 b  |
| Fase Pupal      |                    |                    |
| Peso (mg)       | 159,9 $\pm$ 32,8 a | 151,5 $\pm$ 35,0 a |
| Duração (d)     | 8,5 $\pm$ 0,9 a    | 8,4 $\pm$ 0,7 a    |
| Viabilidade (%) | 76,6 $\pm$ 15,8 a  | 62,2 $\pm$ 16,7 a  |

\* Médias seguidas de letras distintas em cada linha são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% (ANOVA).





Figura 6. Variação no tamanho de *A. gemmatalis* após o término do bioensaio com KPE 0,15%. A- larva testemunha e B- larva KPE 0,15%.

Fonte: (MARTINS, C.H.Z.)

### 3.1.3 Fase Adulta

O efeito de KPE 0,15% na fase adulta de *A. gemmatalis* pode ser observado na Tabela 2.

A conseqüente percentagem de emergência das larvas alimentadas com KPE 0,15% diminuiu cerca de 60% quando comparada ao tratamento testemunha.

KPE 0,15% reduziu significativamente o número de ovos depositados e em conseqüência dos efeitos na fecundidade, KPE afetou a fertilidade de *A. gemmatalis*.

KPE 0,15% ocasionou uma redução de 48,8% na fecundidade de *A. gemmatalis*, quando comparado ao tratamento testemunha. A percentagem de eclosão dos ovos (fertilidade) calculada a partir do número de ovos depositados no tratamento KPE 0,15% diminuiu cerca de 50% quando comparada ao tratamento testemunha. Estes resultados indicam que o crescimento e desenvolvimento da progênie resultante foram negativamente afetados por KPE 0,15%.

Tabela 2. Emergência, fecundidade e fertilidade (Médias  $\pm$  SD) correspondente à fase adulta de *A. gemmatalis* no término do bioensaio com KPE 0.15%.

| Tratamentos | Fase adulta <sup>*,<math>\Psi</math></sup> |                             |                  |
|-------------|--------------------------------------------|-----------------------------|------------------|
|             | Emergência (%)                             | Fecundidade (nº ovos/fêmea) | Fertilidade (%)  |
| Testemunha  | 58.1 $\pm$ 10.1 a                          | 41.5 $\pm$ 7.8 a            | 44.0 $\pm$ 7.8 a |
| KPE 0.15%   | 23.0 $\pm$ 3.9 b                           | 20.0 $\pm$ 3.6 b            | 22.4 $\pm$ 4.2 b |

\*Médias seguidas de letras distintas em cada coluna são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5% (ANOVA).

<sup>$\Psi$</sup>  Cada dado representa a média de três replicatas de um conjunto de 5 casais de adultos.

### 3.2 Análise dos parâmetros fisiológicos relativos ao consumo e utilização de alimento de *A. gemmatalis* tratadas com KPE 0,15%.

#### 3.2.1 Consumo de dieta e Resíduos de excreção

O efeito de KPE 0,15% no consumo de dieta e na eliminação dos resíduos de excreção de *A. gemmatalis* pode ser observado na Tabela 3.

Foi observado KPE 0,15% reduz significativamente o consumo de dieta quando comparado ao tratamento testemunha em aproximadamente 37% (Figura 7).

No tratamento KPE 0,15%, em relação à eliminação dos resíduos de excreção, foi possível verificar uma redução nesse parâmetro de 56,5% quando comparado à testemunha.

Tabela 3. Dieta consumida e resíduos de excreção (Médias  $\pm$  SD) de *A. gemmatalis* no término do bioensaio com KPE 0.15%.

| Variáveis                 | Tratamentos*         |                      |
|---------------------------|----------------------|----------------------|
|                           | Testemunha           | KPE 0.15%            |
| Dieta consumida (mg)      | 173.36 $\pm$ 22.16 a | 110.27 $\pm$ 35.45 b |
| Resíduos de excreção (mg) | 30.74 $\pm$ 5.52 a   | 13.38 $\pm$ 2.72 b   |

\*Médias seguidas de letras distintas em cada linha são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5% (ANOVA).



Figura 7. Dieta consumida por larvas de 4º instar de *A. gemmatals*. **A**: folhas testemunha e **B**: folhas KPE 0,15%.

Fonte: (MARTINS, C.H.Z.).

### 3.2.2 Determinação dos índices nutricionais quantitativos da fase larval relativa ao consumo e utilização do alimento.

O efeito de KPE 0,15% na determinação dos índices nutricionais quantitativos de larvas de 4º instar de *A. gemmatalis* pode ser observado na Tabela 4.

KPE 0,15% afeta a fisiologia e metabolismo de *A. gemmatalis*, reduzindo em 40,3% e 48,9% a ECI e ECD, respectivamente, quando comparado ao tratamento testemunha.

Inversamente, KPE 0,15% aumentou em 10,7% a AD e elevou o CM das larvas cerca de 3 vezes quando comparado ao tratamento testemunha.

Tabela 4. Índices Nutricionais (Médias  $\pm$  SD) relativos ao consumo e utilização do alimento por *A. gemmatalis* após o término do bioensaio com KPE 0,15%.

| Índices Nutricionais (%) | Tratamentos*       |                     |
|--------------------------|--------------------|---------------------|
|                          | Testemunha         | KPE 0,15%           |
| ECI                      | 66,75 $\pm$ 9,18 a | 39,81 $\pm$ 7,9 b   |
| ECD                      | 83,34 $\pm$ 8,89 a | 42,58 $\pm$ 9,17 b  |
| AD                       | 83,53 $\pm$ 3,26 a | 92,53 $\pm$ 3,68 b  |
| C M                      | 16,66 $\pm$ 5,88 a | 55,78 $\pm$ 10,75 b |

\*Médias seguidas de letras distintas em cada linha são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5% (ANOVA).

### 3.3 Efeito de KPE 0,15% na Atividade Tríptica de *A. gemmatalis*.

A atividade tríptica dos homogenatos do intestino médio e fezes de *A. gemmatalis* no término do bioensaio com KPE 0,15% pode ser observada na Tabela 5.

Ensaio bioquímico utilizando-se BApNA como substrato nos homogenatos do IM destes insetos demonstraram que as larvas do tratamento testemunha contêm consistentemente maiores níveis de atividade tríptica do que as larvas tratadas com KPE 0,15%, que diminuiu significativamente a atividade tríptica no IM em 42,3%.

As fezes produzidas por larvas de 4º instar foram coletadas do tratamento KPE 0,15% e tratamento testemunha e utilizadas em ensaios bioquímicos. Através dos resultados obtidos, foi possível verificar que KPE 0,15% provocou um aumento na atividade tríptica de 46% no homogenato das fezes quando comparado ao tratamento testemunha.

Tabela 5. Atividade Tríptica (média  $\pm$  SD) de homogenatos do intestino médio (IM) e fezes de *A. gemmatalis* após o término do bioensaio com KPE 0,15% expressa em pMol BapNA/ $\mu$ g P/min.

| Tratamentos | Atividade Tríptica <sup>*,<math>\Psi</math></sup> |                   |
|-------------|---------------------------------------------------|-------------------|
|             | Homogenato IM                                     | Homogenato Fezes  |
| Testemunha  | 8,36 $\pm$ 0,81 a                                 | 2,12 $\pm$ 0,25 a |
| KPE 0,15%   | 4,63 $\pm$ 1,06 b                                 | 3,93 $\pm$ 0,84 b |

\* Médias seguidas de letras distintas em cada coluna são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5% (ANOVA).

<sup>$\Psi$</sup>  Cada dado representa a média de três replicatas.

### **3.4 Análise do Efeito de KPE 0,15% na Atividade Tríptica dos Homogenatos de *A. gemmatalis* em Gel de Poliacrilamida contendo Gelatina 0,1%.**

O perfil da atividade enzimática de homogenatos do IM e fezes de larvas alimentadas com KPE 0,15% e larvas do tratamento testemunha no término do bioensaio está representada na Figura 8.

O padrão de separação eletroforética (SDS-PAGE) das enzimas do homogenato do IM de larvas de 4º de *A. gemmatalis* em gel de gelatina 0,1% do tratamento testemunha e KPE 0,15% exibiu um perfil diferente relacionado à atividade proteolítica. Várias bandas de atividade enzimática podem ser observadas no gel referentes ao homogenato do IM das larvas testemunha, que aparecem como faixas claras em contraste com um fundo escuro, quando comparada ao tratamento testemunha (Colunas 1 e 2, respectivamente).

Por outro lado, o padrão de separação enzimática do homogenato das fezes de larvas de 4º instar do tratamento KPE 0,15% apresentou mais bandas de atividade enzimática no gel de gelatina quando comparado ao tratamento testemunha (Colunas 5 e 6).

As amostras do homogenato das fezes e IM pré-incubadas com TLCK (inibidor sintético específico para tripsina) foram severamente inibidas em todos os tratamentos (colunas 3-4 e 7-8), indicando que realmente a atividade enzimática observada deve-se a enzimas do tipo tripsina.



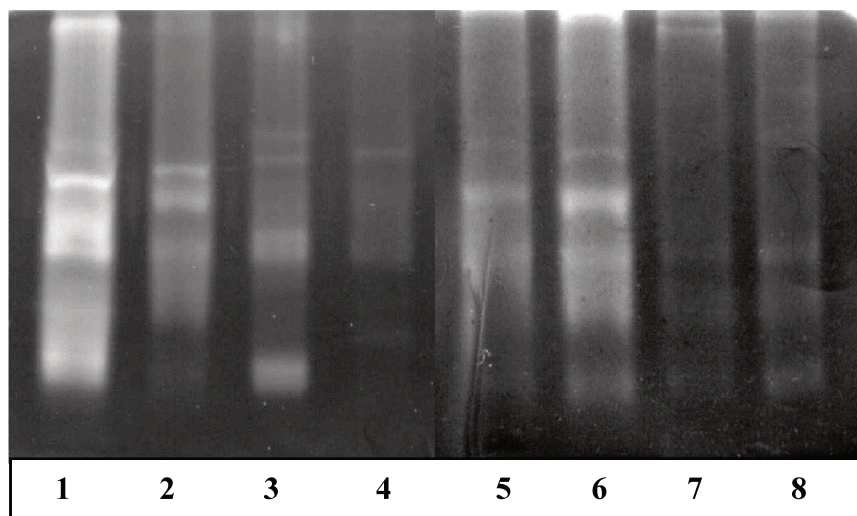


Figura 8. Perfil da atividade enzimática em SDS-PAGE contendo gelatina 0,1% de homogenatos do intestino medido (IM) e fezes de *A. gemmatalis* após o término do bioensaio com KPE 0,15%. **1.** Homogenato IM testemunha; **2.** Homogenato IM KPE 0,15%; **3.** Homogenato IM testemunha com TLCK; **4.** Homogenato IM KPE 0,15% com TLCK; **5.** Homogenato Fezes testemunha; **6.** Homogenato Fezes KPE 0,15%; **7.** Homogenato Fezes testemunha com TLCK; **8.** Homogenato Fezes KPE 0,15% com TLCK.

### 3.5 Efeito dos extratos orgânicos no desenvolvimento de *Anticarsia gemmatalis* alimentadas em folhas de soja IAC-19.

O efeito dos extratos orgânicos de *K. paniculata* no desenvolvimento de *Anticarsia gemmatalis* pode ser observado na tabela 6.

Uma vez determinado o efeito de KPE 0,15% no desenvolvimento de *A. gemmatalis*, procedeu-se à partição química do mesmo com o objetivo de selecionar dentre as várias frações obtidas a mais inseticida.

Através dos resultados obtidos foi possível verificar que o extrato mais efetivo foi o diclorometano, reduzindo em 78,9% a viabilidade larval, diferindo significativamente do tratamento testemunha, seguido dos extratos metanólico (61,11%) e etanólico (12,7%) quando comparados às respectivas testemunhas.

Com relação aos efeitos no crescimento do inseto, o extrato metanólico ocasionou 66,16% de decréscimo no peso médio larval quando comparado ao tratamento testemunha, seguidos do extrato em diclorometano (61,25%) e etanólico (29,18%) quando comparados às respectivas testemunhas. Não foi possível uma comparação estatística dos parâmetros acima relacionados entre os tratamentos com os extratos em função dos diferentes tratamentos testemunha realizados.

Tabela 6. Peso e viabilidade (Médias  $\pm$  SD) correspondentes à fase larval de *A. gemmatalis* no término do bioensaio com os extratos orgânicos de *K paniculata*.

| Tratamentos          | Variáveis*             |                    |
|----------------------|------------------------|--------------------|
|                      | Viabilidade larval (%) | Peso médio (mg)    |
| Testemunha A         | 95,0 $\pm$ 10,0 a      | 4,13 $\pm$ 0,66 a  |
| Fração Diclorometano | 20,0 $\pm$ 4,08 b      | 1,6 $\pm$ 0,42 b   |
| Testemunha B         | 72,0 $\pm$ 10,95 a     | 13,23 $\pm$ 2,61 a |
| Fração Metanol       | 28,0 $\pm$ 7,58 b      | 4,51 $\pm$ 1,25 b  |
| Testmunha C          | 68,78 $\pm$ 7,5 a      | 5,79 $\pm$ 1,16 a  |
| Fração Etanol        | 60,0 $\pm$ 7,07 b      | 4,1 $\pm$ 0,75 b   |

\* Médias seguidas de letras distintas em cada coluna são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5% (ANOVA).

#### 4. Discussão

No processo de modernização ou industrialização, a agricultura se tornou dependente de insumos produzidos fora do setor agrícola, como máquinas, equipamentos, fertilizantes e pesticidas, insumos que encarecem a produção e diminuem a margem de lucro dos produtores de alimentos e fibras. (MENEZES & LIMA, 2005).

Em uma alternativa de produção de alimentos tal como se concebe a agricultura sustentável, busca-se mobilizar harmoniosamente todos os recursos disponíveis na unidade de produção de forma a reduzir o impacto ambiental e a poluição, a minimizar a dependência externa das matérias primas, a atingir a otimização do balanço energético da produção e a produzir alimentos baratos e de alta qualidade biológica para suprir necessidades internas e gerar excedentes exportáveis.

As plantas possuem um potencial elevado como biopesticidas para sua utilização na agricultura porque são mais seletivas contra insetos praga, geralmente são biodegradáveis a produtos não tóxicos, têm pouco ou nenhum efeito sobre organismos não alvos e o meio ambiente (CHARLESTON, 2005). Os derivados vegetais podem ser aplicados em produtos armazenados do mesmo modo que inseticidas sintéticos. Muitos extratos vegetais são conhecidos por possuírem atividade ovicida, repelente, deterrente, inseticida, anti-hormonal contra vários insetos praga (PERERA et al., 2000; MEDEIROS & BOIÇA JÚNIOR, 2005; HAN et al., 2006).

Este tipo de estudo geralmente é realizado por meio de bioensaios, onde o inseto se alimenta e os efeitos no comportamento e desenvolvimento de mesmo são monitorados. Uma vez que KPE afetou a fisiologia e o metabolismo de *A. gemmatalis*, o próximo passo foi estudar como o extrato interagiu com as enzimas digestivas do inseto, ou seja, procuramos elucidar o modo-de-ação de KPE. Este tipo de informação é necessária para verificar possíveis efeitos sobre espécies não-alvo, para que os produtos naturais tenham a eficiência e seletividade desejada no controle das pragas.

Através dos resultados obtidos no bioensaio com KPE 0,15%, pode-se verificar que todas as alterações fortemente relevantes ocorreram na fase larval de *A. gemmatalis* (Tabela 1). Isto pode ser explicado porque é justamente nesta fase que o inseto se alimenta, e conseqüentemente se mantém mais exposto à ação dos compostos inseticidas presentes no extrato (THOMAZINI et al. 2000).

Pesquisas realizadas com plantas da família Meliaceae demonstram essa mesma tendência (BOGORNÍ, 2003; SOUZA & VENDRAMIM., 2004, KOUL et al., 2004 CHARLESTON et al., 2005) assim como estudos envolvendo extratos de plantas da família Sapindaceae (ARRUDA et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2003; BOIÇA JUNIOR et al., 2005; FERNANDES et al., 2005).

RODRÍGUEZ (1995) enfatizou que é mais interessante o uso de plantas inseticidas que afetam o desenvolvimento larval do inseto, pois quando se interrompe esse período, obtém-se a redução na população do inseto na fase em que o dano à cultura está sendo causado.

KPE 0,15% afetou significativamente a fisiologia de *A. gemmatilis*, produzindo uma redução de 52,4% no peso médio de larvas de 4º instar, o que pode estar vinculado a uma inadequação nutricional do substrato alimentar (RODRÍGUEZ & VENDRAMIM, 1996) ou da menor eficiência de conversão do alimento ingerido e digerido, quando comparada ao tratamento testemunha.

A análise dos parâmetros fisiológicos relativos ao consumo e utilização de alimento por *A. gemmatilis* tratadas com KPE 0,15% foi um dos primeiros mecanismos utilizados neste estudo para se investigar como o extrato está agindo sobre o inseto. Foi observado KPE 0,15% reduz significativamente o consumo de dieta quando comparado ao tratamento testemunha em aproximadamente 37% (Tabela 3). Provavelmente este decréscimo na taxa de consumo do alimento seja devido a uma natureza deterrente do extrato e esta atividade foi responsável em parte pela redução no peso médio larval.

Entretanto, o decréscimo observado tanto no ECI e ECD de 40,3% e 48,9%, respectivamente (Tabela 4), indica que KPE exibe uma atividade tóxica para as larvas alimentadas com o extrato. O ECI representa a habilidade do inseto em utilizar o alimento ingerido para a conversão em biomassa. O decréscimo no ECI indica que mais alimento está sendo metabolizado em energia e menos está sendo incorporado em biomassa pelo inseto. O ECD também diminuiu na proporção em que a conversão do alimento digerido para energia aumentou, o que pode ser evidenciado pelo elevado custo metabólico das larvas tratadas com KPE (cerca de três vezes maior), quando comparadas à testemunha. Esta atividade tóxica de KPE é resultado do desvio de grande parte da energia que seria

utilizada para o crescimento, para a degradação dos compostos bioativos no extrato (detoxificação).

Resultados semelhantes foram observados por WHEELER & ISMAN (2001), utilizando-se o extrato metanólico de *Trichilia americana* (Sesse & Mocino) Pennington (Meliaceae) incorporado em dietas artificiais contra *Spodoptera litura* (Fabr.) (Lepidoptera: Noctuidae). Em bioensaios de alimentação, o extrato reduziu o crescimento, consumo e utilização do alimento ingerido e digerido de uma maneira dose-dependente, sugerindo-se tanto uma atividade deterrente como tóxica.

A atividade biológica de azadirachtin, nimbocinol, azadiradione e salannin isoladas de *A. indica* (nim), foi determinada sozinha ou em combinação contra *Helicoverpa armigera* (Hubner) e *Spodoptera litura* (F) (Lepidoptera: Noctuidae). Nimbocinol inibiu em 50% o crescimento nos bioensaios com dietas artificiais para ambas as espécies, comparando-se a eficácia observada para azadiradione e salannin. Nas análises nutricionais, somente nimbocinol e azadiradione reduziram o ECI, indicando toxicidade a um efeito antinutricional (KOUL et al., 2004).

KPE 0,15% causa o alongamento da fase larval, o que pode determinar em experimentos no campo, uma exposição mais prolongada do inseto a predadores e parasitóides. O extrato acetônico e etanólico do tubérculo e várias substâncias isoladas de *Aristolochia pubescens* (Willd) (Sapindaceae) foram avaliados em bioensaios contra *A. gemmatilis*. Foi possível verificar que o ácido aristolóquico e o composto *ent*-kaur-15-en-17-ol também ocasionaram o alongamento da fase larval de *A. gemmatilis* (NASCIMENTO et al., 2003).

O aumento significativo na mortalidade larval apresentada pela pequena concentração de KPE (0.15%) demonstra uma atividade inseticida expressiva, o que pode ser evidenciado pela redução na viabilidade larval em torno de 70% quando comparado ao tratamento testemunha. (Tabela 1). Neste momento, a escolha da concentração a ser utilizada em um bioensaio é importante, pois uma mortalidade próxima de 100% diminui a probabilidade de indivíduos vivos para estudos enzimáticos e exerce uma pressão muito seletiva sobre a população de insetos que podem adquirir resistência.

A dose de KPE 0,15% utilizada neste trabalho foi baseada em estudos anteriores realizados no LPPFB (dados não mostrados) onde verificamos o efeito do extrato aquoso de

*K. paniculata* sobre *A. gemmatilis* na concentração de 1,0 % e 0,5 % (g/L) obtendo uma mortalidade larval de 100 e 95%, respectivamente (MARTINS, C.H.Z., 2004).

Analisando o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* tratadas com o extrato aquoso de sementes de folhas de nim nas concentrações de 0,5-1,7-3,6 e 10% , PRATES et al., (2003) observaram uma mortalidade de 11,1-31,7-79,3 e 100%, respectivamente.

Com o objetivo de avaliar o modo de ação de compostos presentes em extratos aquosos e clorofórmico de folhas de *Trichilia pallida* sobre a traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) em comparação com o extrato aquoso das sementes de *Azadirachta indica* (nim), GONÇALVES-GERVÁSIO (2003) determinou o efeito translaminar, sistêmico, e tópico. Foi possível concluir que os extratos aquosos de sementes de nim provocam alta mortalidade larval de *T. absoluta*, independentemente da sua forma de aplicação e que, embora em menor intensidade, extratos aquosos e clorofórmicos de folhas de *T. pallida* em concentrações maiores do que 5% também prejudicam o desenvolvimento dessa praga, atuando de forma translaminar, sistêmica e tópica, sendo o efeito translaminar mais pronunciado que os demais.

Em um trabalho envolvendo diversas famílias de plantas, incluindo espécies pertencentes à família Meliaceae e Sapindaceae (BOIÇA-JUNIOR et al., 2005), o efeito do extrato aquoso de cerca de vinte espécies foi avaliado em uma concentração mais elevada correspondente a 10% no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera:Plutellidae) em couve. A mortalidade larval foi afetada pelos extratos de *Enterolobium contortisilliquum* (Mimosaceae) , *Nicotiana tabacum* (Solanaceae), *Sapindus saponaria* (Sapindaceae) e *Trichilia pallida* (Meliaceae), resultando em 100% de mortalidade, seguidos dos extratos de *Azadirachta indica* (Meliaceae) (89,6%), *Symphytum officinale* (Boraginaceae) (77,1%), *Bougainvillea glabra* (Nyctaginaceae) (72,9%), *Achillea millefolium* (Asteraceae) (70,8%) e *Chenopodium ambrosioides* (Chenopodiaceae) (70,8%).

Uma vez determinado os parâmetros fisiológicos do consumo e utilização do alimento no bioensaio com KPE 0,15%, por meio da interpretação dos resultados obtidos referentes aos índices nutricionais quantitativos, foi possível esclarecer a natureza deterrente do extrato e seu principal mecanismo de ação, a atividade tóxica para as larvas alimentadas com KPE. Outro aspecto importante a ser considerado em relação aos

parâmetros fisiológicos refere-se ao aumento da Digestibilidade Aproximada em torno de 11% apresentado pelas larvas do tratamento KPE 0,15% em comparação a testemunha (Tabela 4). Este índice representa a percentagem do alimento ingerido que é efetivamente assimilado pelo inseto, indicando uma aproximação da tomada real de nutrientes através das paredes do intestino. Este aumento observado na digestibilidade aproximada indica que houve uma atividade enzimática diferenciada entre os tratamentos, uma vez que no tratamento KPE 0,15%, provavelmente o alimento tenha permanecido em contato por mais tempo no tubo digestivo do inseto para a detoxificação dos compostos aleloquímicos presentes no extrato.

Nesse sentido, a próxima questão no presente estudo foi analisar o modo-de-ação desta toxicidade de KPE. Poucos trabalhos têm sido efetuados em relação a esta questão para extratos vegetais. Portanto, por meio de ensaios enzimáticos para a análise dos efeitos bioquímicos no sistema digestivo de larvas de 4º instar de *A. gemmatalis*, procedeu-se à investigação da questão acima com o objetivo de fornecer maiores informações sobre como a atividade tóxica do extrato atua sobre o inseto.

A atividade tríptica dos homogenatos do intestino médio e fezes de *A. gemmatalis* no término do bioensaio com KPE 0,15% foi determinada utilizando-se BApNA como substrato (Tabela 5). Serino-proteinases são as proteases mais estudadas e estão presentes em vírus, procariotos e eucariotos, sugerindo o papel vital desempenhado pelas mesmas na sobrevivência de diversos organismos. Elas também prevalecem na classe Insecta, especialmente na ordem Lepidoptera (BROADWAY & DUFFEY, 1988; TERRA & FERREIRA., 1994;). Caracterizações recentes de proteases digestivas de *A. gemmatalis* indicam a prevalência de enzimas digestivas do tipo tripsina (OLIVEIRA et al., 2005; XAVIER et al., 2005; PILON et al., 2006).

Os resultados obtidos revelaram que a atividade tríptica no homogenato do IM do tratamento testemunha foi 57,7% maior do que a observada em KPE 0,15%.

A pequena atividade enzimática de homogenatos do IM em KPE foi reflexo de níveis elevados de atividade tríptica no homogenato das fezes das larvas deste tratamento quando comparado a testemunha, que apresentou uma atividade 46% menor.

Estes resultados foram confirmados pelo perfil da atividade enzimática de homogenatos do IM e fezes de larvas alimentadas com KPE 0,15% e larvas do tratamento



testemunha (Figura 8). A utilização de TLCK, inibidor irreversível de enzimas do tipo tripsina, que especificamente alquila um resíduo de histidina próximo ao sítio reativo da serina da tripsina (OLIVEIRA et al., 2005), foi importante para sugerir que realmente a atividade enzimática observada deve-se a enzimas do tipo tripsina, uma vez que quando incubadas com TLCK as amostras do homogenato das fezes e IM de ambos os tratamentos foram severamente inibidas como pode ser observado pelo padrão de separação enzimática em SDS-PAGE contendo gelatina 0,1% (Figura 8).

Portanto, KPE 0,15% atua diretamente na redução da atividade triptica no IM das larvas, criando uma deficiência de aminoácidos essenciais, que se correlaciona diretamente com a alta mortalidade e o decréscimo acentuado no peso das larvas alimentadas com o extrato. Provavelmente, a ligação de um determinado composto presente em KPE as células epiteliais do IM de *A. gemmatilis* e o conseqüente rompimento da membrana peritrófica (EISEMANN et al. 1994; GATEHOUSE et al., 1997) pode fornecer uma explicação para o aumento significativo da atividade triptica no homogenato das fezes das larvas KPE quando comparada ao tratamento testemunha. Consideravelmente, através dos resultados obtidos pode-se determinar que KPE atua diretamente no sistema digestivo de *A. gemmatilis*, interferindo com a digestão, afetando deste modo o mecanismo de reciclagem enzimática das larvas tratadas com KPE.

Trabalhos que investigaram o efeito de azadirachtina em enzimas do intestino médio de insetos, particularmente tripsina, demonstraram que a administração oral, aplicação tópica e a injeção deste limonóide causam uma drástica redução na atividade triptica e KOUL et al. (1996) sugerem que a azadirachtina interfere com o crescimento via impedimento da digestão, ocasionada pela inibição da secreção de enzimas do tipo tripsina pelas células epiteliais do intestino de *Spodoptera litura*.

ABO EL-GHAR et al. (1996) determinaram mudanças na atividade de enzimas digestivas na hemolinfa de larvas do sexto estágio de *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae) após alimentação com extratos etanólicos de *M. azedarach* e *Vinca rosea* (L.) em uma concentração de 5% e observaram uma redução significativa na atividade enzimática, especialmente amilase e invertase.

O peso do inseto é conseqüência da dieta consumida e da digestibilidade e estes parâmetros afetam o desenvolvimento pós-embionário (PILON et al., 2006).



Nossos resultados mostram que o desenvolvimento larval de *A. gemmatalis* é afetado por KPE 0.15%, que reduz a taxa de alimentação e conseqüentemente o peso larval, assim como pode ser observado em relação à digestibilidade do alimento, uma vez que KPE diminui a atividade de enzimas do tipo tripsina no intestino médio dessas larvas, afetando negativamente a absorção protéica cujo reflexo é o efeito negativo na fase adulta. É provável que a correta metabolização de proteínas presentes na dieta do inseto reflita na qualidade e na quantidade de ovos depositados por fêmeas (TELANG et al., 2001).

KPE 0,15% afeta negativamente os parâmetros reprodutivos de *A. gemmatalis*, ocasionado uma significativa redução da fecundidade (48,4%) e fertilidade (49%) dos ovos quando comparado ao tratamento testemunha (Tabela 2). Nossos resultados estão de acordo com pesquisas recentes que demonstram que o acúmulo de proteínas durante o estágio larval é crítico para a vitelogênese (TELANG et al., 2001; 2003).

O extrato aquoso de semente de neem (NSKE) e azadirachtina foram testados quanto a seu efeito na fecundidade, fertilidade e desenvolvimento pós-embriônico de *Bactrocera curcubitae* (Coquillett) and *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae). Singh (2003) observou no décimo dia de experimento que NSKE 0,12% reduziu em 87 e 82% a fecundidade de *B. cucurbitae* e *B. dorsalis*, respectivamente. Conseqüentemente, NSKE afetou severamente a fertilidade destas moscas, a percentagem de eclosão dos ovos variou entre 56 e 62% para *B. cucurbitae* e 61 a 75% para *B. dorsalis*, comparados com 99% de fertilidade no grupo controle. A mesma tendência foi observada para o tratamento com azadirachtina.

MEDEIROS et al. (2005) analisando o efeito de extratos aquosos de diversas espécies em relação à preferência para oviposição de *Plutella xylostella*.concluíram que os extratos apresentaram efeito deterrente na oviposição da praga, com exceção do extrato de *S. adstringens*, que não diferiu da testemunha, tratada apenas com água destilada. Os extratos de *E. contortisilliquum*, *S. saponaria* (frutos) e *T. pallida* (folhas) foram os mais eficientes, apresentando 100% de deterência.

De um modo geral, os resultados deste estudo indicam que KPE possui um potencial inseticida elevado no combate a *A. gemmatalis*, atuando na inibição da alimentação (deterrente) e mais diretamente como toxina no sistema digestivo do inseto. Para a aplicabilidade de KPE como novo agente de controle de insetos, pesquisas adicionais

precisam ser realizadas na área de segurança da saúde humana. Testado sua segurança, com um custo/benefício baixo e renovável, KPE pode ser uma excelente alternativa a utilização de inseticidas sintéticos no combate a insetos praga.

Os resultados promissores obtidos com KPE 0.15% motivaram a pesquisa com extratos orgânicos de *K. paniculata*. Essas pesquisas e testes visam realizar bioensaios utilizando várias ordens e formas de desenvolvimento de insetos, para avaliar os produtos das extrações e purificações químicas das plantas coletadas, selecionando as mais promissoras, em função de mortalidade ou qualquer outro efeito que modifique parâmetros biológicos e/ou comportamental de insetos pragas.

Em geral, extratos altamente apolares ou altamente polares têm menor bioatividade em comparação com extratos de polaridade intermediária (etanólicos, acetônicos e hidroalcolicos). (CUBILLO et al, 1999; ROEL et al 2000a; 2000b, SOUZA & VENDRAMIM, 2004). Considerando que solventes de polaridade intermediária podem extrair compostos bioativos mais eficientemente, alguns autores já testam extratos botânicos com solventes nessa especificação, dispensando extratos apolares (CUBILLO et al., 1999).

No presente estudo, foram testados os extratos em etanol, diclorometano e metanol através de bioensaios pilotos sobre o desenvolvimento larval de *A. gemmatilis* e foi possível verificar que o extrato em diclorometano foi o mais promissor como inseticida (Tabela 6). Alguns autores atribuem a menor atividade inseticida de extratos metanólicos a sua alta polaridade. Desta forma, uma maior quantidade de substâncias inativas, como taninos e açúcares, podem ser extraídas, podendo causar, portanto, uma diluição das substâncias ativas no extrato. Por outro lado, o extrato em diclorometano ou clorofórmio, de menor polaridade, pode impedir a extração de tais substâncias inativas, e em razão da sua polaridade extrair uma maior quantidade de substâncias bioativas (JAGLAN et al., 1997, SOUZA & VENDRAMIM, 2004)

Este resultado equivale ao constatado por GONÇALES-GERVÁSIO (2004), que identificou o extrato em clorofórmio (equivalente ao diclorometano) de folhas de *T. pallida* como o mais eficiente, pois ocasionou 73,8% de mortalidade de lagartas de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae), superando significativamente o extrato aquoso (46,9%) e o hexânico (26,4%). A mesma tendência foi observado por CUNHA (2004) na busca de

substâncias inseticidas sobre *T. absoluta* a partir de extratos aquosos e não aquosos das meliáceas *T. pallida* e *T. pallens*. Dentre os extratos em hexano, diclorometano, e metanol o mais inseticida em ambas as espécies foi o diclorometano, sendo isolados a partir do mesmo triterpenos, esteróides e um limonóide (gedunina) que foram avaliados em bioensaios e também apresentaram bioatividade contra a traça-do-tomateiro.

Diversos autores têm destacado uma relação direta entre o solvente utilizado para a extração e a atividade de meliáceas sobre insetos (ASCHER et al., 1984; MIKOLAJCZACK et al., 1989). ROEL et al. (2000b) estudando o efeito de extratos orgânicos de folhas e ramos de *T. pallida* sobre *Spodoptera frugiperda* observaram que o extrato com menor polaridade (acetônico) foi mais ativo que o mais polar (metanólico), assim como foi observado no presente estudo, onde o extrato em diclorometano (mais apolar) se mostrou mais eficiente que os mais polares (metanólico e etanólico), apesar destes últimos também apresentarem atividade inseticida.

Uma vez determinada dentre as frações testadas de *Koeleria paniculata* a mais inseticida e estimulando sua utilização no combate a *A. gemmatilis*, pode-se esperar uma redução do impacto ambiental dos inseticidas no atual sistema agrícola. Esta redução estará relacionada à mudança do modelo de exploração agrícola, que traz como consequência à substituição do uso de inseticidas convencionais por inseticidas botânicos, dos quais se espera que não alterem substancialmente o equilíbrio ambiental.

Outro aspecto importante é que com a seleção de compostos passíveis de serem elaborados a partir de extrações simplificadas (alcoólica ou aquosa) realizadas no próprio local, isto é, na propriedade rural, haverá economia de recursos para o pequeno produtor, reduzindo sua dependência da aquisição de fórmulas industrializadas, que oneram os custos e a produção.

Percebe-se, assim, que o desenvolvimento de ações de pesquisa no sentido da prospecção e avaliação com atividade inseticida é de grande importância, assim como para a conservação ambiental dos sistemas agroecológicos, onde as frações ativas destas plantas poderão ser utilizadas como inseticidas naturais no manejo integrado de pragas.

## 5. Conclusões

- ◆ Através dos resultados obtidos no bioensaio com KPE 0,15%, pode-se verificar que todas as alterações fortemente relevantes ocorreram na fase larval de *A. gemmatalis*.
- ◆ Foi possível esclarecer a natureza deterrente do extrato e seu principal mecanismo de ação, a atividade tóxica para as larvas alimentadas com KPE, por meio da interpretação dos resultados obtidos referentes aos índices nutricionais quantitativos.
- ◆ KPE 0,15% atua diretamente no sistema digestivo de *A. gemmatalis*, interferindo com a digestão, afetando deste modo o mecanismo de reciclagem enzimática das larvas tratadas com KPE.
- ◆ KPE 0,15% afetou negativamente os parâmetros reprodutivos de *A. gemmatalis*, reduzindo significativamente o número de ovos depositados e em consequência dos efeitos na fecundidade, KPE afetou a fertilidade de *A. gemmatalis*.
- ◆ No bioensaio piloto realizado com os extratos orgânicos de *K. paniculata*, a fração inseticida mais promissora foi o diclorometano, seguido do extrato em metanol e etanol.
- ◆ Deste modo, em função da fácil manipulação, custo, operação e expressiva atividade inseticida o extrato aquoso é o mais recomendável para utilização de pequenos agricultores.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABO EL-GHAR, G. E.S., KHALIL, M. E., EID, T. M. 1996. Some biochemical effects of plant extracts in the black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lep. Noctuidae). **J. Appl. Entomol.** 120, 477-482.

ARRUDA, W., OLIVEIRA, G. M. C., SILVA, I. G. 2003. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 36, 17-25.

ASCHER, K. R. S., ELIYAHU, M., NEMNY, N. E., MEISNER, J. 1984. **Neem seed kernel extract as inhibitor of growth and fecundity in *Spodoptera littoralis*.** In: International Neem Conference 2, Rauischholzhausen, 1984. Natural pesticides from the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other tropical plants. Eschborn: GTZ Press, p. 331-344.

BARBARA, K.A. **Velvetbean caterpillar - *Anticarsia gemmatilis*.** Disponível em: <http://creatures.ifas.ufl.edu/field/velvetbean.htm>. Acesso em: out. 2004.

BOEKE, S. J., BOERSMA, M. G., ALINK, G. M., VAN LOON. J. J. A., VAN HUIS, A, DICKE, M., RIETJENS, M.C.M. 2004. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. **Journal of Ethnopharmacology.** 94, 25–41.

BOGORNÍ, P.C. 2003. **Efeito de extratos aquosos de *Trichilia* spp. Sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em milho.** Piracicaba. 65p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Universidade de São Paulo.

BOIÇA JUNIOR, A. L., MEDEIROS, C. A. M., TORRES, A. L., CHAGAS FILHO, N. R. 2005. Efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de

*Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) em couve. **Arquivos do Insituto Biológico**, São Paulo, **72**, 45-50.

BONATO, P. S.; In **Introdução a Métodos Cromatográficos**; COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L., 3a. ed., Ed. Unicamp, Campinas, São Paulo 1988, p. 143.

BOWN, D. P., WILKINSON, H.S., GATEHOUSE, J.A. 2004. Regulation of expression of genes encoding digestive proteases in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary protease inhibitors. **Physiological Entomology**. 29, 278–290.

BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quanties of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anals of Biochemistry**. **72**, 248-254.

BROADWAY, R. M. & DUFFEY, S. S. 1988. The effect of plant protein quality on insect digestive physiology and the toxicity of plant proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**. 34, 111-111.

BRUNHEROTTO, R., VENDRAMIM, J. D. 2001. Bioatividade de extratos aquosos de *Melia azedarach* L. sobre o desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick). **Neotropical Entomology**. 30, (3), 455-459.

CECHINEL-FILHO, V. 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, 21, (1), 99-105.

CHARLESTON, S. D., KFIR, R., DICKE, M., VET, L. E. M. 2005. Impact of botanical pesticides derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on the

biology of two parasitoid species of the diamondback moth. **Biological Control**. 33, 131–142.

CUBILLO, D., SANABRIA, G., HIJE, L. 1999. Evaluación de la repelencia y mortalidad causadas por insecticidas comerciales y extractos vegetales sobre *Bemisia tabaci*. **Manejo Integrado de Plagas**. 53, 65-71.

CUNHA, U.S. 2004. **Busca de substâncias de *Trichilia pallida* e *Trichilia pallens* (Meliaceae) com atividade sobre a traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep: Gelechiidae)**. Piracicaba, 126p. Tese de doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo

DE LUCA, V., PIERRE, B. 2000 The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. **Trends. Plant. Sci.** 5, 168–173.

DAIGLE, C.J., D.J. BOETHEL, FUXA. J.R. 1990. Parasitoids and pathogens of soybean looper and velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae) in soybeans in Louisiana. **Environmental Entomology**. 19, 746-752.

EDWARDS, P. J.; WRATTEN, S. D. **Ecologia das interações entre insetos e plantas**. São Paulo: EPU, 1981. (Temas de Biologia, 27). 71 p.

EISEMANN, C. H., DONALDSON, R. A., PEARSON, R. D., CADOGAN, L. C., VUOCOLO, T. TELLAM, R. L. 1994. Larvicidal activity of lectins on *Lucilia cuprina*: mechanism of action. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 72, 1–10.

ESCALONA, M. H.; FIALLO, V. R. F.; HERNÁNDEZ, M. M. A.; PACHECO, R. A.; AJA, E. T. P. 2001. **Plaguicidas naturales de origen botánico**. 2. ed. Habana: INIFAT.

FERNANDES, F .F., FREITAS, E. P .S., COSTA, A. C., SILVA, I. G. 2005. Larvicidal potential of *Sapindus saponaria* to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** . 40, 1243-1245

FERNANDES, M. C. A.; RIBEIRO, R. L. D.; AGUIAR-MENEZES, E. L. **Manejo agroecológico de fitoparasitas**. In: AQUINO, A. M. de; ASSIS, R. L. 2005. (Ed.). Agroecologia: Princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, cap. 13. p. 273-322.

FERRI, P.H. 1996. **Química de produtos naturais: métodos gerais**. In: Di Stasi, LC (ED.). Plantas Medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinary. São Paulo: Unesp. Cap.10. p. 129-156

FIRMINO, F., FERNANDES, K.V.S., SALES, M.P., GOMES, V.M., MIRANDA, M.R.<sup>a</sup>, DOMINGUES, S.J.S., XAVIER-FILHO, J. 1996. Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins associate whit putative chitinous structure in the midgut and feces of trh bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. **Braz. J. Biol. Res.** 29, 749-756.

FLINT, M. L.; VAN DEN BOSCH, R. 1981. **Introduction to integrated pest management**. New York: Plenum, 240 p

FUGI, C. G. Q., LOURENÇÃO, A. L., PARRA, J. R. P. 2005. Biology of *Anticarsia gemmatilis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects. **Scientia Agrícola**. 62. (1), 31-35.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. 2002. **Manual de entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 920p.



GATEHOUSE, L. N., SHANNON, A. L., BURGESS, E. P. J., CHRISTELLER, J.T. 1997. Characterisation of major midgut proteinase cDNAs from *Helicoverpa armigera* larvae and changes in gene expression in response to four proteinase inhibitors in the diet. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 27, 929–944.

GILMAN E.F, & WATSON, D.G. 1993. *Koeleria paniculata*, Goldraintree. Document adpted from Fact Sheet ST- 338, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.

GLASER, J.A.; MATTEN, S.R. 2003. Sustainability of insect resistance management strategies for transgenic Bt corn. **Biotechnology Advances**. 22, 45-69.

GÓMEZ, P., CUBILLO, D., MORA, G. A., HIJE, L. 1997. Evaluación de posibles repelentes de *Bemisia tabaci*: II. Extractos vegetales. **Manejo Integrado de Plagas**. 4653, 17-25.

GONÇALES-GERVÁSIO, R. C. R. 2003. **Efeito de extratos de *Trichilia pallida* (Swartz) e *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) e seu parasitóide *Trichogramma pretiosum* Riley**. Piracicaba. 88p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Universidade de São Paulo.

GONÇALVES-GERVÁSIO, R. C. R., VENDRAMIM, J. D. 2004. Modo de ação de extratos de Meliáceas sobre *tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (lepidoptera: Gelechiidae). **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo. 71, (2), 215-224.

HABIBI, J., BACKUS, E. A, HUESISG, J. E., 2000. Effects of phytohemagglutinin (PHA) on the structure of midgut epithelial cells and localization of its binding sites in western tarnished plant bug, *Lygus hesperus* Knight. **J. Insect Physiol.** 46, 611-619.

HAMMAD, E. M. A., NEMER, N. M., HAWI, Z. K., HANNA, L. T. 2000. Responses of the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, to the chinaberry tree (*Melia azedarach* L.) and its extracts. **Annals of Applied Biology**. 137, 79-88.

HAN, M., KIM, S., AHN, Y. J. 2006. Insecticidal and antifeedant activities of medicinal plant extracts against *Attagenus unicolor japonicus* (Coleoptera: Dermestidae). **Journal of Stored Products Research** .42, 15–22.

HAQ, S. K, ATIF S. M, KHAN R. H. 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Arch. Biochem. Biophys.** 431, 145–159.

HARBONE, J.B. 1993 **Introduction to Ecological Biochemistry**, 4<sup>th</sup> edn, Academic Press, London

HOFFMANN-CAMPO, C. B., MOSCARDI, F., CORRÊA-FERREIRA, B. S., OLIVEIRA, I. J., SOSA-GOMEZ, D. R., PANIZZI, A. R., CORSO, L. C., GAZZONI, D. L., OLIVEIRA. 2000. E.B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: Embrapa Soja,. 70 p.

HOSTTETMANN, K., QUEIROZ, E. F., VIEIRA, P. C. 2003 a. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCAR, cap.2, p43-58: A procura dos princípios ativos. (Série de textos da Escola de Verão em Química, 4)

HOSTTETMANN, K., QUEIROZ, E. F., VIEIRA, P. C. 2003 b. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCAR, cap.3, p.59-100: Técnicas de isolamento aplicada aos produtos naturais. (Série de textos da Escola de Verão em Química, 4).

HOSTTETMANN, K., QUEIROZ, E. F, VIEIRA, P. C. 2003 c. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCAR, cap.4, p.101-146. Técnicas

acopladas (CL/UV, CL/EM, CL/RMN). (Série de textos da Escola de Verão em Química, 4).

ISMAN, M. B. 1997. Neem and other botanical insecticides: barriers to commercialization. **Phytoparasitica**, Rehovot, 25, (4), 339- 344.

JAGLAN, M.S., KHOKHAR, K. S., MALIK, M. S, SINGH, R. 1997. Evaluation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) exatrets against american bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner). **Journal os Agricultural and Food Chemistry**. 45, 3263-3268.

KATHRINA, G. A.; ANTONIO, L. O. J. 2004 Controle biológico de insectos mediante extractos botánicos. In: CARBALL, M.; GUAHARAY, F. (Ed.). **Controle biológico de plagas agrícolas**. Managua: CATIE, p. 137-160. (Serie Técnica. Manual Técnico/CATIE, 53).

KOUL, O., SHANKAR, J. S. & KAPIL, R. S. 1996. The effect of neem allelochemicals on nutritional physiology of larval *Spodoptera litura*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. 79, 43-50.

KOUL, O., SINGH, J. M., GOOMBER, S., DANIEWSKI , W. M., BERLOZECKI S. 2004. Activity of some nonazadirachtin limonoids from *Azadirachta indica* against lepidopteran larvae. **Australian Journal of Entomology**. 43, 189–195

LOON, J. J. A. VAN. 2005. Nutritional ecology of insect-/plant interactions: persistent handicaps and the need for innovative approaches. **Opinion** 108, 194-201

LEE, J.H., S.J. JOHNSON AND V.L. WRIGHT. 1990. Quantitative survivorship analysis of the velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae) pupae in soybean fields in Louisiana. **Environmental Entomology**. 19, 978-986.

LIN, W.H., LEI, H.M., FU, H. Z. LI, J. 2002 A new pseudo sesquiterpenoid from the seeds of *Koelreuteria panicula*. **Chinese Chemical Letters**. 13, (11), 1067-1068.

MACEDO, M.L.R, DANIELA, D.C.S., FREIRE, M.G.M., TOYAMA, M.H., MARANGONI, S., NOVELLO, J.C. 2003. Purification and Carachterization of an *N*- Acetylglucosamine-Binding Lectin from *Koelreuteia paniculata* Seeds and Its Effect on the larval Development of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Anagasta kuehniella* (Lepdoptera: Pyralidae). **Journal of Agricultural and Food Chemystry**, 2890-2896.

MARTINS, C.H.Z., 2004. Efeito do extrato aquoso de *Koelreuteria paniculata* Laxm. sobre o desenvolvimento de *Anticarsia gemmatalis* Huebner. (Lepidoptera:Noctuidae). Monografia apresentada para a obtenção do Título de Licenciatura em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

MATOS F. J. A. 1988 **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC. 128p.

MCPHERSON, R.M., BONDARI, K. 1991. Influence of planting date and row width on abundance of velvetbean caterpillars (Lepidoptera:Noctuidae) and southern green stink bugs (Heteroptera:Pentatomidae) in soybean. **Journal of Economic Entomology** .84, 311-316.

MEDEIROS, C. A. M., BOIÇA JÚNIOR, A. L. 2005a. Efeito da aplicação de extratos aquosos em couve na alimentação de lagartas de *Ascia monuste orseis*. **Bragantia**. 4, 633-641.

MEDEIROS, C. A. M.; BOIÇA JUNIOR, A. L.; TORRES, A. L. 2005b. Efeito de extratos aquosos de plantas na oviposição da traça-das-crucíferas, em couve. **Bragantia**. 64, 227- 232.

MENEZES, A., LIMA, E. 2005. **Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola** . Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 58 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 205).

MIKOLAJCZAK, K. L., ZILKOWSKI, B. W., BARTELT, R. J. 1989. Effect of meliaceous seed extracts on growth and survival of *Spodoptera littoralis* (J. E. Smith). **Journal of Chemical Ecology**. 15, (1), 121-128

MOSCARDI, F. & SOSA-GOMEZ D. R. 1992. **Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil**, in Pest management in soybean, ed by Copping LG, Green MB and Rees RT, Elsevier Applied Science, London, pp 98–109

NASCIMENTO, R. I, MURATA, T. A., BORTOLI, S. A., LOPES, L. M. X. 2003. Insecticidal activity of chemical constituents from *Aristolochia pubescens* against *Anticarsia gemmatilis* larvae. **Pest Management Science** 60, 413–416.

NEVES, B. P.; OLIVEIRA, I. T.; NOGUEIRA, J. C. M. 2003. **Cultivo e utilização do nim indiano**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA/CNPAP, 12 p. (Circular Técnica, 62).

OLIVEIRA, M .G., DE SIMONE, S. G., XAVIERA, L. P., GUEDES, R. N. C. 2005. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 140, 369–380.

PAES, N.S., GERHARDT, I.R., COUTINHO, M.V., YOKOYAMA, M., SANTANA, E., HARRIS, N., CHRISPEELS, M.J., GROSSI-DE-SÁ, M.F., 2000. The effect of arcelin-1 on the structure of the midgut of bruchid larvae and immunolocalization of the arcelin protein. **J. Insect. Physiol.** 46, 393-402.

PÉREZ, D., IANNACONE, J. 2004. Efecto insecticida de sachá yoco *Paullinia clavigera* var. *bullata* simpson) (Sapindaceae) y oreja de tigre (*Tradescantia zebrina* hort ex bosse) (Commelinaceae) en el control de *Anopheles benarrochi* gabaldon, cova garcía y lópez, 1941, principal vector de malaria en ucayali, Perú. **Ecología Aplicada**. 3, 1-2.

PERERA, D. R., ARMSTRONG, G., SENANAYAKE, N. (2000). Effect of antifeedants on the diamondback moth (*Plutella xylostella*) and its parasitoid *Cotesia plutellae*. **Pest Management Science** 56, 486–490.

PETERS, W, 1992. **Peritrophic Membranes**. In Zoo Physiology, v.30, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

PICHERSKY E., GANG, D. R. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends in plant science Perspectives**. 5, 1360-1385.

PILON, A. M., OLIVEIRA, M. G. A., GUEDES, R. N. C. 2006. Protein digestibility, protease activity, and post- embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. **Pesticide Biochemistry and Physiology** IN PRESS.

PRATES, H. T., VIANA, P. A., & WAQUIL, J. M. 2003. Atividade de extrato aquoso de folhas de nim (*Azadirachta indica*) sobre *Spodoptera frugiperda*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 38, 437-439.

PRICE, P. W. 1997. **Insect ecology**. New York: John Wiley, 874 p.

RAMIREZ, M. C., TOSCANO, R. A., ARNASON, J, OSMAR, S, CERDA-GARCIA-ROJAS, C. M., MATA, R. 2000. Structure, conformation and absolut

configuration of new antifeedant dolabellanes from *Trichilia trifolia*. **Tetrahedron**. 56, 5058-5091.

RICHARDS, A.G., RICHARDS, P.A., 1997. The peritrophic membranes of insects. **Ann. Rev. Entomol.**, 22, 219-240.

RODRÍGUEZ, H.C. 1995. **Efeito de extratos aquosos de Meliaceae no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**. Piracicaba, 100p. PhD thesis) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

RODRÍGUEZ H., C.; VENDRAMIM, J.D. 1996. Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Manejo Integrado de Plagas**. 42, 14-22.

ROEL, A. R., VENDRAMIM, J. D., FRIGHETTO, R. T. S. 2000a. Efeito do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da lagarta-do-cartucho. **Bragantia**. 59, (1), 53-58.

ROEL, A. R. VENDRAMIM, R. T. S., FRIGHETTO, R. T. S., FRIGHETTO, N. 2000b. Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* (Swartz) (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. 29, (4), 799-808.

SAVOLDI, M. **Ocorrência de lagartas representa uma ameaça à cultura da soja**. Disponível em: <http://www.cnpt.EMBRAPA.br/not0008.htm>. Acesso em: out. 2005.

SAXENA, B.P. 1989. **Insecticides from neem**. In: Arnason, J.T., Philogene, B.J.R., Morand, P. (Eds.), *Insecticides of Plant Origin*. ACS Symposium Series No. 387. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 110–135.

SCHOONHOVEN, L. M., JERMY, T., VAN LOON, J. J. A. 1998. **Insect-/plant biology: from physiology to evolution.** / Chapman and Hall, London

SCHMUTTERER, H., SINGH, R. P. 2002. List of insect pests susceptible to neem products. **In: The Neem Tree *Azadirachta indica* A. Juss. And Other Meliaceous Plants.** Ed. By Schmutterer, H. weinhiem, Germany: VCH Publications, pp.237-252.

SCRIBER, J.M. & SLANSKY, F. Jr. 1981. The nutritional ecology of immature insects. **Annu. Rev. Entomol.** 26, 183-211.

SHIVENDRA, S. 2003. Effects of aqueous extract of neem seed kernel and azadirachtin on the fecundity, fertility and post-embryonic development of the melonfly, *Bactrocera cucurbitae* and the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Applied Entomology.** 127, 540-547.

SIMMONDS, M.S.J., STEVENSON, P.C., PORTER, E.A., VEITCH, N. C. 2001. Insect antifeedant activity of three tetranortriterpenoids from *Trichilia pallida*. **Journal of Natural Products.** 64, 1117-1120.

SOUTHWOOD, T. R. E., HENDERSON, P. A. 2000. **Ecological methods.** 3rd ed. Blackwell Science.

SOMERVILLE, C., SOMERVILLE, S. 1999. Plant functional genomics. **Science.** 285, 380-383.

SOUZA, A. P., VENDRAMIM, J.D. 2004. Bioatividade de extratos orgânicos e aquosos de meliáceas sobre *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo b em tomateiro **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo. 71, (4), 493-497.



STAHL, E., 1888. Pflanzen und Schnecken. Jenaische Zeitschrift f. **Naturwissenschaften**. 22, 557–684.

SUTHERLAND, J. P., BAHARALLY, V., PERMAUL, D. 2002. Use of the botanical insecticide, neem to control the small rice stinkbug *Oebalus poecilus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae) in Guyana. **Entomotropica** 17, 97-101.

SUTIASHVILI, M. G. 2000. Koelreuteria Saponin B From Seeds of *Koelreuteria paniculata*. **Chemistry of Natural Compounds**. 36, (1), p.99

Tecnologias de Produção de soja – região central do Brasil- 2005. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste: Fundação Meredional, 239p. 2004.

TELANG, A., BOOTON, V., CHAPMAN, R. F., WHEELER, D.E. 2001. How female caterpillars accumulate their nutrient reserves. **Journal of Insect Physiology**. 47, 1055–1064.

TELANG, M., SRINIVASAN, A., PATANKAR, A., HARSULKAR, A., JOSHI, V., DAMLE, A., DESHPANDE, V., SAINANI, M., RANJEKAR, P., GUPTA, G. 2003. Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Phytochemistry**. 63, 643–652.

.

TELLMAN, R.L., WIJFFELS, G., WILLADSEN, P., 1999, Peritrophic matrix proteins. **Insect. Biochem. Mol. Biol.** 29, 87-101.

TERRA, W.R., FERREIRA, C., 1994. Insect digestive enzymes properties, compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol.** 109B, 1-62.

TERRA, W.R., 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** 47, 47-61.

THOMAZINI, A. P. B. W., VENDRAMIM, J. D., REGO, M. T. L. 2000. Extratos aquosos de *Trichilia pallida* e a traça-do-tomateiro. **Sci. Agric.** 57, (1), 13-17.

VAN DEN BOSCH, R. 1978. **The pesticide conspiracy. An alarming look at pest control and the people who keep us “hooked” on deadly chemicals.** New York: Doubleday, 226 p.

VENDRAMIM, J. D.; CASTIGLIONI, E. Aleloquímicos, resistência e plantas inseticidas. In: GUEDES, J. C.; DRESTER DA COSTA, I.; CASTIGLIONI, E. 2000. **Bases e técnicas do manejo de insetos.** Santa Maria: UFSM/CCR, DFS,. cap. 8. p. 113-128.

XAVIER, L.P., OLIVEIRA, M.G.A., GUEDES, R.N.C., SANTOS, A.V., DE SIMONE, S.G. 2005. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Eur. J. Entomol.** 102 139–145.

WALDBAUER, G. P. 1968. The consumption and utilization of food by insects. / **Adv. Insect Physiol.** 5, 229-/288.

WEIS, A. E.; BERENBAUM, M. R. 1986. Herbivorous insects and green plants. In: ABRAHAMSON, W. G. **Plant-animal interactions.** New York: McGraw-Hill, p. 123-162.

WEI, X., S.J. JOHNSON, AND A.M. HAMMOND. 1998. Sugar feeding strategy of adult velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology.** 27, 1235-1241.

WHEELER, D. A., ISMAN, M. B. 2001. Antifeedant and toxic activity of *Trichilia Americana* extract against the larvae of *Spodoptera litura*. **Entomologia Experimentalis et Applicata.** 98, 9-16.

WIESBROOK, M. L. 2004. Natural indeed: Are natural insecticides safer and better than conventional insecticides? **Illinois Pesticide Review**, Urbana, 17, (3).