

**ALTERAÇÕES BIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E
ULTRA-ESTRUTURAIS EM *Spodoptera
frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera:
Noctuidae) PROVOCADAS POR EXTRATOS
VEGETAIS E COMPOSTOS FENÓLICOS**

DEJANE SANTOS ALVES

2010

DEJANE SANTOS ALVES

**ALTERAÇÕES BIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E
ULTRA-ESTRUTURAIS EM *Spodoptera
frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera:
Noctuidae) PROVOCADAS POR EXTRATOS
VEGETAIS E COMPOSTOS FENÓLICOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia, área de concentração
em Entomologia Agrícola, para a
obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Geraldo A. Carvalho

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Alves, Dejene Santos.

Alterações biológicas, bioquímicas e ultra-estruturais em
Spodoptera frugiperda (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)
provocadas por extratos vegetais e compostos fenólicos / Dejene
Santos Alves. – Lavras : UFLA, 2010.

100 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Geraldo Andrade de Carvalho.

Bibliografia.

1. Copaíba. 2. Lagarta-militar. 3. Lagarta-do-cartucho. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 595.781

DEJANE SANTOS ALVES

**ALTERAÇÕES BIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E
ULTRA-ESTRUTURAIS EM *Spodoptera
frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera:
Noctuidae) PROVOCADAS POR EXTRATOS
VEGETAIS E COMPOSTOS FENÓLICOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia, área de concentração
em Entomologia Agrícola, para a
obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2010

Prof. Dr. Denilson Ferreira de Oliveira

UFLA

Dr. Ivan Cruz

EMBRAPA

Prof. Dr. Ronald Zanetti Bonetti Folho

UFLA

Prof. Dr. Geraldo Andrade Carvalho
DEN/UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A meu pai (*in memoriam*),
minha mãe e meu irmão,

dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, ao Cristo e ao meu anjo de guarda, pela concessão do dom da vida e presença constante durante essa caminhada.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade concedida. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo auxílio financeiro.

Ao professor Geraldo A. Carvalho, pela orientação, amizade, paciência, compreensão, exemplo e estímulo à pesquisa científica.

Ao professor Denilson F. Oliveira, pelo apoio, orientação, amizade, incentivo e por ter me apresentado ao mundo da pesquisa.

Ao professor Eduardo Alves, por permitir a utilização do Laboratório de Microscopia Eletrônica. À professora Angelita D. Côrrea, por permitir a utilização do Laboratório de Bioquímica.

Aos professores do Departamento de Entomologia, pelos ensinamentos transmitidos durante todo o curso.

Ao professor Ronald Zanetti e Dr. Ivan Cruz pelas valiosas contribuições.

Aos membros do Laboratório de Seletividade, Andréa, Jader, Maurício, Frontino, Rodrigo, Letícia, Jander, Valéria, Natália, Fernanda e Marcelo. Em especial, a Rafaella e ao Matheus, pela ajuda na condução dos experimentos, e ao Stephan e ao Alexandre, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos membros do Laboratório de Produtos Naturais, Viviane, Alan, Willian, Letícia, Marilua e Alaor, pela ótima convivência.

Aos funcionários do Departamento de Entomologia e de Química, pelos bons momentos de convivência. Em especial, a D. Irene, Julinho e Rute, por todo carinho.

À laboratorista Eloísa e ao estagiário Douglas, pelo auxílio nas análises de microscopia eletrônica.

Aos laboratoristas Lamartine e Xulita.

A minha mãe, que nunca mediu esforços para que eu chegasse até aqui.

Ao meu pai que, mesmo não estando de corpo presente, certamente esteve olhando por mim.

Ao meu irmão David, por todo incentivo, carinho e amizade.

A minha irmã Déia, meu cunhado e minhas sobrinhas, Yasmin e Victória, por todo incentivo e carinho.

Ao meu irmão Jean, pelo carinho.

Aos amigos de mestrado Grazielle, Olinto, Juracy, Fabricio, Marília e Fran, pelos ótimos momentos de convivência.

Aos queridos amigos Aline, Flávia, Ney Robson, Mirian, Isabela, Camila e Rafaella, pelos bons ensinamentos, pela agradável companhia e por todo incentivo e amizade.

Aos amigos que, mesmo longe, sempre se fizeram muito presentes na minha vida, Irene, Lucas, Paulo Henrique, Cleide Mara, Edileusa e Hudson.

A Gislaine, agradeço sinceramente pela amizade e a boa vontade em ajudar nos ensaios.

Às amigas Ana Beatriz e Andréa Brasil, pela ótima convivência na república.

Aos irmãos do Centro Espírita Augusto Silva e do Grupo Espírita da Prece, pelo apoio.

Ao Janinho, do Circuito Alternativo, por proporcionar agradáveis momentos de lazer.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Sinceramente agradeço.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	05
ARTIGO 1 Toxicidade de extratos de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. (Fabaceae) para <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).....	08
1 Resumo.....	09
2 Abstract.....	10
3 Introdução.....	11
4 Material e Métodos.....	12
4.1 Criação de <i>S. frugiperda</i>	12
4.2 Coleta e preparo dos extratos vegetais.....	12
4.3 Ensaio biológico com lagartas de primeiro instar de <i>S. frugiperda</i>	13
4.4 Ensaio biológico com lagartas de segundo instar de <i>S. frugiperda</i>	14
4.5 Análise ultra-estrutural dos ovos de <i>S. frugiperda</i>	15
4.6 Quantificação de proteínas nas fezes de <i>S. frugiperda</i>	16
4.7 Determinação da atividade inibitória de tripsina dos extratos das folhas e cascas dos frutos de <i>C. langsdorffii</i>	17
5 Resultados.....	18
5.1 Ensaio biológico com lagartas de primeiro instar de <i>S. frugiperda</i>	18
5.2 Ensaio biológico com lagartas de segundo instar de <i>S. frugiperda</i>	19
5.3 Análise ultra-estrutural dos ovos de <i>S. frugiperda</i>	22
5.4 Quantificação de proteínas nas fezes de <i>S. frugiperda</i>	22
5.5 Determinação da atividade inibitória de tripsina do extrato de <i>A.</i> <i>concolor</i>	23
6 Discussão.....	23
Referências Bibliográficas.....	29
Anexos	36
ARTIGO 2 Efeitos de extratos vegetais e compostos fenólicos sobre características biológicas, bioquímicas e ultra-estruturais de <i>Spodoptera</i> <i>frugiperda</i> (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).....	51
1 Resumo	52
2 Abstract	53
3 Introdução	54
4 Material e Métodos	55

4.1 Coleta e preparo dos extratos.....	55
4.2 Criação dos insetos.....	56
4.3 Efeito dos extratos na biologia de <i>S. frugiperda</i>	56
4.4 Teste de preferência com chance de escolha.....	57
4.5 Efeito dos extratos sobre características nutricionais de <i>S. frugiperda</i> ...	58
4.6 Digestibilidade protéica de <i>S. frugiperda</i> após a ingestão dos extratos...	59
4.7 Determinação da atividade inibitória de tripsina do extrato de <i>A. concolor</i>	59
4.8 Análise ultra-estrutural dos ovos e do intestino médio de <i>S. frugiperda</i>	61
4.9 Extração e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos vegetais.....	61
4.10 Efeito dos compostos fenólicos sobre características biológicas e nutricionais de <i>S. frugiperda</i>	62
5 Resultados e Discussão.....	63
5.1 Efeito dos extratos sobre características biológicas de <i>S. frugiperda</i>	63
5.2 Teste de preferência com chance de escolha.....	64
5.3 Efeito dos extratos sobre fatores nutricionais e digestibilidade protéica de <i>S. frugiperda</i>	65
5.4 Determinação da atividade inibitória de tripsina do extrato de <i>A. concolor</i>	68
5.5 Análise ultra-estrutural dos ovos e do intestino médio de <i>S. frugiperda</i>	69
5.6 Quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos vegetais.....	70
5.7 Efeito dos compostos fenólicos sobre características biológicas e nutricionais de <i>S. frugiperda</i>	70
Referências Bibliográficas.....	74
Anexos	84
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100

RESUMO

ALVES, DeJane Santos. **Alterações biológicas, bioquímicas e ultra-estruturais em *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) provocadas por extratos vegetais e compostos fenólicos.** 2009. 100p. Dissertação (Mestrado em Entomologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, é um inseto polífono, que causa danos a diversas culturas, entretanto, os métodos para seu controle são, muitas das vezes, ineficientes o que justifica a busca por novas formas de manejo. Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de extratos vegetais e compostos fenólicos sobre características biológicas, bioquímicas e ultra-estruturais de *S. frugiperda*. Os extratos vegetais, provenientes das folhas e casca dos frutos, de *Copaifera langsdorffii*, provocaram redução no crescimento, aumento na duração do período de desenvolvimento e na mortalidade, além de afetarem parâmetros relativos à reprodução desse inseto. Ademais, os ovos provenientes de insetos que se alimentaram com esses tratamentos, durante a fase larval, apresentaram anomalias, quando submetidos a análises ultra-estruturais. Destacam-se, ainda, o aumento na excreção de proteínas nas fezes dos insetos e a inibição da atividade de tripsina, em ensaio realizado *in vitro*. Também se constatou que lagartas alimentadas com dieta contendo o extrato de *Actinostemon concolor* apresentaram redução no peso de pupas, prolongamento na fase larval, redução na fecundidade e fertilidade dos adultos, além de alterações em parâmetros nutricionais. Ovos provenientes de adultos nos quais as lagartas foram alimentadas com os extratos de *Palicourea rigida* e *A. concolor* apresentaram anomalias, quando submetidos a análises ultra-estruturais. Crio-fraturas realizadas no intestino médio de lagartas alimentadas com *A. concolor* evidenciaram rupturas nas vilosidades desse inseto. O extrato de *A. concolor* também se mostrou bastante eficiente em reduzir a atividade trípica de *S. frugiperda* em ensaio realizado *in vitro*. Destaca-se, ainda, que *A. concolor* apresentou alta concentração de compostos fenólicos e, quando submetidos a ensaio com *S. frugiperda*, causaram alterações semelhantes às provocadas pelo extrato bruto, tais como redução na sobrevivência, peso das lagartas e pupas, prolongamento da fase larval e alterações nos parâmetros nutricionais. Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam o potencial de *C. langsdorffii* e *A. concolor* para o controle de *S. frugiperda*.

Comitê Orientador: Geraldo A. Carvalho – UFLA (Orientador); Denilson F. Oliveira – UFLA

ABSTRACT

ALVES, Dejana Santos. **Changes biological, biochemical and ultrastructural in *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by plant extracts and phenolic compounds**. 2009. 100p. Dissertation (Master's in Entomology)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The fall armyworm *Spodoptera frugiperda* is a polyphagous insect that causes damage in several crops, methods to control are often inefficient and this justifies the search for new forms of management. Thus, this study was to evaluate the effect of plant extracts and phenolic compounds on biological, biochemical and ultrastructural characteristics of *S. frugiperda*. The plant extracts, made from the leaves and bark of the fruits of *Copaifera langsdorffii* caused a reduction in growth, increase in duration of development, mortality, and affect the parameters for the reproduction of this insect. Moreover, the eggs of insects that fed on these treatments during the larval stage, showed abnormalities when subjected to ultrastructural analysis. Note also the increase in protein excretion in the feces of insects and inhibition of trypsin activity *in vitro* test performed. It can also be observed that larvae fed on diet containing the extract *Actinostemon concolor* showed a reduction in pupal weight, increase in the duration larval phase, reduced fecundity and fertility of adults, and changes in nutritional parameters. Eggs from adults in which the larvae were fed with the extracts of *Palicourea rigida* and *A. concolor* showed abnormalities, when subjected to ultrastructural analysis. Criostructures held in the midgut of larvae fed with *A. concolor* showed breaks in the villi of this insect. The extract of *A. concolor* was also very effective in reducing the trypsin activity of *S. frugiperda* test performed *in vitro*. It can also be evidenced that *A. concolor* showed high concentration of phenolic compounds, which when subjected to the tests with *S. frugiperda* caused changes similar to those caused by the crude extract, such as reduction in survival, weight of larvae and pupae, prolongation of the larval stage and changes in nutritional parameters. The results of this study show the potential of *C. langsdorffii* and *A. concolor* for the control of *S. frugiperda*.

Guidance Committee: Geraldo A. Carvalho – UFLA (Major Professor); Denilson F. Oliveira

INTRODUÇÃO GERAL

A grande biodiversidade terrestre é atribuída, principalmente, aos insetos e às plantas, estimando-se que o número de insetos e angiospermas seja superior a 1 milhão e a 300.000 espécies, respectivamente (Futuyma & Agrawal, 2009).

Os insetos e plantas vêm coevoluindo há milhares de anos e, nesse sentido, o processo de seleção natural favoreceu aquelas plantas que desenvolveram mecanismos de defesa contra o ataque de insetos herbívoros. Tais mecanismos incluem aumento na densidade de tricomas (Kobayashi et al., 2008), emissão de compostos voláteis, que atuam atraindo inimigos naturais (Liu et al., 2009) e produção de metabólitos secundários que afetam a performance dos insetos (Chen, 2008).

Os metabólitos secundários são compostos orgânicos que, geralmente, não estão envolvidos diretamente no crescimento, desenvolvimento e reprodução das plantas (Herbert, 1989). As plantas produzem grande diversidade desses compostos, sendo estimado que o número total exceda a 500.000 (Hadacek, 2002). Dada a enorme diversidade dessas substâncias, os produtos derivados do metabolismo de plantas vêm sendo exaustivamente estudados do ponto de vista de suas atividades biológicas. Os metabólitos secundários são classificados de acordo com a classe química, podendo-se citar como exemplos os compostos fenólicos (taninos, ligninas e flavonoides), alcaloides, glicosídeos cianogênicos e glicosinatos, entre outros envolvidos na proteção da planta contra a herbivoria (Mello & Silva-Filho, 2002).

Os produtos naturais de plantas provocam uma série de efeitos adversos sobre a biologia de insetos o que, por sua vez, pode contribuir para a redução populacional dos mesmos, seja diretamente, a partir do aumento na mortalidade

ou indiretamente, prolongando-se a exposição desses organismos a fatores naturais de mortalidade.

Já foi constatado, por exemplo, que o extrato bruto de *Porteresia coarctata* Takeoka (Poaceae) apresentou forte ação deterrente alimentar para *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). Além disso, também foi verificada redução no conteúdo de proteínas e DNA no tecido adiposo e no intestino médio desse noctuídeo (Ulrichs et al., 2008). Também é possível citar que larvas de *Xanthogaleruca luteola* Mull. (Coleoptera: Chrysomellidae) tratadas com o extrato metanólico de *Artemisia annua* L. (Asteraceae) apresentaram deterrência alimentar, aumento na duração da fase larval, deformação nos adultos, com alterações drásticas na morfologia do sistema reprodutivo feminino e redução na fertilidade e fecundidade. Ademais, os insetos tratados apresentaram níveis de glicose, proteínas, ureia, ácido úrico, alfa-amilase, fosfatase alcalina, alanina amino transferase e aspartato amino transferase significativamente alterados (Shekari et al., 2008). De forma relativamente análoga, extratos provenientes de *Calotropis procera* Ait. (Asclepiadaceae), *Rhazya stricta* Decne. (Apocynaceae) e *Solenostemma argel* (Delile) Hayne (Asclepiadaceae) foram tóxicos para *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae), que apresentaram redução no índice de conversão alimentar e notável atividade sobre as enzimas alimentares amilase e invertase (Abdel-Rahman & Al-Mozini, 2007).

Dentre os produtos naturais derivados de plantas atualmente empregados para o controle de insetos, o nim *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) é um exemplo de sucesso, sendo a planta mais estudada, com efeito comprovado sobre, aproximadamente, 400 espécies de insetos (Martinez, 2002). A atividade biológica do nim foi verificada, inclusive, para a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (Prates et al., 2003), um inseto polífago, de difícil controle, que causa danos a diversas

culturas, sendo considerada praga-chave da cultura no milho no Brasil (Cruz, 1995; Barros et al., 2005). Ademais, vem sendo frequentemente relatada a seleção de populações de *S. frugiperda* resistentes aos pesticidas sintéticos (Yu, 2006; Yu & Mccord Junior, 2007; Virla et al., 2008), justificando-se, assim, estudos que se busquem novas formas de controle para esse inseto-praga.

Nesse sentido, existem vários trabalhos visando avaliar a atividade biológica de produtos naturais sobre *S. frugiperda*. Já foi constatada a eficiência do extrato das folhas de *Trichilia pallens* C. DC. (Meliaceae) em reduzir a sobrevivência larval de *S. frugiperda* (Bogorni & Vendramim, 2003). De forma semelhante, também foi possível citar a não-preferência alimentar de lagartas de *S. frugiperda* por folhas de milho tratadas com óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) (Castro et al., 2006). Destaca-se, ainda, o efeito deterrente alimentar do extrato etanólico de *Rollinia emarginata* (Annonaceae), sobre *S. frugiperda* (Colom et al., 2007). No mesmo sentido, também foi constatado o efeito antialimentar do extrato de folhas de *Croton jatrophoides* Pax. (Euphorbiaceae) sobre a lagarta-do-cartucho do milho (Nihei et al., 2004).

Também foi possível verificar a eficiência de extratos provenientes do fruto verde de *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae), das folhas de *Ruta graveolense* L. (Rutaceae), de folhas e ramos de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) e das folhas de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) no controle de *S. frugiperda* (Santiago et al., 2008). Nesse mesmo contexto, os extratos aquosos de *Talisia esculenta* (A. St.-Hil.) Radlk (Sapindaceae) e *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) mostraram efeito na sobrevivência, no peso das lagartas e na duração da fase larval de *S. frugiperda*. Além disso, as lagartas do tratamento *S. saponaria* apresentaram atividade trípica menor (Santos et al., 2008).

Ainda sobre a atividade biológica de extratos vegetais sobre *S. frugiperda*, foi constatado que o extrato metanólico dos frutos de *Melia*

azedarach L. (Meliaceae) afetou o consumo alimentar desse inseto, reduziu a taxa de crescimento, aumentou o período de desenvolvimento larval, além de acarretar redução no peso das pupas (Breuer & Schmidt, 1995). Nesse sentido, outros trabalhos mostraram que o extrato de *M. azedarach* apresentou inibição na atividade da colinesterase e a ativação de 34% na NADPH-citocromo c redutase de *S. frugiperda* (Breuer et al., 2003).

Tendo em vista o exposto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de extratos vegetais sobre características biológicas, bioquímicas e ultra-estruturais de *S. frugiperda*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAHMAN, H.A.; AL-MOZINI, R.N. Antifeedant and toxic activity of some plant extracts against larvae of cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Khairpur, v.10, n.24, p.4467-4472, Dec. 2007.
- BARROS, R.G.; ALBERNAZ, K.C.; TAKATSUKA, F.S.; CZEPAK, C.; FERNANDES, P.M.; TOFOLI, G.R. Eficiência de inseticidas no controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.35, n.3, p.179-182, jul. 2005.
- BOGORNI, P.C.; VENDRAMIM, J.D. Bioatividade de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.32, n.4, p.665-669, out./dez. 2003.
- BREUER, M.; HOSTE, B.; LOOF, A.; NAQVI, S.N.H. Effect of *Melia azedarach* extract on the activity of NADPH-cytochrome c reductase and cholinesterase in insects. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v.76, n.3, p.99-103, July 2003.
- BREUER, M.; SCHMIDT, G.H. Effect of *Melia azedarach* extract incorporated into an artificial diet on growth, development and fecundity of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lep., Noctuidae). **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, Stuttgart, v.103, n.6, p.171-194, Dec. 1995.
- CASTRO, D.P.; CARDOSO, M.G.; MORAES, J.C.; SANTOS, N.M.; BALIZA, D.P. Não-preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepdoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.8, n.4, p.27-32, out. 2006.
- CHEN, M.S. Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. **Insect Science**, Elmsford, v.15, n.2, p.101-114, Apr. 2008.
- COLOM, O.A.; POPICH, S.; BARDON, A. Bioactive constituents from *Rollinia emarginata* (Annonaceae). **Natural Product Research**, London, v.21, n.3, p.254-259, Mar. 2007.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA CNPMS, 1995. 45p.

FUTUYMA, D.J.; AGRAWAL, A.A. Macroevolution and the biological diversity of plants and herbivores. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.106, n.43, p.18054-18061, Oct. 2009.

HADACEK, F. Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.21, n.1, p.273-322, July/Aug. 2002.

HERBERT, R.B. **The biosynthesis of secondary metabolites**. 2.ed. London: Chapman & Hall, 1989. 231p.

KOBAYASHI, S.; ASAI, T.; FUJIMOTO, Y.; KOHSHIMA, S. Anti-herbivore structures of *Paulownia tomentosa*: morphology, distribution, chemical constituents and changes during shoot and leaf development. **Annals of Botany**, London, v.101, n.7, p.1035-1047, Mar. 2008.

LIU, Y.H.; LIU, D.L.; AN, M.; FU, Y.L.; ZENG, R.S.; LUO, S.M.; WU, H.; PRATLEY, J. Modelling tritrophic interactions mediated by induced defence volatiles. **Ecological Modelling**, Netherlands, v.220, n.23, p.3241-3247, Dec. 2009.

MARTINEZ, S.S. **O nim-*Azadirachta indica***: natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, 2002. 142p.

MELLO, M.O.; SILVA-FILHO, M.C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.14, n.2, p.71-81, May/Aug. 2002.

NIHEL, K.I.; ASAKA, Y.; MINE, Y.; ITO, C.; FURUKAWA, H.; MOTOHARU, J.I.; KUBO, I. Insect antifeedants from tropical plants: structures of dummin and dumsenin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.52, n.11, p.3325-3328, May 2004.

PRATES, H.T.; VIANA, P.A.; WAQUIL, J.M. Atividade de extrato aquoso de folhas de nim (*Azadirachta indica*) sobre *Spodoptera frugiperda*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.3, p.437-439, mar. 2003.

SANTIAGO, G.P.; PÁDUA, L.E.M.; SILVA, P.R.R.; CARVALHO, E.M.S.; MAIA, C.B. Efeitos de extratos de plantas na biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) mantida em dieta artificial. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.3, p.792-796, maio/jun. 2008.

SANTOS, W.L.; FREIRE, M.G.M.; BOGORNÍ, P.C.; VENDRAMIM, J.D.; MACEDO, M.L.R. Effect of the aqueous extracts of the seeds of *Talisia esculenta* and *Sapindus saponaria* on fall armyworm. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.51, n.2, p.373-383, Mar./Apr. 2008.

SHEKARI, M.; SENDI, J.; ETEBARI, K.; ZIBAEI, A.; SHADPARVAR, A. Effects of *Artemisia annua* L. (Asteraceae) on nutritional physiology and enzyme activities of elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* Mull. (Coleoptera: Chrysomellidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v.91, n.1, p.66-74, May 2008.

ULRICH, C.; MEWIS, I.; ADHIKARY, S.; BHATTACHARYYA, A.; GOSWAMI, A. Antifeedant activity and toxicity of leaf extracts from *Porteresia coarctata* Takeoka and their effects on the physiology of *Spodoptera litura* (F.). **Journal Pest Science**, Berlin, v.81, n.2, p.79-84, June 2008.

VIRLA, E.G.; ÁLVAREZ, A.; LOTO, F.; PERA, L.M.; BAIGORÍ, M. Fall armyworm strains (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina, their associate host plants and response to different mortality factors in laboratory. **Florida Entomologist**, Gainesville, v.91, n.1, p.63-69, Mar. 2008.

YU, S.J. Insensitivity of acetylcholinesterase in a field strain of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v.84, n.2, p.135-142, Feb. 2006.

YU, S.J.; MCCORD JUNIOR, E. Lack of cross-resistance to indoxacarb in insecticide-resistant *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Pest Management Science**, London, v.63, n.1, p.63-67, Jan. 2007.

ARTIGO 1

Toxicidade de extratos de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae) para

Spodoptera frugiperda (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

(O artigo 1 será transcrito para língua inglesa e encaminhado para publicação no

Periódico Científico Journal of Insect Science)

1 RESUMO

Toxicidade de extratos de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae) para *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

A lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* é um inseto polífono que causa prejuízos a diversas culturas, tais como milho e algodão. Os métodos atualmente disponíveis para o seu controle são, muitas das vezes, ineficientes, acarretando vários efeitos adversos, como a seleção de populações de insetos resistentes e contaminação ambiental. Nesse contexto, extratos de plantas mostram-se como uma alternativa bastante promissora para uso no manejo de pragas agrícolas. Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a toxicidade de extratos de *Copaifera langsdorffii* para *S. frugiperda*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento, sendo cada parcela constituída por seis lagartas mantidas individualizadas. Extratos metanólicos provenientes das folhas e das cascas, sementes e polpa dos frutos de *C. langsdorffii* foram incorporados à dieta artificial e oferecidos a lagartas de primeiro instar de *S. frugiperda*, em condições de laboratório. Os extratos oriundos das folhas e das cascas dos frutos de *C. langsdorffii* foram os mais tóxicos para *S. frugiperda*. Dessa maneira, esses tratamentos foram adicionados em dieta artificial e empregados em novos ensaios com lagartas de segundo instar de *S. frugiperda*. Foi constatado que os extratos vegetais causaram redução no crescimento das lagartas, aumento na duração do período de desenvolvimento e mortalidade. A fertilidade e a fecundidade dos adultos também foram afetadas pelos extratos. Ocorreu menor viabilidade dos ovos para os tratamentos nos quais as lagartas foram alimentadas com os extratos das folhas e cascas. Ademais, tais ovos, quando submetidos a análises ultra-estruturais, sob microscópio eletrônico de varredura, apresentaram anomalias nas regiões aeropilar e micropilar. Destaca-se, ainda, que os tratamentos com extratos das folhas e cascas de *C. langsdorffii* aumentaram a excreção de proteínas nas fezes dos insetos e inibiram a atividade de tripsina, em ensaio realizado *in vitro*.

Palavras-chave: copaíba, lagarta-militar, produtos naturais

2 ABSTRACT

Toxicity of extracts from *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae) to *Spodoptera frugiperda*

The fall armyworm *Spodoptera frugiperda* is a polyphagous insect that causes damage to various crops, such as, corn and cotton. The methods currently available for its control are often inefficient, leading to various adverse effects, such as selection of resistant insect and behaviour contamination. In this context, plant extracts are shown as a promising alternative for use in the management of agricultural pests. The objective of this study was to evaluate the toxicity of extracts of *Copaifera langsdorffii* for *S. frugiperda*. The experimental design was completely randomized with six replicates per treatment, each plot had six caterpillars kept individually. Methanolic extracts from the leaves and peels, seeds and pulp of the fruits of *C. langsdorffii* were incorporated into artificial diet and offered to first instar larvae of *S. frugiperda* in laboratory conditions. It was observed that extracts derived from leaves and fruit peels of *C. langsdorffii* were more toxic to *S. frugiperda*. Thus, these extracts added to artificial diet and used in further experiments on second instar larvae of *S. frugiperda*. The plant extracts caused a reduction in growth of larvae, increased duration of development and mortality. The fertility and fecundity of adults also were affected by the extracts. It was also observed lower viability of eggs to treatments in which larvae were treated with extracts of leaves and fruit peels. Moreover, such eggs when subjected to ultrastructural analysis under a scanning electron microscope showed abnormalities in aeropylar and micropylar regions. Note also the treatments with extracts of leaves and fruit peels of *C. langsdorffii* increased excretion of protein in the feces of insects and inhibited the activity of trypsin in vitro test performed.

Key words – copaiba, fall armyworm, natural products

3 INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* é um inseto polífago, amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais das Américas (Andrews, 1988), causando prejuízos a diversas culturas, como, por exemplo, milho e algodão. O método de controle químico, geralmente utilizado para o controle desse inseto, vem favorecido a seleção de populações de insetos resistentes aos pesticidas (Yu, 2006; Yu & McCord Junior, 2007; Virla et al., 2008), o que justifica a busca por novas moléculas para o controle de *S. frugiperda*.

No contexto de busca por novas moléculas ativas contra insetos, as fabáceas se destacam como uma das famílias botânicas com maior número de plantas com atividade inseticida. Um dos primeiros inseticidas botânicos utilizados, a rotenona, foi isolado de uma espécie de planta pertencente a essa família (Morallo-Rejesus, 1986). Dentre os efeitos provocados por fabáceas sobre insetos, podem-se destacar redução na oviposição e na sobrevivência (Okwute et al., 2009), interrupção no crescimento e malformações nos insetos (Innocent et al., 2008) e inibição de enzimas digestivas (Ramos et al., 2008). Quanto à inibição de processos enzimáticos, moléculas capazes de inativar a enzima tripsina de insetos já foram isoladas de vários gêneros de plantas da família Fabaceae (Gomes et al., 2005; Oliveira et al., 2007; Macedo et al., 2009).

Nesse sentido, *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae) apresenta-se como uma alternativa bastante promissora para ser utilizada no controle de insetos, haja vista que essa espécie possui relato de atividade tóxica contra outros insetos (Mendonça et al., 2005). Vale ainda ressaltar que Krauchenco et al. (2001) isolaram de suas sementes inibidores de proteinases.

Assim, as hipóteses desse trabalho são: os extratos provenientes das folhas, casca, polpa e semente dos frutos de *C. langsdorffii* apresentam efeitos

letais e/ou subletais às lagartas de primeiro instar de *S. frugiperda*; os extratos oriundos das folhas e cascas dos frutos de *C. langsdorffii* alteram parâmetros biológicos e reprodutivos de *S. frugiperda*; a alimentação dos insetos com os extratos das folhas e cascas dos frutos de copaíba, durante a fase jovem, provoca alterações ultra-estruturais nos ovos provenientes desses adultos; a ingestão dos extratos, provenientes das folhas e cascas dos frutos de copaíba pelas lagartas, causa aumento na excreção de proteínas das fezes desse inseto e os extratos das cascas e folhas de *C. langsdorffii* podem provocar inibição na atividade da enzima tripsina de *S. frugiperda*.

Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de extratos provenientes de diferentes estruturas de *C. langsdorffii* sobre parâmetros biológicos, bioquímicos e ultra-estruturais de lagartas de *S. frugiperda*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Criação de *S. frugiperda*

Todos os insetos utilizados nos experimentos foram provenientes de criação de laboratório, em que as lagartas foram alimentadas com dieta artificial (Greene et al., 1976) e os adultos receberam como alimento solução aquosa de mel a 10%. Para a montagem dos experimentos, foram utilizadas lagartas provenientes de segunda postura.

4.2 Coleta e preparo dos extratos vegetais

O material botânico foi coletado no campus da Universidade Federal de Lavras, MG, durante o mês de agosto às 9h00, tendo as amostras foram encaminhadas para identificação e a exsiccata depositada no Herbário ESAL, sob o número 05437.

Para o preparo dos extratos, os tecidos vegetais provenientes das folhas, cascas, polpas e sementes dos frutos de *C. langsdorffii* foram picados, macerados em metanol e filtrados utilizando-se algodão hidrófilo. Ao resíduo foi adicionado mais metanol, sendo esse procedimento repetido até que a fase líquida apresentasse coloração bem clara, evidenciando o término da extração. As fases líquidas foram combinadas e concentradas em evaporador rotatório até a completa eliminação do solvente e, em seguida, foram liofilizadas, dando origem aos extratos vegetais.

4.3 Ensaio biológico com lagartas de primeiro instar de *S. frugiperda*

Os extratos vegetais foram previamente solubilizados em solução aquosa de Tween 80 a 1% e incorporados à dieta artificial de Greene et al. (1976), na concentração de 1.000 ppm. A incorporação dos extratos foi realizada ao final do preparo da dieta, quando esta atingiu temperatura próxima a 55°C, a fim de se evitar a degradação de possíveis compostos presentes nos extratos. Os pedaços de dieta foram previamente pesados e transferidos para recipientes plásticos de 50 ml, em que foi inoculada uma lagarta recém-eclodida. Alíquotas da dieta permaneceram nas mesmas condições em que o experimento foi conduzido, a fim de se estimar a perda de água.

Os tratamentos foram constituídos da dieta acrescida dos extratos de folhas, polpa dos frutos, casca dos frutos ou sementes de *C. langsdorffii*. Como tratamentos controle foram adotadas dietas acrescidas de água ou de solução aquosa de Tween 80 a 1%. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e seis repetições, sendo cada parcela constituída de seis lagartas que foram mantidas individualizadas, totalizando 36 insetos por tratamento.

Os parâmetros biológicos avaliados foram sobrevivência durante a fase larval, a cada três dias; peso e consumo alimentar das lagartas após sete dias da montagem do experimento; duração do período larval; duração, peso e sobrevivência de pupas.

Para o cálculo do consumo alimentar foi utilizado fator de correção para perda de água: $[1-a/2][W-(L+bL)]$, em que a = peso inicial da alíquota da dieta; b = média de perda de peso da alíquota; W = peso da dieta introduzida e L = peso da dieta não comida (Cohen, 2004).

Os valores referentes ao consumo e ao peso das lagartas após sete dias de alimentação com os extratos e os parâmetros duração das fases larval e pupal, peso e sobrevivência dos insetos na fase pupal foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, utilizando-se o pacote Mvnormteste do software R® (R Development Core Team, 2009) para verificar a normalidade dos dados. Em seguida, os dados foram submetidos à ANOVA e ao teste de Scott-Knott, utilizando-se o pacote Laercio do software R® (R Development Core Team, 2009). Os dados associados à sobrevivência dos insetos, durante a fase larval, foram submetidos à análise de sobrevivência, aplicando-se o modelo de Weibull, por meio do pacote Survival do software R® (R Development Core Team, 2009). Após a seleção do modelo matemático mais adequado por meio da análise de resíduos, realizou-se a análise de contraste para verificar a semelhança entre os tratamentos empregados e a formação de grupos congêneres. Também foram calculados os tempos letais 50 (TL50) para cada grupo formado.

4.4 Ensaio biológico com lagartas de segundo instar de *S. frugiperda*

Os extratos provenientes das folhas e das cascas dos frutos de *C. langsdorffii* foram solubilizados em solução aquosa de Tween 80 a 1% e incorporados à dieta artificial, nas concentrações de 300, 600, 1.000 e 1.300 ppm. Os pedaços de dieta foram transferidos para recipiente plástico de 50 mL,

em que foi inoculada uma lagarta de segundo instar, com três dias de vida, mantida previamente em dieta artificial. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos, dieta contendo extrato das folhas ou das cascas dos frutos de *C. langsdorffii*, nas concentrações de 300, 600, 1.000 e 1.300 ppm. Como tratamentos controles foram utilizadas dietas acrescidas de água ou de solução aquosa de Tween 80 a 1%. Para cada tratamento foram empregadas seis repetições, sendo a parcela experimental constituída de seis lagartas mantidas individualizadas. Foram conduzidos experimentos separados para os extratos provenientes das folhas e para os oriundos das cascas do fruto de *C. langsdorffii*.

Para a construção da curva de crescimento das lagartas, os insetos foram pesados após sete dias da realização do experimento, tendo as pesagens subsequentes sido realizadas a cada dois dias, até o 17º dia após a montagem do experimento. Avaliaram-se também a sobrevivência acumulada e a duração da fase larval, a duração e a sobrevivência na fase pupal, o peso das pupas e a razão sexual dos adultos ($rs = n^\circ \text{ de fêmeas} / n^\circ \text{ de fêmeas} + n^\circ \text{ de machos}$).

Por ocasião da emergência dos adultos, cinco casais de cada tratamento foram individualizados e mantidos em gaiola de PVC (10 cm de altura x 10 cm de diâmetro). Tais insetos foram alimentados com solução aquosa de mel a 10%. A longevidade dos adultos foi determinada por meio de observações diárias e as posturas foram recolhidas diariamente para quantificação. Aquelas provenientes do segundo dia de postura de cada casal foram utilizadas para a determinação da viabilidade e as referentes ao terceiro dia de postura, encaminhadas para observação em microscópio eletrônico de varredura, com o objetivo de constatar anomalias morfológicas nas superfícies dos ovos. Também foram registrados os períodos de pré-oviposição e oviposição.

Os valores associados à curva de crescimento das lagartas foram analisados pelo pacote drc do software R® (R Development Core Team, 2009),

utilizando-se o modelo logístico e teste de Lack-of-fit. No que se refere aos parâmetros sobrevivência acumulada e duração da fase larval, duração e sobrevivência na fase pupal, peso das pupas, razão sexual dos adultos, períodos de pré-oviposição e oviposição, longevidade de machos e fêmeas, número de ovos por fêmeas e viabilidade dos ovos, os dados foram submetidos à ANAVA, conforme descrito anteriormente e as médias, seguidas do desvio padrão (SD), foram apresentadas por meio de estatística descritiva, utilizando-se o pacote gplots do software R (R Development Core Team, 2009).

4.5 Análise ultra-estrutural dos ovos de *S. frugiperda*

Os ovos da terceira postura, provenientes dos casais de *S. frugiperda* obtidos no ensaio com lagartas de segundo instar, foram submetidos à análise ultra-estrutural em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Para análise do material, utilizou-se o protocolo padrão para amostras biológicas, de acordo com Alves (2004). Inicialmente, os ovos foram fixados com Karnovsky, por 24 horas. Em seguida, foi realizada uma pós-fixação com solução de tetróxido de ósmio 1% (g/mL) em tampão cacodilato 0,05M. A amostra foi então lavada com água destilada e desidratada com soluções aquosas de concentração crescente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%). Posteriormente, foram submetidas à secagem utilizando-se o aparelho de Ponto Crítico Balzers CPD 030. Após a secagem, foram montadas em stubs de alumínio e levadas ao evaporador de ouro SCD 050 da Balzers. Terminado o preparo, amostras foram observadas no MEV Leo Evo 40. O software utilizado para a geração das imagens foi o Leo User Interface.

4.6 Quantificação de proteínas nas fezes de *S. frugiperda*

As fezes provenientes das lagartas de segundo instar empregadas no bioensaio anterior foram coletadas, por ocasião da pupação, e agrupadas para

formarem amostras compostas, sendo cada amostra formada pelas fezes de uma parcela experimental. As amostras foram liofilizadas e alíquotas foram retiradas para a extração de proteínas, de acordo com o método adaptado de Ferreira et al. (2008). Em seguida, os extratos proteicos tiveram o teor de proteína quantificado por meio do método de Bradford (1976). A concentração proteica das amostras foi determinada espectrofotometricamente a 594 nm, tomando-se como base uma curva padrão de albumina de soro bovina, ou BSA, com concentrações de proteína variando de 2 a 20 µg. Para cada amostra composta foram realizadas três extrações e as leituras realizadas em triplicata. Os dados foram submetidos ao teste de F e análise de regressão, utilizando-se o software R (R Development Core Team, 2009).

4.7 Determinação da atividade inibitória de tripsina dos extratos das folhas e cascas dos frutos de *C. langsdorffii*

As enzimas digestivas foram obtidas de acordo com o método adaptado de Oppert et al. (2005). Para isso, lagartas de 4º instar de *S. frugiperda*, mantidas em criação de laboratório, foram imobilizadas em gelo. Em seguida, a extremidade anterior e a posterior foram removidas e o intestino retirado. O intestino foi, então, macerado em homogenizador tipo Potter, na proporção de dois intestinos para 8 mL de água destilada a 4°C. Após a maceração, o homogeneizado foi filtrado em tela de náilon de 100 micrômetros e centrifugado a 30.000 x g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante consistiu no extrato enzimático utilizado nos ensaios de inibição de tripsina.

A inibição de tripsina foi determinada pela medição da atividade enzimática residual para o substrato N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA), na comparação em um ensaio cinético com quatro períodos de tempo (Erlanger et al., 1961; Kakade, 1974).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e os tratamentos empregados consistiram do extrato de folhas de *C. langsdorffii*, nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 ppm e do extrato oriundo da casca dos frutos de *C. langsdorffii*, nas concentrações de 75, 125, 250, 500 e 1.000 ppm, determinadas a partir de ensaios prévios. Como tratamentos controle, a reação procedeu na ausência e na presença do inibidor, enzima e substrato. Para isso, cada tubo com 200 µL do extrato enzimático foi incubado com o mesmo volume do extrato bruto de *C. langsdorffii*, previamente solubilizado em metanol. Em seguida, foi adicionado o substrato BAPNA, na concentração de 0,87 mM, preparado em DMSO e tampão Gly-NaOH 0,1 M, pH 9,7. A reação procedeu a 30°C e, após o período de tempo de 30, 60, 90 e 120 minutos, a reação foi interrompida com solução de ácido acético a 30%. Foram utilizadas quatro repetições, sendo cada uma representada por um tubo de vidro.

Os resultados foram expressos em percentagem de inibição de tripsina, por meio da comparação da velocidade de reação nos controles e nos tratamentos com extratos. A análise dos dados foi feita por meio do teste de F e de análise de regressão, por meio do software R (R Development Core Team, 2009).

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio biológico com lagartas de primeiro instar de *S. frugiperda*

O extrato proveniente das folhas de *C. langsdorffii* foi o mais tóxico às lagartas de *S. frugiperda*, apresentando TL50 de 13,17 dias, provocando mortalidade de 73,4% após o término do período de avaliação. Os insetos alimentados com os extratos provenientes das sementes, polpa e casca dos frutos de *C. langsdorffii* apresentaram mortalidade de aproximadamente 34% ao término da avaliação, com TL50 de 43,49 dias (Figura 1B).

O consumo alimentar das lagartas de *S. frugiperda*, após sete dias de alimentação, não foi afetado pelos extratos vegetais, com médias variando de 491,3±23,65 a 596,4±32,56 mg. Entretanto, os insetos que se desenvolveram em dieta contendo os extratos provenientes das sementes e cascas dos frutos de *C. langsdorffii* apresentaram pesos médios, respectivamente, 1,62 e 4,29 vezes menores do que aqueles alimentados com dieta contendo o controle Tween (Tabela 1A).

Os extratos provenientes das sementes, casca e polpa dos frutos de *C. langsdorffii* provocaram aumento na duração da fase larval de *S. frugiperda*. Contudo, esses tratamentos não causaram efeitos sobre os parâmetros duração da fase pupal, peso de pupas e sobrevivência na fase pupal desse noctuídeo (Tabela 2A).

5.2 Ensaio biológico com lagartas de segundo instar de *S. frugiperda*

Houve redução na percentagem de sobrevivência acumulada das lagartas de *S. frugiperda* ($F=5,5425$; $p\leq 0,0010$), tendo as médias nos tratamentos controle, água e Tween sido, respectivamente, de 97,2±5,44 e 86,1±6,21, ao passo que, nos tratamentos com o extrato das cascas dos frutos de *C. langsdorffii*, as médias variaram de 63,9±16,38 a 80,6±19,48. Foi constatado prolongamento médio da fase larval nos insetos alimentados com o extrato das cascas dos frutos de copaíba de 2,6 dias, quando comparado com os tratamentos controle ($F=12,2750$; $p\leq 0,0013$). No que se refere ao parâmetro peso de pupas, as médias foram de 258,4±12,05 e 263,0±5,03 nas testemunhas, água e Tween e, nos tratamentos com o extrato, os valores variaram de 233,0±10,82 a 248,2±19,76 ($F=3,6754$; $p\leq 0,0103$). A duração da fase pupal nos controles apresentou médias de 10,1±0,89 e 10,5±0,53, enquanto nos tratamentos com o extrato os valores médios variaram de 10,9±0,87 a 11,5±0,45 ($F=4,0135$; $p\leq 0,0066$). Não foram observadas diferenças para a sobrevivência dos insetos

durante a fase pupal ($F=1,1274$; $p\leq 0,3673$) e para a razão sexual dos adultos ($F=1,1274$; $p\leq 0,3673$) (Figura 2B).

No ensaio com o extrato das folhas de *C. landsdorffii*, a sobrevivência acumulada dos insetos na fase larval apresentou valores médios de $97,2\pm 6,80$ e de $94,4\pm 8,60$ nas testemunhas, água e Tween, respectivamente, ao passo que, nos tratamentos com o extrato, as médias variaram de $36,7\pm 18,26$ a $80,5\pm 12,54$ ($F=11,1090$; $p\leq 0,0000$). Os tratamentos controle, água e Tween apresentaram médias para duração da fase larval de $19,6\pm 1,23$ e $20,0\pm 1,53$, respectivamente, ao passo que, nos tratamentos com diferentes concentrações do extrato das folhas, as médias variaram de $23,0\pm 1,09$ a $30,9\pm 4,15$ ($F=34,9780$; $p\leq 0,0000$). O peso de pupas apresentou médias de $245,3\pm 20,5$ e $258,1\pm 9,67$ nas testemunhas e, nos tratamentos com o extrato, os valores variaram de $197,2\pm 16,54$ a $240,2\pm 14,9$ ($F=12,1270$; $p\leq 0,0000$). Não foram constatadas diferenças nos parâmetros sobrevivência na fase pupal ($F=0,5778$; $p\leq 0,6814$) e razão sexual dos adultos ($F=1,4430$; $p\leq 0,2493$) (Figura 3B).

No que se refere à curva de crescimento com as lagartas alimentadas com o extrato das folhas de *C. langsdorffii*, a análise de contraste permitiu a formação de quatro grupos. O primeiro era formado pelas testemunhas água e Tween, com peso máximo médio de $0,4894$ g e o segundo, formado pelos tratamentos com o extrato das folhas nas concentrações de 300 e 600 ppm, apresentou peso máximo médio de $0,2475$ g. As concentrações de 1.000 e 1.300 ppm diferiram entre si, com peso máximo de $0,1414$ e $0,0649$ g, respectivamente. Quanto ao extrato das cascas dos frutos de *C. langsdorffii*, também foi possível a formação de quatro grupos, sendo o primeiro constituído pelas testemunhas água e Tween, com peso máximo médio de $0,4951$ g. As lagartas alimentadas com extrato nas concentrações de 300 e 600 ppm apresentaram peso máximo médio de $0,3934$ g. O tratamento com extrato nas

concentrações de 1.000 e 1.300 ppm propiciou peso máximo médio de 0,3303 e 0,2965 g, respectivamente (Figura 4B).

As lagartas que se alimentaram da dieta contendo os extratos das cascas dos frutos de *C. langsdorffii*, nas concentrações de 1.000 e 1.300 ppm, originaram adultos que apresentaram médias do período de pré-oviposição de $4,3 \pm 0,96$ e $3,5 \pm 0,58$, respectivamente, ao passo que, nas testemunhas, as médias foram de $2,5 \pm 0,57$ e $2,8 \pm 0,5$, para água e Tween, respectivamente ($F=5,6571$; $p \leq 0,0026$). No que se refere ao período de oviposição, as médias variaram de $8,2 \pm 0,96$ a $8,3 \pm 0,74$, nos tratamentos controle e de $5,3 \pm 1,89$ a $6,5 \pm 1,91$ nos tratamentos com extratos ($F=2,4159$; $p \leq 0,0765$). A longevidade de machos ($F=1,3500$; $p \leq 0,2888$) e fêmeas ($F=1,6848$; $p \leq 0,1892$) não foi afetada por esse tratamento. O período de oviposição e o número de ovos por fêmea foram reduzidos por todas as concentrações avaliadas. O número de ovos por fêmea variou de $1.579,8 \pm 375,34$ a $1.628,8 \pm 35,54$, nas testemunhas Tween e água, respectivamente, e $895,5 \pm 112,75$ a $1.206,6 \pm 127,08$, nos tratamentos com o extrato das cascas de copaíba. A viabilidade dos ovos nos tratamentos controle foi de $84,2 \pm 9,86$ e $83,1 \pm 9,71$, para água e Tween, respectivamente, ao passo que, no tratamento com o extrato, as médias variaram de $56,8 \pm 9,33$ a $69,0 \pm 6,28$ ($F=4,6188$; $p \leq 0,0043$) (Figura 5B).

No ensaio com o extrato das folhas de *C. langsdorffii*, foi constatado que não ocorreram alterações nos parâmetros período de pré-oviposição ($F=0,7143$; $p \leq 0,5919$), oviposição ($F=0,7788$; $p \leq 0,5520$) e longevidade de fêmeas ($F=2,4344$; $p \leq 0,0809$) e machos ($F=1,6595$; $p \leq 0,1988$). Entretanto, as fêmeas apresentaram redução na fecundidade ($F=7,6818$; $p \leq 0,0006$), tendo sido constatado que as médias para número de ovos nas testemunhas, água e Tween, foram de $1.895,4 \pm 285,99$ e $1.969,0 \pm 518,20$, respectivamente, ao passo que, nos tratamentos com extrato, as médias variaram de $1.008,4 \pm 489,86$ a $1.073,6 \pm 179,40$. Esse tratamento também causou redução na viabilidade dos

ovos, com médias oscilando entre $53,5 \pm 2,75$ a $84,5 \pm 7,93$ ($F=13,6150$; $p \leq 0,0000$) (Figura 6B).

5.3 Análise ultra-estrutural dos ovos de *S. frugiperda*

Os ovos das fêmeas de *S. frugiperda* oriundas de lagartas que foram alimentadas com dieta contendo os extratos das folhas de *C. langsdorffii* apresentaram descamações na superfície da região micropilar e areopilar do córion (Figura 7B). Já os tratamentos com os extratos das cascas de *C. langsdorffii* provocaram rachaduras e deposição anormal de material no córion dos insetos (Figura 8B).

5.4 Quantificação de proteínas nas fezes de *S. frugiperda*

A concentração de proteínas nas fezes das lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com extrato das cascas de copaíba aumentou de acordo com a concentração do extrato, variando de 2,99 a 4,32 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ($F=57,6000$; $p \leq 0,0000$). Não houve diferença na concentração de proteínas nas fezes das lagartas alimentadas com dieta acrescida de água e de Tween ($F=0,0686$; $p \leq 0,7988$), sendo as concentrações médias de 2,61 e 2,57 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente. De forma análoga, foi verificada correlação entre o aumento na concentração do extrato das folhas de copaíba e a excreção de proteínas nas fezes dos insetos ($F=130,9$; $p \leq 0,0000$), com médias variando de 2,83 a 3,90 $\mu\text{g}/\text{mg}$ nos tratamentos com o extrato. No que se refere às testemunhas, água e Tween, as médias foram, respectivamente, de 2,35 e 2,41 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ($F=0,1628$; $p \leq 0,6951$) (Figura 9B).

5.5 Determinação da atividade inibitória de tripsina dos extratos das folhas e cascas dos frutos de *C. langsdorffii*

Os extratos das cascas dos frutos de *C. langsdorffii*, nas concentrações de 75 a 1.000 ppm, causaram inibição na faixa de 4,7% a 37,7% na atividade de tripsina de *S. frugiperda* (F=211,7000; p≤0,0000). A inibição na atividade dessa enzima também foi constatada para os extratos das folhas de *C. langsdorffii* que, nas concentrações de 25 a 400 ppm, apresentaram médias de 11,8% a 46,3% (F=158,3000; p≤0,0000) (Figura 10B).

6 DISCUSSÃO

Estudos a respeito da atividade inseticida de *C. langsdorffii* são escassos. Contudo, já foi relatado o efeito do óleo de copaíba sobre a mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) (Mendonça et al., 2005). Também já foi constatado que outras espécies de plantas, pertencentes ao gênero *Copaifera*, apresentam atividade inseticida, como, por exemplo, a espécie *Copaifera reticulata* Ducke (Fabaceae), da qual foram isolados os diprtenos 3-β-acetoxilabd-8 (17)-13-dien-15-oico e ácido alepterólico, que apresentaram efeito sobre a sobrevivência de larvas de *A. aegypti* (Geris et al., 2008).

Apesar de os extratos oriundos das sementes, polpa e casca dos frutos de copaíba também terem afetado a mortalidade das lagartas de *S. frugiperda*, os resultados não foram tão pronunciados, quando comparados com aqueles obtidos para o extrato das folhas de *C. langsdorffii*. Possivelmente, isso se deu em função de as plantas apresentarem variação na produção de metabólitos secundários de acordo com a parte estudada (Silva et al., 2002; Harris et al., 2007; Sharma et al., 2008; François et al., 2009). A variação no teor de

metabólicos secundários em função da estrutura vegetal analisada apresenta correlação positiva com a atividade biológica (Srivastava et al., 2008).

Em estudo realizado com o extrato obtido a partir de diferentes partes do fruto de *Citrus aurantium* (L.) (Rutaceae), foi verificado que a casca do fruto apresentou maior atividade biológica para adultos de *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae) do que os extratos obtidos a partir do mesocarpo e do endocarpo do fruto (Siskos et al., 2007). De forma relativamente análoga, foi constatado que o extrato de folhas senescentes de *Melia azedarach* L. (Meliaceae) foi muito mais efetivo no controle de *A. aegypti*, provocando alta atividade larvicida, retardando o tempo de desenvolvimento, além de causar efeito inibidor de oviposição, do que quando comparado com o extrato dos frutos dessa planta (Coria et al., 2008).

A redução no peso de insetos sem que ocorra diminuição no consumo alimentar é, possivelmente, resultado da presença de substâncias com efeito de antibiose em seus organismos. São inúmeros os relatos em literatura de antibiose provocada pela ingestão de substâncias de origem natural, que podem ser caracterizadas por afetarem a atividade de enzimas digestivas sem, contudo, causarem redução no consumo alimentar (Farias-Rivera et al., 2003; Pavela et al., 2008). Dentre as classes de substâncias com efeito antibiótico, destacam-se os inibidores de proteínases, lipases e amilases (Nathan et al., 2006; Kansal et al., 2008; Silva et al., 2009). Nesse sentido, foi isolado, das sementes de *Plathymenia foliolosa* (Benth.) (Fabaceae), um inibidor de tripsina, o qual não causou alterações no consumo alimentar de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), contudo, reduziu drasticamente o crescimento e retardou o desenvolvimento desse inseto (Ramos et al., 2008).

Apesar de os extratos provenientes das sementes, polpa ou casca dos frutos de *C. langsdorffii* terem reduzido o peso das lagartas, é possível que não tenham provocado o mesmo efeito no peso das pupas, devido ao alongamento da

fase larval, constatado nesses tratamentos. Ou seja, as lagartas apresentaram crescimento mais lento, havendo a necessidade de passarem maior período de tempo se alimentando, a fim de completarem essa fase de desenvolvimento e atingirem peso de pupa estatisticamente igual ao do controle negativo. O aumento na duração da fase larval, nesse caso, é desvantajoso para os insetos, já que aumenta a exposição aos fatores de mortalidade natural em condições de campo, tais como predadores e parasitoides.

De maneira análoga ao constatado no presente trabalho, Medeiros et al. (2007) observaram aumento na duração da fase larval de *Ascia monuste orseis* (Latreille) (Lepidoptera: Pieridae) após tratamento, via ingestão com extrato de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). Contudo, não foi verificada redução no peso das pupas desses insetos. A menor toxicidade de agentes químicos ao estágio de pupa dos insetos já foi constatada por outros autores, sendo, em geral, atribuída ao fato de apresentarem maior tolerância a agentes químicos do que quando comparada a insetos em estágios mais ativos (Bell, 1978; Jbilou et al., 2006).

As lagartas de segundo instar de *S. frugiperda*, alimentadas com o extrato das cascas dos frutos e folhas de copaifeira, apresentaram redução na sobrevivência. Entretanto, para ambos os tratamentos, não foram observadas relações entre as doses utilizadas e a mortalidade acumulada. Em estudo utilizando óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* Saint-Hilaire (Rutaceae) para o controle de ninfas de quinto instar de *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae), de maneira semelhante ao constatado no presente trabalho, os autores não puderam propor uma relação entre a dose aplicada e seu efeito na mortalidade (Mello et al., 2007).

Efeitos de crescimento mais lento e de redução no ganho de peso de insetos alimentados com substâncias inseticidas de origem natural têm sido relatados (Martinez & Emden, 2001; Sintim et al., 2009). Dentre os fatores

envolvidos na redução do ganho de peso, destacam-se as alterações fisiológicas e bioquímicas provocadas pela ingestão de compostos naturais com atividade inseticida. Um exemplo é o efeito de *Simmondsia chinensis* (Clink) (Buxaceae) e *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sobre lagartas de *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae), que receberam tais tratamentos, via ingestão, e apresentaram redução no ganho de peso corpóreo (Marei et al., 2009). Os autores atribuíram a redução na massa corpórea ao efeito deletério dos aleloquímicos presentes nessas plantas. Tais substâncias, ao passarem pela membrana peritrófica, podem ter provocado danos ao epitélio do intestino do inseto ou podem causar inibição de enzimas digestivas. Os aleloquímicos podem também se combinar com aminoácidos ácidos no intestino médio, levando à redução no peso dos insetos.

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que o extrato das cascas dos frutos de *C. langsdorffii*, quando administrados na fase larval, são capazes de causar efeitos adversos sobre a fase adulta dos insetos. De maneira análoga ao observado no presente trabalho, o extrato de *M. azedarach* causou aumento no período de pré-oviposição, reduziu o período de oviposição, além de influenciar negativamente a fertilidade das fêmeas de *S. littoralis* (Schmidt et al., 1997). Ainda, pode-se citar a redução no número de ovos colocados por *S. frugiperda* após tratamento, via ingestão durante a fase larval, de frações provenientes de *Ipomoea murucoides* Roem et Schult (Convolvulaceae) (Curzio et al., 2009). A redução na fertilidade das fêmeas de *S. frugiperda* também foi constatada, após a ingestão, na fase jovem, de inibidores de proteinases presentes em *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) (Telang et al., 2003).

No que se refere às alterações estruturais observadas nos ovos de adultos originados de lagartas alimentadas com os extratos vegetais das folhas e cascas dos frutos de *C. langsdorffii*, resultados semelhantes foram encontrados por Fila et al. (2002). Tais autores, ao estudarem o efeito da exposição de larvas de

Spodoptera exigua (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) ao inseticida fenitrothion, constataram que os ovos oriundos dos adultos sobreviventes apresentaram anomalias quando analisados sob microscópio eletrônico de varredura. Foi possível observar, em tais ovos, rachaduras em torno da região micropilar e aeropilar semelhantes às constatadas no presente trabalho para o extrato das folhas de *C. langsdorffii*. A deposição anormal de material no córion de *S. frugiperda*, constatada no presente trabalho, assemelha-se à verificada por Adamski et al. (2005), ao estudarem a interação entre a herança de malformações coriônicas e a resistência de *S. exigua* a inseticidas. Ademais, os autores formularam a hipótese de que esse efeito pode ter ocorrido devido ao fato de os pesticidas organofosforados apresentarem, em geral, capacidade de causar distúrbios no metabolismo de proteínas. E, como a camada de cimento do córion é composta por lipoproteínas, tal inseticida, possivelmente, provocou distúrbios nas glândulas de cimento das fêmeas, o que explica as malformações encontradas no córion dos ovos desses insetos. Tais resultados assemelham-se àqueles encontrados no presente trabalho, no qual também foi constatado que o extrato de *C. langsdorffii* foi capaz de alterar o metabolismo proteico de *S. frugiperda*.

O aumento no teor de proteínas excretadas nas fezes das lagartas, aliado à inibição na atividade de tripsina, demonstra que, possivelmente, um dos modos de ação do extrato de *C. langsdorffii* sobre *S. frugiperda* seja por meio da inibição de tripsina. Tais resultados encontram sustentação no trabalho realizado por Krauchenco et al. (2001), em que foi purificado, das sementes de *C. langsdorffii*, um inibidor de proteínases. No mesmo sentido, Silva et al. (2001) caracterizaram inibidores de tripsina nas sementes de *C. langsdorffii*. Os inibidores de proteínases são capazes de causar efeito nos insetos de magnitude semelhante aos observados no presente trabalho, tais como redução na sobrevivência e no ganho de peso, alongamento das fases jovens e alterações na

fecundidade e na fertilidade dos insetos (Leo & Gallerani, 2002; Gomes et al., 2005; Bhattacharyya et al., 2007).

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que *C. langsdorffii* apresenta potencial para ser utilizada no manejo de *S. frugiperda*, já que o extrato dessa planta foi capaz de reduzir a sobrevivência da lagarta-do-cartucho. Além disso, provocou efeitos subletais, tais como redução no crescimento, aumento no tempo necessário ao desenvolvimento, redução na fertilidade e fecundidade das fêmeas, alterações estruturais nos ovos dos insetos provenientes de adultos que receberam o tratamento durante a fase larval e modificações no metabolismo proteico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSKI, Z.; NIEWADZI, M.; ZIEMNICKI, K. Inheritance of chorionic malformations and insecticide resistance by *Spodoptera exigua*. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.126, n.2/3, p.114-118, Sept. 2005.
- ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 43p.
- ANDREWS, K.L. Latin American research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v.71, n.4, p.630-653, Dec. 1988.
- BELL, C.H. Limiting concentrations for fumigant efficiency in the control of insect pests. In: INTERNATIONAL WORKING CONFERENCE ON STORED-PRODUCT ENTOMOLOGY, 2., 1978, Ibadan. **Proceedings...** Ibadan: SPE, 1978. p.182-192.
- BHATTACHARYYA, A.; LEIGHTON, S.M.; BABU, C.R. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, New York, v.145, n.4, p.669-677, May 2007.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, n.5, p.248-254, Sept. 1976.
- COHEN, A.C. **Insect diets science and technology**. Boca Raton: CRC, 2004. 324p.
- CORIA, C.; ALMIRON, W.; VALLADARES, G.; CARPINELLA, C.; LUDUEÑA, F.; DEFAGO, M.; PALACIOS, S. Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Bioresource Technology**, Essex, v.99, n.8, p.3066-3070, May 2008.
- CURZIO, L.G.V.; VELAZQUEZ, V.M.H.; RIVERA, I.L.; FEFER, P.G.; ESCOBAR, E.A. Biological activity of methanolic extracts of *Ipomoea murucoides* Roem et Schult on *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. **Journal of Entomology**, New York, v.6, n.2, p.109-116, 2009.

ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two, new chromogenic substrates of tripsina. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v.95, n.1, p.271-278, Nov. 1961.

FARIAS-RIVERA, L.A.; HERNANDEZ-MENDONZA, J.L.; MOLINA-OCHOA, J.M.; PERCADOR-RUBIO, A. Effect of leaf extracts of teosinte, *Zea diploperennis* L.; and a mexican maize variety, criollo 'uruapeño', on the growth and survival of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v.86, n.3, p.239-243, Sept. 2003.

FERREIRA, A.H.; CRISTOFOLETTI, P.T.; PIMENTA, D.C.; RIBEIRO, A.F.; TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Structure, processing and midgut secretion of putative peritrophic membrane ancillary protein (PMAP) from *Tenebrio molitor* larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.38, n.2, p.233-243, Feb. 2008.

FILA, K.; ADAMSKI, Z.; ZIEMNICKI, K. Exposure to fenitrothion causes malfunctions of *Spodoptera exigua* Hubner (Lep.; Noctuidae) eggs. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.126, n.2/3, p.114-118, Apr. 2002.

FRANÇOIS, T.; MICHEL, J.D.P.; LAMBERT, S.M.; NDIFOR, F.; VYRY, W.N.A.; HENRI, A.Z.P.; CHANTAL, M. Comparative essential oils composition and insecticidal effect of different tissues of *Piper capense* L.; *Piper guineense* Schum. et Thonn.; *Piper nigrum* L. and *Piper umbellatum* L. grown in Cameroon. **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v.8, n.3, p.424-431, Feb. 2009.

GERIS, R.; SILVA, I.G.; SILVA, H.H.G.; BARISON, A.; RODRIGUES-FILHO, E.; FERREIRA, A.G. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* (Duke), with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.50, n.1, p.25-28, jan./fev. 2008.

GOMES, C.E.M.; BARBOSA, A.E.A.D.; MACEDO, L.L.P.; PITANGA, J.C.M.; MOURA, F.T.; OLIVEIRA, A.S.; MOURA, R.M.; QUEIROZ, A.F.S.; MACEDO, F.P.; ANDRADE, L.B.S.; VIDAL, M.S.; SALES, M.P. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallid* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitidis capitata* (fruit fly). **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v.43, n.12, p.1095-1102, Dec. 2005.

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

HARRIS, C.S.; BURT, A.J.; SALEEM, A.; MAILE, P.; MARTINEAU, L.C.; HADDAD, P.S.; BENNET, S.A.L.; ARNASONI, J.T.A. Single HPLC-PAD-APCI/MS method for the quantitative comparison of phenolic compounds found in leaf, stem, root and fruit extracts of *Vaccinium angustifolium*. **Phytochemical Analysis**, Sussex, v.18, n.1, p.161-169, Mar. 2007.

INNOCENT, E.; JOSEPH, C.C.; GIKONYO, N.K.; NKUNYA, M.H.H.; HASSANALI, A. Growth disruption activity of polar extracts from *Kotschya uguenensis* (Fabaceae) against *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) larvae. **International Journal of Tropical Insect Science**, Wallingford, v.28, n.4, p.220-224, Feb. 2008.

JBILLOU, R.; ENNABILI, A.; SAYAH, F. Insecticidal activity of four medicinal plant extracts against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v.5, n.10, p.936-940, May 2006.

KAKADE, M.L.; RACKIS, J.J.; MCGHEE, J.E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy bean products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.51, n.3, p.376-382, May/June 1974.

KANSAL, R.; GUPTA, R.N.; KOUNDAL, K.R.; KUHAR, K.; GUPTA, V.K. Purification, characterization and evaluation of insecticidal potential of trypsin inhibitor from mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) seeds. **Acta Physiologia Plantarum**, Bratislava, v.30, n.6, p.761-768, May 2008.

KRAUCHENCO, S.; SILVA, J.A.; NAGEM, R.A.; BRANDÃO NETO, J.R.; FORRER, V.P.; CARMONA, F.R.; MACEDO, M.L.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; POLIKARPOV, I. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a novel trypsin inhibitor from seeds of *Copaifera langsdorffii*. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, Copenhagen, v.57, n.3, p.1316-1318, Sept. 2001.

LEO, F. de; GALLERANI, F. The mustard trypsin inhibitor 2 affects the fertility of *Spodoptera littoralis* larvae fed on transgenic plants. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.32, n.5, p.489-496, May 2002.

MACEDO, M.L.R.; PANDO, S.C.; CHEVREUIL, L.R.; MARANGONI, S. Properties of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Delonix regia* seeds against digestive proteinases of *Anagasta kuehniella* (Z.) and *Corcyra cephalonica* (S.) (Lepidoptera: Pyralidae). **Protein and Peptide Letters**, Amsterdam, v.16, n.12, p.1459-1465, Nov. 2009.

MAREI, S.S.; AMR, E.M.; SALEM, N.Y. Effect of some plant oils on biological, physiological and biochemical aspects of *Spodoptera littoralis* (Boisd.). **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, Peshawar, v.5, n.1, p.103-107, 2009.

MARTINEZ, S.S.; EMDEN, H.F. van. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by Azadirachtin. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.30, n.1, p.113-125, Mar. 2001.

MEDEIROS, C.A.M.; BOIÇA JUNIOR, A.L.; ANGELINI, M.R. Efeito subletal de extratos vegetais aquosos de *Azadirachta indica* A. Juss. e *Sapindus saponaria* L. sobre aspectos biológicos de *Ascia monuste orseis* (Latreille) (Lepidoptera: Pieridae) em couve. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, Madri, v.33, n.1, p.27-34, Jan. 2007.

MELLO, C.B.; UZEDA, C.D.; BERNARDINO, M.V.; LOPES, D.M.; KELECOM, A.; FEVEREIRO, P.C.A.; GUERRA, M.S.; OLIVEIRA, A.P.; ROCHA, L.M.; GONZALEZ, M.S. Effects of the essential oil obtained from *Pilocarpus spicatus* Saint-Hilaire (Rutaceae) on the development of *Rhodnius prolixus* nymphae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v.17, n.4, p.514-520, Oct./Dec. 2007.

MENDONÇA, F.A.C.; SILVA, K.F.S.; SANTOS, K.K.; RIBEIRO JUNIOR, K.A.L.; SANT'ANA, A.E.G. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, Milano, v.76, n.7/8, p.629-636, Dec. 2005.

MORALLO-REJESUS, B. Botanical insecticides against the diamondback moth. In: INTERNATIONAL WORKSHOP, ASIAN VEGETABLE RESEARCH AND DEVELOPMENT CENTER, 1., 1986, Shanhua. **Proceedings...** Shanhua: Asian Vegetable Research and Development Center, 1986. p.17-18.

NATHAN, S.S.; CHUNG, P.G.; MURUGAN, K. Combined effect of biopesticides on the digestive enzymatic profiles of *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (the rice leaffolder) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, London, v.64, n.3, p.382-389, July 2006.

OKWUTE, S.K.; ONYIA, R.; ANENE, C.; AMODU, O.P. Protectant, insecticidal and antimicrobial potentials of *Dalbergia saxatilis* Hook f. (Fabaceae). **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v.8, n.23, p.6556-6560, Dec. 2009.

OLIVEIRA, A.S.; MIGLIOLO, L.; AQUINO, R.O.; RIBEIRO, J.K.C.; MACEDO, L.L.P.; ANDRADE, L.B.S.; BEMQUERER, M.P.; SANTOS, E.A.; KIYOTA, S.; SALES, M.P. Purification and characterization of a trypsin papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and its in vitro effects towards digestive enzymes from insect pests. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.45, n.10/11, p.858-865, Oct./Nov. 2007.

OPPERT, B.; MORGAN, T.D.; HARTZER, K.; KRAMER, K.J. Compensatory proteolytic responses to dietary proteinase inhibitors in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v.140, n.1, p.53-58, Feb. 2005.

PAVELA, R.; VRCHOTOVÁ, N.; ŠERÁ, B. Growth inhibitory effect of extracts from *Reynoutria* sp. plants against *Spodoptera littoralis* larvae. **Agrociência**, Cidade do México, v.42, n.5, p.573-584, July/Aug. 2008.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2009. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 10 fev. 2010.

RAMOS, V.S.; SILVA, G.S.; FREIRE, M.G.M.; MACHADO, O.L.T.; PARRA, J.R.P.; MACEDO, M.L.R. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v.56, n.23, p.11348-11355, Nov. 2008.

SCHMIDT, G.H.; AHMED, A.A.I.; BREUER, M. Effect of *Melia azedarach* extract on larval development and reproduction..parameters of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) and *Agrotis ipsilon* (Hufn.) (Lep. Noctuidae). **Anzeiger für Schädlingskunde**, Berlin, v.70, n.1, p.4-12, Dec. 1997.

SHARMA, U.K.; SHARMA, K.; SHARMA, N.; SHARMA, A.; SINGH, H.P.; SINHA, A. Microwave-assisted efficient extraction of different parts of *Hippophae rhamnoides* for the comparative evaluation of antioxidant activity and quantification of its phenolic constituents by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.56, n.2, p.374-379, Jan. 2008.

SILVA, B.M.; ANDRADE, P.B.; FERRERES, F.; DOMINGUES, A.L.; SEABRA, R.M.; FERREIRA, M.A. Phenolic profile of quince fruit (*Cydonia oblonga* Miller) (Pulp and Peel). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.50, n.16, p.4615-4618, June 2002.

SILVA, E.M.; VALENCIA, A.; GROSSI-DE-SÁB, M.F.; ROCHAB, T.L.; FREIRE, E.; PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S. Inhibitory action of Cerrado plants against mammalian and insect α -amylases. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v.95, n.3, p.141-146, Nov. 2009.

SILVA, J.A.; MACEDO, M.L.R.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. Biochemical characterization and n-terminal sequences of two new trypsin inhibitors from *Copaifera langsdorffii* seeds. **Journal of Protein Chemistry**, Dublin, v.20, n.1, p.1-7, Jan. 2001.

SINTIM, H.O.; TASHIRO, T.; MOTOYAMA, N. Response of the cutworm *Spodoptera litura* to sesame leaves or crude extracts in diet. **Journal of Insect Science**, Elmsford, v.9, n.52, p.1-13, Jan. 2009.

SISKOS, E.P.; KONSTANTOPOULOU, M.A.; MAZOMENOS, B.E.; JERVIS, A.M. Insecticidal activity of *Citrus aurantium* fruit, leaf, and shoot extracts against adult olive fruit flies (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanhan, v.100, n.4, p.1215-1220, July/Aug. 2007.

SRIVASTAVA, A.; BARTARYA, R.; TONK, S.; SRIVASTAVA, S.S.; KUMARI, K.M. Larvicidal activity of an indigenous plant, *Centratherum anthelminticum*. **Journal of Environmental Biology**, Santiniketan, v.29, n.5, p.669-672, Sept. 2008.

TELANG, M.; SRINIVASAN, A.; PATANKAR, A.; HARSULKAR, A.; JOSHI, V.; DAMLE, A.; DESHPANDE, V.; SAINANI, M.; RANJEKAR, P.; GUPTA, G.; BIRAH, A.; RANI, S.; KACHOLE, M.; GIRI, A.; GUPTA, V. Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Phytochemistry**, Oxford, v.63, n.6, p.643-652, July 2003.

VIRLA, E.G.; ÁLVAREZ, A.; LOTO, F.; PERA, L.M.; BAIGORÍ, M. Fall armyworm strains (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina, their associate host plants and response to different mortality factors in laboratory. **Florida Entomologist**, Gainesville, v.91, n.1, p.63-69, Mar. 2008.

YU, S.J. Insensitivity of acetylcholinesterase in a field strain of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v.84, n.2, p.135-142, Feb. 2006.

YU, S.J.; MCCORD JUNIOR, E. Lack of cross-resistance to indoxacarb in insecticide-resistant *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Pest Management Science**, London, v.63, n.1, p.63-67, Jan. 2007.

ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1A Médias (\pm EP) para consumo alimentar e peso das lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> , após sete dias de sua exposição às dietas tratadas com os extratos de <i>Copaifera langsdorffii</i>	37
TABELA 2A Médias (\pm EP) para duração das fases larval e pupal, peso das pupas, sobrevivência na fase pupal de <i>Spodoptera frugiperda</i> tratados em dieta artificial com os extratos de <i>Copaifera langsdorffii</i>	38

TABELA 1A Médias (\pm EP) para consumo alimentar e peso das lagartas de *Spodoptera frugiperda*, após sete dias de sua exposição às dietas tratadas com os extratos de *Copaifera langsdorffii*.

Tratamento	Consumo alimentar (mg) ¹	Peso das lagartas (mg) ²
Água	491,3 \pm 23,65	56,3 \pm 3,36 a
<i>C. langsdorffii</i> – casca do fruto	560,6 \pm 17,20	12,4 \pm 5,60 c
<i>C. langsdorffii</i> – folha ³	-	-
<i>C. langsdorffii</i> – polpa do fruto	596,4 \pm 32,56	49,5 \pm 8,46 a
<i>C. langsdorffii</i> – semente do fruto	525,9 \pm 29,59	32,8 \pm 6,75 b
Tween	514,0 \pm 18,98	53,2 \pm 4,98 a
p \leq	0,0710	0,0000
F	2,7413	10,703

¹ Não significativo.

² Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott.

³ Devido à alta mortalidade observada no tratamento, não foi possível mensurar esse parâmetro.

TABELA 2A Médias (\pm EP) para duração das fases larval e pupal, peso das pupas, sobrevivência na fase pupal de *Spodoptera frugiperda* tratados em dieta artificial com os extratos de *Copaifera langsdorffii*.

Tratamento	Duração da fase larval (dias) ¹	Duração da fase pupal (dias) ²	Peso de pupas (mg) ²	Sobrevivência na fase pupal (%) ²
Água	23,2 \pm 0,24 b	11,6 \pm 0,24	308,5 \pm 3,03	89,7 \pm 4,72
<i>C. langsdorffii</i> - casca fruto	27,9 \pm 1,53 a	11,4 \pm 0,35	310,0 \pm 10,0	100,0 \pm 0,00
<i>C. langsdorffii</i> – folhas ³	-	-	-	-
<i>C. langsdorffii</i> - polpa fruto	26,0 \pm 1,08 a	14,9 \pm 0,34	316,9 \pm 9,81	100,0 \pm 0,00
<i>C. langsdorffii</i> – semente	26,1 \pm 1,40 a	12,2 \pm 0,59	314,8 \pm 5,08	76,3 \pm 10,19
Tween 80 a 1%	23,9 \pm 0,29 b	11,5 \pm 0,58	304,8 \pm 5,42	87,8 \pm 5,81
p \leq	0,0001	0,2445	0,4195	0,0634
F	18,458	1,4135	0,6714	3,0278

¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

²Não significativo.

³Devido à alta mortalidade observada nesse tratamento, não foi possível mensurar esses parâmetros.

ANEXO B	Página
FIGURA 1B Sobrevivência de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> , ao longo do tempo, alimentadas com dieta artificial contendo extratos provenientes das folhas, sementes, casca e polpa dos frutos de <i>Copaifera langsdorffii</i> , sendo $y = \exp((\mu)^{-\alpha} * (x^{\alpha}))$, em que y = sobrevivência; μ = tempo letal 50; $\alpha = 1,013171$ e x = tempo (dias).....	41
FIGURA 2B Médias (\pm SD) para sobrevivência acumulada e duração da fase larval, peso de pupas, duração e sobrevivência na fase pupal e razão sexual de <i>Spodoptera frugiperda</i> alimentada com dieta artificial contendo diferentes concentrações de extratos da casca dos frutos de <i>Copaifera langsdorffii</i>	42
FIGURA 3B Médias (\pm SD) para sobrevivência acumulada e duração da fase larval, peso de pupas, duração e sobrevivência na fase pupal e razão sexual de <i>Spodoptera frugiperda</i> alimentadas com dieta artificial contendo diferentes concentrações de extratos das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i>	43
FIGURA 4B Curva de crescimento de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> alimentadas com dieta artificial contendo extratos das folhas e da casca dos frutos de <i>Copaifera langsdorffii</i> , sendo $y = 1/(1+\exp(b(\log(x)-\log(e))))$, em que “b” e “e” são os interceptos e x = tempo (dias).....	44
FIGURA 5B Médias (\pm SD) para os períodos de pré-oviposição e oviposição, longevidade de fêmeas e machos, número de ovos por fêmea e viabilidade dos ovos de adultos de <i>Spodoptera frugiperda</i> que receberam, durante a fase larval, tratamento com diferentes concentrações dos extratos vegetais das cascas dos frutos de <i>Copaifera langsdorffii</i>	45
FIGURA 6B Médias (\pm SD) para os períodos de pré-oviposição e oviposição, longevidade de fêmeas e machos, número de ovos por fêmea e viabilidade dos ovos de adultos de <i>Spodoptera frugiperda</i> que receberam, durante a fase larval, tratamento com diferentes concentrações dos extratos vegetais das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i>	46
FIGURA 7B Microscopia eletrônica de varredura dos ovos dos adultos de <i>Spodoptera frugiperda</i> provenientes das lagartas tratadas com os extratos das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i> . A, B e C: água (setas indicam região aeropilar e micropilar, respectivamente, sem alterações morfológicas); D, E e F: T etas indicam região aeropilar e micropilar, respectivamente, sem alterações morfológicas); G, H e I: <i>C. langsdorffii</i> folhas 300 ppm (setas	

	indicam região aeropilar e micropilar, respectivamente, com alterações); J, K e L: <i>C. langsdorffii</i> folhas 600 ppm (setas indicam região aeropilar e micropilar, respectivamente, com alterações); M, N e O <i>C. langsdorffii</i> folhas 1.000 ppm (setas indicam região aeropilar e micropilar, respectivamente, com alterações).....	47
FIGURA 8B	Microscopia eletrônica de varredura dos ovos dos adultos de <i>Spodoptera frugiperda</i> provenientes das lagartas tratadas com os extratos da casca dos frutos de <i>Copaifera langsdorffii</i> . A e B: água (setas indicam áreas sem alterações morfológicas); C e D: Tween (setas indicam áreas sem alterações morfológicas); E e F: <i>C. langsdorffii</i> 300 ppm (setas indicam áreas com alterações morfológicas); G e H: <i>C. langsdorffii</i> 600 ppm (setas indicam áreas com alterações morfológicas); I e J: <i>C. langsdorffii</i> 1.000 ppm (setas indicam áreas com alterações morfológicas); (F) <i>C. langsdorffii</i> 1.300ppm (setas indicam áreas com alterações morfológicas).....	48
FIGURA 9B	Quantificação de proteínas nas fezes das lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> alimentadas com diferentes concentrações dos extratos da casca dos frutos e das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i>	49
FIGURA 10B	Inibição na atividade de tripsina (%) de <i>Spodoptera frugiperda</i> após incubação com o extrato das folhas e das cascas dos frutos de <i>Copaifera langsdorffii</i>	50

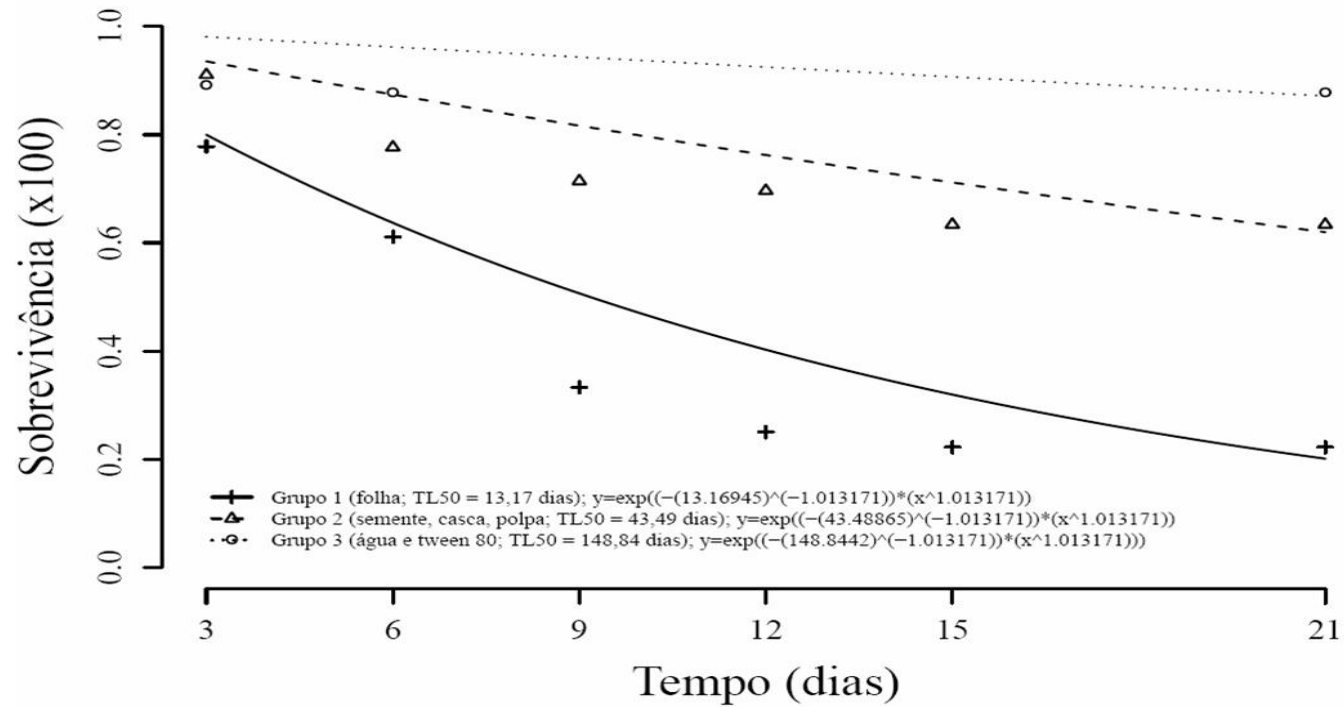


FIGURA 1B Sobrevivência de lagartas de *Spodoptera frugiperda*, ao longo do tempo, alimentadas com dieta artificial contendo extratos provenientes das folhas, sementes, casca e polpa dos frutos de *Copaifera langsdorffii*, sendo $y = \exp((\mu)^{-\alpha}) * (x^{\alpha})$, em que y = sobrevivência; μ = tempo letal 50; $\alpha = 1,013171$ e x = tempo (dias).

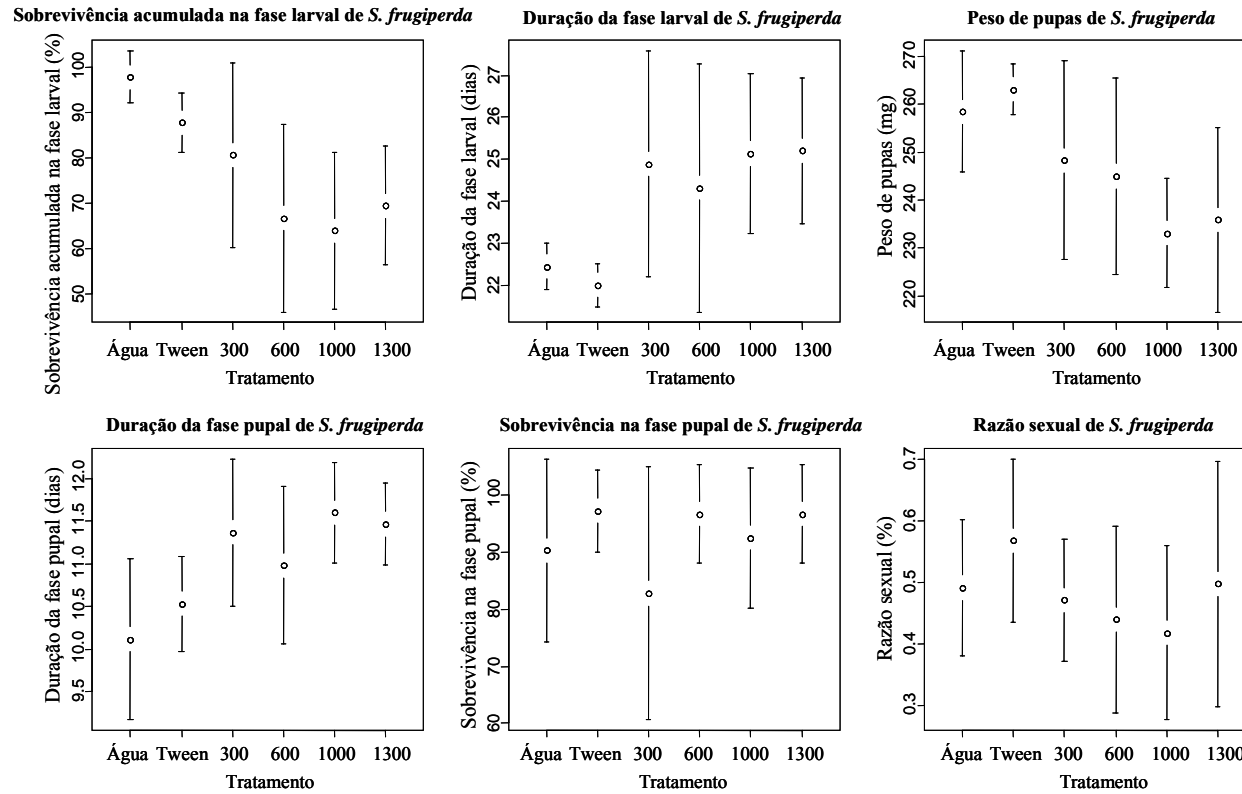


FIGURA 2B Médias (\pm SD) para sobrevivência acumulada e duração da fase larval, peso de pupas, duração e sobrevivência na fase pupal e razão sexual de *Spodoptera frugiperda* alimentada com dieta artificial contendo diferentes concentrações de extratos da casca dos frutos de *Copaifera langsdorffii*.

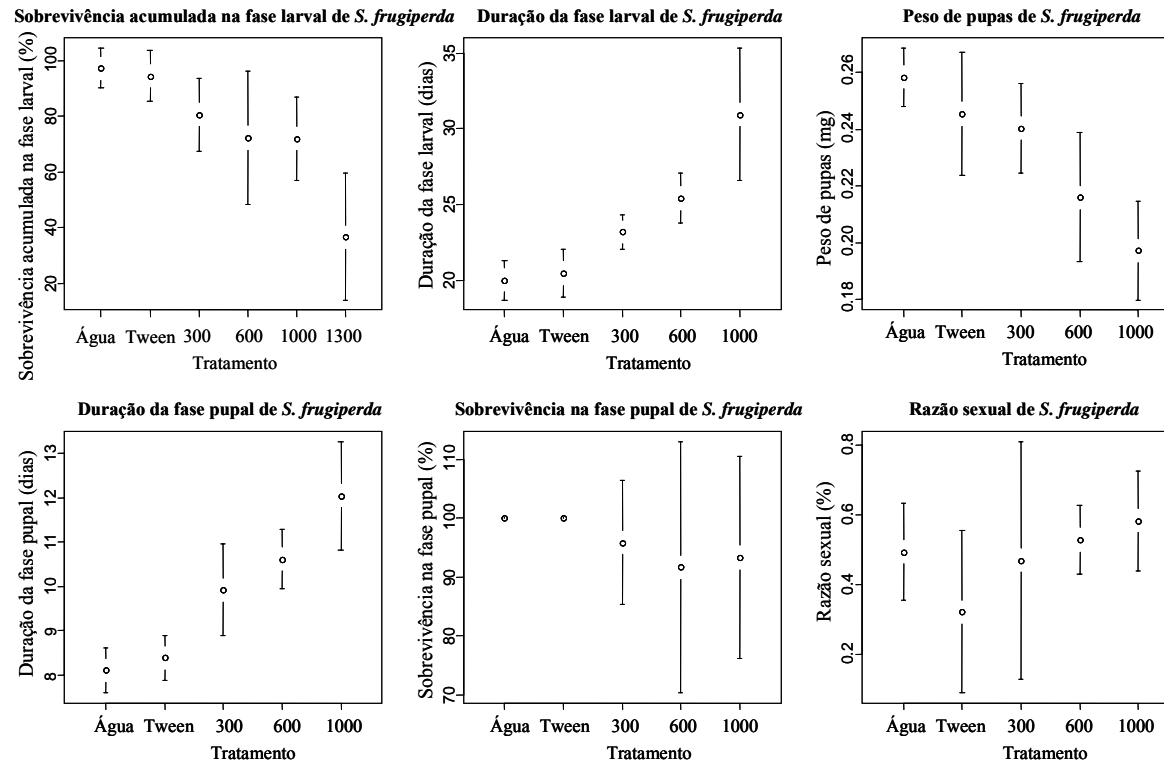


FIGURA 3B Médias (\pm SD) para sobrevivência acumulada e duração da fase larval, peso de pupas, duração e sobrevivência na fase pupal e razão sexual de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo diferentes concentrações de extratos das folhas de *Copaifera langsdorffii*.

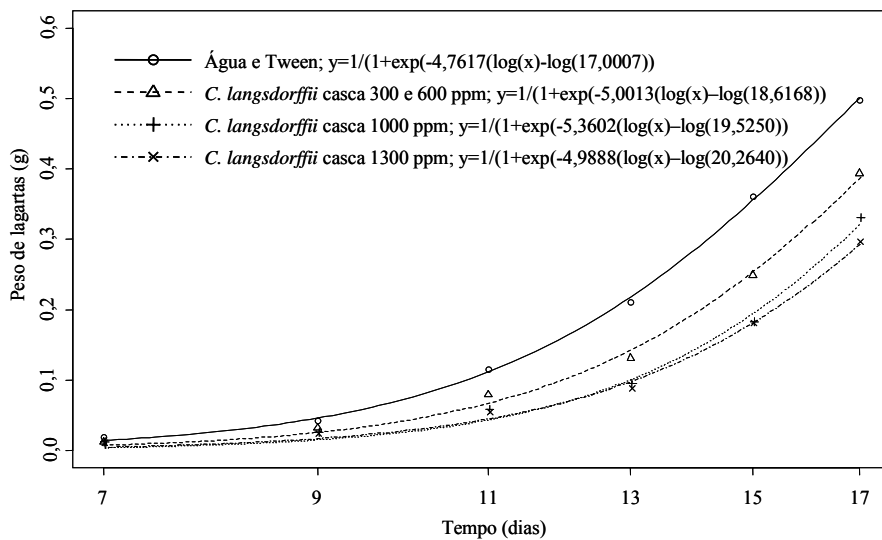
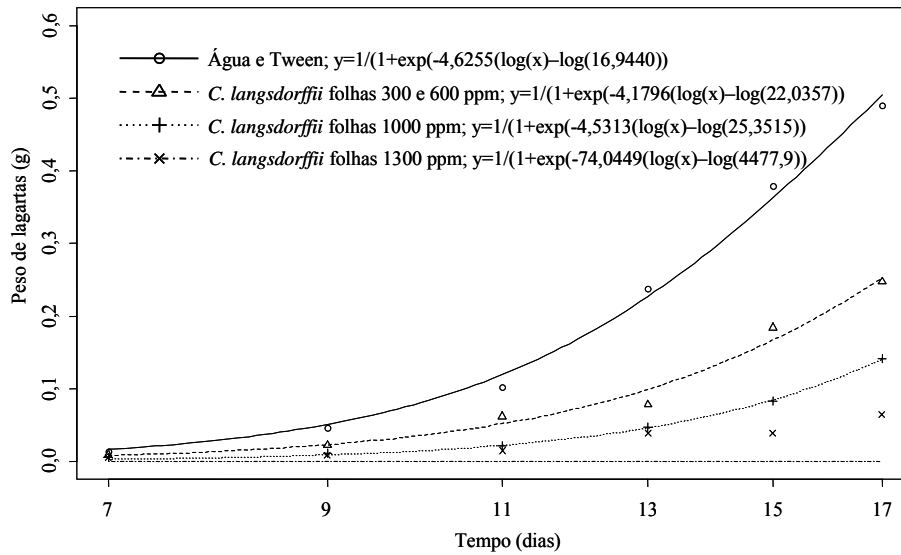


FIGURA 4B Curva de crescimento de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo extratos das folhas e da casca dos frutos de *Copaifera langsdorffii*, sendo $y = 1/(1+\exp(b(\log(x)-\log(e)))$, em que “b” e “e” são os interceptos e $x = \text{tempo (dias)}$.

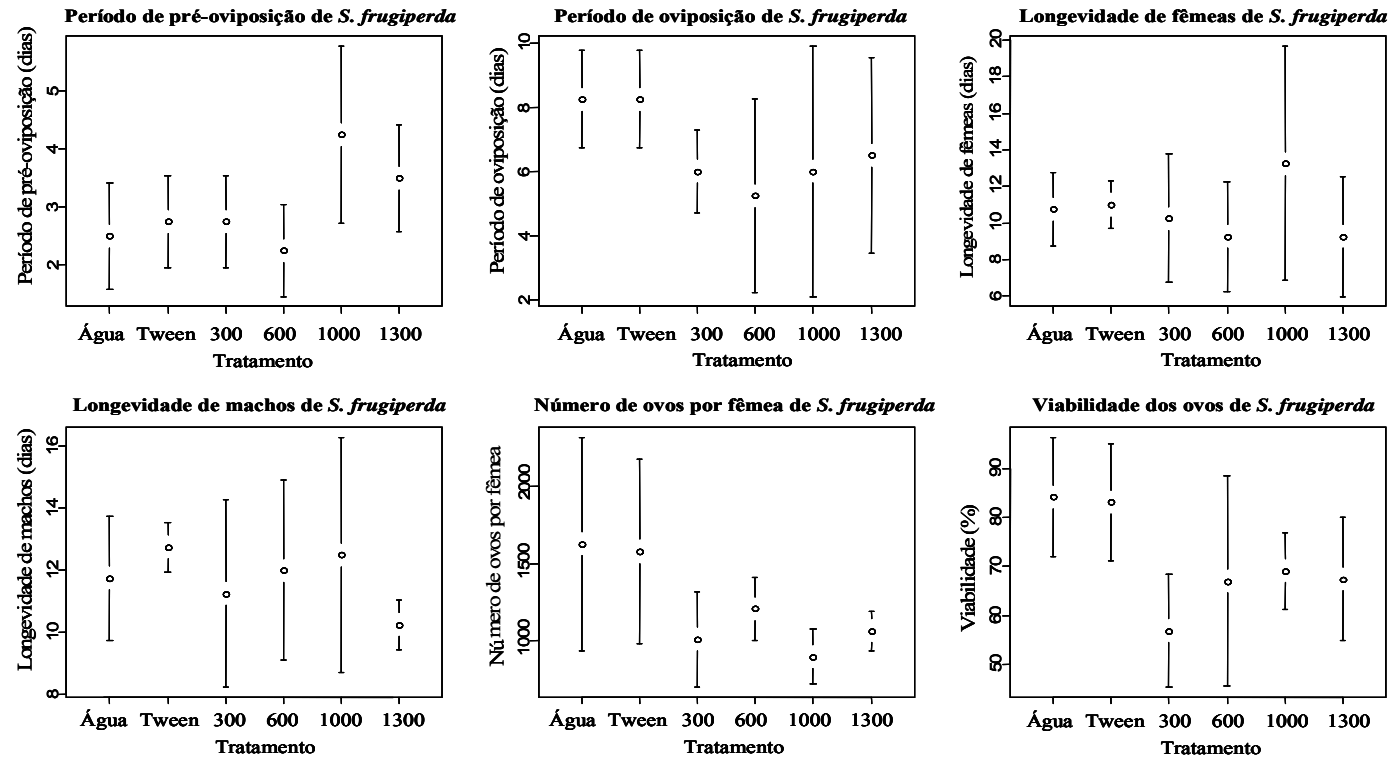


FIGURA 5B Médias (\pm SD) para os períodos de pré-oviposição e oviposição, longevidade de fêmeas e machos, número de ovos por fêmea e viabilidade dos ovos de adultos de *Spodoptera frugiperda* que receberam, durante a fase larval, tratamento com diferentes concentrações dos extratos vegetais das cascas dos frutos de *Copaifera langsdorffii*.

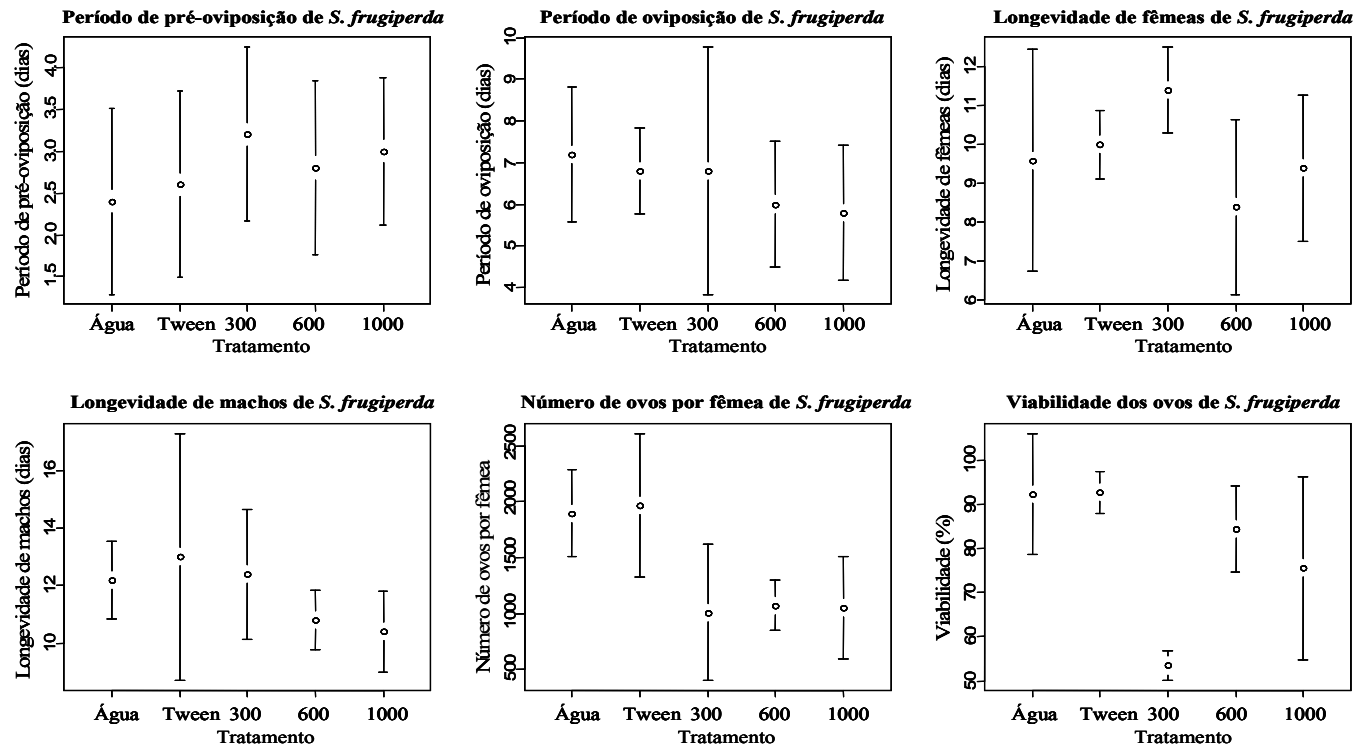


FIGURA 6B Médias (\pm SD) para os períodos de pré-oviposição e oviposição, longevidade de fêmeas e machos, número de ovos por fêmea e viabilidade dos ovos de adultos de *Spodoptera frugiperda* que receberam, durante a fase larval, tratamento com diferentes concentrações dos extratos vegetais das folhas de *Copaifera langsdorffii*.

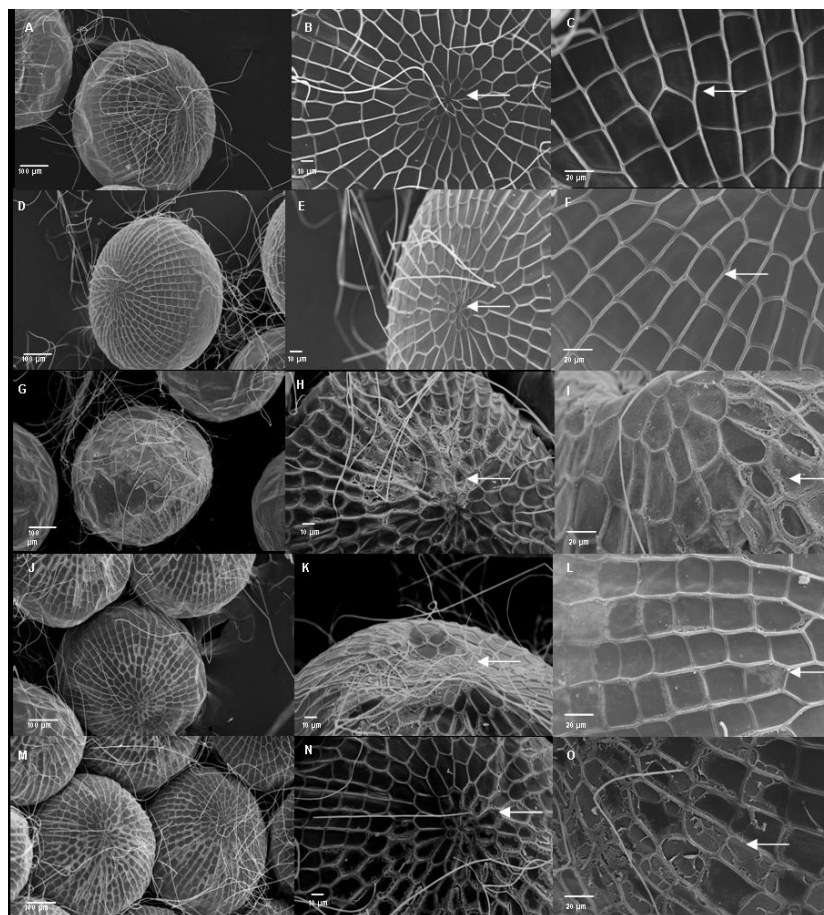


FIGURA 7B Microscopia eletrônica de varredura dos ovos dos adultos de *Spodoptera frugiperda* provenientes das lagartas tratadas com os extratos das folhas de *Copaifera langsdorffii*. A, B e C: água (setas indicam região aeropilar e micropilar, respectivamente, sem alterações morfológicas); D, E e F: Tween (setas indicam região aeropilar e micropilar, respectivamente, sem alterações morfológicas); G, H e I: *C. langsdorffii* folhas 300 ppm (setas indicam região aeropilar e micropilar, respectivamente, com alterações); J, K e L: *C. langsdorffii* folhas 600 ppm (setas indicam região aeropilar e micropilar, respectivamente, com alterações); M, N e O *C. langsdorffii* folhas 1.000 ppm (setas indicam região aeropilar e micropilar, respectivamente, com alterações).

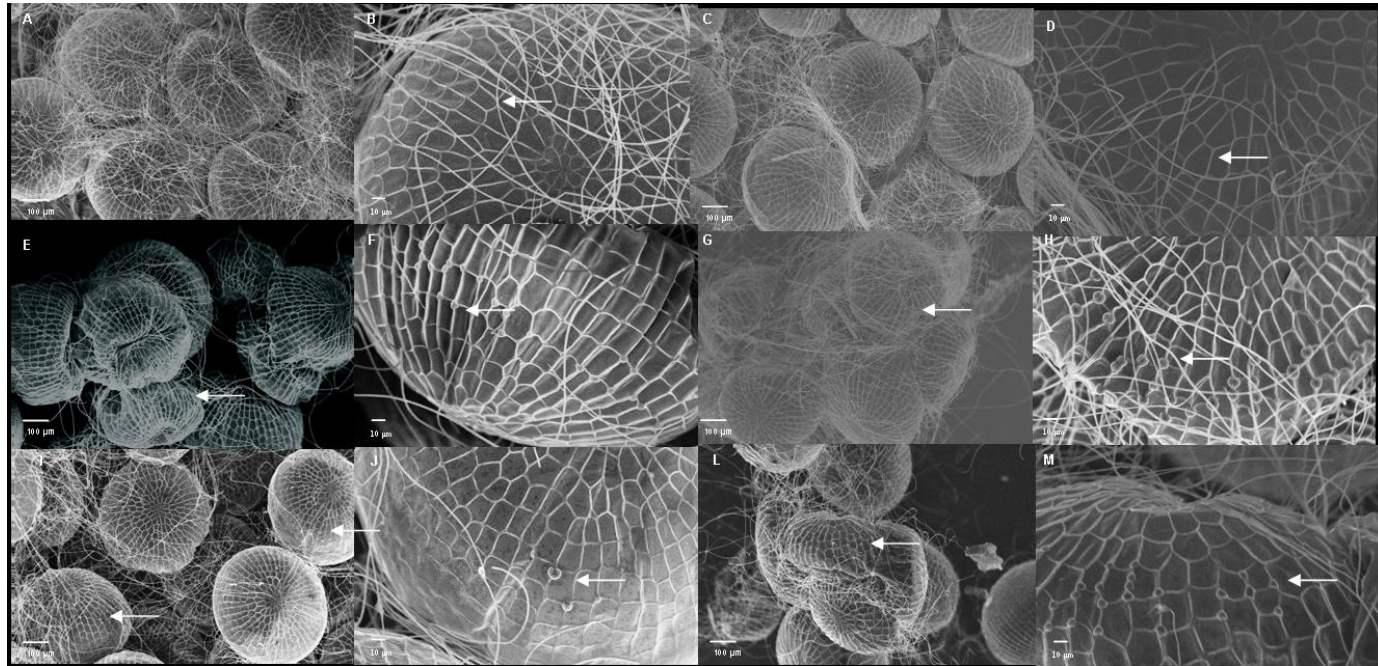


FIGURA 8B Microscopia eletrônica de varredura dos ovos dos adultos de *Spodoptera frugiperda* provenientes das lagartas tratadas com os extratos da casca dos frutos de *Copaifera langsdorffii*. A e B: água (setas indicam áreas sem alterações morfológicas); C e D: Tween (setas indicam áreas sem alterações morfológicas); E e F: *C. langsdorffii* 300 ppm (setas indicam áreas com alterações morfológicas); G e H: *C. langsdorffii* 600 ppm (setas indicam áreas com alterações morfológicas); I e J: *C. langsdorffii* 1.000 ppm (setas indicam áreas com alterações morfológicas); (K) *C. langsdorffii* 1.300ppm (setas indicam áreas com alterações morfológicas).

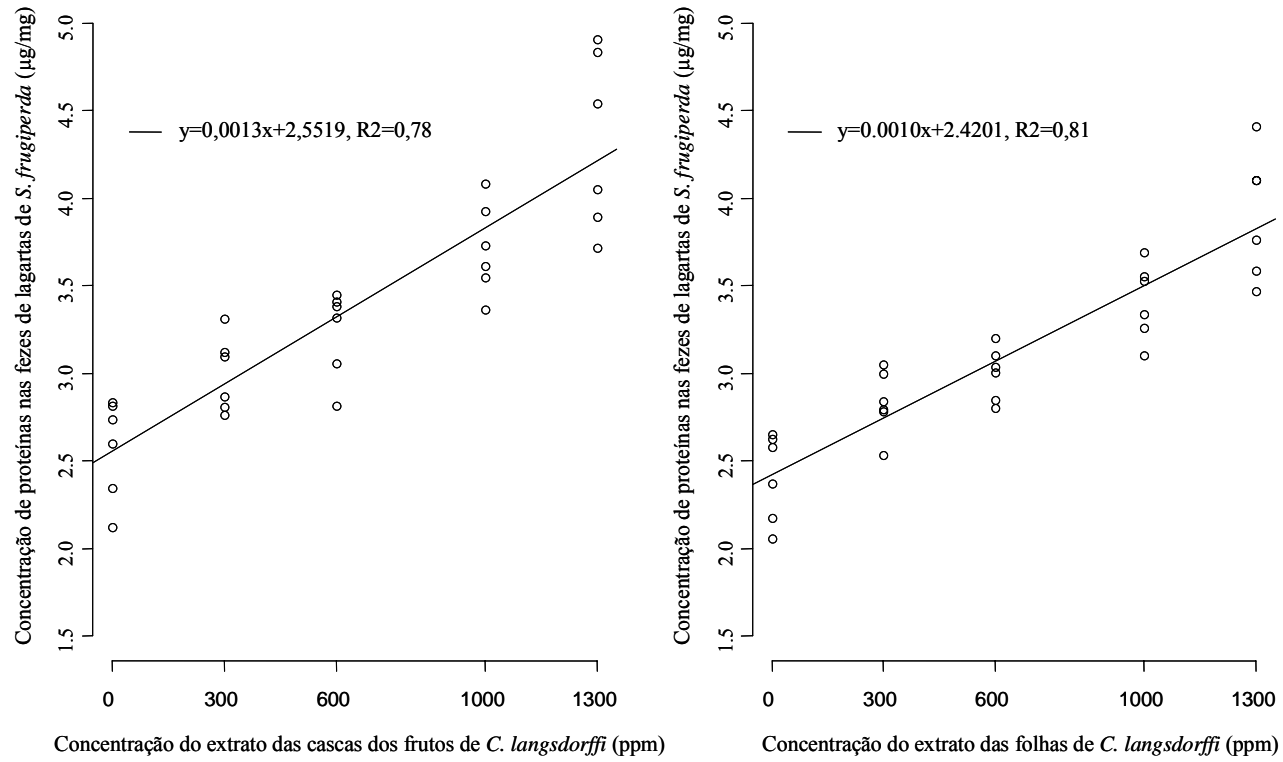


FIGURA 9B Quantificação de proteínas nas fezes das lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com diferentes concentrações dos extratos da casca dos frutos e das folhas de *Copaifera langsdorffii*.

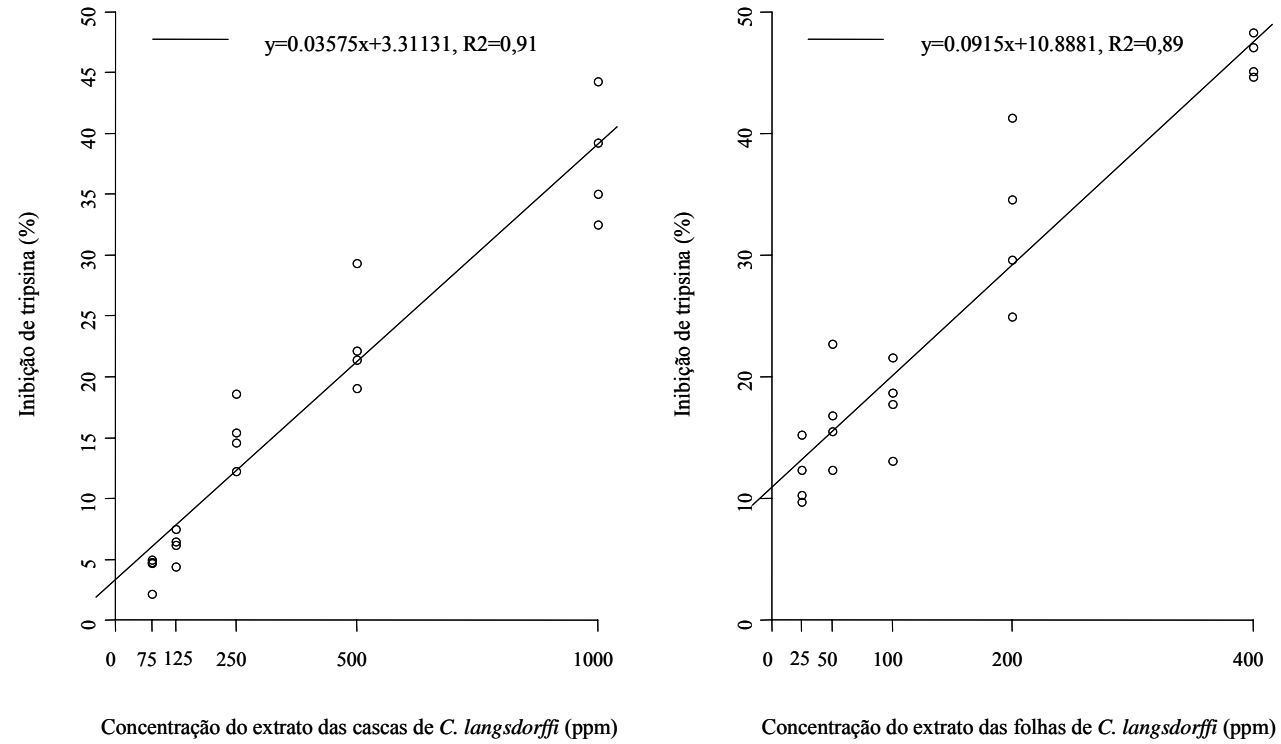


FIGURA 10B Inibição na atividade de tripsina (%) de *Spodoptera frugiperda* após incubação com o extrato das folhas e das cascas dos frutos de *Copaifera langsdorffii*.

ARTIGO 2

Efeitos de extratos vegetais e compostos fenólicos sobre características biológicas, bioquímicas e ultra-estruturais de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)
(Lepidoptera: Noctuidae)

(O artigo 2 será transcrito para a língua inglesa e encaminhado para publicação no periódico científico Industrial Crops and Products)

1 RESUMO

Efeitos de extratos vegetais e compostos fenólicos sobre características biológicas, bioquímicas e ultra-estruturais de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

As propriedades inseticidas de metabólitos secundários de plantas vêm sendo muito estudados, podendo provocar alterações em parâmetros biológicos dos insetos e comprometendo o seu desempenho. Tendo em vista as dificuldades encontradas para o controle de *Spodoptera frugiperda* por meio do uso de pesticidas sintéticos, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de extratos vegetais e compostos fenólicos sobre características biológicas, bioquímicas e ultra-estruturais desse inseto. Extratos vegetais provenientes de *Geonoma shottiana*, *Actinostemon concolor*, *Palicourea rigida* e *Rudgea viburnoides* foram incorporados em dieta artificial e oferecidos para lagartas de *S. frugiperda*. Os extratos de *A. concolor* e *R. viburnoides* reduziram a sobrevivência de *S. frugiperda* durante a fase larval. Lagartas alimentadas com dieta contendo o extrato de *A. concolor* apresentaram redução no peso de pupas, prolongamento na fase larval, redução na fecundidade e fertilidade dos adultos. Quanto aos parâmetros nutricionais, esse tratamento provocou redução no peso das lagartas, aumento no índice de consumo alimentar, na digestibilidade proteica e nas taxas de crescimento relativo, metabólica relativa, digestibilidade aparente e custo metabólico, além de causar redução na eficiência de conversão do alimento ingerido e digerido. Alterações ultra-estruturais puderam ser constatadas em ovos provenientes de adultos nos quais as lagartas foram alimentadas com os extratos de *P. rigida* e *A. concolor*. Criofraturas realizadas no intestino médio de lagartas alimentadas com *A. concolor* evidenciaram rupturas nas vilosidades desse inseto. O extrato de *A. concolor* também se mostrou bastante eficiente em reduzir a atividade triptica de *S. frugiperda* em ensaio realizado *in vitro*. Destaca-se, ainda, que *A. concolor* apresentou alta concentração de compostos fenólicos que, quando submetidos a ensaio com *S. frugiperda*, causaram alterações semelhantes às provocadas pelo extrato bruto, tais como redução na sobrevivência e no peso das lagartas e pupas, aumento no índice de consumo, prolongamento da fase larval e alterações nos parâmetros nutricionais. Os resultados encontrados no presente trabalho evidenciam o grande potencial de *A. concolor* para o controle de *S. frugiperda*.

Palavras-chave: produtos naturais, lagarta-do-cartucho, *Actinostemon concolor*

2 ABSTRACT

Effects of plant extracts and phenolic compounds on the characteristics biological, biochemical, and ultrastructural of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

Secondary metabolites of plants have been widely studied for its insecticidal properties; such products can cause changes in biological parameters of insects, thus affecting the performance of the same. Considering the difficulties encountered in the control of *Spodoptera frugiperda* through the use of synthetic pesticides, this study was to evaluate the effect of plant extracts and phenolics compounds about biological, biochemical and ultrastructural characteristics of this insect. Thus, plant extracts from *Geonoma shottiana*, *Actinostemon concolor*, *Palicourea rigida* and *Rudgea virbuinoides* were incorporated into artificial diet and offered to larvae of *S. frugiperda*. The extracts of *A. concolor* and *R. virbuinoides* reduced the survival of *S. frugiperda* during the larval stage. Larvae fed a diet containing the extract of *A. concolor* showed a reduction in pupal weight, prolongation larval stage, reduced fecundity and fertility of adults. Regarding nutritional parameters, this treatment caused a reduction in weight of larvae, an increase in the rate of consumption, protein digestibility and relative growth rate, metabolic ratio, digestibility and metabolic cost and cause reduction in the efficiency of conversion of ingested food and digested. Ultrastructural changes could be detected in eggs from adults in which the larvae were fed with the extracts of *P. rigida* and *A. concolor*. Criofracture out in the midgut of larvae fed with *A. concolor* showed breaks in the villi of this insect. The extract of *A. concolor* was also very effective in reducing the trypsin activity of *S. frugiperda* test done in vitro. Can also be noted that *A. concolor* showed high concentration of phenolic compounds, such compounds, when subjected to the tests with *S. frugiperda* caused changes similar to those caused by the crude extract, such as reduction in survival, weight of larvae and pupae increased rate of consumption, prolongation of the larval stage and changes in nutritional parameters. The results of this study show the great potential of *A. concolor* for the control of *S. frugiperda*.

Key words: natural products, armyworm, *Actinostemon concolor*

3 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a busca por princípios ativos de plantas contra insetos-praga tem se intensificado. São inúmeros os esforços na descoberta de novos produtos em alternativa aos pesticidas sintéticos, já que, muitas vezes, o método de controle químico pode se mostrar ineficiente, além de causar uma série de efeitos adversos ao ambiente (Georges et al., 2008; Al-Mazra'awi & Ateyyat, 2009; Rahuman et al., 2009).

Nesse contexto, inúmeros insetos-praga se destacam por serem de difícil controle por meio do uso de pesticidas sintéticos, merecendo destaque a *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (Barros et al., 2005). Trata-se de um inseto polífago, que causa danos a diversas culturas, tais como as do milho, do algodão etc.. Além disso, tem sido frequentemente relatada a seleção de populações de *S. frugiperda* resistentes a pesticidas (Yu, 2006; Yu & McCord Junior, 2007; Kansal et al., 2008; Virla et al., 2008), justificando-se, assim, a necessidade de novos estudos que busquem alternativas para o controle desse inseto.

As substâncias derivadas do metabolismo de plantas podem ser letais aos insetos ou, ainda, causar efeitos subletais, tais como redução no peso, fecundidade, fertilidade, alongamento das fases imaturas, deterrência alimentar, modificações ultra-estruturais em alguns tecidos, alterações em parâmetros nutricionais e inibição de enzimas digestivas (Malau & James, 2008; Nathan et al., 2008; Correia et al., 2009).

Entre as classes de metabólitos secundários de plantas com reconhecida atividade inseticida merecem destaque os compostos fenólicos, tais como lignina, flavonoides e taninos, conhecidos por conferirem proteção à planta contra a herbivoria (Schaller, 2008). Nesse contexto, metabólitos de plantas pertencentes à família Arecaceae são poucos estudados, do ponto de vista de sua

atividade biológica, contudo, sabe-se que tais plantas são ricas em lignina (Modafar et al., 2000). Recentemente, vem sendo detectada a atividade biológica de ligninas sobre insetos (Khanam et al., 2006; Kanis et al., 2009). Já as plantas pertencentes à família Euphorbiaceae são ricas em flavonoides, particularmente flavonas e flavonóis, os quais têm sido identificados em muitos gêneros dessa família de plantas (Rizk, 2008; Noori et al., 2009).

A respeito da atividade inseticida de flavonoides sobre lepidópteros, podem-se citar as flavonas isoladas de *Gnaphalium affine* D. Don. (Asteraceae), as quais foram tóxicas a *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) (Morimoto et al., 2003). Dentre as variadas classes de metabólitos secundários produzidos por rubiáceas, estão presentes os compostos fenólicos, que se mostram ativos contra lepidópteros (Beninger & Abou-Zaid et al., 1997; Mallikarjuna et al., 2004; Hoffmann-Campo et al., 2006).

Tendo em vista o exposto, a hipótese deste trabalho é a de que plantas pertencentes às famílias Arecaceae, Euphorbiaceae e Rubiaceae são ricas em compostos fenólicos e que essas substâncias apresentam toxicidade a insetos. Assim, esta pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar o efeito de extratos de plantas pertencentes às famílias Arecaceae, Euphorbiaceae e Rubiaceae sobre características biológicas, bioquímicas e ultra-estruturais de *S. frugiperda*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e preparo dos extratos

Foram selecionadas, para estudo, plantas pertencentes às famílias Arecaceae, Euphorbiaceae e Rubiaceae (Tabela 1A), para as quais, até o momento, não existem relatos de atividade inseticida e os trabalhos fitoquímicos são escassos. Os materiais botânicos foram coletados e amostras foram encaminhadas para identificação e depósito de exsicata no Herbário ESAL-

UFLA, sendo o restante empregado para o preparo dos extratos. Para a obtenção dos extratos, os materiais vegetais foram secos em estufa, à temperatura de 65°C e submetidos à extração com metanol. As fases líquidas foram concentradas em evaporador rotatório até a eliminação do solvente e liofilizadas, dando origem aos extratos vegetais.

4.2 Criação dos insetos

As lagartas obtidas de criação de laboratório foram alimentadas com dieta artificial desenvolvida por Greene et al. (1976) e os adultos com solução de mel a 10%. Os insetos permaneceram em sala climatizada (25±2°C, UR de 70±10% e fotofase de 14 horas). Para a realização dos experimentos foram utilizadas lagartas provenientes da segunda postura em laboratório.

4.3 Efeito dos extratos na biologia de *S. frugiperda*

Para a realização do bioensaio, os extratos vegetais foram previamente solubilizados em solução aquosa de Tween 80 a 1% e incorporados à dieta artificial desenvolvida por Greene et al. (1976), na concentração de 1.000 ppm. Depois de solidificada, a dieta foi cortada em pedaços, tendo sua massa mensurada e transferida para recipientes plásticos de 50 mL, aos quais foi inoculada uma lagarta recém-eclodida de *S. frugiperda*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento, sendo cada parcela constituída por seis lagartas, mantidas de forma isolada. As características biológicas avaliadas foram: duração das fases larval e pupal, peso das pupas (após 24 horas de pupação), percentagem de sobrevivência dos insetos nas fases larval e pupal, e razão sexual dos adultos.

Logo após a emergência dos insetos, casais de *S. frugiperda* foram isolados em gaiolas. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição

constituída por um casal. A longevidade dos adultos foi determinada por meio de observações diárias. As posturas foram recolhidas diariamente para quantificação, sendo aquelas provenientes do segundo dia de postura de cada casal utilizadas para a determinação da viabilidade e as referentes ao terceiro dia de postura encaminhadas para observação em microscópio eletrônico de varredura. Foram determinados os períodos de pré-oviposição e oviposição.

4.4 Teste de preferência com chance de escolha

Os extratos vegetais foram incorporados à dieta artificial na concentração de 1.000 ppm. Pedacos de dieta (1,5 cm de diâmetro x 1,3 cm de altura), previamente pesados, foram dispostos equidistantemente em arena constituída de placa de Petri (15 cm de diâmetro x 1,9 cm de altura). Em cada arena foram colocados dois pedacos de dieta contendo os tratamentos com os extratos e dois pedacos de dieta, nos quais foi incorporada solução aquosa de Tween 80 a 1%. No centro de cada arena, foram liberadas seis lagartas de *S. frugiperda*, com sete dias de idade, alimentadas com dieta artificial. Foram mantidas alíquotas da dieta nas mesmas condições em que foi conduzido o experimento, para a estimativa da perda de água.

O delineamento foi inteiramente casualizado com dez repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por uma arena. A avaliação da não-preferência das lagartas pelos extratos foi calculada em função da percentagem de lagartas em cada tratamento, após 24, 48 e 72 horas da liberação dos insetos, sendo contabilizadas apenas aquelas lagartas que se encontravam em cima da dieta no momento da avaliação. Após 72 horas, as sobras alimentares foram pesadas. O índice de deterrência alimentar (IDA) foi calculado de acordo com a fórmula $(C-T)/(C+T)*100$, em que C é o consumo no tratamento controle (solução aquosa de Tween 80 a 1%) e T é o consumo no tratamento com extrato (Farrar Junior et al., 1989). A perda de água foi corrigida utilizando-se a fórmula

Natural Losses $[1-a/2][W-(L+bL)]$, em que a = peso inicial da alíquota, b = média de perda de peso da alíquota, w = peso da dieta introduzida, L = peso da dieta não consumida (Cohen, 2004).

4.5 Efeito dos extratos sobre características nutricionais de *S. frugiperda*

Os extratos vegetais solubilizados em solução aquosa de Tween de 80 a 1% foram incorporados em dieta artificial. Os pedaços de dieta foram previamente pesados e lagartas recém-eclodidas foram inoculadas.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento, sendo cada parcela formada por seis lagartas, mantidas isoladas. Alíquotas permaneceram nas mesmas condições em que foi conduzido o experimento para estimativa da perda de água. Após 10 dias de alimentação com os extratos, avaliaram-se o consumo alimentar e o peso das lagartas e das fezes. Com esses dados foi calculado o índice de consumo (IC) = alimento ingerido/ganho de peso x dias de alimentação (g/g/dia), expresso em peso fresco, sendo a perda de água corrigida pela fórmula Natural Losses (Cohen, 2004). As fezes dos insetos provenientes de cada parcela experimental foram agrupadas e encaminhadas para determinação da digestibilidade proteica. Alíquotas da dieta também foram amostradas e empregadas para quantificação de proteínas.

Após dezoito dias da alimentação das lagartas de dieta contendo os tratamentos, os parâmetros nutricionais foram determinados por meio do método gravimétrico. Assim, alíquotas de dieta, lagartas e fezes, mantidas nas mesmas condições do experimento, foram submetidas a processo de liofilização para a determinação do peso seco. Por ser insignificante, o peso inicial dos insetos foi desprezado. Os parâmetros nutricionais foram calculados de acordo com Waldbauer (1968) e Slansky & Scriber (1985): índice de consumo (IC) (g/g/dia) = $I/B_m \times t$; taxa metabólica relativa (RMR) (g/g/dia) = $M/B_m \times t$; eficiência de conversão do alimento ingerido (%ECI) = $B/I \times 100$; digestibilidade aproximada

(%AD) = $(I-F)/I \times 100$; eficiência de conversão do alimento digerido (%ECD) = $B/I-F \times 100$ e custo metabólico (%CM) = $100 - ECD$, em que t = duração do período de alimentação (dias); F = peso das fezes produzidas (g) durante t; B = ganho de peso pelas lagartas (g) durante t = I - F - M; I = peso do alimento ingerido (g) durante t (alimento fornecido – sobra de alimento); I - F = alimento assimilado (g) durante t; M = alimento metabolizado durante período de alimentação (g) = I - F - B. O delineamento foi inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento, sendo cada parcela constituída por seis lagartas mantidas de forma isolada.

4.6 Digestibilidade proteica de *S. frugiperda* após a ingestão dos extratos

A digestibilidade proteica foi estimada tomando-se como base a quantificação de proteínas presentes nos tratamentos, em função do consumo alimentar do inseto, e as proteínas excretadas com as fezes, levando-se em consideração o peso de fezes após dez dias de alimentação das lagartas de dieta contendo os tratamentos. A extração de proteínas foi feita de acordo com metodologia proposta por Ferreira et al. (2008) e o teor de proteínas quantificado pelo método de Bradford (1976), tomando-se como padrão Soro albumina bovina, com concentração variando de 2 a 20 µg/mL. Foram empregadas duas repetições para cada extração e as amostras lidas em triplicata. A digestibilidade foi estimada pela fórmula: digestibilidade proteica (%) = $[(\text{proteína ingerida} - \text{proteína excretada}) \times 100] / \text{proteínas ingeridas}$.

4.7 Determinação da atividade inibitória de tripsina do extrato de *A. concolor*

Haja vista a alta atividade inseticida do extrato de *A. concolor*, o mesmo foi selecionado com vistas a determinar a atividade inibitória de tripsina de *S. frugiperda*. Assim, as enzimas digestivas foram obtidas de acordo com

metodologia de Oppert et al. (2005), com modificações. Lagartas de 4º instar de *S. frugiperda*, obtidas de criação de laboratório, foram imobilizadas em gelo e, em seguida, tiveram as extremidades anterior e posterior removidas e o intestino retirado. O intestino foi, então, macerado em homogenizador tipo Potter, na proporção de dois intestinos para 8 mL de água destilada, a 4°C. Após a maceração, o homogeneizado foi filtrado em tela de náilon de 100 micrômetros e centrifugado a 30.000 x g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante consistiu no extrato enzimático utilizado nos ensaios de inibição de tripsina.

A inibição de tripsina foi determinada pela medição da atividade enzimática residual para o substrato N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA), na comparação em um ensaio cinético com quatro períodos de tempo (Erlanger et al., 1961; Kakade, 1974). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, tendo os tratamentos empregados consistido do extrato de *Actinostemon concolor* (Spreng.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae) nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 250 ppm, determinadas a partir de ensaios prévios. Como tratamentos controle, a reação procedeu na ausência e na presença do inibidor, enzima e substrato. Para isso, 200µL do extrato enzimático foram incubados com o mesmo volume do extrato bruto de *A. concolor*, previamente solubilizado em metanol. Em seguida, foi adicionado o substrato BAPNA, na concentração de 0,87 mM, preparado em DMSO e tampão Gly-NaOH 0,1 M e pH 9,7. A reação procedeu a 30°C, tendo, após o período de tempo de 30, 60, 90 e 120 minutos, sido interrompida com solução de ácido acético a 30%. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de tripsina, por meio da comparação da velocidade de reação nos controles e nos tratamentos contendo os extratos.

4.8 Análise ultra-estrutural dos ovos e do intestino médio de *S. frugiperda*

Os ovos de terceira postura de *S. frugiperda*, provenientes de lagartas que foram alimentadas com dieta contendo os extratos, foram submetidos à análise ultra-estrutural em microscópio eletrônico de varredura, segundo metodologia proposta por Alves (2004).

Para verificar possíveis alterações ultra-estruturais no intestino médio das lagartas de *S. frugiperda*, os extratos vegetais foram incorporados em dieta artificial e oferecidos a lagartas recém-eclodidas.

O delineamento foi inteiramente casualizado com 20 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por uma lagarta. Após quatorze dias de alimentação, as lagartas foram imobilizadas em gelo, seguindo metodologia de Bolognesi et al. (2001) e dissecadas em fixador Karnovsky modificado (Barbeta et al., 2008). O material permaneceu em fixador por 24 horas e, em seguida, foi transferido para glicerol 30%, por 30 minutos. Posteriormente, foi imerso em nitrogênio líquido e realizada criofatura para a separação do intestino médio. Em seguida, os cortes referentes ao intestino médio foram preparados seguindo o protocolo padrão para amostras biológicas (Alves, 2004).

As imagens foram observadas no microscópio eletrônico de varredura Leo Evo 40. O software utilizado para a geração das imagens foi o “Leo User Interface”.

4.9 Extração e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos vegetais

Para a extração dos compostos fenólicos, alíquotas dos extratos foram dissolvidas em metanol 50% e submetidas a refluxo por 15 minutos. Após a extração, o material foi filtrado e o sobrenadante reservado, tendo o procedimento de extração sido repetido por três vezes, dando origem aos extratos fenólicos. A determinação do teor de fenóis totais presentes nas

amostras dos extratos vegetais foi feita utilizando-se o método de Folin-Dennis (Association of Official Analytical Chemists-AOAC, 1960). Assim, alíquotas dos extratos fenólicos foram tomadas e a elas foram adicionados reagente de Folin-Dennis e solução saturada de carbonato de sódio. As amostras tiveram a absorbância lida a 720 nm, em espectrofotômetro.

O teor de fenóis foi mensurado a partir da construção de uma curva de calibração usando ácido gálico como padrão, com concentração variando de 0 a 10µg/mL. O extrato fenólico excedente foi concentrado sob vácuo e liofilizado para ser submetido a ensaio biológico com lagartas de *S. frugiperda*. O procedimento de extração dos compostos fenólicos foi realizado utilizando-se três repetições por tratamento e as leituras foram feitas em triplicatas.

4.10 Efeito dos compostos fenólicos sobre características biológicas e nutricionais de *S. frugiperda*

O extrato fenólico proveniente de *A. concolor* foi dissolvido em solução aquosa de Tween 80 a 1% e incorporado à dieta artificial, de acordo com o rendimento obtido na extração, tomando como base a concentração de 1.000 ppm, utilizada nos ensaios anteriores. A massa da dieta foi previamente mensurada e, em seguida, foram inoculadas as lagartas de 1º instar de *S. frugiperda*. Alíquotas permaneceram nas mesmas condições de condução do experimento para estimativa da perda de água.

O delineamento foi inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento, sendo cada parcela constituída por seis lagartas. Após 10 dias de alimentação com os extratos, o índice de consumo (IC), expresso em g/g/dia e o peso das lagartas foram avaliados. Para estimativa da perda de água foi utilizada a fórmula Natural Losses (Cohen, 2004). Os demais parâmetros avaliados foram sobrevivência nas fases larval e pupal, peso de pupas, duração das fases larval e pupal, e razão sexual dos adultos. Após 18 dias da montagem do experimento,

os parâmetros nutricionais foram calculados com base no peso seco, da mesma forma que descrito anteriormente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito dos extratos sobre características biológicas de *S. frugiperda*

O extrato de *A. concolor* provocou redução na sobrevivência de *S. frugiperda* durante a fase larval; contudo, não foi observado efeito na sobrevivência desse inseto na fase pupal (Tabela 2A). Os aleloquímicos presentes em extratos vegetais podem causar toxicidade variada em função da fase de desenvolvimento em que o inseto se encontra. Isso pode explicar o fato de esses extratos terem afetado a sobrevivência de *S. frugiperda* na fase larval, mas não terem provocado mortalidade durante a fase de pupa. Há relatos de que insetos na fase de pupa apresentam maior tolerância a agentes químicos em comparação com outras fases de desenvolvimento (Bell, 1978). Scott et al. (2003) reportaram que o estágio pupal de *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) foi menos sensível à ação do extrato de *Piper nigrum* L. (Piperaceae) do que quando comparado ao estágio larval.

Lagartas alimentadas com dieta artificial contendo o extrato proveniente de *A. concolor* apresentaram peso médio de pupas 1,33 vez menor do que o observado para a testemunha Tween. Além disso, tal tratamento prolongou a fase larval desse inseto em 11,8 dias e a fase pupal, em 1,2 dia. A razão sexual não foi afetada por nenhum tratamento (Tabela 2A). A redução no peso, muitas vezes, apresenta correlação com o alongamento das fases imaturas, o que é um indicativo da presença de substâncias com efeito de antibiose sobre os insetos (Pereira et al., 2002). Já foi relatada, em outras espécies pertencentes à família Euphorbiaceae, a presença de aleloquímicos que causam efeitos semelhantes ao observado neste trabalho sobre *S. frugiperda*. Santiago et al. (2008), por

exemplo, verificaram que o extrato de *Ricinus comunis* L. (Euphorbiaceae) provocou alongamento na fase larval e redução no peso de pupas de *S. frugiperda*.

Os adultos provenientes de lagartas alimentadas com o extrato de *A. concolor* apresentaram redução de 41,4% na fecundidade das fêmeas, em relação ao com o tratamento controle Tween. A viabilidade dos ovos colocados pelos insetos foi reduzida nos tratamentos com *A. concolor* e *R. virbuinoides*, tendo os resultados mais pronunciados sido obtidos para o tratamento com *A. concolor*. Os períodos de pré-oviposição e oviposição e a longevidade de fêmeas e machos não foram afetados pelos extratos (Tabela 3A). A redução na fertilidade e na fecundidade de *S. frugiperda*, após tratamento com *A. concolor*, possivelmente se deu em função da redução no crescimento dos insetos durante as fases imaturas, provocada por uma assimilação inadequada de nutrientes na fase larval.

De forma semelhante ao constatado neste trabalho, Pineda et al. (2009) constataram que a ingestão de azadiractina por *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae) provocou redução na fertilidade e na fecundidade das fêmeas. Os autores consideraram tais efeitos como sendo resultado da interferência dessas substâncias no metabolismo de proteínas desse inseto.

5.2 Teste de preferência com chance de escolha

Em ensaio com chance de escolha, as lagartas de *S. frugiperda* apresentaram não preferência pelo extrato de *A. concolor* somente após 72 horas de exposição à dieta contendo esse extrato (Tabela 4A). Não foi observada diferença significativa, no que se refere ao índice de deterrência alimentar ($F=2.2737$; $p\leq 0,0760$) (Figura 1B). A redução do número de lagartas que se alimentaram do extrato de *A. concolor*, apenas 72 horas após a exposição a esse tratamento, indica que o extrato não apresenta efeito antialimentar sobre esse

inseto, demonstrando que ele cessou sua alimentação nesse tratamento somente após decorrido o tempo necessário para que o extrato provocasse efeito tóxico sobre as lagartas. Em muitos casos, a redução no peso de insetos e o alongamento das fases imaturas, devido à ingestão de metabólitos secundários, podem ocorrer em função da não-preferência do inseto em se alimentar daquele substrato (Abdel-Rahman & Al-Mozini, 2007; Zapata et al., 2009). Contudo, no presente trabalho, ficou evidenciado que o mecanismo responsável pela atividade inseticida de *A. concolor* sobre *S. frugiperda* é antibiose, haja vista que, apesar de esse extrato ter provocado redução no peso e alongamento da fase larval, só foi menos preferido pelo inseto após determinado tempo de alimentação. Além disso, o consumo alimentar não foi afetado.

5.3 Efeito dos extratos sobre fatores nutricionais e digestibilidade proteica de *S. frugiperda*

O peso das lagartas e o índice de consumo de *S. frugiperda*, após 10 dias de alimentação com os extratos vegetais, foram afetados pelo extrato de *A. concolor*, no qual as lagartas apresentaram peso médio duas vezes menor do que o observado no tratamento controle. O índice de consumo desses insetos foi 1,9 vez maior do que o constatado para a testemunha Tween. No que se refere à digestibilidade proteica, os tratamentos com os extratos de *Palicouria rigida* e *A. concolor* acarretaram os maiores valores de digestibilidade, indicando que *S. frugiperda* pode ter maximizado a digestão de proteínas como mecanismo compensatório à absorção inadequada de nutrientes (Tabela 5A).

Dessa maneira, observou-se que a utilização de alimento e o crescimento de *S. frugiperda*, após 10 dias de alimentação, foram severamente afetados pelo tratamento com o extrato de *A. concolor*. Apesar do aumento no índice de consumo, as lagartas apresentaram o peso drasticamente reduzido, o que indica que esse extrato apresenta substâncias com efeito de antibiose a *S. frugiperda*.

Tais resultados concordam com o aumento na digestibilidade de proteínas devido, possivelmente, a uma compensação na hiperprodução de proteases (Bolter & Jongsma, 1997). Resultados semelhantes foram observados por Pilon et al. (2006), os quais constataram que a ingestão de benzamidina, inibidor sintético de tripsina, por *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), resultou em aumento de 70% no consumo alimentar. Contudo, as lagartas apresentaram redução de 50% no ganho de peso, além de aumento na digestibilidade de proteínas. Pode-se citar também que lagartas de *Heliothis zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com taninos condensados apresentaram redução na atividade de proteases (Klocke & Chan, 1982).

Tem sido constatado que a digestão de proteínas no intestino médio de insetos não é eliminada pela ingestão de substâncias que afetam a atividade enzimática de proteases. Ao contrário, o que se observa, muitas vezes, é uma hiperprodução de proteases digestivas, como mecanismo compensatório (Broadway, 1997; Burgess et al., 2002). Entretanto, a elevada produção dessas proteases afeta negativamente a disponibilidade de aminoácidos, que são essenciais para a síntese de outras proteínas, prejudicando, assim, o crescimento e o desenvolvimento dos insetos (Mello & Silva-Filho, 2002; Murdock & Shade, 2002; Oppert et al., 2005).

O extrato de *A. concolor* alterou os parâmetros nutricionais de *S. frugiperda*. Verificou-se que a quantidade de alimento ingerido por grama de peso corpóreo do inseto por dia (RCR) foi 1,5 vez maior para esses insetos, quando comparado com o controle Tween o que, por sua vez, acarretou em aumento de 1,9 vez na quantidade de alimento ingerido, que foi gasto em metabolismo, por miligrama de peso corpóreo (RMR), quando comparado com o tratamento com Tween. A elevação na quantidade de alimento ingerido pode ter ocorrido devido a um aumento compensatório para a assimilação de nutrientes. Também houve redução na percentagem do alimento ingerido pelo

inseto que foi efetivamente transformado em biomassa (ECI). De forma análoga, constatou-se redução na percentagem do alimento digerido que foi convertido em biomassa do inseto (ECD). Os parâmetros custo metabólico e digestibilidade aparente foram maximizados no tratamento com *A. concolor* (Tabela 6A).

Apesar de o extrato de *A. concolor* ter provocado aumento do índice de consumo de *S. frugiperda*, esses insetos apresentaram redução no crescimento, o que pode ser atribuído ao fato de o tratamento ter causado diminuição na eficiência de conversão do alimento ingerido e digerido em biomassa. Assim, os insetos tiveram um aumento no índice de consumo, como um mecanismo compensatório à baixa conversão do alimento em biomassa. A redução na eficiência de conversão do alimento ingerido indica que mais alimento foi metabolizado para a conversão em energia e menos para a produção de biomassa, ou seja, para o crescimento do inseto (Koul et al., 2003). Esse achado corrobora o fato de esses insetos terem apresentado maior taxa metabólica, ou seja, uma parcela significativa do alimento ingerido foi gasta em metabolismo e menor quantidade foi efetivamente transformada em biomassa. Tal resultado é apoiado pelo aumento no custo metabólico desses insetos. Resultados semelhantes foram encontrados a partir do tratamento, via ingestão, de extratos de *Reynoutria* sp. (Polygonaceae) por lagartas de *S. littoralis*, tendo sido constatado que os tratamentos não afetaram o consumo alimentar, entretanto, reduziram o crescimento das lagartas e a eficiência de conversão do alimento ingerido e digerido em biomassa (Pavela et al., 2008).

Em geral, a redução na eficiência de conversão do alimento aliada a não diminuição no consumo causa redução na digestibilidade aparente. Contudo, no presente estudo, foi constatado aumento na digestibilidade aparente, o que encontra sustentação no trabalho realizado por Reynolds et al. (1985), em que foi demonstrado que os insetos podem aumentar o tempo de retenção do alimento, a fim de maximizar a absorção de nutrientes. De mesma forma,

Nathan et al. (2005) mostraram que limonoides presentes no neem (*Azadirachta indica* A. Juss - Meliaceae) aumentaram a digestibilidade aparente de *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae). Pode-se citar, ainda, que um inibidor de tripsina purificado das sementes de *Plathymenia foliolosa* (Benth.) (Fabaceae) não afetou o consumo alimentar de *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), mas causou redução na eficiência de conversão do alimento ingerido e digerido, e aumento na digestibilidade aparente. Os autores sugeriram que isso pode ter ocorrido devido ao fato de o alimento ter permanecido maior tempo no intestino dos insetos (Ramos et al., 2009).

5.4 Determinação da atividade inibitória de tripsina do extrato de *A. concolor*

Foi constatado que o extrato bruto de *A. concolor*, nas concentrações de 25 a 250 ppm, foi capaz de causar inibição na faixa de 32,7% a 81,8% da atividade da tripsina de *S. frugiperda* ($F=102,9$; $p<0,0001$) (Figura 2B). Os resultados obtidos com o extrato bruto mostram-se bastante promissores, quando comparados ao efeito de substâncias puras, também inibidores da atividade de tripsina, sobre outros lepidópteros (Ramos et al., 2008).

Os inibidores de proteases, presentes nas plantas, são pequenas moléculas de proteínas muito importantes na defesa contra insetos fitófagos. Essas moléculas inibem proteases presentes no intestino dos insetos, causando redução na disponibilidade de aminoácidos necessários para o crescimento e o desenvolvimento dos mesmos (Lawrence & Koundal, 2002; Leo et al., 2002). Contudo, outras classes de substâncias também podem causar efeitos semelhantes; taninos, por exemplo, são conhecidos por complexarem enzimas digestivas dos insetos, reduzindo a atividade de proteases presentes no intestino (Klocke & Chan, 1982; Nation, 2002; Rai & Carpinella, 2006).

Como resultado de distúrbio no metabolismo de proteínas, os insetos podem apresentar alterações em diversos parâmetros, tais como distúrbios no crescimento e em parâmetros nutricionais, alterações morfológicas e redução no desempenho reprodutivo (Leo & Gallerani, 2002; Franco et al., 2003; Ramos et al., 2009). Dessa maneira, tendo em vista o efeito do extrato de *A. concolor* sobre a inibição de tripsina de *S. frugiperda*, *in vitro*, provavelmente um dos mecanismos de ação do extrato de *A. concolor* é a redução na atividade dessa enzima de *S. frugiperda*.

5.5 Análise ultra-estrutural dos ovos e do intestino médio de *S. frugiperda*

Os ovos provenientes dos insetos que foram alimentados com os extratos de *A. concolor* e *R. virbuinoides* apresentaram malformações, com deposição anormal de material no córion (Figura 3B), justificando-se a baixa viabilidade dos mesmos. O efeito de substâncias químicas sobre a embriogênese de *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) já foi relatada por outros autores, os quais atribuíram tais malformações à capacidade dos aleloquímicos de afetarem o metabolismo de proteínas e lipídios, principais constituintes da camada do córion dos insetos (Fila et al., 2002; Adamsk et al., 2005).

As vilosidades do intestino das lagartas de *S. frugiperda* apresentaram rupturas, quando observadas em microscópio eletrônico de varredura (Figura 4B). De forma análoga ao constatado no presente trabalho, Correia et al. (2009) observaram histólise do epitélio intestinal de *S. frugiperda* após tratamento, via ingestão, com *A. indica*. Podem-se citar, ainda, rupturas das vilosidades do intestino de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), bastante semelhantes às observadas no presente estudo, após a ingestão de um metabólito secundário (Barbeta et al., 2008).

5.6 Quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos vegetais

No que se refere à quantificação dos compostos fenólicos, presentes nos extratos vegetais, *A. concolor* apresentou concentração aproximadamente cinco vezes maior do que as constatadas nos demais tratamentos. Os compostos fenólicos também puderam ser detectados, embora em menor quantidade, nos extratos de *P. rigida*, *R. viburnoides* e *Geonoma shottiana* ($F=1694,4$; $p<0,0001$) (Figura 5B). Trabalhos fitoquímicos com *P. rigida*, *A. concolor*, *R. viburnoides* e *G. shottianna* são escassos em literatura até o presente momento. Contudo, sabe-se que outras espécies da família Euphorbiaceae, tal como *A. concolor*, apresentam elevados teores de compostos fenólicos. Em *Alchornea glandulosa* Endl. & Poeppig (Euphorbiaceae), por exemplo, os compostos fenólicos representam 10% ($98,81\pm 0,05$ mg/g) do extrato metanólico (Calvo et al., 2007). Para *P. rigida*, sabe-se que alcaloides, bastante comuns na família Rubiaceae, não são encontrados; contudo, a espécie produz iridoides glicosilados (loganin) (Lopes et al., 2004).

Quanto aos fenóis, ácidos fenólicos já foram isolados de *Palicourea demissa* Standl. (Rubiaceae) (El-Seedi et al., 1999). Em se tratando de *R. viburnoides*, o perfil cromatográfico mostra a presença de taninos, flavonoides, triterpenos e saponinas (Alves et al., 2004). No que diz respeito a *G. shottianna*, em geral, os trabalhos fitoquímicos com plantas da família Arecaceae são escassos, mas é relatada a presença de compostos fenólicos em muitos gêneros (Khanavi et al., 2009; Namvar et al., 2009; Chang et al., 2010).

5.7 Efeito dos compostos fenólicos sobre características biológicas e nutricionais de *S. frugiperda*

O extrato fenólico de *A. concolor* reduziu significativamente a sobrevivência dos insetos durante a fase larval. Contudo, não houve efeito desses compostos sobre a sobrevivência de *S. frugiperda* na fase de pupa

(Tabela 7A). Os compostos fenólicos são classicamente conhecidos por atuarem nos sistemas de defesa das plantas, promovendo proteção contra herbivoria (Mello & Silva-Filho, 2002; Campos et al., 2008). O efeito letal de compostos fenólicos sobre insetos é bem conhecido, podendo-se citar o efeito de taninos sintéticos sobre a sobrevivência de *S. litura* (Nomura & Itioka, 2002). Também vale a pena citar o efeito inseticida dos extratos de *Vitex polygama* Cham. (Verbenaceae) e *Siphoneugena densiflora* Berg (Myrtaceae) sobre *S. frugiperda*. Quando as substâncias ativas foram isoladas, constatou-se que, entre os compostos isolados, os flavonoides apresentaram os melhores resultados inseticidas (Gallo et al., 2006).

A respeito do modo de ação de compostos fenólicos sobre insetos, alguns autores relataram a formação de lesões degenerativas no intestino (Arteel & Lindroth, 1992). Entretanto, mais recentemente, foi demonstrado que, para *Malacosoma disstria* Hübner (Lepidoptera: Lasiocampidae), a ingestão de compostos fenólicos não apenas produz um estresse oxidativo no conteúdo do lúmen do intestino médio, como também pode levar a um aumento do estresse oxidativo nos tecidos do intestino, o que provocaria a formação de lesões no mesmo (Barbehenn et al., 2008).

Após 10 dias de alimentação com o extrato fenólico de *A. concolor*, o índice de consumo para lagartas de *S. frugiperda* foi quase o dobro do que o encontrado no controle Tween. Também foi constatado que as lagartas apresentaram peso médio duas vezes menor do que os do tratamento controle (Tabela 7). O aumento na taxa de consumo de insetos herbívoros ocorre como resposta a uma baixa disponibilidade de nutrientes ou, então, como resultado de uma reduzida eficiência fisiológica após a ingestão do alimento (Slansky, 1993; Kause et al., 1999). Compostos fenólicos são capazes de causar efeitos dessa magnitude em insetos e, nesse mesmo sentido, lagartas de *M. disstria*

apresentaram aumento na taxa de consumo relativo e redução no crescimento, quando alimentadas com glicosídeos fenólicos (Hemming & Lindroth, 2000).

Pupas provenientes de lagartas alimentadas com os compostos fenólicos de *A. concolor* apresentaram peso 1,3 vez inferior ao observado para a testemunha Tween. Além disso, as fases larval e pupal foram alongadas, não ocorrendo efeito sobre a razão sexual dos adultos (Tabela 7). Alterações no desenvolvimento de lepidópteros, tais como redução no peso de pupas e alongamento na duração da fase jovem, devido à ingestão de compostos fenólicos são conhecidas. O flavonoide astilbina, isolado de *Dimorphandra mollis* Benth. (Fabaceae), provocou redução no peso e prolongamento do ciclo de *S. frugiperda*, tendo tais alterações sido atribuídas ao efeito de antibiose dessa substância sobre tal inseto (Pereira et al., 2002).

Em se tratando dos parâmetros nutricionais, a taxa de crescimento relativo foi 1,93 vez maior para os insetos alimentados com os compostos fenólicos de *A. concolor*, em comparação com o controle Tween. A eficiência de conversão do alimento ingerido e digerido foi 1,71 e 2,18 vezes menores, respectivamente do que no tratamento controle, ao passo que o custo metabólico e a digestibilidade aparente apresentaram valores médios 1,02 e 1,31 vez maiores do que o constatado na testemunha (Tabela 8A).

O efeito de compostos fenólicos sobre os parâmetros nutricionais de *S. frugiperda*, constatado no presente trabalho, confirmam resultados encontrados em literatura para outras espécies de insetos (Stamp, 1990; Hemming & Lindroth, 2000). Os compostos fenólicos podem atuar reduzindo a palatabilidade ou, então, agindo como inibidores da digestão por meio da precipitação de proteínas alimentares ou de enzimas digestivas (Bernays & Chamberlain, 1980). Os resultados encontrados no presente trabalho corroboram para que o possível modo de ação dessas substâncias, presentes em *A. concolor*, sobre *S. frugiperda* se dê por meio da inibição de enzimas digestivas.

No presente trabalho foi evidenciado o potencial do extrato e dos compostos fenólicos de *A. concolor* para o controle de *S. frugiperda*. Esses tratamentos afetaram a sobrevivência dos insetos na fase larval, provocaram redução no peso de lagartas e pupas, e alongamento da fase larval. A redução no peso é prejudicial aos insetos, já que os mesmos se tornam mais vulneráveis, em função do peso reduzido e soma-se a isso o maior tempo de exposição, devido ao alongamento da fase larval, a fatores naturais de mortalidade, tais como inimigos naturais e a condições ambientais adversas. O fato de os tratamentos terem provocado aumento na taxa de consumo relativo dos insetos não anula os efeitos prejudiciais desses aleloquímicos sobre *S. frugiperda*, já que tais compostos podem diminuir o ataque à planta de forma indireta, a partir da redução na população de insetos, que pode ser constatada em função da redução na sobrevivência e no desempenho reprodutivo dos adultos.

As alterações nos parâmetros nutricionais e lesões nos intestinos dos insetos evidenciam que esses compostos são capazes de afetar a absorção de nutrientes o que, por sua vez, reduz o potencial de crescimento e desenvolvimento de *S. frugiperda*. O aumento na digestibilidade de proteínas, aliado à inibição da atividade de tripsina, reforça a hipótese de que o provável mecanismo de ação inseticida de *A. concolor* sobre *S. frugiperda* ocorre devido à inibição de proteases do inseto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, H.R.; AL-MOZINI, R.N. Antifeedant and toxic activity of some plant extracts against larvae of cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalagad, v.10, n.24, p.4467-4472, Dec. 2007.

ADAMSKI, Z.; NIEWADZI, M.; ZIEMNICKI, K. Inheritance of chorionic malformations and insecticide resistance by *Spodoptera exigua*. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.126, n.2/3, p.114-118, Sept. 2005.

AL-MAZRA'AWI, M.S.; ATEYYAT, M. Insecticidal and repellent activities of medicinal plant extracts against the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* (Hom.: Aleyrodidae) and its parasitoid *Eretmocerus mundus* (Hym.: Aphelinidae). **Journal of Pest Science**, Berlin, v.82, n.2, p.149-154, May 2009.

ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 43p.

ALVES, R.M.S.; STEHMANN, J.R.; ISAIAS, R.M.S.; BRANDÃO, M.G.L. Caracterização botânica e química de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth.; (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v.14, n.1, p.49-56, jan. 2004.

ARTEEL, G.E.; LINDROTH, R.L. Effects of aspen phenolic glycosides on gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. **The Great Lakes Entomologist**, Michigan, v.25, n.4, p.239-244, 1992.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 9.ed. Washington, 1960. 111p.

BARBEHENN, R.V.; MABEN, R.E.; KNOESTER, J.J. Linking phenolic oxidation in the midgut lumen with oxidative stress in the midgut tissues of a tree-feeding caterpillar *Malacosoma disstria* (Lepidoptera: Lasiocampidae). **Environmental Entomology**, Lanham, v.37, n.5, p.1113-1118, Oct. 2008.

BARBETA, B.L.; MARSHALL, A.T.; GILLON, A.D.; CRAIK, D.J.; ANDERSON, M.A. Plant cyclotides disrupt epithelial cells in the midgut of lepidopteran larvae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, New York, v.105, n.4, p.1221-1225, Jan. 2008.

BARROS, R.G.; ALBERNAZ, K.C.; TAKATSUKA, F.S.; CZEPAK, C.; FERNANDES, P.M.; TOFOLI, G.R. Eficiência de inseticidas no controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.35, n.3, p.179-182, 2005.

BELL, C.H. Limiting concentrations for fumigant efficiency in the control of insect pests. In: INTERNATIONAL WORKING CONFERENCE ON STORED-PRODUCT ENTOMOLOGY, 2., 1978, Ibadan. **Proceedings...** Ibadan: SPT, 1978. p.182-192.

BENINGER, C.W.; ABOU-ZAID, M.M. Flavonol glycosides from four pine species that inhibit early instar gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) development. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v.25, n.6, p.505-512, Sept. 1997.

BERNAYS, E.A.; CHAMBERLAIN, D.J. A study of tolerance of ingested tannin in *Schistocerca gregaria*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.26, n.6, p.415-420, 1980.

BOLOGNESI, R.; RIBEIRO, A.F.; TERRA, W.R.; FERREIRA, C. The Peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*: secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling digestive enzymes. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v.47, n.2, p.62-75, June 2001.

BOLTER, C.; JONGSMA, M.A. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.43, n.10, p.885-895, Oct. 1997.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, n.5, p.248-254, Sept. 1976.

BROADWAY, R.M. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.43, n.9, p.855-874, Sept. 1997.

BURGESS, E.P.J.; LÖVEI, G.L.; MALONE, L.A.; NIELSEN, I.W.; GATEHOUSE, H.S.; CHRISTELLER, J.T. Prey-mediated effects of the protease inhibitor aprotinin on the predatory carabid beetle *Nebria brevicollis*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.48, n.12, p.1093-1101, Dec. 2002.

- CALVO, T.R.; LIMA, Z.P.; SILVA, J.S.; BALLESTEROS, K.V.; PELLIZZON, C.H.; HIRUMA-LIMA, C.A.; TAMASHIRO, J.; BRITO, A.R.M.; KIOMI, T.R.; VILEGAS, W. Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.30, n.3, p.451-459, Mar. 2007.
- CAMPOS, W.G.; FARIA, A.P.; OLIVEIRA, M.G.A.; SANTOS, H.L. Induced response against herbivory by chemical information transfer between plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.20, n.4, p.257-266, Oct./Dec. 2008.
- CHANG, C.L.; WANG, G.J.; ZHANG, L.J.; TSAI, W.J.; CHEN, R.Y.; WU, Y.C.; KUO, Y.H. Cardiovascular protective flavonolignans and flavonoids from *Calamus quiqueseinervius*. **Phytochemistry**, Oxford, v.71, n.2/3, p.271-279, Feb. 2010.
- COHEN, A.C. **Insect diets science and technology**. Boca Raton: CRC, 2004. 324p.
- CORREIA, A.A.; TEIXEIRA, V.W.; TEIXEIRA, Á.A.C.; OLIVEIRA, J.V.; TORRES, J.B. Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com nim. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.38, n.1, p.83-91, fev. 2009.
- EL-SEEDI, H.R. Coumarins, benzoic acids and triterpenoids from *Palicourea demissa*. **Revista Latinoamericana de Química**, Cidade do México, v.27, n.3, p.13-16, 1999.
- ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two, new chromogenic substrates of tripsina. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.95, n.1, p.271-278, Nov. 1961.
- FARRAR JUNIOR, R.R.; BARBOUR, J.D.; KENNEDY, G.G. Quantifying food consumption and growth in insects. **Annals of the Entomological Society of América**, Lanham, v.82, n.5, p.593-598, Sept. 1989.

FERREIRA, A.H.; CRISTOFOLETTI, P.T.; PIMENTA, D.C.; RIBEIRO, A.F.; TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Structure, processing and midgut secretion of putative peritrophic membrane ancillary protein (PMAP) from *Tenebrio molitor* larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.38, n.2, p.233-243, Feb. 2008.

FILA, K.; ADAMSKI, Z.; ZIEMNICKI, K. Exposure to fenitrothion causes malfunctions of *Spodoptera exigua* Hübner (Lep.; Noctuidae) eggs. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.126, n.2/3, p.114-118, Apr. 2002.

FRANCO, O.L.; SANTOS, R.C.; BATISTA, J.A.N.; MENDES, A.C.M.; ARAÚJO, M.A.M.; MONNERATA, R.G.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; FREITAS, S.M. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. **Phytochemistry**, Oxford, v.63, n.3, p.343-349, June 2003.

GALLO, M.B.C.; ROCHA, W.C.; CUNHA, U.S. da; DIOGO, F.A.; SILVA, F.C. da; VIEIRA, P.C.; VENDRAMIM, J.D.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F. da G.F.; BATISTA-PEREIRA, L.G. Bioactivity of extracts and isolated compounds from *Vitex polygama* (Verbenaceae) and *Siphoneugena densiflora* (Myrtaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, London, v.62, n.11, p.1072-1081, Sept. 2006.

GEORGES, K.; JAYAPRAKASAM, B.; DALAVOY, S.S.; NAIR, M.G. Pest-managing activities of plant extracts and anthraquinones from *Cassia nigricans* from Burkina Faso. **Bioresource Technology**, Essex, v.99, n.6, p.2037-2045, Apr. 2008.

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

HEMMING, J.D.C.; LINDROTH, R.L. Effects of phenolic glycosides and protein on gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) and forest tent caterpillar (Lepidoptera: Lasiocampidae) performance and detoxication activities. **Environmental Entomology**, Lanham, v.29, n.6, p.1108-1115, Dec. 2000.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; OLIVEIRA, M.C.N. de; OLIVEIRA, L.J. Detrimental effect of rutin on *Anticarsia gemmatalis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.10, p.1453-1459, out. 2006.

- KAKADE, M.L.; RACKIS, J.J.; MCGHEE, J.E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy bean products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.51, n.3, p.376-382, May/June 1974.
- KANIS, L.A.; ANTONIO, R.D.; ANTUNES, E.P.I.; PROPHIRO, J.S.; SILVA, O.S. Larvicidal effect of dried leaf extracts from *Pinus caribaea* against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.42, n.4, p.373-376, jul./ago. 2009.
- KANSAL, R.; KUMAR, M.; KUHAR, K.; GUPTA, R.N.; SUBRAHMANYAM, B.; KOUNDAL, K.R.; GUPTA, V.K. Purification and characterization of trypsin inhibitor from *Cicer arietinum* L. and its efficacy against *Helicoverpa armigera*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.20, n.4, p.313-322, Oct./Dec. 2008.
- KAUSE, A.; HAUKIOJA, E.; HANHIMA, S. Phenotypic plasticity in foraging behavior of sawfly larvae. **Ecology**, Durham, v.80, n.4, p.1230-1241, June 1999.
- KHANAM, L.A.M.; TALUKDER, D.; HYE, A. Toxic and repellent action of sugarcane bagasse-based lignin against some stored grain insect pests. **University Journal of Zoology**, Rajshahi, v.25, n.1, p.27-30, 2006.
- KHANA VI, M.; SAGHARI, Z.; MOHAMMADIRAD, A.; KHADEMI, R.; HADJIAKHOONDI, A.; ABDOLLAHI, M. Comparison of antioxidant activity and total phenols of some date varieties. **Daru**, Tehran, v.17, n.2, p.104-108, Mar. 2009.
- KLOCKE, J.A.; CHAN, B.G. Effects of cotton condensed tannin on feeding and digestion in the cotton pest, *Heliothis zea*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.28, n.11, p.911-915, 1982.
- KOUL, W.M.; DANIEWSKI, J.S.; MULTANI, M.; GUMULCA, G.S. Antifeedant effects of the limonoids from *Entandrophragma candolei* (Meliaceae) on the gram pod borer, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.51, n.25, p.7271-7275, Dec. 2003.
- LAWRENCE, P.K.; KOUNDAL, K.R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v.15, n.1, p.93-109, Apr. 2002.

LEO, F. de; GALLERANI, R. The mustard trypsin inhibitor 2 affects the fertility of *Spodoptera littoralis* larvae fed on transgenic plants. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.32, n.5, p.489-496, May 2002.

LEO, F. de; VOLPICELLA, M.; LICCIULLI, F.; LIUNI, S.; GALLERANI, R.; CECI, L.R. Plant-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. **Nucleic Acids Research**, London, v.30, n.1, p.347-348, Jan. 2002.

LOPES, S.; POSER, G.L.; KERBER, V.A.; FARIAS, F.M.; KONRATH, E.L.; MORENO, P.; SOBRAL, M.E.; ZUANAZZI, J.A.S.; HENRIQUES, A.T. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v.32, n.12, p.1187-1195, Dec. 2004.

MALAU, M.B.; JAMES, D.B. Evaluation of larvicidal properties of some plant. **Journal of Toxicology**, New York, v.4, n.2, p.293-297, May 2008.

MALLIKARJUNA, N.; KRANTHI, K.R.; JADHAV, D.R.; KRANTHI, S.; CHANDRA, S. Influence of foliar chemical compounds on the development of *Spodoptera litura* (Fab.) in interspecific derivatives of groundnut. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.128, n.5, p.321-328, June 2004.

MELLO, M.O.; SILVA-FILHO, M.C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.14, n.2, p.71-81, May/Aug. 2002.

MODAFAR, C.E.; TANTAOU, A.; BOUSTANI, E.E. Changes in cell wall-bound phenolic compounds and lignin in roots of date palm cultivars differing in susceptibility to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis*. **Journal of Phytopathology**, Saint Paul, v.148, n.7/8, p.405-411, Dec. 2000.

MORIMOTO, M.; TANIMOTO, K.; NAKANO, S.; OZAKI, T.; NAKANO, A.; KOMAI, K. Insect antifeedant activity of flavones and chromones against *Spodoptera litura*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.51, n.2, p.389-393, Dec. 2003.

MURDOCK, L.L.; SHADE, R.E. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.50, n.22, p.6605-6611, Oct. 2002.

NAMVAR, F.; MOHAMED, S.; BEHRAVAN, J.; MUSTAPHA, N.M.; ALITHEEN, N.B.M.; OTHMAN, F. Estrogenic activity of *Elaeis guineensis* leaf. **Pharmacologyonline**, Salerno, v.78, n.2, p.818-826, May/Aug. 2009.

NATHAN, S.S.; CHOI, M.Y.; SEO, H.Y.; PAIK, C.H.; KALAIVANI, K. Toxicity and behavioral effect of 3beta,24,25-trihydroxycycloartane and beddomei lactone on the rice leaffolder *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.72, n.4, p.1156-1162, May 2008.

NATHAN, S.S.; KALAIVANI, K.; MURUGAN, K.; CHUNG, P.G. Efficacy of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae) the rice leaffolder. **Crop Protection**, Brunswick, v.24, n.8, p.760-763, Aug. 2005.

NATION, J.L. **Insect physiology and biochemistry**. Boca Raton: CRC, 2002. 41p.

NOMURA, M.; ITIOKA, T. Effects of synthesized tannin on the growth and survival of a generalist herbivorous insect, the common cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v.37, n.2, p.285-289, 2002.

NOORI, M.; CHEHREGHANI, A.; KAVEH, M. Flavonoids of 17 species of Euphorbia (Euphorbiaceae) in Iran. **Toxicological and Environmental Chemistry**, New York, v.91, n.4, p.631-641, June 2009.

OPPERT, B.; MORGAN, T.D.; HARTZER, K.; KRAMER, K.J. Compensatory proteolytic responses to dietary proteinase inhibitors in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v.140, n.1, p.53-58, Jan. 2005.

PAVELA, R.; VRCHOTOVÁ, N.; ŠERÁ, B. Growth inhibitory effect of extracts from *Reynoutria* sp. plants against *Spodoptera littoralis* larvae. **Agrociencia**, Cidade do México, v.42, n.5, p.573-584, July/Aug. 2008.

PEREIRA, L.G.B.; PETACCI, F.; FERNANDES, J.B.; CORREA, A.G.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.F.; MALASPINA, O. Biological activity of astilbin from *Dimorphandra mollis* against *Anticarsia gemmatilis* and *Spodoptera frugiperda*. **Pest Management Science**, London, v.58, n.5, p.503-507, May 2002.

PILON, A.M.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R.N.C. Protein digestibility, protease activity, and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v.86, n.1, p.23-29, Sept. 2006.

PINEDA, S.; MARTINEZ, A.M.; FIGUEROA, J.I.; SCHNEIDER, M.I.; ESTAL, P.D.; VINUELA, E.; GOMEZ, B.; SMAGGHE, G.; BUDIA, F. Influence of azadirachtin and methoxyfenozide on life parameters of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.102, n.4, p.1490-1496, Aug. 2009.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna, 2009. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 1 fev. 2010.

RAHUMAN, A.A.; BAGAVAN, A.; KAMARAJ, C.; VADIVELU, M.; ABDUZ-ZAHIR, A.; ELANGO, G.; PANDIYAN, G. Evaluation of indigenous plant extracts against larvae of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Journal Parasitology Research**, Berlin, v.104, n.3, p.637-643, Feb. 2009.

RAI, M.; CARPINELLA, M.C. **Advances in phytomedicine**. New York: Elsevier, 2006. 514p.

RAMOS, V.S.; FREIRE, M.G.M.; PARRA, J.R.P.; MACEDO, M.L.R. Regulatory effects of an inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds on the larval development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Oxford, v.152, n.2, p.255-261, Feb. 2009.

RAMOS, V.S.; SILVA, G.S.; FREIRE, M.G.M.; MACHADO, O.L.T.; PARRA, J.R.P.; MACEDO, M.L.R. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v.56, n.23, p.11348-11355, Nov. 2008.

REYNOLDS, S.E.; NOTTINGHAM, S.F.; STEPHENS, A.E. Food and water economy and its relation to growth in fifth instar larvae of tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.31, n.2, p.119-127, 1985.

RIZK, A.F.M. The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.94, n.1/2, p.293-326, May 2008.

SANTIAGO, G.P.; PÁDUA, L.E.M.; SILVA, P.R.R.; CARVALHO, E.M.S.; MAIA, C.B. Efeitos de extratos de plantas na biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) mantida em dieta artificial. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.3, p.792-796, maio/jun. 2008.

SCHALLER, A. **Induced plant resistance to herbivory**. Hardcover: Springer, 2008. 464p.

SCOTT, I.M.; JENSEN, H.; SCOTT, J.G.; ISMAN, M.B.; ARNASON, J.T.; PHILOGÈNE, B.J. Botanical insecticides for controlling agricultural pests: piperamides and the colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v.54, n.4, p.212-225, 2003.

SLANSKY, F. Nutritional ecology: the fundamental quest for nutrients. In: STAMP, N.E.; CASEY, T.M. (Ed.). **Caterpillars: ecological and evolutionary constraints on foraging**. London: Chapman and Hall, 1993. p.29-91.

SLANSKY, F.J.; SCRIBER, J.M. Food consumption and utilization. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. London: Pergamon, 1985. v.4, p.165-211.

STAMP, N.E. Growth versus molting time of caterpillars as a function of temperature, nutrient concentration and the phenolic rutin. **Oecologia**, Berlin, v.82, n.1, p.107-113, Jan. 1990.

VIRLA, E.G.; ÁLVAREZ, A.; LOTO, F.; PERA, L.M.; BAIGORÍ, M. Fall armyworm strains (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina, their associate host plants and response to different mortality factors in laboratory. **Florida Entomologist**, Gainesville, v.91, n.1, p.63-69, Mar. 2008.

WALDBAUER, G.P. The consumption and utilization of food by insects. **Advances in Insect Physiology**, San Diego, v.5, n.7, p.229-288, Feb. 1968.

YU, S.J. Insensitivity of acetylcholinesterase in a field strain of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v.84, n.2, p.135-142, Feb. 2006.

YU, S.J.; MCCORD JUNIOR, E. Lack of cross-resistance to indoxacarb in insecticide-resistant *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Pest Management Science**, London, v.63, n.1, p.63-67, Jan. 2007.

ZAPATA, N.; BUDIA, F.; VIÑUELA, E.; MEDINA, P. Antifeedant and growth inhibitory effects of extracts and drimanes of *Drimys winteri* stem bark against *Spodoptera littoralis* (Lep.; Noctuidae). **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v.30, n.1, p.119-125, July 2009.

ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1A Materiais botânicos empregados para o preparo dos extratos.....	86
TABELA 2A Efeito dos extratos vegetais de <i>Geonoma schottiana</i> , <i>Actinostemon concolor</i> , <i>Palicouria rigida</i> e <i>Rudgea viburnoides</i> , incorporados à dieta artificial, sobre peso de pupas, duração das fases larval e pupal, e razão sexual dos adultos de <i>Spodoptera frugiperda</i>	87
TABELA 3A Efeito de extratos de <i>Geonoma schottiana</i> , <i>Actinostemon concolor</i> , <i>Palicouria rigida</i> e <i>Rudgea viburnoides</i> sobre os períodos de pré-oviposição e oviposição (dias), longevidades das fêmeas e machos (dias), número de ovos por fêmea e viabilidade de ovos (%) de <i>Spodoptera frugiperda</i> , que receberam tratamentos via ingestão durante a fase larval.....	88
TABELA 4A Número de lagartas se alimentando de dieta contendo os extratos vegetais provenientes de <i>Actinostemon concolor</i> , <i>Geonoma schottiana</i> , <i>Rudgea viburnoides</i> e <i>Palicouria rigida</i> e com solução aquosa de Tween 80 a 1%, após 24, 48 e 72 horas da liberação dos insetos nas arenas.....	89
TABELA 5A Efeito de extratos de <i>Actinostemon concolor</i> , <i>Geonoma schottiana</i> , <i>Palicouria rigida</i> e <i>Rudgea viburnoides</i> sobre o peso de lagartas, índice de consumo (IC) e digestibilidade proteica (%) de <i>S. frugiperda</i> , após 10 de alimentação.....	90
TABELA 6A Efeito dos extratos de <i>Rudgea viburnoides</i> , <i>Palicouria rigida</i> , <i>Geonoma schottiana</i> e <i>Actinostemon concolor</i> e sobre a taxa de crescimento relativo (RCR) (g/g/dia), taxa metabólica relativa (RMR) (g/g/dia), eficiência de conversão do alimento ingerido (%ECI), digestibilidade aparente (%AD), eficiência de conversão do alimento digerido (%ECD) e custo metabólico (%CM) de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	91
TABELA 7A Efeito de compostos fenólicos, provenientes de <i>Actinostemon concolor</i> , sobre a sobrevivência na fase larval (%), índice de consumo (g/g/dia) e peso das lagartas (g), após 10 dias de alimentação e peso de pupas (g), duração das fases larval e pupal (dias) e razão sexual dos adultos de <i>Spodoptera frugiperda</i>	92

TABELA 8A Efeito de compostos fenólicos, provenientes de *Actinostemon concolor*, taxa de crescimento relativo (RCR) (g/g/dia), taxa metabólica relativa (RMR) (g/g/dia), eficiência de conversão do alimento ingerido (%ECI), digestibilidade aparente (%AD), eficiência de conversão do alimento digerido (%ECD) e custo metabólico (%CM) de lagartas de *Spodoptera frugiperda*..... 93

TABELA 1A Materiais botânicos empregados para o preparo dos extratos.

Espécie	Família	Número de exsicata
<i>Actinostemon concolor</i> (Spreng.) Müll. Arg.	Euphorbiaceae	16782
<i>Geonoma schottiana</i> Mart.	Arecaceae	12945
<i>Rudgea viburnoides</i> (Cham.) Benth.	Rubiaceae	14001
<i>Palicourea rigida</i> Kunth	Rubiaceae	8933

TABELA 2A Efeito dos extratos vegetais de *Geonoma schottiana*, *Actinostemon concolor*, *Palicouria rigida* e *Rudgea viburnoides*, incorporados à dieta artificial, sobre peso de pupas, duração das fases larval e pupal, e razão sexual dos adultos de *Spodoptera frugiperda*.

Tratamento	Sobrevivência na fase larval (%) ¹	Peso de pupas (mg) ¹	Duração da fase larval (dias) ¹	Duração da fase pupal (dias) ¹	Razão sexual ^{ns}	Sobrevivência na fase pupal (%) ^{ns}
Água	91,7±3,73 a	293,8±3,43 a	23,0±0,42 a	11,8±0,28 ab	0,43±0,04	96,3± 3,52
<i>A. concolor</i>	63,9±5,12 b	217,2±10,01 b	34,9±0,74 b	12,8±0,33 a	0,63±0,10	80,0±10,89
<i>G. schottiana</i>	72,2±5,54 ab	286,3±10,42 a	23,4±0,44 a	12,0±0,38 ab	0,52±0,12	84,5±7,43
<i>P. rígida</i>	86,1±6,65 ab	297,1±3,11 a	22,4±0,24 a	11,4±0,23 b	0,45±0,06	97,2±2,78
<i>R. viburnoides</i>	69,4±6,68 ab	296,4±3,78 a	22,5±0,33 a	11,9±0,33 ab	0,46±0,11	90,0±4,47
Tween	88,9±12,61 a	288,7±2,92 a	23,1±0,39 a	11,6±0,20 ab	0,47±0,08	94,4±4,23
P ≤	0,0017	0,0001	0,0001	0,0403	0,6078	0,3433
F	5,0708	26,5000	113,7300	2,6858	0,7282	1,774

¹ Médias seguidas de mesma letra, em cada coluna, não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

^{ns} Médias não significativas, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

TABELA 3A Efeito de extratos de *Geonoma schottiana*, *Actinostemon concolor*, *Palicouria rigida* e *Rudgea viburnoides* sobre os períodos de pré-oviposição e oviposição (dias), longevidades das fêmeas e machos (dias), número de ovos por fêmea e viabilidade de ovos (%) de *Spodoptera frugiperda*, que receberam tratamentos via ingestão durante a fase larval.

Tratamento	Período de pré-oviposição ^{ns}	Período de oviposição ^{ns}	Longevidades ^{ns}		Número de ovos/fêmea ¹	Viabilidade dos ovos ¹
			fêmeas	machos		
Água	3,6±0,24	7,4±0,40	11,6±0,75	13,8±0,97	1399,6±87,96 a	89,4±2,58 a
<i>A. concolor</i>	4,2±0,25	5,5±0,65	9,8 ±0,75	12,0±0,71	826,3 ±77,38 b	61,5±3,40 c
<i>G. schottiana</i>	3,7±0,40	6,2±0,58	13,0±0,32	14,8±0,37	1162,2±76,63 ab	81,4±1,65 ab
<i>P. rigida</i>	4,5±0,21	5,6±0,87	10,8±1,03	14,7±1,31	1292,0±63,56 a	78,3±5,49 ab
<i>R. viburnoides</i>	4,0±0,41	5,3±1,05	11,8±0,85	13,3±0,48	1098,3±138,53 ab	72,7±2,52 bc
Tween	3,8±0,37	8,0±1,18	12,8±1,32	15,0±1,14	1410,2±96,94 a	91,5±2,39 a
P ≤	0,5806	1,7877	1,8386	1,5743	5,4776	12,1770
F	0,7720	0,1590	0,1487	0,2106	0,0022	0,0000

¹ Médias seguidas de mesma letra, em cada coluna, não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

^{ns} Médias não significativas, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

TABELA 4A Número de lagartas se alimentando de dieta contendo os extratos vegetais provenientes de *Actinostemon concolor*, *Geonoma schottiana*, *Rudgea viburnoides* e *Palicouria rigida* e com solução aquosa de Tween 80 a 1%, após 24, 48 e 72 horas da liberação dos insetos nas arenas.

Tratamento	Proporção de lagartas se alimentando da dieta com extrato versus dieta com Tween								
	24 horas			48 horas			72 horas		
	Tratamento	Tween	χ^2	Tratamento	Tween	χ^2	Tratamento	Tween	χ^2
Água	2,8±0,15	2,5±0,13	0,78	1,8±0,13	1,7±0,26	1,78	1,9±0,10	1,5±0,17	1,44
<i>A. concolor</i>	1,6±0,16	2,2±0,20	2,44	1,6±0,22	1,9±0,18	2,67	1,1±0,17	1,9±0,23	4,33*
<i>G. schottiana</i>	1,8±0,20	2,2±0,13	2,00	1,9±0,23	1,9±0,23	1,89	2,1±0,28	1,9±0,27	1,67
<i>R. viburnoides</i>	1,9±0,10	1,6±0,31	1,44	1,9±0,18	2,0±0,15	1,67	1,5±0,17	1,9±0,23	2,78
<i>P. rigida</i>	2,0±0,21	1,8±0,20	1,56	1,8±0,19	2,1±0,10	2,00	1,5±0,22	1,8±0,29	3,00

*Significativo ($p < 0,05$).

TABELA 5A Efeito de extratos de *Actinostemon concolor*, *Geonoma schottiana*, *Palicouria rigida* e *Rudgea viburnoides* sobre o peso de lagartas, índice de consumo (IC) e digestibilidade proteica (%) de *S. frugiperda*, após 10 de alimentação.

Tratamento	Peso de lagartas (g) ¹	Índice de consumo (g/g/dia) ¹	Digestibilidade proteica (%) ¹
<i>A. concolor</i>	0,0201±0,0029 b	1,2581±0,1064 a	97,1±0,51 a
Água	0,0432±0,0028 a	0,5669±0,0481 b	87,9±1,58 b
<i>G. schottiana</i>	0,0330±0,0023 a	0,7029±0,0624 b	88,7±1,88 b
<i>P. rigida</i>	0,0339±0,0013 a	0,7092±0,0595 b	95,5±0,59 a
<i>R. viburnoides</i>	0,0363±0,0024 a	0,7298±0,0590 b	88,4±0,71 b
Tween	0,0409±0,0029 a	0,6595±0,0589 b	89,4±1,11 b
P ≤	0,0000	0,0000	0,0000
F	10,5480	12,902	11,626

¹Médias seguidas de mesma letra, em cada coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey.

TABELA 6A Efeito dos extratos de *Rudgea viburnoides*, *Palicouria rígida*, *Geonoma schottiana* e *Actinostemon concolor* e sobre a taxa de crescimento relativo (RCR) (g/g/dia), taxa metabólica relativa (RMR) (g/g/dia), eficiência de conversão do alimento ingerido (%ECI), digestibilidade aparente (%AD), eficiência de conversão do alimento digerido (%ECD) e custo metabólico (%CM) de lagartas de *Spodoptera frugiperda*.

Parâmetros nutricionais ¹	Tratamento						F	p
	Água	Tween	<i>R. viburnoides</i>	<i>P. rígida</i>	<i>G. schottiana</i>	<i>A. concolor</i>		
RCR	0,44±0,02b	0,46±0,03b	0,49±0,04ab	0,54±0,02ab	0,53±0,05ab	0,68±0,08a	3,3969	0,0150
RMR	0,25±0,03b	0,26±0,02b	0,30±0,03b	0,32±0,03b	0,31±0,04b	0,50±0,16a	5,8860	0,0007
ECI	12,66±0,63a	12,37±0,74a	11,70±1,02ab	10,32±0,48ab	11,05±1,06ab	8,75±0,95b	2,9830	0,0265
ECD	18,62±1,53a	18,40±1,21a	15,81±1,01ab	15,37±1,03ab	16,27±1,61ab	10,75±1,05b	4,2435	0,0049
CM	81,37±1,67b	82,00±1,33b	84,18±1,11ab	84,63±1,13ab	83,72±1,77ab	89,25±1,15a	4,2435	0,0049
AD	69,17±2,72b	67,70±2,42b	73,67±2,32ab	68,08±3,34b	68,44±1,72b	81,34±0,46a	5,1809	0,0015

¹Médias seguidas de mesma letra, em cada linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey.

TABELA 7A Efeito de compostos fenólicos, provenientes de *Actinostemon concolor*, sobre a sobrevivência na fase larval (%), índice de consumo (g/g/dia) e peso das lagartas (g), após 10 dias de alimentação e peso de pupas (g), duração das fases larval e pupal (dias) e razão sexual dos adultos de *Spodoptera frugiperda*.

Tratamento	Água	Tween	<i>A. concolor</i>	P ≤	F
Sobrevivência na fase larval ¹	88,8±5,55 a	80,0±5,44 a	44,4±3,52 b	0,0000	22,7790
Peso de lagartas ¹	0,04±0,004 a	0,03±0,003 a	0,02±0,004 b	0,0045	7,9340
Índice de consumo ¹	0,86±0,14 b	0,89±0,10 b	1,82±0,72 a	0,0078	6,8482
Peso de pupas ¹	0,30±0,007 a	0,28±0,004 a	0,21±0,01 b	0,0001	39,4780
Duração da fase larval ¹	20,0±0,17 b	20,7±0,16 b	28,8±0,51 a	0,0001	223,9200
Duração da fase pupal ¹	9,4±0,11 b	9,9±0,20 b	11,2±0,23 a	0,0001	24,7690
Sobrevivência na fase pupal ^{ns}	82,2±6,76	90,6±4,25	86,1±9,04	0,7046	0,3585
Razão sexual ^{ns}	0,49±0,09	0,50±0,11	0,62±0,16	0,3079	0,7395

¹Médias seguidas de mesma letra, em cada linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey.

^{ns} Valores não significativos, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

TABELA 8A Efeito de compostos fenólicos, provenientes de *Actinostemon concolor*, taxa de crescimento relativo (RCR) (g/g/dia), taxa metabólica relativa (RMR) (g/g/dia), eficiência de conversão do alimento ingerido (%ECI), digestibilidade aparente (%AD), eficiência de conversão do alimento digerido (%ECD) e custo metabólico (%CM) de lagartas de *Spodoptera frugiperda*.

Parâmetros nutricionais ¹	Tratamento			F	p
	Água	Tween	<i>A. concolor</i>		
RCR	0,45±0,04 b	0,48±0,01 b	0,93±0,14 a	10,4540	0,0014
ECI	12,63±0,97 a	11,64±0,22 a	6,81±1,15 b	12,5720	0,0006
AD	60,98±2,77 b	63,20±1,99 b	83,04±3,10 a	20,8200	0,0001
ECD	20,90±1,69 a	18,53±0,77 a	8,51±1,74 b	19,9630	0,0001
CM	82,27±1,34 b	84,03±0,48 b	92,04±1,54 a	18,4780	0,0001
RMR	0,22±0,03 b	0,24±0,01 b	0,73±0,14 a	12,1440	0,0001

¹Médias seguidas de mesma letra, em cada linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey.

ANEXO B		Página
FIGURA 1B	Índice de deterrência alimentar (IDA) de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> após tratamento com os extratos de <i>Actinostemon concolor</i> , <i>Geonoma schottiana</i> , <i>Rudgea viburnoides</i> e <i>Palicouria rígida</i>	95
FIGURA 2B	Porcentagem de inibição da tripsina de <i>S. frugiperda</i> após incubação com o extrato de <i>A. concolor</i>	96
FIGURA 3B	Análise ultra-estrutural de ovos de <i>Spodoptera frugiperda</i> provenientes de lagartas que foram alimentadas com dieta contendo os extratos vegetais. A e B – água; C e D – Tween 80 a 1%; E e F – <i>Palicouria rígida</i> ; G e H – <i>Rudgea viburnoides</i> ; I e J – <i>Geonoma shottiana</i> ; L e M – <i>Actinostemon concolor</i> (setas indicam malformações e deposição anormal de material no córion).....	97
FIGURA 4B	Análise ultra-estrutural do intestino médio de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> alimentadas com dieta contendo extratos vegetais. A e B – água; C e D – Tween 80 a 1%; E e F – <i>Palicouria rígida</i> ; G e H – <i>Rudgea viburnoides</i> ; I e J – <i>Geonoma shottiana</i> ; L e M – <i>Actinostemon concolor</i> (setas indicam rupturas nas vilosidades do intestino).....	98
FIGURA 5B	Concentração de compostos fenólicos nos extratos de <i>Geonoma shottiana</i> , <i>Palicouria rígida</i> , <i>Actinostemon concolor</i> e <i>Rudgea viburnoides</i>	99

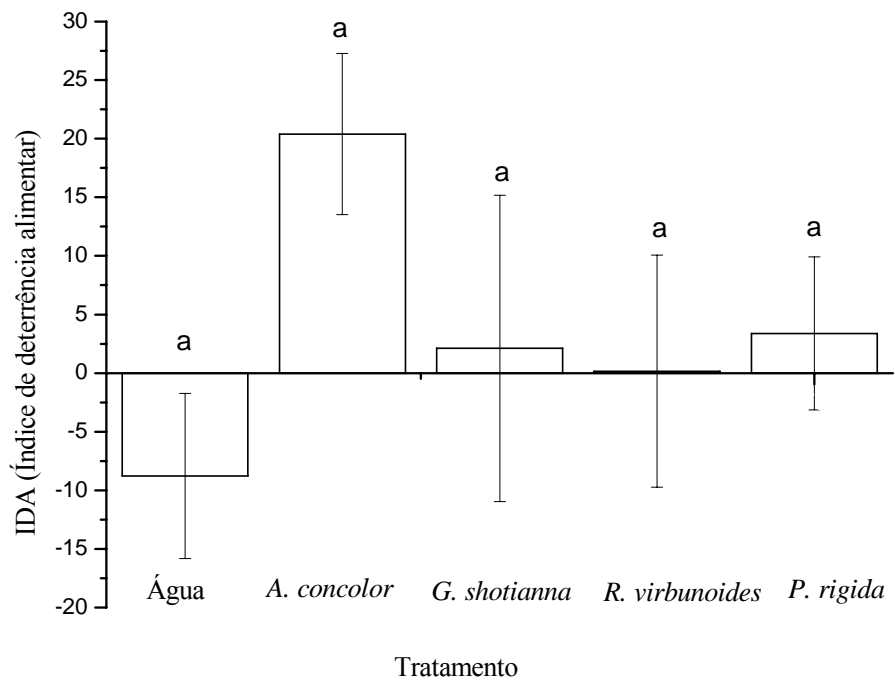


FIGURA 1B Índice de deterência alimentar (IDA) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* após tratamento com os extratos de *Actinostemon concolor*, *Geonoma schottiana*, *Rudgea viburnoides* e *Palicourea rígida*.

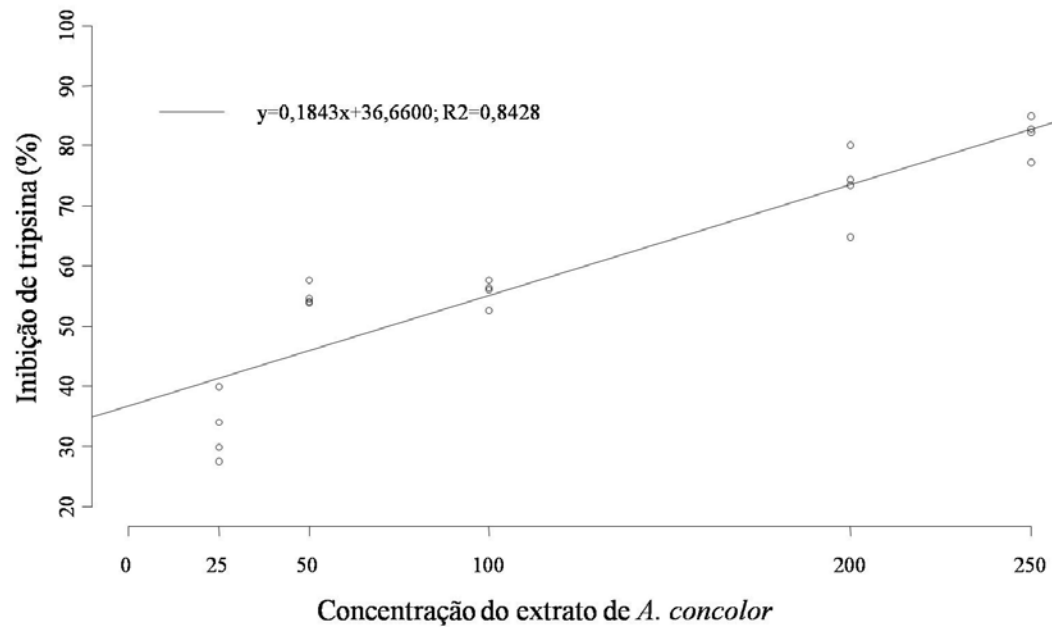


FIGURA 2B Percentagem de inibição da tripsina de *S. frugiperda* após incubação com o extrato de *A. concolor*.

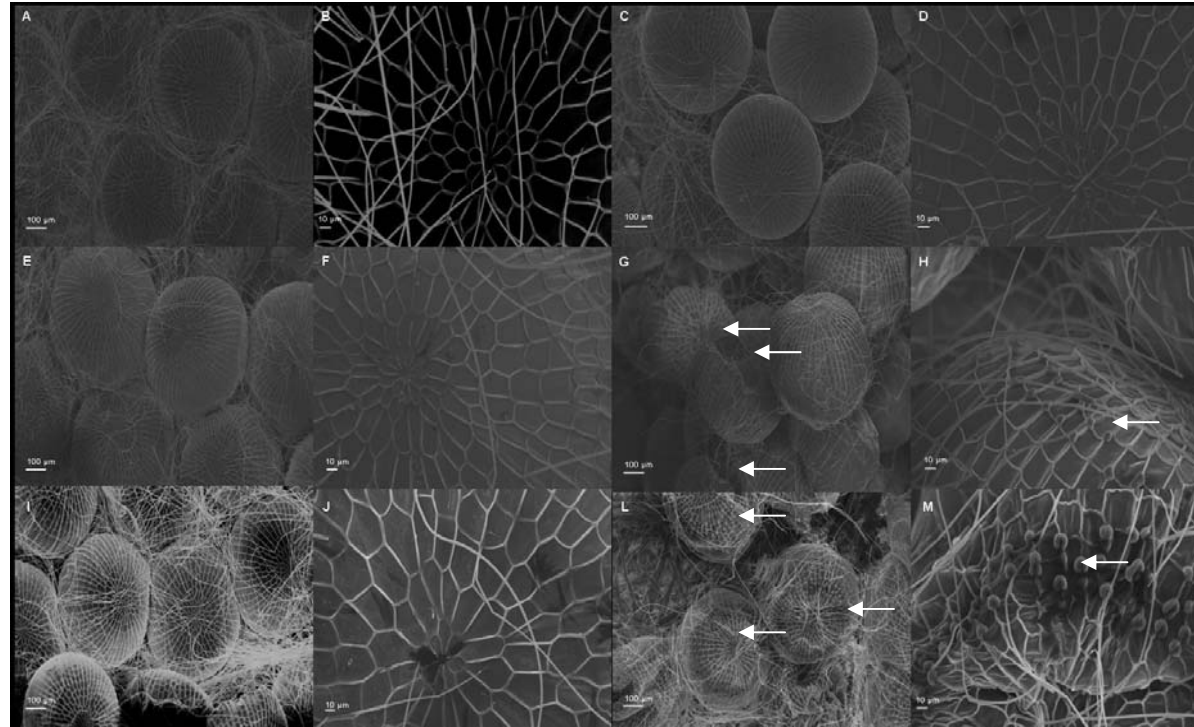


FIGURA 3B Análise ultra-estrutural de ovos de *Spodoptera frugiperda* provenientes de lagartas que foram alimentadas com dieta contendo os extratos vegetais. A e B – água; C e D – Tween 80 a 1%; E e F – *Palicouria rigida*; G e H – *Rudgea viburnoides*; I e J – *Geonoma shottiana*; L e M – *Actinostemon concolor* (setas indicam malformações e deposição anormal de material no córion).

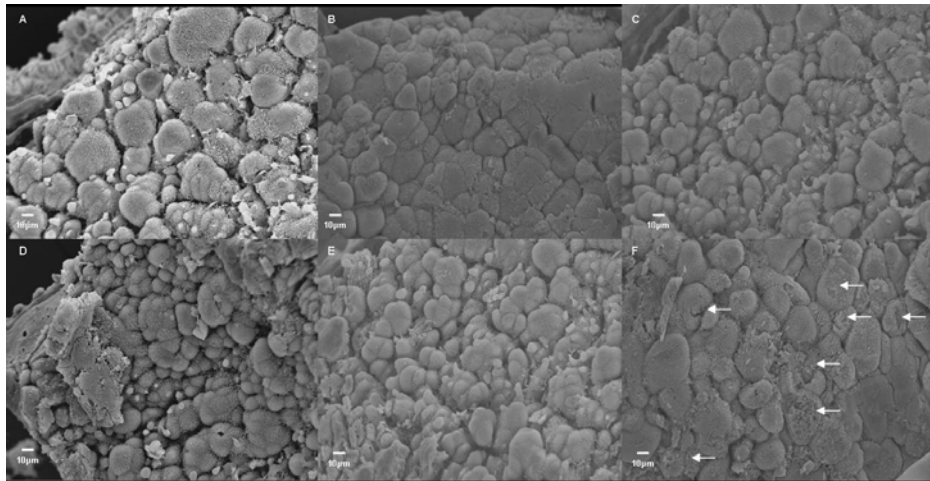


FIGURA 4B Análise ultra-estrutural do intestino médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta contendo extratos vegetais. A e B – água; C e D – Tween 80 a 1%; E e F – *Palicourea rigida*; G e H – *Rudgea vibunoides*; I e J – *Geonoma shottiana*; L e M – *Actinostemon concolor* (setas indicam rupturas nas vilosidades do intestino).

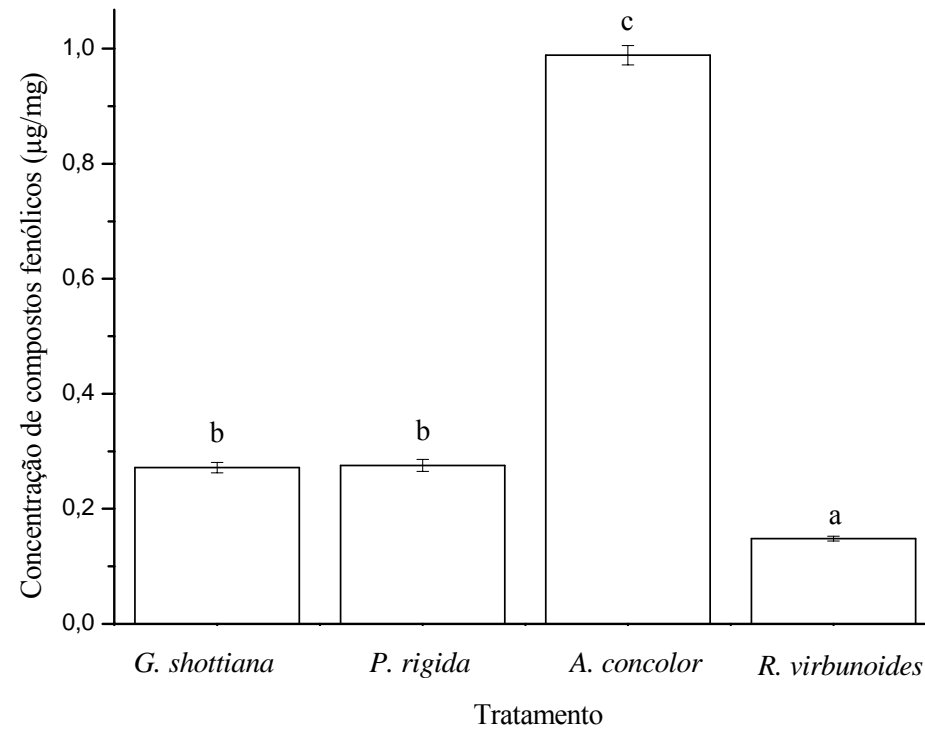


FIGURA 5B Concentração de compostos fenólicos nos extratos de *Geonoma shottiana*, *Palicourea rigida*, *Actinostemon concolor* e *Rudgea viburnoides*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* é inseto-praga de diversas culturas. Tendo em vista as dificuldades encontradas para o seu controle, justifica-se o desenvolvimento de novos métodos para o manejo desse inseto.

Nesse contexto foi constatado, no presente trabalho, que os extratos brutos das folhas e cascas dos frutos de *Copaifera langsdorffii* causaram efeitos letais e subletais sobre *S. frugiperda*. Alterações ultra-estruturais foram verificadas nos ovos provenientes de insetos que se alimentaram com esses tratamentos, durante a fase larval. Destacam-se, ainda, o aumento na excreção de proteínas nas fezes dos insetos e inibição da atividade de tripsina.

Também pode ser verificada a atividade inseticida do extrato de *Actinostemon concolor* sobre *S. frugiperda*. Tal tratamento provocou redução no peso de pupas, prolongamento na fase larval, redução na fecundidade e fertilidade dos adultos, além de alterações em parâmetros nutricionais. Alterações ultra-estruturais foram constatadas nos ovos, provenientes de adultos nos quais as lagartas foram alimentadas com esse extrato, e nas vilosidades do intestino de *S. frugiperda*. O extrato de *A. concolor* também se mostrou bastante eficiente em reduzir a atividade da tripsina de *S. frugiperda*. Destaca-se, ainda, que *A. concolor* apresentou alta concentração de compostos fenólicos que, quando submetidos a ensaio com *S. frugiperda*, causaram alterações semelhantes às provocadas pelo extrato bruto.

Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam o potencial de *C. langsdorffii* e *A. concolor* para o controle de *S. frugiperda*. Ademais, corroboram para que o possível modo de ação inseticida dessas plantas seja por meio da inibição de proteases de *S. frugiperda*.