

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
ANGÉLICA MASSAROLI

EFEITO DE EXTRATOS DE ANNONÁCEAS SOBRE A LAGARTA FALSA
MEDIDEIRA *Chrysodeixis includens* (WALKER 1857) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

CURITIBA
2013

ANGÉLICA MASSAROLI

EFEITO DE EXTRATOS DE ANNONÁCEAS SOBRE A LAGARTA FALSA
MEDIDEIRA *Chrysodeixis includens* (WALKER 1857) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia,
Setor de Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Paraná como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Ciências, área
de concentração Zoologia.

Orientador: Dr. Luís Amilton Foerster

Co-orientadora: Dra. Mônica Josene Barbosa
Pereira

CURITIBA
2013



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação Zoologia



TERMO DE APROVAÇÃO

ANGÉLICA MASSAROLI

“EFEITO DE EXTRATOS DE ANNONÁCEAS SOBRE A LAGARTA FALSA MEDIDEIRA *Chrysodeixis includens* (WALKER 1857) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas - Zoologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:

Professor Dr. Luis Amilton Foerster (Orientador)

Professora Dra. Alessandra Regina Butnariu
Membro Externo

Professor Dr. Bráulio dos Santos
Membro Interno

Curitiba, 13 de Dezembro de 2013.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia/UFPR
Setor de Ciências Biológicas - Departamento de Zoologia
Caixa Postal 19020 - CEP 81531-980 - Curitiba - Paraná
Telefone/FAX +55 (0**41) 3361-1641

“É preciso correr riscos [...]. Só entendemos direito o milagre da vida quando deixamos que o inesperado aconteça. [...] A felicidade às vezes é uma benção – mas geralmente é uma conquista.” (Na Margem do Rio Piedra eu sentei e chorei – Paulo Coelho, 1994, p. 25).

*Aos meus pais José e Irene Massaroli e ao
meu noivo Cassiano Luiz Sztoltz que me
apoiaram nesta etapa de minha vida,*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Tudo na vida necessita de uma base, um apoio para ficar em pé e crescer, e, por isso, quero agradecer primeiramente aos quatro alicerces da minha vida...

...*Deus* por me conceder os outros alicerces, dar sentido a vida e forças para nunca desistir;

...*Minha família*, Pai José Massaroli, Mãe Irene B. Massaroli, Noivo Cassiano L. Sztolz, Primo irmão James H. Barp e as minhas *Babys* Pitchula e Bellinha, por acreditarem em mim e estarem sempre ao meu lado me apoiando e aguentando minhas crises;

...*Minhas amigas/irmãs* Ana Regina Lucena, Marcela Silva C. de Paula, Bruna M. Favetti, Edilaine S. Viana pela amizade e pelo apoio profissional e pessoal, pois sempre estiveram ao meu lado nas alegrias e tristezas;

...E a minha "*família científica*" em especial meu "Avô/Pai" (orientador) o Dr. Luis Amilton Foerster, por ter acreditado em mim me concedendo esta oportunidade e me ensinando cada dia mais. Também a minha segunda "Mãe científica" Dra. Mônica Josene B. Pereira por ter aceitado o desafio de me co-orientar e permitir o uso do laboratório de Entomologia. E é claro que não poderia deixar de agradecer imensamente às minhas "Mães científicas", as doutoras Alessandra R. Butnariu e Augusta K. Doetzer, pois se hoje cheguei a este degrau de minha vida profissional (e pessoal) foi graças a elas, que me mostraram o primeiro degrau e sempre estiveram ao meu lado para que eu conseguisse subir cada um.

Com certeza estes alicerces foram fundamentais nesta jornada, mas há vários outros que também contribuíram profissional e pessoalmente para que este trabalho pudesse ser desenvolvido, por isso agradeço:

À equipe do Laboratório de Entomologia da Universidade do Estado de Mato Grosso, em especial a equipe de criação de lepidópteros, Valdilene C. Barbosa, Thais Lohaine Braga, Douglas Francisco, Fabiano Schirmer. E outros membros da equipe que sempre me ajudaram Vanessa Golin, Pedro El Hage e nossa querida Mary (Marilza Costa).

À todos os membros do Laboratório de Controle Integrado de Insetos (UFPR) (Milena, Fernanda, Flávia, Carla ...) e, em especial, ao doutorando Diones Krinski por toda a ajuda que me deste na preparação dos extratos, ideias, busca de materiais, entre outros.

Ao professor Dr. Guilherme L. Sasaki e sua equipe do laboratório de bioquímica da UFPR, pela produção dos extratos.

Ao professor Dr. José R. P. Parra e sua equipe por permitir a visita ao seu laboratório (ESALQ) onde aperfeiçoei as técnicas de criação de lepidópteros.

À todos os professores da UNEMAT, em especial a Dr^a Ana Arnt, Dr. Eduardo Bessa e ao prof. Diogo Costa que sempre me ajudaram nas horas difíceis.

Ao Núcleo de Educação em Ciências *Tabebuia aurea* (NECTAR), pelo apoio financeiro e pessoal na pesquisa e na manutenção da criação estoque.

Ao todos do Programa de Pós-graduação em Zoologia da UFPR e todos os professores que compartilharam seus conhecimentos durante as disciplinas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Peço perdão pelos nomes que não citei, pois como são muitas as pessoas que contribuíram para este trabalho, seria impossível citar um por um, mas, mesmo assim, agradeço profundamente a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

À Todos meu Muito Obrigada!!!!

INDICE

LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
RESUMO GERAL.....	1
GENERAL ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO GERAL.....	5
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	8
CAPITULO I.....	10
<i>Annona mucosa</i> Jacq.: Um fitoinseticida promissor para o controle de <i>Chrysodeixis includens</i> (Lepidoptera: Noctuidae).....	10
RESUMO:	11
ABSTRACT:	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
2.1. <i>Obtenção do extrato</i>	14
2.2. <i>Criação de Chrysodeixis includens</i>	15
2.3. <i>Bioensaios - Toxicidade por ingestão e contato</i>	16
2.4. <i>Análise Estatística</i>	17
3. RESULTADOS	17
4. DISCUSSÃO.....	25
5. AGRADECIMENTO.....	28
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
CAPITULO II.....	32
Efeitos tóxicos do extrato bruto de <i>Annona crassiflora</i> Mart. sobre a lagarta falsa-medideira <i>Chrysodeixis includens</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	32
RESUMO:	33
ABSTRACT	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.1. <i>Obtenção dos extratos</i>	36
2.2. <i>Criação Estoque de Chrysodeixis includens</i>	37

2.3. Experimentos.....	37
2.3.1. Efeito sobre ovos.....	38
2.3.2. Efeito por contato	38
2.3.3. Efeito por ingestão.....	39
2.4. Análise Estatística	39
3. RESULTADOS	39
3.1. Efeito sobre os ovos.....	39
3.2. Efeito por Contato.....	40
3.3. Efeito por ingestão	42
4. DISCUSSÃO	44
5. AGRADECIMENTOS.....	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
CONSIDERAÇÕES FINAIS	51

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1 - Porcentagem de mortalidade (\pm DP) de *Chrysodeixis includens* de 1º instar expostas a diferentes concentrações do extrato de *Annona mucosa* por ingestão e por contato, após 24, 72 e 120 horas após aplicação.....19

Tabela 2 - Porcentagem de mortalidade (\pm DP) de *Chrysodeixis includens* de 3º instar expostas a diferentes concentrações do extrato de *Annona mucosa* por ingestão e por contato, após 24, 72 e 120 horas após aplicação.....20

Tabela 3 – Porcentagem de mortalidade (\pm DP) de *Chrysodeixis includens* de 5º expostas à diferentes concentrações do extrato de *Annona mucosa* por ingestão e por contato, após 24, 72 e 120 horas após aplicação.....23

Tabela 4 – Concentração letal (CL₅₀ e CL₉₀) para o tratamento por ingestão ou aplicação por contato do extrato de *Annona mucosa* para lagartas de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae).....24

CAPITULO II

Tabela 1 – Média (\pm DP) de lagartas eclodidas no quarto dia após aplicação de diferentes concentrações do extrato de *Annona crassiflora*.....40

Tabela 2 - Porcentagem (\pm DP) de mortalidade após 120 horas da aplicação do extrato de *Annona crassiflora* por ingestão em lagartas de *Chrysodeixis includens* de 1º instar, porcentagem (\pm DP) de mortalidade durante todo o período larval, duração do período larval (dias).....43

Tabela 3 - Porcentagem (\pm DP) de mortalidade após 120 horas da aplicação do extrato de *Annona crassiflora* por ingestão em lagartas de *Chrysodeixis includens* de 3º instar, porcentagem (\pm DP) de mortalidade durante todo o período larval, duração do período larval (dias).....44

Tabela 4 - Porcentagem (\pm DP) de mortalidade após 120 horas da aplicação do extrato de *Annona crassiflora* por ingestão em lagartas de *Chrysodeixis includens* de 5º instar, porcentagem (\pm DP) de mortalidade até atingir estágio de pupa, duração do 5º instar (dias).....44

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1 – Recipientes usados na criação de *Chrysodeixis includens* em dieta artificial. A – gaiola de PVC; B – extremidade superior da gaiola (*voil* contendo ovos); C – extremidade inferior da gaiola contendo mel 10% e água embebidos em algodão; D – Pote plástico de 145 mL contendo dieta artificial e lagartas de 1º instar; E – Copo de 50 mL com lagartas de 4º instar.....15

Figura 2 – A - Recipiente de 145 mL contendo papel filtro no fundo e uma folha de soja convencional com um pedaço de algodão umedecido no pecíolo da folha; B - Aplicação na superfície adaxial; C - Folhas deixadas sobre a bancada após aplicação para secagem.....17

Figura 3 – Lagartas de *Chrysodeixis includens* de 3º instar após ingestão de folhas tratadas com extrato, mortas presas a exúvia, 72 horas após a ingestão. A e B – Concentração de 2,0%; C e D - Concentração de 4,0%; E e F - Concentração de 8,0%.....18

Figura 4 – Lagartas mortas em fase de pré-pupa no tratamento de 0,5%, após 120 horas da ingestão do extrato.....21

Figura 5 – *Chrysodeixis includens* de 5º instar, mortas após aplicação de extrato de *Annona mucosa* por contato, apresentando edema na epiderme.....21

CAPITULO II

Figura 1 - Porcentagem de mortalidade de lagartas de 1º instar de *Chrysodeixis includens*, após aplicação por contato do extrato bruto de *Annona crassiflora* em diferentes concentrações.....41

Figura 2 - Porcentagem de mortalidade de lagartas de 3º instar de *Chrysodeixis includens*, após aplicação por contato do extrato bruto de *Annona crassiflora* em diferentes concentrações.....41

Figura 3 - Porcentagem de mortalidade de lagartas de 5º instar de *Chrysodeixis includens*, após aplicação por contato do extrato bruto de *Annona crassiflora* em diferentes concentrações.....42

Figura 4 – Lagartas de *Chrysodeixis includens* mortas em pré pupa após 72 horas da aplicação por contato do extrato bruto de *Annona crassiflora*.....42

RESUMO GERAL

“Dentre as plantas com propriedades inseticidas as anonáceas, destacam-se por possuírem em sua composição as acetogeninas, com potencial inseticida já comprovado. Assim este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos dos extratos brutos de sementes de Annona mucosa e de Annona crassiflora sobre a lagarta falsa medideira (Chrysodeixis includens).”



Agradecimentos:

Ao Dr. Luís A.
Foerster;

A Dr^a Mônica
Josene B. Pereira;

Ao Dr. Guilherme
L. Sasaki;

Ao Programa de
Pós-graduação em
Zoologia (UFPR);

A Coordenação de
Aperfeiçoamento
de Pessoal de
Nível Superior
(CAPES)



RESUMO GERAL

Chrysodeixis (= *Pseudoplusia*) *inclusens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) ou lagarta falsa medideira, como é conhecida popularmente, é praga desfolhadora de diversas culturas de importância econômica. Seu controle é feito quase exclusivamente através de inseticidas químicos, que nem sempre são eficientes devido ao hábito da lagarta em permanecer na face abaxial das folhas no terço médio da planta. Além disso, os agrotóxicos trazem inúmeras desvantagens como a contaminação ambiental, surgimento de linhagens resistentes e riscos à saúde humana. Uma das técnicas que visam diminuir estes impactos ambientais é a utilização de plantas com propriedades inseticidas. Entre as plantas com propriedades inseticidas, as anonáceas destacam-se por possuírem em sua composição as acetogeninas, cujo potencial inseticida já foi comprovado. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos dos extratos brutos de sementes de *Annona mucosa* Jacq. e de *Annona crassiflora* Mart. sobre lagartas de *C. inclusens*. Avaliaram-se concentrações dos extratos contendo 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0% através de dois modos de aplicação: ingestão de folhas de soja tratadas e contato direto. Os tratamentos foram testados em lagartas de 1º, 3º e 5º instares e para *A. crassiflora* avaliou-se também o efeito sobre ovos. No capítulo I, *A. mucosa* apresentou alta eficiência no controle de todos os instares avaliados, tanto pelo método de ingestão da folha tratada com extrato quanto pelo contato direto com o extrato, demonstrando características de toxicidade por sua ação sobre o complexo de hormônios do crescimento. No capítulo II, foram avaliados os efeitos de *A. crassiflora* em diferentes fases do desenvolvimento de *C. inclusens*, e constatou-se que pelo método de contato, esta espécie apresenta potencial inseticida, enquanto que pelo método de ingestão, não se obteve uma resposta imediata, mas observou-se efeitos subletais, impedindo assim, uma segunda geração. Os extratos apresentam atividade inseticida para todos os instares, de modo que no momento da aplicação independente da idade, as lagartas estão susceptíveis à ação do extrato, bem como os dois métodos de aplicação apresentaram resultados satisfatórios, fato que é importante devido ao comportamento da lagarta.

PALAVRA-CHAVES: Lagarta falsa medideira; FitoInseticida; Acetogeninas.

GENERAL ABSTRACT

“Among the plants with insecticidal properties the Annonaceae, are noted for having in its composition the acetogenins that have been tested and proven to have the potential as insecticides. This study aimed to evaluate the effects of extracts of seeds Annona mucosa and A. crassiflora on three instars of the soybean looper Chrysodeixis includens.”



Acknowledgments:

Dr. Luís A. Foerster;

Dr^a Mônica Josene B. Pereira;

Dr. Guilherme L. Sasaki;

Programa de Pós-graduação em Zoologia (UFPR);

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)



GENERAL ABSTRACT

Chrysodeixis (= *Pseudoplusia*) *includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) or soybean looper, is a defoliator pest of economically important crops. Since 2003, this caterpillar has become a major pest of soybeans, due to the increased use of insecticides and fungicides which reduced the action of parasitoids and pathogens like the fungus *Nomurea rileyi*. Thus, its control has relied almost exclusively on chemical insecticides, which are not always efficient due to the habit of the caterpillar to stay on the abaxial surface of the leaves, and moreover, due to the numerous disadvantages such as environmental pollution, pest resistance and risks to human health. Currently, one of the techniques to reduce these environmental impacts is the use of plants with insecticidal properties; this technique had been used for thousands of years, but ended in oblivion due to the advent of synthetic products, but today with so many disadvantages of chemicals, this technique comes back to become an alternative to pest control. Among the plants with insecticidal properties the Annonaceae, are noted for having in its composition the acetogenins known to be potential insecticides. This study aimed to evaluate the effects of extracts of seeds *Annona mucosa* and *A. crassiflora* on three instars of the soybean looper *C. includens*. In chapter one, *A. mucosa* showed high efficiency against all instars of the soybean looper, evaluated both by contact and ingestion. The results showed that the extract interferes with growth hormones, leading to the death of the insects due to cuticle malformation. In chapter two, we evaluated the effects of the extract of seeds of *A. crassiflora* on different instars and it was found that the contact method was more efficient than the ingestion of treated leaves. However after ingesting the extract there was no immediate response, but was observed sublethal effects, preventing a second generation. The extracts showed insecticidal activity against all instars, regardless of larval age and application method, indicating that, under field conditions, larvae that do not get in contact with the product will be killed by the ingestion of the extracts.

KEY-WORDS: Soybean Looper; Phytoinsecticide; Acetogenins.

INTRODUÇÃO GERAL

“...Assim, esta dissertação esta dividida em dois capítulos. No primeiro é avaliado o potencial inseticida de Annona mucosa em Chrysodeixis includens. E no segundo capítulo são enfatizados os efeitos de Annona crassiflora no desenvolvimento e mortalidade da praga em questão. Os resultados obtidos foram discutidos visando o potencial de bioprospecção destas espécies vegetais e na possibilidade de utilização destas em programas Manejo Integrado de Pragas.”



Agradecimentos:

Ao Dr. Luís A.
Foerster;

A Dr^a Mônica
Josene B. Pereira;

Ao Dr. Guilherme
L. Sasaki;



INTRODUÇÃO GERAL

Chrysodeixis (= *Pseudoplusia*) *inclusens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) ou lagarta falsa medideira, como é conhecida popularmente, foi registrada atacando aproximadamente 70 espécies vegetais de importância econômica, entre elas a soja, algodão, feijão, girassol, fumo, maracujá, tomate e diversas hortaliças (Moscardi et al., 2012).

No Brasil, nos principais estados produtores de soja (*Glycine max* L.), *C. inclusens* era considerada uma praga secundária, controlada naturalmente por parasitoides e fungos entomopatogênicos (Sosa-Gomez et al., 2003). No entanto desde 2003, este inseto vem se destacando como principal praga em diversos estados como Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Bahia (Bueno et al., 2009; Moscardi et al., 2012).

Essa mudança de *status* de praga secundária para praga principal, está diretamente relacionada ao surgimento da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi* Sidow) no Brasil durante a safra 2001/2002. A partir do registro deste fungo houve um aumento no uso de fungicidas para o seu controle. Consequentemente, diminuíram as populações de fungos entomopatogênicos, os quais controlavam naturalmente *C. inclusens*, como o fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow), acarretando o aumento das populações de *C. inclusens* nos diversos estados produtores da soja (Sosa-Gomez et al., 2003; Sosa-Gomez et al., 2006).

Para o controle de *C. inclusens*, bem como de outras lagartas, na maioria dos casos são utilizados inseticidas neurotóxicos que também favorecem a diminuição dos inimigos naturais da praga. Além disso, nem sempre a aplicação é eficiente devido ao hábito da falsa medideira de permanecer na face abaxial da folha no terço médio da planta de soja, não sendo atingida pelos produtos (Oliveira et al., 2010), fazendo com que as doses sejam aumentadas, o que contribui para o surgimento de populações resistentes, impactando ainda mais os inimigos naturais, além de aumentar o risco de contaminação ambiental e à saúde humana.

Mediante essa problemática, deve-se optar pela utilização de técnicas e estratégias de controle baseadas na filosofia do manejo integrado de pragas (MIP), as quais são menos prejudiciais aos inimigos naturais, ao meio ambiente e ao homem (Isman, 2006).

Nos últimos anos diversas estratégias de controle de pragas vêm sendo pesquisadas, destacando-se o uso de plantas com propriedades inseticidas. A utilização de inseticidas botânicos ou fitoinseticidas é uma técnica antiga. Por volta do ano 2000 a.C. na Índia e no Egito plantas com propriedades inseticidas já eram utilizadas para o controle de pragas. A China também já utilizou inseticidas de origem vegetal para o controle de pragas

de grãos armazenados por volta do ano 1200 a.C. (Moreira et al., 2006). Porém, durante a Segunda Guerra Mundial, com o advento dos inseticidas químicos, o uso de produtos naturais caiu em esquecimento (Casida e Quistad, 1998).

Atualmente com tantos problemas decorrentes do uso excessivo de inseticidas químicos, a utilização de produtos vegetais para o controle de pragas ressurgem como uma alternativa para ser integrada na filosofia do MIP.

Os fitoinseticidas apresentam vantagens, pois possuem rápida degradação e ação, baixa toxicidade a mamíferos, alguns apresentam seletividade a inimigos naturais e baixa fitotoxicidade, são de fácil obtenção e reduzem os custos de produção (Shin-Foon e Yu-Tong, 1993; Moreira et al., 2006).

O potencial inseticida de diversas plantas já foi comprovado cientificamente, entre elas as mais promissoras são as das famílias Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Annonaceae, Piperaceae e Canellaceae (Jacobson, 1989; Isman, 2006).

Dentre estas famílias, a bioatividade das Annonaceae já foi verificada para diversas espécies de insetos, em especial sobre pragas da ordem Lepidoptera, como, *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae) (Leatemala e Isman, 2004; Seffrin et al., 2010), *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) (Saito et al., 2004; Álvarez-Colom et al., 2007; Blessing et al., 2010), *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelichiidae) (Silva et al., 2007), *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (Fontana et al., 1998; Saito et al., 2004), *Pseudaletia sequax* Franclemont (Lepidoptera: Noctuidae) (Fontana et al., 1998), *Plutella xylostela* Linnaeus (Lepidoptera: Plutellidae) (Laetamia e Isman, 2004; Dadang e Prijono, 2009; Trindade et al., 2011), entre outras, que são pragas de diversas culturas. No entanto, algumas espécies de anonas ainda não foram exploradas como é o caso de *Annona mucosa* Jacq. e de *A. crassiflora* Mart., e em *C. includens*, nenhum estudo com fitoinseticidas foi realizado.

Devido a importância de *C. includens* em diversas culturas e do potencial das anonáceas como inseticidas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de extratos brutos de sementes de *A. mucosa* e de *A. crassiflora* sobre a lagarta falsa medideira. Esta dissertação está dividida em dois capítulos; no primeiro é abordado o potencial inseticida de *A. mucosa* em lagartas de primeiro, terceiro e quinto instares, e no segundo capítulo são avaliados os efeitos de *A. crassiflora* no desenvolvimento e mortalidade de *C. includens*. Os resultados obtidos foram discutidos com base no potencial de bioprospecção destas espécies vegetais e na possibilidade de sua utilização em programas de MIP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez-Colom, O.; Neske, A.; Popich, S. & Bardón, A. 2007. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Pest Science**, v.80, p.63–67.
- Blessing, L. T.; Colom, O. A.; Popich, S.; Neske, A. & Bardon, A., 2010. Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Pest Science**, v. 83, p. 307-310.
- Bueno, R. C. O. F.; Parra, J. R. P.; Bueno, A. F. & Haddad, M. L. 2009. Desempenho de Trichogramatídeos como potenciais agentes de controle de *Pseudoplusia includens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v.38, p.389-394.
- Casida, J.E.; Quistad, G.B. 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? **Annual Review of Entomology**, v.43, p.1-16.
- Dadang, E.D.F.; Prijono, D. 2009. Effectiveness of two botanical insecticide formulations to two major cabbage insect pests on field application. **J. ISSAAS**, v.15, p.42-51.
- Fontana, J.; Lancas, F.; Pasos, M.; Cappelaro, E.; Villegas, J.; Baron, M.; Nosedá, M.; Pomilio, M.; Vitale, A.; Webber, A.; Maul, A.; Peres, W. & Foerster, L. 1998. Selective Polarity- and adsorption- guided extraction/purification of *Annona* sp. polar acetogenins and biological assay against agricultural pests. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70, p.67-76.
- Isman, M.B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v.51, p.45–66.
- Jacobson, M. Botanical pesticides: past, present and future. In: Arnason, J.T.; Philogène, B.J.R.; Morand, P. 1989. **Insecticides of plant origin**. Washington, DC, American Chemical Society. v. 387, p.69-77.
- Leatemia, J. A. & Isman, M. B. 2004. Toxicity and antifeedant activity of crude seed extracts of *Annona squamosa* (Annonaceae) against lepidopteran pests and natural enemies. **International Journal of Tropical Insect Science**, v.24, p.150-158.
- Moreira, M. D.; Picanço, M. C.; Silva, E. M.; Moreno, S. C. & Martins, J. C. Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas in: Venzon, M.; Júnior, T. J. P.; Pallini, A. 2006. **Controle alternativo de pragas e doenças**. cap.5 – p.89.
- Moscardi, F.; Bueno, A. F.; Sosa-Gómez, D. R.; Roggia, S.; Hoffmann-Campo, C. B.; Pomari, A. F.; Corso, I. C.; Yano, S. A. C. 2012. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: Hoffmann-Campo, B. C.; Corrêa-Ferreira, B. S. & Moscardi, F. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**, Brasília, DF: Embrapa, 2012. 859p.
- Oliveira, J.R.G.; Ferreira, M.C.; Román, R.A.A. 2010. Diferentes diâmetros de gotas e equipamentos para aplicação de inseticida no controle de *Pseudoplusia includens*. **Engenharia Agrícola**, v. 30, p. 92-99.
- Saito, M. L.; Pott, A.; Ferraz, J. M. G. & Nascimento, R.S. 2004. Avaliação de plantas com atividade deterrente alimentar em *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) e *Anticarsia*

- gemmatalis* Hubner. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.14, p.1-10.
- Seffrin, R. C.; Shikano, I.; Akhtar, Y. & Isman, M. B. 2010. Effects of crude seed extracts of *Annona atemoya* and *Annona squamosa* L. against the cabbage looper, *Trichoplusia ni* in the laboratory and greenhouse. **Crop Protection**, v.29, p.20–24.
- Shin-Foon, C; Yu-Tong, Q. 1993. Experiments on the application of botanical insecticides for the control of diamondback moth in South China. **Journal of Applied Entomology**, v.116, p.479-486.
- Silva, A.P.T., Pereira, M.J.B., Bento, L.F. 2007. Extrato metanólico da semente de araticum (*Annona coriacea*) (Mart.) sobre a mortalidade da traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, p.1150-1153.
- Sosa-Gomez, D.R. 2006 Seletividade de agroquímicos para fungos entomopatogênicos. Embrapa Soja, Londrina, PR. Disponível em: http://www.cnpso.embrapa.br/download/artigos/seletiv_fung.pdf. Acesso em: 07 Out. 2013.
- Sosa-Gómez, D.R.; Delpin, K.E.; Moscardi, F. & Nozaki, M.H. 2003. The impact of fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson epizootics and on populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean. **Neotropical Entomology**, v.32, p.287-291.
- Trindade R.C.P.; Luna, J.S.; Lima, M.R.F.; Silva, P.P. & Sant'ana, A.E.G. 2011. Larvicidal activity and seasonal variation of *Annona muricata* (Annonaceae) extract on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, v.37.

CAPITULO I

Annona mucosa Jacq.: Um fitoinseticida promissor para o controle de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae)

“...Baseado nestes resultados, podemos inferir que Annona mucosa apresenta potencial para bioprospecção na área de produtos fitossanitários, podendo ser utilizada de duas formas. Através da fabricação em pequena escala (artesanal) para uso por pequenos e médios produtores, ou através da síntese das moléculas bioativas para que possa ser produzida em larga escala.”



Agradecimentos:

Ao Dr. Guilherme L. Sasaki;

À Equipe de criação de lepidópteros do Laboratório de Entomologia da UNEMAT/CUTS;

A CAPES pela bolsa de pós-graduação.

Artigo escrito segundo as normas do periódico
Journal of Pest Science



<http://link.springer.com/journal/10340>



Annona mucosa Jacq.: Um fitoinseticida promissor para o controle de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae)

RESUMO: Várias espécies da família Annonaceae têm sido estudadas devido ao potencial inseticida de seus metabólitos secundários. *Annona mucosa* é uma espécie promissora para o controle de pragas visto que já foi eficiente para o controle de alguns insetos. Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial inseticida do extrato bruto de sementes de *A. mucosa* sobre a lagarta falsa medideira *Chrysodeixis includens*, que é praga de diversas culturas. O extrato foi preparado e diluído em água com solubilizante nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0%, sendo estas testadas em lagartas de 1º, 3º e 5º instares através de aplicação oral e tópica. O extrato de *A. mucosa* apresentou efeito inseticida para *C. includens* em todos os instares avaliados. Em lagartas de 1º instar observou-se uma alta mortalidade após 24 horas, pelos dois métodos utilizados. Para lagartas de 3º instar, pelo método de ingestão a mortalidade nas concentrações não diferiu estatisticamente entre si. Pelo método de contato sobre lagartas de 3º instar, após 24 horas na maior concentração a mortalidade atingiu 80%. Lagartas de 5º instar após ingerirem folhas tratadas, apresentaram mortalidade significativa apenas após 72 horas nas concentrações entre 2,0 e 8,0% e por contato a mortalidade foi de 93,3% na maior concentração após 24 horas da aplicação. Os resultados mostram que *A. mucosa* é uma espécie promissora para o desenvolvimento de novas moléculas, para o controle de *C. includens*.

PALAVRAS-CHAVE: Annonaceae, Bioinseticida, Controle Alternativo, Desfolhador.

Annona mucosa Jacq.: A promising phytoinsecticide for the control of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae)

ABSTRACT: Several species of the Annonaceae family are studied due to their potential insecticidal secondary metabolites. *Annona mucosa* is a promising species for pest control as it has been proven for some insects. The crude extract of seeds of *A. mucosa* was evaluated for its insecticidal potential on the soybean looper *Chrysodeixis includens* which is a pest of many crops. The extract was prepared and diluted in water and solubilizer at concentrations of 0.5; 1.0; 2.0; 4.0 and 8.0%, which were tested on larvae of the first, 3rd and 5th instars through oral and topical application. The extract of *A. mucosa* showed insecticidal effect against *C. includens* in all instars evaluated. On 1st instar larvae there was a high mortality 24 hours after application, by both methods evaluated. For third instar larvae mortality the method of ingestion, did not differ statistically among concentrations tested, with higher mortality observed reached 60% for the 8% concentration after 120 hours of application. By contact on 3rd instar caterpillars, after 24 hours at the highest concentration mortality reached 80%. Fifth instar caterpillars after eating treated leaves attained significant mortality only after 72 hours at concentrations between 2.0 and 8.0% while contact mortality was 93.3% at the highest concentration after 24 hours of application. The results show that *A. mucosa* is a promising alternative for the development of new molecules for the control of *C. includens*.

KEY-WORDS: Annonaceae, Bioinsecticide, Alternative Control, Defoliator.

1. INTRODUÇÃO

Annona mucosa Jacq. é uma planta nativa da Floresta Amazônica e Mata Atlântica, pertencente a família Annonaceae, conhecida popularmente como biribá, araticum, ariticum, condessa, fruta-da-condessa, fruta-de-conde ou graviola brava (Lorenzi 2002).

Diversos estudos apontam que os compostos químicos conhecidos como “acetogeninas de anonáceas” presentes na família Annonaceae apresentam atividades biológicas importantes, como atividade citotóxica, antitumoral, antimicrobiana, inseticida entre outras (Ruprecht e McLaughlin 1990; Alali et al. 1999). Para *A. mucosa* já é comprovado seu potencial antimicrobiano e antifúngico (Caetano e Dadoun 1987), antitumoral e inibidor da síntese de ATP do complexo mitocondrial I (Shi et al. 1996; 1997; Gu et al. 1997; Chavez et al. 1999; Liaw et al. 2003), atividade leishmanicida (De Lima et al. 2012), além de potencial inseticida (Alali et al. 1999; Ribeiro et al. 2013; Costa et al. 2013).

Nos últimos anos plantas com potencial inseticida vêm se destacando em relação aos inseticidas químicos, pois são menos nocivas ao meio ambiente e ao homem (Isman 2006). Além disso, o uso excessivo e contínuo de produtos neurotóxicos favorece o surgimento de pragas resistentes aos princípios ativos (Bueno et al. 2007; Boyer et al. 2012).

Boethel et al. (1992) abordam sobre a resistência a inseticidas, em populações de plusiíneos (Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae), no sudoeste dos Estados Unidos, desde a década de 1960, e destacam que a resistência das populações da região pode ter sido ocasionada devido às muitas aplicações em algumas culturas, como crisântemo e tomate, onde o número de aplicações de produtos sintéticos chega a 100 por ano.

Dentre os plusiíneos, *Chrysodeixis* (= *Pseudoplusia*) *inclusens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae) conhecida popularmente como lagarta falsa medideira, é uma praga ocorrente desde o norte dos Estados Unidos até o sul da América do Sul (Alford e Hammond 1982). Já foi registrada atacando aproximadamente 70 espécies vegetais entre elas soja, algodão, feijão, girassol, fumo, maracujá, tomate e diversas hortaliças (Herzog 1980; Benassi et al. 2012; Moscardi et al. 2012).

No Brasil, nos principais estados produtores de soja, *C. inclusens* era considerada uma praga secundária, sendo controlada naturalmente por parasitoides e fungos entomopatogênicos (Sosa-Gomez et al. 2003). Porém, desde 2003, esta praga vem

apresentando surtos nos estados de Mato Grosso do Sul, Goiás, São Paulo, Paraná e Mato Grosso (Bueno et al. 2009).

Para o controle desta lagarta, na maioria das vezes é utilizado o controle químico, mas este, nem sempre é eficiente devido ao hábito dela permanecer na face abaxial das folhas no terço médio das plantas, não entrando em contato direto com o inseticida (Oliveira 2010). Devido a isto, muitas vezes as dosagens de produtos são drasticamente aumentadas, diminuindo as populações de inimigos naturais e favorecendo o aparecimento de populações resistentes.

Logo, é preciso que novas moléculas e novos modos de ação com menores danos ao meio ambiente e aos inimigos naturais, sejam pesquisados para serem utilizados em programas de manejo integrado de *C. includens* (Viegas Júnior 2003).

Considerando que *A. mucosa* já apresentou potencial inseticida sobre espécies como *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) (Costa et al. 2013) e *Sitophilus zeamays* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) (Ribeiro et al. 2013), o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial inseticida desta planta sobre *C. includens* em condições de laboratório.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do extrato

Partes da planta (galhos, folhas, flores e frutos) de *A. mucosa* foram coletados para identificação em Tangará da Serra – MT. Após a confirmação da espécie, a exsiccata foi depositada no Herbário da Universidade do Estado de Mato Grosso, campus de Tangará da Serra (UNEMAT/CUTS) sob o registro Nº 92. Dos frutos coletados foram retiradas as sementes e estas foram desidratadas em estufa de circulação de ar a 40°C por 72 horas. Após a secagem, as sementes foram trituradas em moinho tipo faca e o pó obtido foi levado ao laboratório de Bioquímica de Carboidratos da Universidade Federal do Paraná, onde foi submetido à deslipidificação por três dias com solvente orgânico clorofórmio-metanol (2:1), utilizando aparelho extrator *Soxhlet* em manta aquecida a 60°C até a exaustão.

O material extraído foi rotaevaporado a 40°C para remoção dos solventes, obtendo-se então o extrato bruto. A partir destes extratos, foram feitas as diluições para as concentrações utilizadas nos bioensaios.

2.2. Criação de *Chrysodeixis includens*

As lagartas de *C. includens* utilizadas nos bioensaios foram obtidas da criação estabelecida no Laboratório de Entomologia da UNEMAT/CUTS. Na criação todas as fases de *C. includens* foram mantidas em sala climatizada a $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa (UR) de $70\pm 10\%$.

Os adultos foram mantidos em gaiolas de PVC de (100mm x 200mm) (Figura 1A) revestidas internamente com papel sulfite e a abertura superior fechada com tecido tipo *voil* preso por um elástico (Figura 1B) e, na extremidade inferior por uma placa de Petri contendo papel filtro e um recipiente, contendo algodão embebido em solução de 10% de mel para alimentação e o outro com água (Figura 1C), o quais eram trocados três vezes por semana.

Os ovos obtidos foram destinados aos bioensaios e à manutenção da criação. Para manutenção da criação, o substrato contendo ovos (papel sulfite e o *voil*) era recortado em tiras, e estas colocadas na tampa de potes plásticos de 145 mL contendo dieta artificial de Greene et al. (1976) (Figura 1D). Neste recipiente as lagartas eclodiram e permaneceram por aproximadamente 10 dias, quando foram transferidas para copos de 50 mL com tampa de acetato contendo a mesma dieta, onde permanecem até atingirem o estágio de pupa (Figura 1E). As pupas foram retiradas dos copos e colocadas nas gaiolas de PVC. Após a emergência dos adultos, estes eram mantidos nas gaiolas descritas anteriormente, até a morte.



Figura 1 – Recipientes usados na criação de *Chrysodeixis includens* em dieta artificial. A – gaiola de PVC; B – extremidade superior da gaiola (*voil* contendo ovos); C – extremidade inferior da gaiola contendo mel 10% e água embebidos em algodão; D – Pote plástico de 145 mL contendo dieta artificial e lagartas de 1º instar; E – Copo de 50 mL com três lagartas de 4º instar.

2.3. Bioensaios - Toxicidade por ingestão e contato

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Entomologia da UNEMAT/CUTS em câmaras climatizadas do tipo BOD a $25\pm 1^\circ\text{C}$ e UR $70\pm 10\%$, com fotoperíodo de 12 horas.

Os tratamentos para todos os bioensaios consistiram de extrato de sementes de *A. mucosa* nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0%. O extrato bruto foi solubilizado em água com Polissorbato 80 (Tween 80[®]) a 5% e misturados por 5 minutos em agitador magnético.

Os bioensaios foram realizados com delineamento inteiramente casualizado, com cinco concentrações e dois tratamentos controle (água e água + Tween 80[®]), cada tratamento com 15 repetições de uma lagarta.

Ovos de 24 horas foram retirados da criação e colocados sob condições controladas anteriormente citadas. As lagartas foram mantidas em recipientes plásticos de 145 mL com fundo de papel filtro e alimentadas com folhas de soja (var. convencional Tucunaré), obtidas de cultivo em casa de vegetação. As folhas de soja depois de coletadas foram lavadas em água corrente, colocadas no recipiente com a lagarta, sendo que o pecíolo foi envolvido com algodão úmido para evitar o ressecamento (Figura 2A).

Lagartas de 1^o instar foram submetidas aos tratamentos 24 horas após a eclosão e, para os demais bioensaios, as lagartas foram alimentadas até atingirem o instar desejado (3^o e 5^o), observando-se diariamente a liberação da cápsula cefálica.

Dois modos de aplicação do extrato foram avaliados: ingestão da folha tratada e por contato direto. No método por ingestão, o extrato foi aplicado na face adaxial das folhas (Figura 2B). Para isso o extrato solubilizado era colocado em uma placa de Petri e a face adaxial da folha de soja foi passada na solução e deixadas sobre a bancada com este lado para cima por aproximadamente 30 minutos, para evaporação do excesso da solução (Figura 2C). Após esse período eram oferecidas para as lagartas por 24h, quando então era realizada a primeira avaliação, e a folha trocada por uma nova sem tratamento.

No método por contato, aplicou-se no dorso de cada lagarta uma microgota (1 μL para lagartas de 1^o instar e 2 μL para lagartas de 3^o e 5^o instares) com auxílio de uma micropipeta, sendo que, para as lagartas de 1^o instar, a aplicação foi feita com o uso de estereomicroscópio. Após a aplicação, as lagartas foram mantidas em condições controladas e a mortalidade avaliada diariamente.

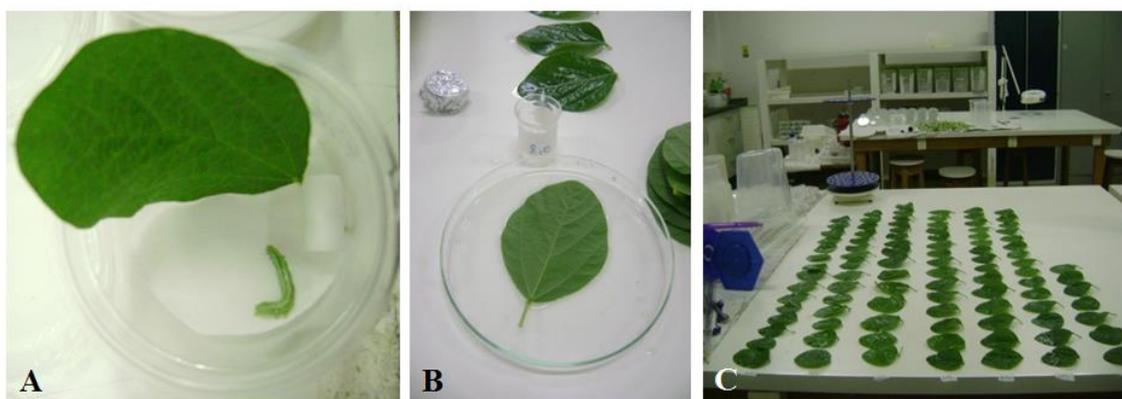


Figura 2 – A - Recipiente de 145 mL contendo papel filtro no fundo e uma folha de soja com o pecíolo envolvido em algodão umedecido B – Folha tratada na superfície adaxial; C - Folhas deixadas sobre a bancada após aplicação para secagem.

2.4. Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. Como os dados não atenderam os pressupostos de normalidade, os resultados de mortalidade foram analisados através do teste de *Kruskal-Wallis* a 5% e as comparações entre os métodos de aplicação foram analisadas pelo teste de *Mann-Whitney* a 5%. A concentração letal de metade das lagartas tratadas (CL_{50}) e CL_{90} foram calculadas pela análise de Probit (Finney 1971). Para estas análises foi utilizado o *software* Statistica 7.0.

3. RESULTADOS

O extrato de sementes de *A. mucosa* apresentou efeito inseticida para lagartas de *C. includens* em todos os instares avaliados. As avaliações foram realizadas diariamente por cinco dias, porém, como os resultados foram semelhantes, optamos por apresentar os resultados de 24, 72 e 120 horas após aplicação (HAA).

Em lagartas de 1º instar, observou-se uma alta mortalidade logo nas primeiras 24 horas após a aplicação, tanto por contato, quanto por ingestão (Tabela 1). Por ingestão a concentração de 4,0% apresentou mortalidade de 73,3% diferindo dos tratamentos controle, enquanto que por contato as duas maiores concentrações diferiram estatisticamente dos tratamentos controle. Com o passar das horas a mortalidade teve um aumento significativo para concentrações menores pelo método de ingestão, sendo que 72 HAA, as concentrações de 1,0 e 2,0% apresentaram mortalidade superior a 80,0% e as maiores concentrações atingiram 100,0% de mortalidade. Estes resultados mantiveram-se até 120 HAA.

Pelo método de contato, 72 HAA a mortalidade permaneceu alta apenas nas duas maiores concentrações e 120 HAA a concentração de 2,0% também apresentou mortalidade significativa (Tabela 1).

Em lagartas de 3º instar a mortalidade não diferiu estatisticamente pelo método de ingestão mesmo após 120 HAA, sendo de 60% para a maior concentração (Tabela 2). No entanto, 27,7% do total de lagartas mortas após 72 HAA, nas concentrações de 2,0 a 8,0% morreram presas na exúvia ou na cápsula cefálica no momento da ecdise (Figura 3A-F).

Por contato, 24 HAA na concentração de 8,0% a mortalidade atingiu 80% e diferiu estatisticamente dos controles (Tabela 2). Após 72 horas a concentração de 4,0% atingiu 86,6% de mortalidade e 120 HAA as duas maiores concentrações atingiram 93,3% de mortalidade diferindo dos tratamentos controle (Tabela 2). Das lagartas mortas durante as 120 horas de avaliação, 16,2% morreram como no método por ingestão, presas na exúvia durante a ecdise.



Figura 3 – Lagartas de *Chrysodeixis includens* de 3º instar após ingestão de folhas tratadas com extrato, mortas presas a exúvia, 72 horas após a ingestão. A e B – Concentração de 2,0%; C e D - Concentração de 4,0%; E e F - Concentração de 8,0%.

Tabela 1 - Porcentagem de mortalidade (\pm DP) de *Chrysodeixis includens* de 1º instar expostas a diferentes concentrações do extrato de *Annona mucosa* por ingestão e por contato, após 24, 72 e 120 horas após aplicação

Trat.	Ingestão			Contato		
	24h	72h	120h	24h	72h	120h
Água	0,0 \pm 0,0 b ¹	6,6 \pm 2,5 b	6,6 \pm 2,5 b	0,0 \pm 0,0 c	0,0 \pm 0,0 c	0,0 \pm 0,0 c
Água +Tween[®]	0,0 \pm 0,0 b	6,6 \pm 2,5 b	6,6 \pm 2,5 b	20,0 \pm 4,1 bc	20,0 \pm 4,1 bc	20,0 \pm 4,1 bc
0,5%	13,3 \pm 3,5 ab	60,0 \pm 5,0 ab	60,0 \pm 5,0 ab	40,0 \pm 5,0 abc	40,0 \pm 5,0 abc	53,3 \pm 5,1 abc
1,0%	13,3 \pm 3,5 ab	80,0 \pm 4,1 a	86,6 \pm 3,5 a	60,0 \pm 5,0 abc	66,6 \pm 4,8 ab	66,6 \pm 4,8 ab
2,0%	33,3 \pm 4,8 ab	93,3 \pm 2,5 a	93,3 \pm 2,5 a	80,0 \pm 4,1 ab	80,0 \pm 4,1 ab	86,6 \pm 3,5 a
4,0%	73,3 \pm 4,5 a	100,0 \pm 0,0 a	100,0 \pm 0,0 a	93,3 \pm 2,5 a	93,3 \pm 2,5 a	93,3 \pm 2,5 a
8,0%	26,6 \pm 4,5 ab	100,0 \pm 0,0 a	100,0 \pm 0,0 a	86,6 \pm 3,5 a	93,3 \pm 2,5 a	93,3 \pm 2,5 a
H	32,8	66,2	68,7	45,4	49,2	50,4

¹Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não são significativamente diferentes ($p > 0,05$) segundo o Teste *Kruskal-Wallis* a 5%.

Tabela 2 - Porcentagem de mortalidade (\pm DP) de *Chrysodeixis includens* de 3º instar expostas a diferentes concentrações do extrato de *Annona mucosa* por ingestão e por contato, após 24, 72 e 120 horas após aplicação

Trat.	Ingestão			Contato		
	24h ^{n.s.}	72h ^{n.s.}	120h ^{n.s.}	24h	72h	120h
Água	0,0 \pm 0,0	6,6 \pm 2,5	13,3 \pm 3,5	0,0 \pm 0,0 b ¹	6,6 \pm 2,5 b	6,6 \pm 2,5 c
Água +Tween[®]	0,0 \pm 0,0	13,3 \pm 3,5	20,0 \pm 4,1	0,0 \pm 0,0 b	20,0 \pm 4,1 b	20,0 \pm 4,1 bc
0,5%	13,3 \pm 3,1	26,6 \pm 4,5	26,6 \pm 4,5	46,6 \pm 5,1 ab	60,0 \pm 5,0 ab	86,6 \pm 3,5 a
1,0%	26,6 \pm 4,5	53,3 \pm 5,1	53,3 \pm 5,1	6,6 \pm 2,5 b	66,6 \pm 4,8 ab	73,3 \pm 4,5 ab
2,0%	13,3 \pm 3,5	46,6 \pm 5,1	53,3 \pm 5,1	40,0 \pm 5,0 ab	60,0 \pm 5,0 ab	80,0 \pm 4,1 ab
4,0%	0,0 \pm 0,0	46,6 \pm 5,1	46,6 \pm 5,1	60,0 \pm 5,0 ab	86,6 \pm 3,5 a	93,3 \pm 2,5 a
8,0%	13,3 \pm 3,5	46,6 \pm 5,1	60,0 \pm 5,0	80,0 \pm 4,1 a	93,3 \pm 2,5 a	93,3 \pm 2,5 a
H	10,5	13,7	13,0	40,4	37,4	50,7

^{n.s.} Não significativo Teste *Kruskal-Wallis* a 5%. ¹Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não são significativamente diferentes ($p > 0,05$) segundo o Teste *Kruskal-Wallis* a 5%.

Quando avaliado o efeito do extrato de *A. mucosa* sobre lagartas de 5º instar de *C. includens* por ingestão, nas primeiras 24 horas após aplicação não houve diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 3). Após 72 horas a concentração de 2,0% atingiu 86,6% de mortalidade diferindo dos tratamentos controle, e as concentrações de 4,0 e 8,0% atingiram 73,3% de mortalidade diferindo apenas do tratamento controle com água. Após 120 horas da aplicação por ingestão, as concentrações de 2,0 a 8,0% igualaram-se, atingindo 93,3% de mortalidade (Tabela 3). Observou-se também que o extrato de *A. mucosa* por ingestão afetou a duração do 5º instar. Nas concentrações de 0,5 e 1,0% houve um aumento na mortalidade após 72 horas (Tabela 3), e as lagartas ainda não haviam entrado em estágio de pré-pupa, sendo que, em condições normais, a duração média do 5º instar a 25º C é de 2,4 dias e a fase de pré-pupa é de 1,4 dias (dados não publicados). Nestes tratamentos também se observou a mal formação dos indivíduos que atingiram o estágio de pupa, onde 20,0% destas estavam deformadas e não atingiram a fase adulta (Figura 4).



Figura 4 – Lagartas mortas em fase de pré-pupa no tratamento de 0,5%, após 120 horas da ingestão do extrato.

Na aplicação do extrato por contato em lagartas de 5º instar, 24 horas após aplicação, a mortalidade atingiu 93,3% e após 72 horas a mortalidade chegou a 100,0% para a concentração de 8,0%. Nas menores concentrações, após 72 HAA, a mortalidade teve aumentos significativos e após 120 horas todas as concentrações apresentaram mortalidade superior a 70,0%, diferindo estatisticamente dos tratamentos controle (Tabela 3). Neste método de aplicação também se observaram lagartas mortas durante o estágio de pré-pupa, e também se constatou que várias lagartas mortas apresentavam edemas na epiderme (Figura 5).



Figura 5 – *Chrysodeixis includens* de 5º instar, mortas após aplicação de extrato de *Annona mucosa* por contato, apresentando edema na epiderme.

Nas avaliações de 24 horas pelo método de ingestão em todos os instares, as concentrações menores apresentaram maior mortalidade em relação a maior concentração (Tabelas 1, 2 e 3). Isso pode estar relacionado ao palato, sendo que nas menores concentrações o sabor deve ser mais palatável, enquanto que na maior concentração o sabor deve ser acentuado, repelindo a alimentação, no entanto, por falta de outro alimento a lagarta é obrigada a se alimentar e com o passar das horas a mortalidade se iguala em algumas concentrações.

A aplicação por contato apresentou maiores taxas de mortalidade em relação ao método por ingestão e também seu efeito foi mais rápido, pois em todos os instares avaliados, após 24 horas o método por contato apresentou mortalidade igual ou superior a 80%. Quando comparados estatisticamente os métodos de ingestão e contato quanto a mortalidade ao final de 120 horas após aplicação, não foi constatada diferença estatística entre ambos os métodos de aplicação, para nenhum dos instares, concluindo-se que ambos os métodos de aplicação são eficientes.

Através das concentrações letais (CL) também é possível observar que o método por contato apresentou resultados em menor tempo após a aplicação, porém ao final das 120 horas os valores da CL por ingestão e por contato se equiparam.

As CLs 50 e 90 foram calculadas para 24, 72 e 120 horas (Tabela 4). Pelo método de ingestão, as CL₅₀ e CL₉₀ ficaram com valores muito elevados para 24 horas em todos os instares avaliados. No entanto após 72 e 120 horas da aplicação, a CL₅₀ apresentou valores menores (Tabela 4). Apenas a CL₉₀ para lagartas de terceiro mantiveram-se com valores elevados. Pelo método de contato, em 24 HAA as CLs já apresentavam concentrações pequenas e estas foram diminuindo no decorrer das avaliações. Lagartas de terceiro instar foram mais resistentes às concentrações de *A. mucosa* em relação às lagartas de primeiro e quinto instares, por isso apresentaram maiores CLs, principalmente pelo método de ingestão (Tabela 4).

Tabela 3 – Porcentagem de mortalidade (\pm DP) de *Chrysodeixis includens* de 5º instar expostas a diferentes concentrações do extrato de *Annona mucosa* por ingestão e por contato, após 24, 72 e 120 horas após aplicação

Trat.	Ingestão			Contato		
	24h ^{n.s.}	72h	120h	24h	72h	120h
Água	0,0 \pm 0,0	6,6 \pm 2,5 c ¹	6,6 \pm 2,5 c	0,0 \pm 0,0 b	6,6 \pm 2,5 b	6,6 \pm 2,5 b
Água + Tween®	0,0 \pm 0,0	13,3 \pm 3,5 bc	13,3 \pm 3,5 bc	0,0 \pm 0,0 b	6,6 \pm 2,5 b	6,6 \pm 2,5 b
0,5%	13,3 \pm 3,5	40,0 \pm 5,0 abc	66,6 \pm 4,8 abc	33,3 \pm 4,8 ab	80,0 \pm 4,1 a	86,6 \pm 3,5 a
1,0%	6,6 \pm 2,5	66,6 \pm 4,8 abc	73,3 \pm 4,5 ab	13,3 \pm 3,5 b	66,6 \pm 4,8 ab	73,3 \pm 4,5 a
2,0%	40,0 \pm 5,0	86,6 \pm 3,5 a	93,3 \pm 2,5 a	33,3 \pm 4,8 ab	73,3 \pm 4,5 a	73,3 \pm 4,5 a
4,0%	20,0 \pm 4,1	73,3 \pm 4,5 ab	93,3 \pm 2,5 a	53,3 \pm 5,1 ab	80,0 \pm 4,1 a	86,6 \pm 3,5 a
8,0%	13,3 \pm 3,5	73,3 \pm 4,5 ab	93,3 \pm 2,5 a	93,3 \pm 2,5 a	100,0 \pm 0,0 a	100,0 \pm 0,0 a
H	14,8	35,8	54,2	44,9	51,0	56,9

^{n.s.} Não significativo pelo Teste *Kruskal-Wallis* a 5%. ¹Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na colunas não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) segundo o Teste *Kruskal-Wallis* a 5%.

Tabela 4 – Concentração letal (CL₅₀ e CL₉₀) (%) para o tratamento por ingestão ou aplicação por contato do extrato de *Annona mucosa* para lagartas de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae)

Instar	CL (%)	Ingestão			Contato		
		24h	72h	120h	24h	72h	120h
1°	CL ₅₀ (IC95%)	7,70 ¹ (7,3 - 8,0) ²	1,65 (0,5 - 2,8)	1,61 (0,4 - 2,7)	2,05 (1,7 - 2,3)	1,68 (1,1 - 2,1)	1,35 (0,8 - 1,9)
	CL ₉₀ (IC95%)	15,70 (14,9 - 16,4)	3,80 (2,4 - 5,2)	3,74 (2,3 - 5,1)	6,38 (5,8 - 6,9)	5,65 (4,8 - 6,4)	5,52 (4,6 - 6,3)
3°	CL ₅₀ (IC95%)	109,38 (107,3 - 111,4)	6,41 (6,3 - 6,5)	4,59 (4,56 - 4,63)	4,05 (3,96 - 4,13)	1,55 (1,18 - 1,93)	0,40 (-0,19 - 1,00)
	CL ₉₀ (IC95%)	215,30 (211,3 - 219,3)	17,05 (16,7 - 17,3)	13,23 (13,12 - 13,34)	8,36 (8,18 - 8,54)	6,12 (5,47 - 6,77)	5,47 (4,68 - 6,26)
5°	CL ₅₀ (IC95%)	25,65 (24,57 - 26,72)	2,06 (1,94 - 2,17)	0,85 (0,22 - 1,48)	3,83 (3,70 - 3,96)	1,37 (0,75 - 2,00)	1,14 (0,38 - 1,90)
	CL ₉₀ (IC95%)	51,20 (48,97 - 53,44)	8,18 (7,90 - 8,46)	5,33 (4,45 - 6,90)	7,48 (7,23 - 7,73)	5,28 (4,34 - 6,22)	4,91 (3,87 - 5,95)

¹Valores calculados pela Análise de Probit. ²Intervalos de Confiança de 95% (IC).

4. DISCUSSÃO

Os resultados apontam que *A. mucosa* possui potencial inseticida, assim como verificado para outras espécies do gênero *Annona*. Apesar da potencialidade das anonas, poucos estudos foram realizados até o momento com esta espécie, sendo este o primeiro trabalho sobre o efeito de *A. mucosa* em lepidópteros.

Para lagartas de primeiro instar, após 72 horas da aplicação as concentrações entre 1,0 e 8,0% foram eficazes através do método de ingestão, enquanto que pelo método de contato as concentrações de 4,0 e 8,0% se sobressaíram em relação aos controles. Em lagartas de terceiro instar, porém, pelo método de ingestão não se obteve resultado satisfatório, no entanto através do contato direto as duas maiores concentrações também foram eficientes para o controle de *C. includens*. A concentração de 2,0% já se mostrou eficiente 72 HAA, para controle de lagartas de quinto instar, confirmando assim o potencial inseticida que *A. mucosa* apresenta.

O potencial de *A. mucosa* já foi anteriormente avaliado sobre outros insetos pragas como o gorgulho do milho (*Sitophilus zeamays* Mots. (Coleoptera: Curculionidae)) por Ribeiro et al. (2013), que testaram o efeito de diferentes partes da planta (folhas, galhos e sementes) em diferentes solventes (hexano, diclorometano e etanol) e concluíram que o extrato de sementes de *A. mucosa* na concentração de 300 mg Kg⁻¹ com solvente hexânico proporcionou mortalidade de 98,0% e com solvente diclorometano 85,5%. Na concentração de 1500 mg Kg⁻¹ para ambos os solventes a mortalidade atingiu 100%.

O efeito de sementes de *A. mucosa* também foi avaliado para larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) por Costa et al. (2013), constatando que o extrato metanólico na concentração de 0,1 mg mL resulta em 100% de mortalidade após 24 horas da aplicação. Para lagartas de *C. includens* de primeiro instar, também se registrou uma alta mortalidade (superior a 70%) após 24 horas da aplicação, pelos dois métodos de aplicação, confirmando o potencial inseticida de *A. mucosa*.

Apesar de não existirem estudos de *A. mucosa* sobre lepidópteros, outras espécies de anonas também apresentaram potencial inseticida sobre outros lepidópteros praga. Seffrin et al. (2010) testaram extratos metanólicos de *A. atemoia* (híbrido de *A. cherimolia* x *A. squamosa*) e *A. squamosa*, em lagartas de 3º instar de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae), por ingestão e por contato e concluíram que *A. squamosa* foi mais eficiente na deterrência alimentar e na inibição do crescimento larval.

No presente trabalho *A. mucosa* não apresentou resultados satisfatórios quanto à mortalidade pelo método de ingestão em lagartas de terceiro instar, porém se observou que as lagartas morreram no momento da ecdise ficando presas à exúvia, podendo este resultado estar ligado à inibição do crescimento larval assim como observado por Seffrin et al. (2010) sobre *T. ni*.

O extrato etanólico de folhas de *A. muricata* causou 100% de mortalidade em lagartas de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) alimentadas com folhas de couve tratadas com o extrato na concentração de 5 mg mL⁻¹ (Trindade et al. 2011). As lagartas mortas apresentavam coloração escura e tamanho reduzido (inibição do crescimento larval), e, além disso, muitas lagartas morreram durante a ecdise por não se liberarem completamente da exúvia, provavelmente pelo efeito dos componentes químicos do extrato no sistema hormonal da praga. Resultado como este foi registrado neste trabalho para lagartas de terceiro instar, onde as lagartas morreram com coloração semelhante e algumas no momento da ecdise, e no 5º instar, onde as lagartas não conseguiram atingir o estágio de pupa, o que pode estar diretamente ligado aos hormônios do crescimento.

A interferência hormonal das acetogeninas foi verificada por Blessing et al. (2010) que avaliaram acetogeninas de *A. montana* (annonacin, cis-annonacin-10-one, densicomacin-1, gigantetronenin, murihexocin-B e tucupentol) sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e observaram que todas as acetogeninas oferecidas na proporção de 100 µg em dieta artificial, eliminaram 100% da praga na fase larval ou pupal. Blessing et al. (2010) destacaram que para as acetogeninas, annonacin, cis-annonacin-10-one e gigantetronenin, não foram detectadas correlações entre a toxicidade e a capacidade já conhecida destas acetogeninas, de inibir a oxidação da NADH, indicando que esta não é a única causa para a mortalidade larval. Esta constatação explica as alterações morfológicas observadas nas lagartas e pupas de *S. frugiperda*, as quais são típicas de compostos que interferem na atividade hormonal de lepidópteros, e que também foram observadas no presente estudo para *C. includens*.

Acetogeninas de *A. cherimolia* também foram testadas sobre lagartas de *S. frugiperda* por Álvarez Colon et al. (2007). Dentre as acetogeninas, squamocin ocasionou 100% de mortalidade no estágio larval, enquanto as demais acetogeninas testadas (itrabin, cherimolin-1 e -2, neoannonim, almuñequin, motrilin, tucumanin e asimicin) apresentaram um aumento significativo na duração da fase larval, morte na fase pupal e malformação no abdômen e asas dos adultos, impedindo assim a próxima geração.

O presente estudo confirma o potencial inseticida de *A. mucosa*, como já registrado por outros autores, e este potencial pode estar relacionado às acetogeninas descritas na composição de sementes de *A. mucosa* (Pettit et al. 1987; Shi et al. 1995; Shi et al., 1996 (A e B); Chaves et al. 1999).

As acetogeninas são fortes inibidores da produção de ATP do complexo mitocondrial I (NADH ubiquinona oxidoreductase) em insetos, e esta redução na produção de energia tem como consequência a morte celular programada (apoptose) (Lewis et al. 1993; Ahammadsahib et al. 1993; Tormo et al. 1999), bem como apresentam características de compostos que interferem na atividade hormonal de lepidópteros (Blessing et al. 2010), podendo ser estes os motivos da morte de *C. includens* no presente estudo.

Com relação às concentrações letais (CL) para matar 50 e 90% das lagartas, pelo método de ingestão, os valores foram elevados, principalmente para lagartas de terceiro instar. Entretanto, ao final das avaliações as CLs do método de ingestão e contato se assemelham. Resultados similares foram registrados por Lima et al. (2009), que testaram óleo essencial de *Piper hispidinervum* (Piperaceae) sobre *S. frugiperda* e constataram que o aumento das CLs, nas avaliações iniciais, pode estar ligado ao efeito *knock-down*, no qual inicialmente as lagartas apenas fazem a mordida de prova, e param de se alimentar por algumas horas. Só após determinado tempo elas voltam a se alimentar ingerindo assim o extrato.

Baseado nestes resultados, podemos inferir que *A. mucosa* apresenta potencial para bioprospecção na área de produtos fitossanitários, podendo ser utilizada de duas formas. Através da fabricação do extrato em pequena escala (artesanal) para uso por pequenos e médios produtores, ou através da síntese das moléculas bioativas para que possam ser produzidos os produtos comerciais em larga escala.

No primeiro caso a produção artesanal pode ser feita através da reutilização de sementes que são descartadas de fábricas de sucos e sorvetes ou através do cultivo das plantas pelo agricultor (Ribeiro et al. 2013). No segundo caso, mais estudos são necessários para a identificação dos compostos e estruturas moleculares e os modos de ação das acetogeninas de anonáceas. Métodos de ação diferentes dos já conhecidos (neurotóxicos, inibidores de acetilcolinesterase, inibidores do canal de sódio, inibidores da síntese de quitina, entre outros) podem ser registrados e utilizados para o controle de

pragas que já apresentam resistência aos princípios e vias de ação, disponíveis comercialmente.

A partir do conhecimento das moléculas e estruturas químicas dos compostos ativos, será possível a produção de novos produtos a partir da molécula sintética, de forma a serem produzidos em grande quantidade para comercialização, resultando no controle eficaz da praga e com menores impactos ao meio ambiente.

Estudos de semi-campo e campo também devem ser realizados de forma a confirmar os resultados obtidos em laboratório. Para novos estudos a concentração de 4,0% deve ser explorada visto que apresentou bons resultados para todos os instares avaliados 72 HAA por ambos os métodos de aplicação.

Conclui-se que *A. mucosa* é uma espécie promissora para o desenvolvimento de novas moléculas para o controle de *C. includens*, porém mais estudos são necessários para verificar o potencial inseticida sobre outros lepidópteros praga, bem como sobre os inimigos naturais, para que produtos com estas moléculas possam ser indicados em programas de manejo integrado de pragas.

5. AGRADECIMENTO

Agradecemos ao professor Dr. Guilherme L. Sasaki do Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná por ter auxiliado na obtenção do extrato. Agradecemos também a equipe de criação de lepidópteros do Laboratório de Entomologia da UNEMAT/CUTS, pelo auxílio na criação da lagarta e a CAPES pela bolsa de pós-graduação concedida.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahammadsahib KI, Hollingworth RM, Mcgovren JP, Hui YH, McLaughlin JL (1993) Mode of action of bullatacin: A potent antitumor and pesticidal annonaceous acetogenin. *Life Sciences* 53:1113-1120
- Alali FQ, Xi Liu X, McLaughlin JL (1999) Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. *Journal of Natural Products* 62:504-540
- Alford AR, Hammond Junior AM (1982) Plusiinae (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Louisiana soybean ecosystems as determined with looplure-baited traps (*Pseudoplusia includens*, *Rachiplusia nu*, *Trichoplusia* spp.). *Journal of economic Entomology* 75:647-650

- Álvarez-Colom O, Neske A, Popich S, Bardón A (2007) Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Pest Science* 80:63-67
- Benassi VL, RM, Valente FI, Comerio EF, Carvalho S (2012) Lagarta- Falsa-Medideira, *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857), nova praga do maracujazeiro no Espírito Santo. *Revista Brasileira de Fruticultura* 34:941-943
- Blessing LT, Colom OA, Popich S, Neske A, Bardon A (2010) Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Pest Science* 83:307-310
- Boethel DJ, Mink JS, Wier AT, Thomas JD, Leonard BR, Gallardo F (1992). Management of insecticide resistant soybean loopers (*Pseudoplusia includens*) in the southern United States. In: Copping LG, Green MB, Rees R T (eds) *Pest management in soybean*. Society of Chemical Industry, Essex, England, pp.66
- Boyer S, Zhang H, Lemperiere G (2012) A review of control methods and resistance mechanisms in stored-product insects. *Bulletin of Entomological Research* 102:213-229
- Bueno RCOF, Parra JRP, Bueno AF, Moscardi F, Oliveira JRG, Camillo MF (2007) Sem barreira. *Revista Cultivar* 93:12-15
- Bueno RCOF, Parra JRP, Bueno AF, Haddad ML (2009) Desempenho de Trichogramatídeos como potenciais agentes de controle de *Pseudoplusia includens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical Entomology* 38:389-394
- Caetano C, Dadoun H (1987) Pallidine and aporphinoid alkaloids from *Rollinia mucosa*. *Journal of Natural Products* 50:330
- Chávez D, Acevedo LA, Mata R (1999) Tryptamine Derived amides and Acetogenins from the seeds of *Rollinia mucosa*. *Journal Natural Products* 62:1119-1122
- Costa MS, Pereira MJB, Oliveira SS, Souza PT, Dall'oglio EL, Alves TC (2013) Anonáceas provocam mortalidade em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Revista Brasileira de Biociências* 11:184-190
- De Lima JPS, Pinheiro MLB, Santos AMG, Pereira JLS, Santos DMF, Barison A, Silva-Jardim I, Costa EV (2012) In Vitro Antileishmanial and Cytotoxic Activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). *Revista Virtual de Química* 4:692-702
- Finney DJ (1971) *Probit Analysis*. Cambridge University Press, Cambridge, pp.31
- Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA (1976) Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology* 69:487-488
- Gu ZM, Zhou D, Lewis NJ, Wu J, Shi G, Mclaughlin JL (1997) Isolation of new bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa* guided by liquid chromatography/mass spectrometry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 5:1911-1916

- Herzog DC (1980) Sampling soybean looper on soybean. In: Kogan M, Herzog DC (eds.) *Sampling Methods in Soybean Entomology*, Springer-Verlag, New York. 1980, pp.141-168
- Isman MB (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review Entomology* 51:45–66
- Lewis MA, Arnason JT, Philogene BJR, Rupperecht JK, McLaughlin JL (1993) Inhibition of respiration at site I by asimicin, an insecticidal acetogenin of the Pawpaw, *Asimina triloba* (Annonaceae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 45:15-23
- Liaw CC, Chang FR, Wu MJ, Wu YC (2003) A novel constituent from *Rollinia mucosa*, rollicosin, and a new approach to develop annonaceous acetogenins as potential antitumor agents. *Journal of Natural Products* 66:279-281
- Lima RK, Cardoso MG, Moraes JC, Melo BA, Rodrigues VG, Guimarães PL (2009) Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Amazônica* 39:126-129
- Lorenzi H (2002) *Árvores Brasileiras - manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, v.2*, Nova Odessa, São Paulo
- Moscardi F, Bueno AF, Sosa-Gómez DR, Roggia S, Hoffmann-Campo CB, Pomari AF, Corso IC, Yano SAC (2012) Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: Hoffmann-Campo BC, Corrêa-Ferreira BS, Moscardi F (eds) *Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga*, Brasília, Distrito Federal
- Oliveira JRG, Ferreira MC, Román RAA (2010) Diferentes diâmetros de gotas e equipamentos para aplicação de inseticida no controle de *Pseudoplusia includens*. *Engenharia Agrícola* 30:92-99
- Pettit GR, Cragg GM, Polonsky J, Herald DL, Goswami A, Smith CR, Moretti C, Schimdt JM, Weisleder D (1987) Isolation and structure of rolliniastatin 1 from the South American tree *Rollinia mucosa*. *Canadian Journal of Chemistry* 65:1433-1435
- Ribeiro LP, Vendramim JD, Bicalho KU, Andrade MS, Fernandes, JB, Moral RA, Demétrio CGB (2013) *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): A promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 55:6-14
- Rupperecht JK, Hui YH, McLaughlin JL (1990) Annonaceous acetogenins: a review. *Journal Natural Products* 53:237-78
- Seffrin RC, Shikano I, Akhtar Y, Isman MB (2010) Effects of crude seed extracts of *Annona atemoya* and *Annona squamosa* L. against the cabbage looper, *Trichoplusia ni* in the laboratory and greenhouse. *Crop Protection* 29:20–24

- Shi G, Alfonso D, Fatope MO, Zeng L, Gu Z, Zhao G, He Z, MacDougal JM, McLaughlin JL (1995) Mucocin: A new annonaceous acetogenin bearing a tetrahydropyran ring. *Journal American Chemical Society* 117:10409-10410
- Shi G, Gu Z, He K, Wood KV, Zeng L, Ye Q, MacDougal JM, McLaughlin JL (1996 A) Applying Mosher's method to acetogenins bearing vicinal diols. The absolute configurations of muricatetrocin C and Rollidecins A and B, new bioactive acetogenins from *Rollinia mucosa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4:1281-1286
- Shi G, Koslowski JF, Schwedler JT, Wood KV, MacDougal JM, McLaughlin JL (1996 B) Muconin and mucoxin: additional nonclassical bioactive acetogenins from *Rollinia mucosa*. *Journal of Organic Chemistry* 61:7988-7989
- Shi G, MacDougal JM, McLaughlin JL (1997) Bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa*. *Phytochemistry* 45:719-723
- Sosa-Gómez DR, Delpin KE, Moscardi F, Nozaki MH (2003) The impact of fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson epizootics and on populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean. *Neotropical Entomology* 32:287-291
- Tormo JR, Gallardo T, González MC, Bermejo A, Cabedo N, Andreu I, Estornell E (1999) Annonaceous acetogenins as inhibitors of mitochondrial complex I. *Current Topics in Phytochemistry* 2:69-90
- Trindade RCP, Luna JS, Lima MRF, Silva PP, Sant'ana AEG (2011) Larvicidal activity and seasonal variation of *Annona muricata* (Annonaceae) extract on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Revista Colombiana de Entomologia* 37
- Viegas Júnior C (2003) Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova* 26:390-400

CAPITULO II

Efeitos tóxicos do extrato bruto de *Annona crassiflora* Mart. sobre a lagarta falsa-medideira *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae)

“Baseado no potencial já comprovado de outras anonáceas, e dos bons resultados para *A. crassiflora*, conclui-se que esta espécie de anona apresenta grande potencial para o controle de *C. includens*, em todos os instares avaliados, com destaque para a ação por contato”



Agradecimentos:

Ao Dr. Guilherme
L. Sasssaki;

À Equipe de
criação de
lepidópteros do
Laboratório de
Entomologia da
UNEMAT/CUTS;

Artigo escrito
segundo as
normas do
periódico
**Journal of
Biopesticides**



<http://www.jbiopest.com/users/LW8/index.php>



Efeitos tóxicos do extrato bruto de *Annona crassiflora* Mart. sobre a lagarta falsa-medideira *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae)

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do extrato de sementes de *Annona crassiflora* sobre a lagarta falsa medideira, *Chrysodeixis includens* em diferentes fases de desenvolvimento em condições de laboratório. O extrato foi testado nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0% por dois métodos de aplicação, ingestão da folha tratada e contato direto com o extrato, e em diferentes fases do desenvolvimento, ovo, 1º, 3º e 5º instar. O extrato apresentou atividade ovicida em todas as concentrações avaliadas. Para lagartas em todos os instares o método por contato apresentou mortalidade satisfatória. A exposição de folhas tratadas com extrato para ingestão, não foi eficiente após 120 horas para nenhum dos instares avaliados, sendo que a maior mortalidade registrada foi de 60,0% para lagartas de 1º instar na maior concentração. No entanto, outros efeitos foram observados nas lagartas tratadas por ingestão. Lagartas de 1º e 3º instar tiveram um aumento na mortalidade ao longo do desenvolvimento, reduzindo o número de lagartas que completaram o ciclo. Para lagartas de 1º instar, 93,3% morreram na concentração de 4,0% até o final da fase larval, e para lagartas de 3º instar a mortalidade atingiu os 86,0% para a maior concentração. A mortalidade no tratamento com lagartas de 5º instar, mesmo até o final do ciclo, não ultrapassou 60,0%, contudo, verificou-se que as lagartas tiveram um prolongamento do quinto instar e uma alta ocorrência de pupas deformadas das quais não emergiram adultos, chegando a 70% na concentração de 8,0%. Conclui-se que o extrato de *A. crassiflora* apresenta grande potencial para o controle de *C. includens*, porém mais estudos são necessários para comprovar estes resultados em condições de semi-campo e campo, bem como estudos bioquímicos de identificação e isolamento das moléculas bioativas.

PALAVRAS-CHAVE: Annonaceae, Bioinseticidas, Fitoinseticida, Desfolhadora.

Toxic effects of crude extract of *Annona crassiflora* Mart. on the Soybean Looper *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae)

ABSTRACT: This study evaluated the effects of seed extract of *Annona crassiflora* on the soybean looper at different stages of development in laboratory conditions. The extract was tested at concentrations of 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 and 8.0 % by means of two methods of application, ingestion of treated leaf and direct contact with the extract, and at different stages of development, egg, 1st, 3rd and 5th instar. The extract showed ovicidal activity at all concentrations tested, however the solubilizer may have contributed towards this result. The treatments by topical application were highly toxic to all instars. Ingestion of treated leaves showed no efficiency after 120 hours for any instar evaluated, and the highest mortality recorded was 60.0% for first instar at the 8% concentration . However, other effects were observed in caterpillars that ingested the extract. First and 3rd instar larvae had an increased mortality during development, reducing the number of larvae that completed the cycle. For 1st instar soybean looper, 93.3% died in the concentration of 4.0% by the end of the larval stage, and in 3rd instar larval mortality reached 86.0% at the highest concentration. Mortality of 5th instar larvae did not exceed 60.0% at the end of the larval stage, however it was observed that larvae had an extension of the fifth instar and a high incidence of deformed pupae and emerging adults, causing 70% mortality at the concentration of 8.0%. Thus, it is concluded that *A. crassiflora* extract has great potential for pest control, especially for small and medium producers of the “Cerrado” region that can get the fruit in native areas and can grow plants on their properties to obtain the crude extract.

KEY-WORDS: Annonaceae, Bioinsecticides, Phytoinsecticide, Defoliator.

1. INTRODUÇÃO

Conhecida popularmente como lagarta falsa medideira, *Chrysodeixis* (= *Pseudoplusia*) *inclusens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), já foi registrada atacando aproximadamente 70 espécies vegetais entre elas soja, algodão, feijão, girassol, fumo, maracujá, tomate e diversas hortaliças (Moscardi et al., 2012).

No Brasil, nos principais estados produtores de soja, *C. inclusens* era considerada uma praga secundária, sendo controlada naturalmente por parasitoides e fungos entomopatogênicos (Sosa-Gomez et al. 2003). No entanto desde 2003, após o surgimento da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi* Sidow), *C. inclusens* vem se destacando como praga primária em diversos estados como Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Bahia (Bueno et al., 2009; Moscardi et al. 2012).

Este aumento no nível populacional de *C. inclusens* ocorreu em virtude do aumento no uso de fungicidas para o controle do fungo da ferrugem asiática, que conseqüentemente, diminuiu as populações de fungos entomopatogênicos, os quais controlavam naturalmente *C. inclusens*, como o fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow), acarretando assim, o aumento das populações de *C. inclusens* nos diversos estados produtores da soja (Sosa-Gomez et al., 2003, 2006).

Na maioria dos casos o controle desta lagarta é realizado com inseticidas químicos, porém, este método muitas vezes não é eficiente devido ao hábito desta praga de permanecer na face abaxial das folhas, não entrando em contato direto com o inseticida (Oliveira, 2010). Por este motivo muitas vezes as doses de produtos são aumentadas drasticamente, diminuindo as populações de inimigos naturais e favorecendo o aparecimento de populações resistentes (Bueno et al., 2007). Mediante essa problemática o controle de pragas deve optar pela utilização de técnicas e estratégias de controle baseadas na filosofia de manejo integrado de pragas (MIP), as quais são menos prejudiciais aos inimigos naturais e ao homem.

Entre as diversas técnicas consideradas para o MIP, a utilização de plantas com efeito tóxico para insetos fitófagos, destaca-se por apresentar diversas vantagens em relação aos produtos sintéticos, como rápida degradação no meio ambiente, baixa toxicidade à mamíferos, menor custo e alguns apresentam seletividade à inimigos naturais (Moreira et al., 2006).

Devido aos resultados promissores com extratos vegetais para o controle de insetos pragas, diversas famílias de plantas têm se destacado como, por exemplo, Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Annonaceae, Piperaceae e Canellaceae, entre outras (Jacobson, 1989; Isman, 2006).

Entre as famílias com potencial inseticida, as anonáceas destacam-se por possuírem em sua composição moléculas conhecidas como “acetogeninas de anonáceas”, que apresentam atividade inseticida comprovada e podem ser uma alternativa no combate a lepidópteros desfolhadores (Alali et al., 1999; Ribeiro et al., 2013; Costa et al., 2013).

O efeito das Annonaceae foi verificado para diversas espécies de lepidópteros pragas como *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae) (Leatemia e Isman, 2004; Seffrin et al., 2010), *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) (Saito et al., 2004; Álvarez-Colom et al., 2007; Blessing et al., 2010), *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelichiidae) (Silva et al., 2007), *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (Fontana et al., 1998; Saito et al., 2004), *Pseudaletia sequax* Franclemont (Lepidoptera: Noctuidae) (Fontana et al., 1998); *Plutella xylostela* Linnaeus (Lepidoptera: Plutellidae) (Laetamia e Isman, 2004; Dadang e Prijono, 2009; Trindade et al., 2011).

Apesar dos vários estudos com anonáceas, poucos foram realizadas até o momento com *Annona crassiflora* Mart., principalmente sobre lepidópteros praga. Desse modo, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do extrato de sementes de *A. crassiflora* sobre *C. includens* em diferentes fases de seu desenvolvimento em condições de laboratório.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos extratos

O material vegetal foi coletado em áreas de Cerrado do município de Tangará da Serra – MT foi identificado e sua exsicata encontra-se depositada no Herbário da Universidade do Estado de Mato Grosso campus de Tangará da Serra (UNEMAT/CUTS).

As sementes foram secas em estufa de circulação de ar a 40°C por 72 horas e após este período, foram trituradas em moinho tipo faca. O pó obtido foi levado ao laboratório

de Bioquímica de Carboidratos da Universidade Federal do Paraná, onde foi submetido à deslipidificação por três dias com solvente orgânico clorofórmio-metanol (2:1) utilizando aparelho extrator *Soxhlet* em manta aquecida a 60°C até a exaustão.

O material extraído foi rotaevaporado a 40° C para remoção dos solventes, obtendo-se então o extrato bruto. A partir deste extrato, foram feitas as diluições para as concentrações utilizadas nos experimentos.

2.2. Criação Estoque de *Chrysodeixis includens*

Ovos e lagartas de *C. includens* utilizadas nos experimentos foram obtidos da criação estoque do Laboratório de Entomologia da UNEMAT/CUTS. A criação estoque foi mantida em sala climatizada a 25±3°C e umidade relativa (UR) de 70±10%. Os adultos eram acondicionados em gaiolas de PVC de (100mm x 200mm) revestidas internamente com papel sulfite e a extremidade superior é fechada com tecido tipo *voil* preso por um elástico e a outra extremidade inferior por uma placa de Petri forrada com papel filtro e um recipiente contendo alimento (solução de mel a 10%) e água.

Os ovos obtidos foram destinados aos bioensaios e à manutenção da criação. Para manutenção da criação, o substrato contendo ovos (papel sulfite ou *voil* da gaiola) foi recortado em tiras e estas colocadas na tampa de potes plásticos de 145 mL contendo dieta artificial de Greene *et al.* (1976).

As lagartas que eclodiam permaneciam neste recipiente até atingirem o terceiro instar, quando então eram transferidas para copinhos de 50 mL com tampa de acetato contendo a mesma dieta, onde continuavam até atingirem o estágio de pupa. As pupas eram então transferidas para gaiolas de PVC onde permaneciam até o final do ciclo.

2.3. Experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Entomologia da UNEMAT/CUTS em câmaras climatizadas do tipo BOD a 25±1°C e UR 70±10%, com fotoperíodo de 12 horas em delineamento inteiramente casualizado.

O extrato de *A. crassiflora* foi testado nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0%. Para atingir as concentrações, o extrato foi diluído no solubilizante polissorbato 80

(Tween 80[®]) a 10% e água, e agitado por 5 minutos em agitador magnético. Por isso dois tratamentos controle foram incluídos, um com água e outro com água+solubilizante. Para cada tratamento foram feitas 15 repetições, com uma lagarta por repetição. No ensaio ovicida foram realizadas 10 repetições contendo 10 ovos em cada repetição.

2.3.1. Efeito sobre ovos

Tiras de *voil* contendo os ovos provenientes das gaiolas da criação estoque, foram recortadas de modo que cada tira contivesse 10 ovos de 24 horas, e cada uma destas foi considerada uma repetição, totalizando 10 repetições por tratamento.

As tiras foram mergulhadas nas concentrações de cada tratamento por três segundos e colocadas sobre a bancada para evaporação do excesso de líquido por aproximadamente 30 minutos. Após secas cada tira foi acondicionada em tubo de ensaio de vidro, com tampa de algodão, e mantidas em condições controladas já mencionadas e avaliadas quanto à viabilidade dos ovos no quarto dia após a aplicação.

2.3.2. Efeito por contato

Para este experimento, ovos de 24 horas foram retirados da criação estoque e colocados nas condições controladas já mencionadas. Para o ensaio com lagartas de 1^o instar, após 24 horas da eclosão estas foram submetidas aos tratamentos, para os demais tratamentos as lagartas foram alimentadas até atingirem o 3^o e 5^o instar.

As lagartas foram mantidas em potes plásticos de 145 mL com fundo de papel filtro e alimentadas com folhas de soja (*var.* convencional Tucunaré) obtidas de cultivo em casa de vegetação. Depois de colhidas as folhas eram lavadas em água corrente e colocadas no pote contendo a lagarta, com o pecíolo enrolado em algodão úmido para manter a turgidez da folha.

Para avaliar o efeito do extrato por contato, uma microgota (1 µL para lagartas de 1^o e 3^o instar e 2 µL para lagarta de 5^o instar) foi colocada sobre o dorso de cada lagarta com auxílio de uma micropipeta e para as lagartas de 1^o instar com uso de estereomicroscópio. Após a aplicação as lagartas foram mantidas em condições controladas e avaliadas diariamente por cinco dias quanto à mortalidade.

2.3.3. Efeito por ingestão

Para avaliar o efeito do extrato por ingestão, o extrato foi aplicado na superfície adaxial da folha de soja e deixada sobre a bancada para evaporação do excesso da solução por aproximadamente 30 minutos. Após este período a folha era oferecida à lagarta por 24 horas quando era realizada a primeira avaliação e a folha trocada por uma nova sem tratamento.

Após a aplicação, as lagartas eram mantidas em condições de temperatura e umidade já citadas e avaliadas diariamente por cinco dias quanto à mortalidade. Como a taxa de mortalidade foi baixa mesmo após cinco dias de avaliação, optou-se por avaliar o efeito do extrato até o final do ciclo, avaliando-se diariamente quanto à mudança de instar, de deformidades e mortalidade.

2.4. Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. Após constatar que os resultados não atendiam aos pressupostos de normalidade, estes foram analisados utilizando o teste de *Kruskal-Wallis* a 5%. Para estas análises foi utilizado o *software* Statistica 7.0.

3. RESULTADOS

3.1. Efeito sobre os ovos

Não houve eclosão de lagartas em nenhuma das concentrações testadas, as quais diferiram estatisticamente do controle com água (Tabela 1). O tratamento controle com solubilizante quando comparado com a testemunha com água, apresentou uma redução de 20% na eclosão das lagartas, indicando uma participação do solubilizante na atuação do extrato. No entanto, a ausência de eclosão larval em todas as concentrações do extrato demonstra a atividade ovicida de *A. crassiflora* ainda que com uma pequena participação do solubilizante.

Tabela 1 – Porcentagem (\pm DP) de lagartas de *Chrysodeixis includens* eclodidas no quarto dia após aplicação de diferentes concentrações do extrato de *Annona crassiflora*

Tratamentos	% Lagartas eclodidas
Água	90,0 \pm 1,0 a ¹
Água + Solubilizante	70,0 \pm 8,0 ab
0,5%	0,0 \pm 0,0 b
1,0%	0,0 \pm 0,0 b
2,0%	0,0 \pm 0,0 b
4,0%	0,0 \pm 0,0 b
8,0%	0,0 \pm 0,0 b
H	58,0

¹Valores seguidos pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de *Kruskal-Wallis* a 5%.

3.2. Efeito por Contato

O extrato bruto de *A. crassiflora* pela aplicação por contato apresentou atividade inseticida para lagartas de *C. includens* de 1º instar (Figura 1). Na primeira avaliação, após 24 horas da aplicação, o extrato apresentou mortalidade de 80% na maior concentração e após 120 horas da aplicação, a mortalidade neste tratamento chegou a 86%, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Figura 1). Nas demais concentrações não houve diferença estatística (Figura 1).

Em lagartas de terceiro instar, o extrato apresentou mortalidade superior a 50% nas primeiras 24 horas após a aplicação na maior concentração, entretanto não houve diferença estatística dos demais tratamentos (Figura 2). Apenas após 48 horas após a aplicação a maior concentração diferiu dos demais tratamentos atingindo 66% de mortalidade. Transcorridas 96 horas, a mortalidade nas concentrações de 4,0 e 8,0% igualaram-se e diferiram estatisticamente das demais concentrações, permanecendo assim até a última avaliação (Figura 2).

Para lagartas de 5º instar, apenas após 72 horas após a aplicação o extrato apresentou mortalidade na maior concentração diferindo das demais concentrações (Figura 3). A maior mortalidade registrada para este experimento foi de 93,3% para a concentração de 8,0% após 120 horas da aplicação. Nesse bioensaio houve um aumento da mortalidade após 72 horas quando as lagartas iniciaram a fase de pré-pupa, não atingindo o estágio de pupa (Figura 4).

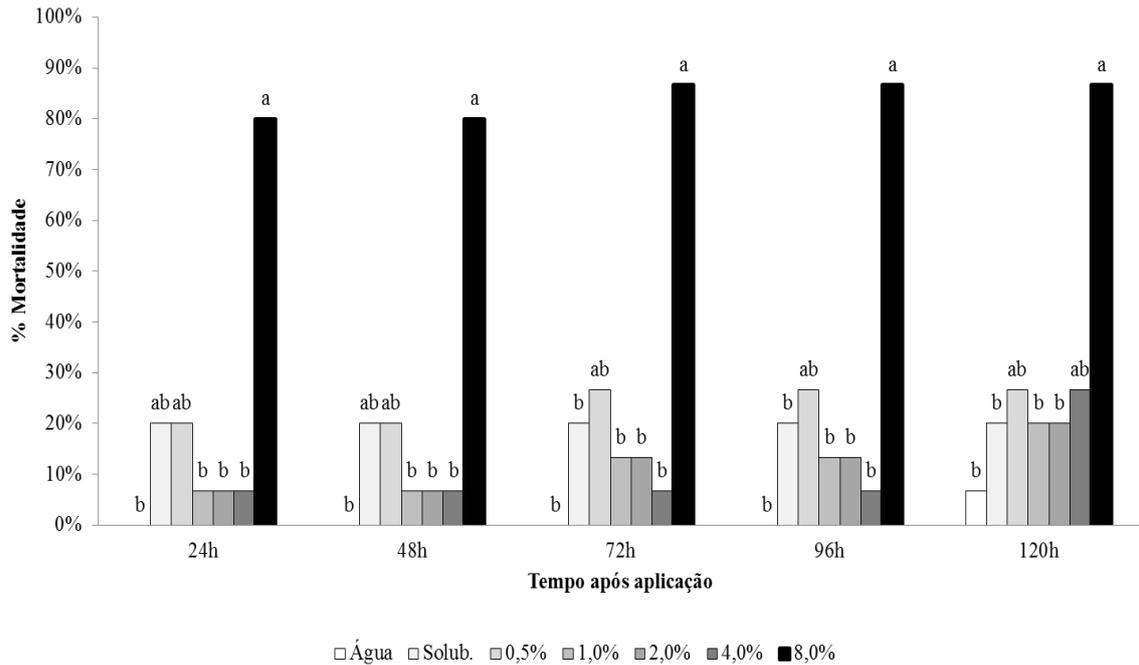


Figura 1 - Porcentagem de mortalidade de lagartas de 1º instar de *Chrysodeixis includens*, após aplicação por contato do extrato bruto de *Annona crassiflora* em diferentes concentrações.

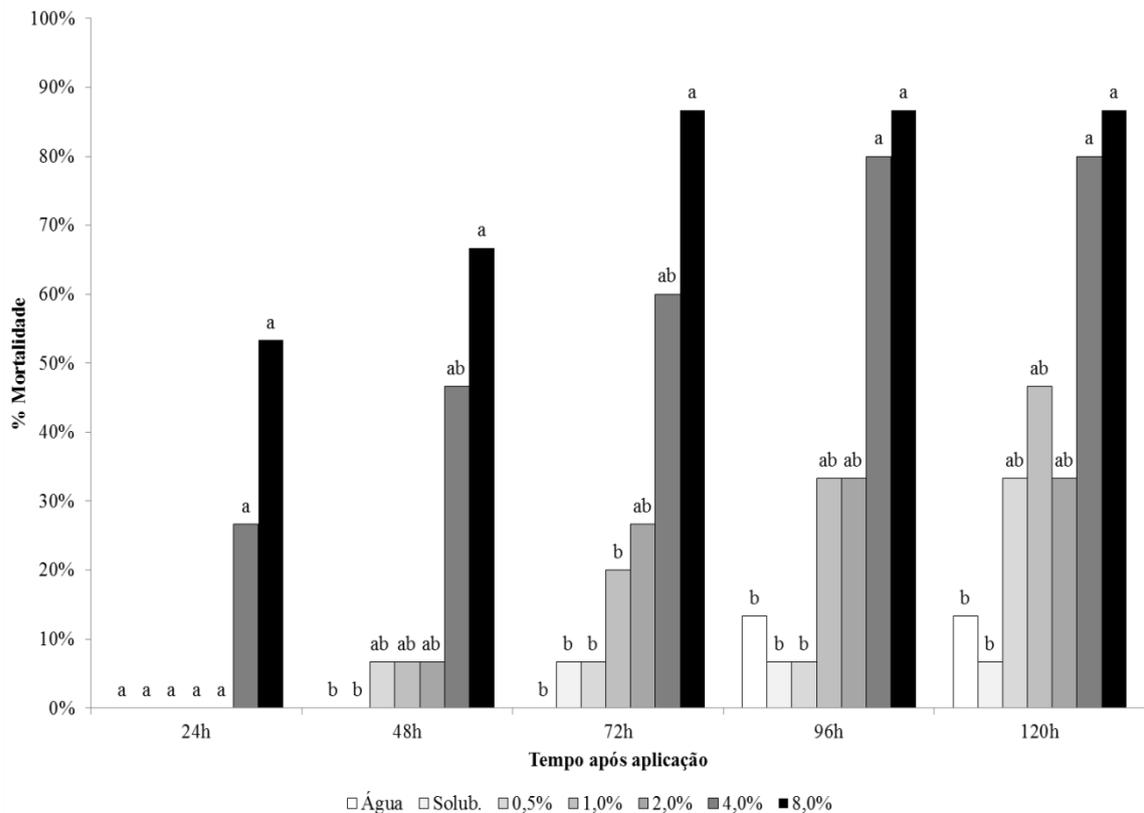


Figura 2 - Porcentagem de mortalidade de lagartas de 3º instar de *Chrysodeixis includens*, após aplicação por contato do extrato bruto de *Annona crassiflora* em diferentes concentrações.

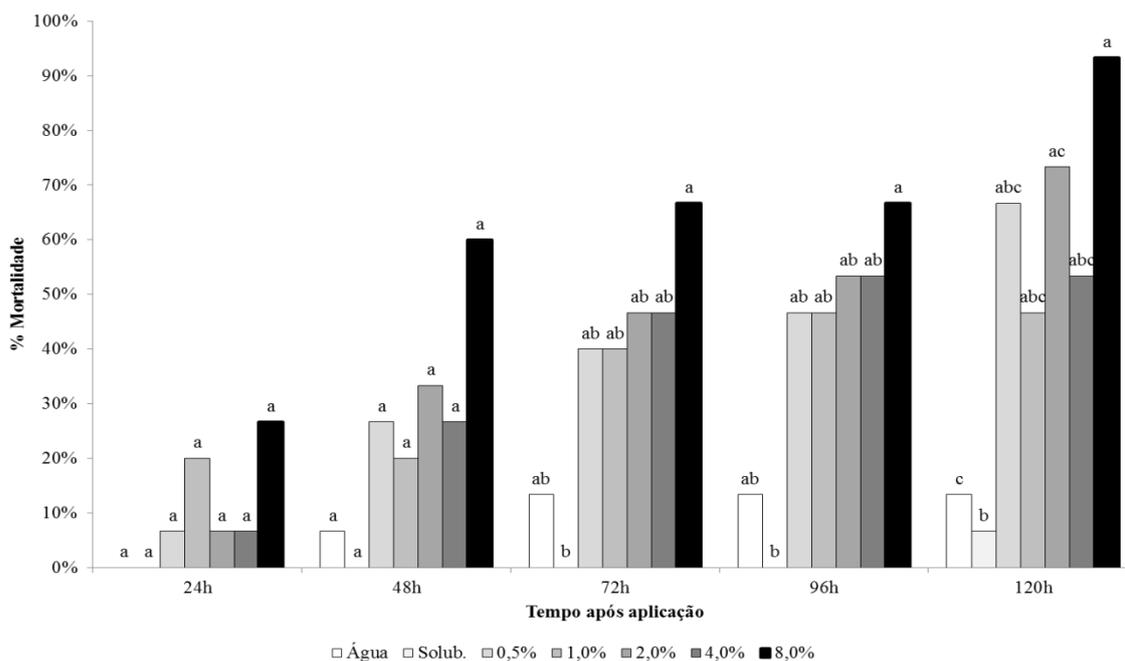


Figura 3 - Porcentagem de mortalidade de lagartas de 5º instar de *Chrysodeixis includens*, após aplicação por contato do extrato bruto de *Annona crassiflora* em diferentes concentrações.



Figura 4 – Lagartas de *Chrysodeixis includens* mortas em pré-pupa após 72 horas da aplicação por contato do extrato bruto de *Annona crassiflora*.

3.3. Efeito por ingestão

A ingestão de folhas tratadas com extrato de *A. crassiflora* por *C. includens* foi pouco tóxica após 120 horas para os três instares avaliados (Tabelas 2, 3 e 4). Diante deste resultado, optou-se por avaliar o desenvolvimento e mortalidade das lagartas até o final do ciclo, considerando a duração do período larval e a formação de pupas.

Nos tratamentos com lagartas de 1º e 3º instares houve um aumento na mortalidade, reduzindo o número de lagartas que completaram o desenvolvimento (Tabela 2 e 3). Para lagartas de 1º instar, 93,3% morreram na concentração de 4,0% até o final da fase larval (Tabela 2).

Para lagartas de 3º instar a mortalidade atingiu 86,0% para a maior concentração (Tabela 3) e no 5º instar, mesmo até o final do ciclo, não ultrapassou 60,0% (Tabela 4).

Quanto à duração total do período larval, para lagartas de 1º e 3º instar, em ambos os experimentos, não houve diferença estatística no tempo de desenvolvimento do período larval (Tabelas 2 e 3). Em lagartas de 5º instar, considerou-se apenas a duração do instar em questão, e verificou-se que lagartas dos tratamentos tiveram um prolongamento do instar, diferindo estatisticamente nas concentrações de 1,0 e 4,0% (Tabela 4).

Com relação à formação de pupas, apenas em lagartas de 5º instar se observou pupas deformadas das quais não emergiram adultos, variando de 20 a 70%, nas concentrações de 1,0 à 8,0%, valores estes, não significativos se comparados com os controles (Tabela 4).

Tabela 2 - Porcentagem (\pm DP) de mortalidade de lagartas de *Chrysodeixis includens* de 1º instar após 120 horas da ingestão de folhas tratadas com extrato de *Annona crassiflora*, porcentagem (\pm DP) de mortalidade durante todo o período larval, duração do período larval (dias)

Tratamentos	% Mortalidade 120 HAA ^{n.s.}	% Mortalidade larval	Duração período larval ^{n.s.}
Água	6,6 \pm 2,6	13,0 \pm 3,5 b ¹	16,5
Solubilizante	0,0 \pm 0,0	13,0 \pm 3,5 b	16,1
0,5%	6,6 \pm 2,6	66,0 \pm 4,8 ab	17,3
1,0%	33,3 \pm 4,9	66,0 \pm 4,8 ab	16,8
2,0%	20,0 \pm 4,1	73,0 \pm 4,5 ab	17,0
4,0%	46,6 \pm 5,1	93,0 \pm 2,5 a	18,0
8,0%	60,0 \pm 5,0	73,0 \pm 4,5 ab	16,5
H	24,6	35,51	7,01

^{n.s.} Não significativo pela análise de variância a 5%. ¹Médias seguidas pela mesma letra na colunas não diferem entre si ($p > 0,05$) segundo o Teste *Kruskal-Wallis* a 5%.

Tabela 3 - Porcentagem (\pm DP) de mortalidade de lagartas de *Chrysodeixis includens* de 3^o instar após 120 horas da ingestão de folhas tratadas com extrato de *Annona crassiflora*, porcentagem (\pm DP) de mortalidade durante todo o período larval, duração do período larval (dias)

Tratamentos	% Mortalidade 120 HAA ^{n.s.}	Mortalidade larval	Duração período larval ^{n.s.}
Água	6,6 \pm 2,6	13,0 \pm 3,5 c ¹	18,9
Solubilizante	6,6 \pm 2,6	20,0 \pm 4,1 bc	19,3
0,5%	20,0 \pm 4,1	66,0 \pm 4,8 abc	19,4
1,0%	13,3 \pm 3,5	80,0 \pm 4,1 ab	18,0
2,0%	26,6 \pm 4,6	86,0 \pm 3,5 a	18,5
4,0%	6,6 \pm 2,6	46,0 \pm 5,1 abc	18,6
8,0%	33,3 \pm 4,9	86,0 \pm 3,5 a	20,0
H	7,64	34,97	8,98

^{n.s.}Não significativo pela análise de variância a 5%. ¹Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na colunas diferem entre si ($p > 0,05$) segundo o Teste *Kruskal-Wallis* a 5%.

Tabela 4 - Porcentagem (\pm DP) de mortalidade de lagartas de *Chrysodeixis includens* de 5^o instar após 120 horas da ingestão de folhas tratadas com extrato de *Annona crassiflora*, porcentagem (\pm DP) de mortalidade larval total, duração do 5^o instar (dias)

Tratamentos	% Mortalidade 120 HAA ^{n.s.}	% Mortalidade larval ^{n.s.}	Duração 5 ^o instar
Água	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	5,0 b ¹
Solubilizante	6,6 \pm 2,6	6,6 \pm 2,6	5,4 b
0,5%	0,0 \pm 0,0	26,0 \pm 4,6	5,9 b
1,0%	13,3 \pm 3,5	26,0 \pm 4,6	7,0 a
2,0%	33,3 \pm 4,9	33,0 \pm 4,9	6,1 b
4,0%	20,0 \pm 4,1	60,0 \pm 5,0	7,5 a
8,0%	26,6 \pm 4,6	33,0 \pm 4,9	6,0 b
H	12,32	17,55	36,72

^{n.s.}Não significativo pela análise de variância a 5%. ¹Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na colunas diferem entre si ($p > 0,05$) segundo o Teste *Kruskal-Wallis* a 5%.

4. DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que *A. crassiflora* apresenta atividade inseticida através do contato com a praga em todas as fases do desenvolvimento avaliadas, enquanto que por ingestão o extrato apresentou efeitos subletais, comprovando que, assim como

outras espécies de anonas, *A. crassiflora* é uma espécie promissora para o controle de insetos pragas.

Com relação ao potencial ovicida, apesar do solubilizante ter afetado a viabilidade dos ovos, nos tratamentos com o extrato em diferentes concentrações a eclosão de lagartas foi totalmente inviabilizada. Até o momento não há estudos sobre o efeito ovicida de anonáceas sobre ovos de lepidópteros. Mas vários autores relataram o potencial ovicida de outras espécies vegetais como *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (Apocynaceae) e *Melia azedarach* L. (Meliaceae) sobre ovos de *P. xylostella*, onde a inibição de eclosão foi de 46,7 e 37,9% respectivamente (Torres et al., 2006).

A inviabilização dos ovos pode estar relacionada à textura do córion do ovo de *C. includens* que assim como os ovos de *P. xylostella*, apresentam textura rugosa que favorece a fixação dos extratos vegetais mantendo-os aderidos à superfície do ovo inviabilizando-o.

O efeito tóxico de *A. crassiflora* sobre as lagartas de *C. includens* apresentou um resultado rápido pelo método de contato, enquanto que, pelo método de ingestão a toxicidade ocorreu de forma mais lenta.

No experimento por contato houve o efeito inseticida logo nas primeiras 24 horas após aplicação na maior concentração. Enquanto que por ingestão, observou-se uma alta mortalidade ao longo do ciclo, não oferecendo uma resposta imediata, mas impedindo o desenvolvimento de uma nova geração.

Por ingestão, Prates et al. (2000) obtiveram resultados semelhantes quando ofereceram extrato etanólico de sementes de *A. crassiflora* na concentração de 10,000 µg mL⁻¹ em dieta artificial para *S. frugiperda*. O extrato apresentou uma mortalidade de 56,7%; as lagartas que não morreram continuaram sendo avaliadas e as que haviam ingerido extrato tiveram um efeito negativo no desenvolvimento.

Apesar de neste trabalho as características avaliadas não terem sido as mesmas de Prates et al. (2000), foi possível constatar que *A. crassiflora* interfere no desenvolvimento larval de *C. includens*.

Leatemia e Isman (2004), ao avaliarem o efeito do extrato bruto de sementes de *A. squamosa* sobre *P. xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) por ingestão, verificaram uma alta mortalidade da lagarta, após 12 dias de alimentação com discos de folhas tratados com o extrato, reforçando mais uma vez o potencial das Annonaceas.

As anonáceas possuem em sua composição acetogeninas que apresentam um potencial tóxico estomacal, sendo eficazes para o controle de insetos mastigadores como os lepidópteros (Isman, 2006). Baseando-se nesse potencial tóxico, patentes já foram registradas sobre as acetogeninas de anonáceas, para o controle de insetos mastigadores e sugadores (Mikolajczak et al., 1988).

Diversos autores registraram o potencial inseticida para outras espécies de anonas sobre diversas espécies de insetos (Seffrin et al., 2010; Trindade et al., 2011; Ribeiro et al., 2013; Costa et al., 2013), comprovando que as acetogeninas de anonáceas isoladas interferem no desenvolvimento de lepidópteros e possuem um alto potencial inseticida (Alali et al., 1999; Morales et al., 2004; Castilho-Sanches et al., 2010).

As acetogeninas presentes nas anonáceas são fortes inibidores da produção de ATP do complexo mitocondrial I (NADH ubiquinona oxidoreductase) em insetos, e esta redução na produção de energia leva as células à apoptose (morte celular programada) (Lewis et al., 1993; Ahammadsahib et al., 1993; Tormo et al., 1999). Além disso, as acetogeninas apresentam características de compostos que interferem na atividade hormonal de lepidópteros, conforme observado pelas alterações morfológicas nas lagartas e pupas de *S. frugiperda* por Blessing et al., (2010) e Prates et al. (2000), as quais são típicas de compostos que interferem na atividade hormonal de lepidópteros, e que também foram observadas no presente estudo em *C. includens*.

Com relação à duração do período larval avaliado nos experimentos via ingestão, para lagartas de 1º e 3º instar, não foi verificado aumento no período larval. Já no bioensaio com lagartas de 5º instar, verificou-se a prorrogação na duração do instar. A média no 5º instar é de cinco dias, comprovada pelo tratamento controle, e nos tratamentos de 1,0 e 4,0% que apresentaram uma menor mortalidade, houve um aumento na duração do instar para sete dias.

Acetogeninas de *A. cherimolia* (itrabin, almunequin, asimicin e cherimolin 2) foram testadas por ingestão em *S. frugiperda*, e apresentaram um aumento na duração do período larval, algumas chegando a 50% a mais na duração do período (Álvarez Colon et al. 2007). Outras acetogeninas como densicomacin, gitantetronecin, murihexocin-B, tucupentol obtidas de *A. montana* também apresentaram um aumento na duração da fase larval de *S. frugiperda* chegando a aumentar em 100% a duração desse estágio (Blessing et al, 2010).

Castilho-Sanches et al. (2010) destacam que os metabólitos secundários de anonáceas são promissores para o controle de diversos insetos pragas, tendo variações nas concentrações usadas para cada tipo de inseto. Além disso, mencionam a necessidade da realização de experimentos em semi campo e campo para comprovar os resultados obtidos em laboratório, bem como pesquisas voltadas para o efeito destes metabólitos sobre os inimigos naturais das pragas.

Baseado no potencial já comprovado de outras anonáceas, e dos bons resultados para *A. crassiflora* no estudo de Prates et al. (2000) e no presente trabalho, conclui-se que esta espécie de anona apresenta grande potencial para o controle de *C. includens*, em todos os instares avaliados, com destaque para a ação por contato, que apresentou resposta mais rápida em relação ao método por ingestão, que também foi eficiente ao longo do tempo, impedindo uma próxima geração da praga.

Apesar dos bons resultados obtidos no presente trabalho, mais estudos devem ser realizados para desenvolver técnicas e modos de cultivo de *A. crassiflora*, para que seja possível o uso desta planta pela indústria alimentícia e seus resíduos possam ser empregados em mais estudos e até mesmo em produtos secundários, como os fitoinseticidas.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao professor Dr. Guilherme L. Sasaki do Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, por ter auxiliado na obtenção do extrato. Agradecemos também a equipe de criação de lepidópteros do Laboratório de Entomologia da UNEMAT/CUTS, pelo auxílio na criação da lagarta e à CAPES pela bolsa de pós-graduação concedida.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahammadsahib, K.I., Hollingworth, R.M., McGovren, J.P., Hui, Y.H. e McLaughlin, J.L. 1993. Mode of action of bullatacin: A potent antitumor and pesticidal Annonaceous Acetogenin. *Life Sciences*, 53:1113-1120.
- Alali, F.Q., Xi Liu, X. e McLaughlin, J.L. 1999. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. *Journal of Natural Products*, 62:504-540.

- Álvarez-Colom, O., Neske, A., Popich, S. e Bardón, A. 2007. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Pest Science*, 80:63–67.
- Blessing, L.T., Colom, O.A., Popich, S., Neske, A. e Bardon, A. 2010. Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Pest Science*, 83:307-310.
- Bueno, R.C.O.F., Parra, J.R.P., Bueno, A.F., Moscardi, F., Oliveira, J.R.G. e Camillo, M.F. 2007. Sem barreira. *Revista Cultivar*, 93:12-15.
- Bueno, R.C.O.F., Parra, J.R.P., Bueno, A.F. e Haddad, M.L. 2009. Desempenho de Trichogramatídeos como potenciais agentes de controle de *Pseudoplusia includens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical Entomology*, 38:389-394.
- Castillo-Sánchez, L.E., Jiménez-Osornio, J.J. e Delgado-Herrera, M.A. 2010. Secondary metabolites of the Annonaceae, Solanaceae and Meliaceae families used as biological control of insects. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12:445-462.
- Costa, M.S., Pereira, M.J.B., Oliveira, S.S., Souza, P.T., Dall’oglio, E.L. e Alves, T.C. 2013. Anonáceas provocam mortalidade em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera:Culicidae). *Revista Brasileira de Biociências*, 11:184-190.
- Dadang, F.E.D. e Prijono, D. 2009. Effectiveness of two botanical insecticide formulations to two major cabbage insect pests on field application. *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*, 15:42-51.
- Fontana, J., Lancas, F., Pasos, M., Cappelaro, E., Villegas, J., Baron, M., Nosedá, M., Pomilio, M., Vitale, A., Webber, A., Maul, A., Peres, W. e Foerster, L. 1998. Selective polarity- and adsorption- guided extraction/purification of *Annona* sp. polar acetogenins and biological assay against agricultural pests. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70:67-76.
- Greene, G.L., Leppla, N.C. e Dickerson, W.A. 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, 69:487-488.
- Isman, M.B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review Entomology*, 51:45–66.
- Jacobson, M. Botanical pesticides: past, present and future. In: Arnason, J.T.; Philogène, B.J.R.; Morand, P. 1989. *Insecticide of plant origin*. Washington, DC, American Chemical Society, 387:69-77.
- Leatemia, J.A. e Isman, M.B. 2004. Toxicity and antifeedant activity of crude seed extracts of *Annona squamosa* (Annonaceae) against lepidopteran pests and natural enemies. *International Journal of Tropical Insect Science*, 24:150-158.
- Lewis, M.A., Arnason, J.T., Philogene, J.R., Rupprecht, J.K. e McLaughlin, J.L. 1993. Inhibition of respiration at site I by asimicin, an insecticidal acetogenin of the paw paw, *Asimina triloba* (Annonaceae). *Pesticide Biochemistry Physiology*, 45:15-23.

- Mikolajczak, K.L., McLaughlin, J.L. e Rupprecht, J.K. 1988. Control of pests with Annonaceous acetogenins. *U.S. Patent* No. 4,721,727.
- Morales, C.A.; Gonzalez, R. e Aragon, R. 2004. Evaluacion de la actividad larvicida de extractos polares y no polares de acetogeninas de *Annona muricata* sobre larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Revista Colombiana de Entomologia*, 30:187-192.
- Moreira, M.D., Picanço, M.C., Silva, E.M., Moreno, S.C. e Martins, J.C. Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas in: Venzon, M., Júnior, T.J.P. e Pallini, A. 2006. *Controle alternativo de pragas e doenças*. cap.5,89pp.
- Moscardi, F., Bueno, A.F., Sosa-Gómez, D.R.; Roggia, S., Hoffmann-Campo, C.B., Pomari, A.F., Corso, I.C., Yano, S.A.C. 2012. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: Hoffmann-Campo, B.C., Corrêa-Ferreira, B.S. e Moscardi, F. *Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga*, Brasília, DF: Embrapa, 2012. 859p.
- Oliveira, J.R.G., Ferreira, M.C. e Román, R.A.A. 2010. Diferentes diâmetros de gotas e equipamentos para aplicação de inseticida no controle de *Pseudoplusia includens*. *Engenharia Agrícola*, 30:92-99.
- Prates H.T., Viana P.A., Pimenta L.P.S. e Boaventura M.A.D. Insecticide action of ethanolic extract from *Annona crassiflora* seeds against *Spodoptera frugiperda*. *Anais... XXI-International Congress of Entomology, Brazil, August 20-26, 2000* p. 1135.
- Ribeiro, L.P., Vendramim, J.D., Bicalho, K.U., Andrade, M.S., Fernandes. J.B., Moral, R.A. e Demétrio, C.G.B. 2013. *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): A promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 55:6-14.
- Saito, M.L., Pott, A., Ferraz, J.M.G. e Nascimento, R.S. 2004. Avaliação de plantas com atividade deterrente alimentar em *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) e *Anticarsia gemmatalis* Hubner. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 14:1-10.
- Seffrin, R.C., Shikano, I., Akhtar, Y. e Isman, M.B. 2010. Effects of crude seed extracts of *Annona atemoya* and *Annona squamosa* L. against the cabbage looper, *Trichoplusia ni* in the laboratory and greenhouse. *Crop Protection*, 29:20–24.
- Silva, A.P.T., Pereira, M.J.B. e Bento, L.F. 2007. Extrato metanólico da semente de araticum (*Annona coriacea*) (Mart.) sobre a mortalidade da traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*). *Revista Brasileira de Agroecologia*, 2:1150-1153.
- Sosa-Gómez, D.R., Delpin, K.E., Moscardi, F. e Nozaki, M.H. 2003. The impact of fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson epizootics and on populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean. *Neotropical Entomology*, 32:287-291.
- Sosa-Gomez, D.R. 2006 Seletividade de agroquímicos para fungos entomopatogênicos. Embrapa Soja, Londrina, PR. Disponível em:

http://www.cnpso.embrapa.br/download/artigos/seletiv_fung.pdf. Acesso em: 07 Out. 2013.

- Tormo, J.R., Gallardo, T., Aragón, R., Cortes, D. e Estornell, E. 1999. Specific interactions of monotetrahydrofuranic annonaceous acetogenins as inhibitors of mitochondrial complex I. *Chemico-Biological Interactions*, 122:171–183.
- Torres, A.L., Boiça, Jr. A.L., Manfré, C.A.M. e Barros, R. 2006. Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pyrifolium* no desenvolvimento e oviposição de *Plutella xylostella*. *Bragantia*, 65:447-457.
- Trindade R.C.P., Luna, J.S., Lima, M.R.F., Silva, P.P. e Sant'ana, A.E.G. 2011. Larvicidal activity and seasonal variation of *Annona muricata* (Annonaceae) extract on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Revista Colombiana de Entomologia*, 37.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

“As plantas inseticidas são ótimas fontes de substâncias bioativas, sendo viáveis para programas de manejo integrado de pragas, contribuindo para que o equilíbrio do meio seja alcançado, não deixam resíduos químicos, pois são moléculas existentes no meio, degradam rapidamente e apresentam baixa toxicidade ao homem.”



Agradecimentos:

...Deus;

...Minha família;

...Minhas
amigas/irmãs;

...Minha “família
científica”;

...A todos que
colaboraram meu
muito Obrigada !



COSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados aqui apresentados confirmam o potencial de *A. mucosa* e de *A. crassiflora* como fitoinseticidas para o controle de *Chrysodeixis includens*. Resultados estes que se tornam ainda mais importantes se considerarmos as vantagens que as plantas inseticidas oferecem ao meio ambiente e ao homem.

As plantas inseticidas são ótimas fontes de substâncias bioativas, sendo viáveis para programas de manejo integrado de pragas, possibilitando que o equilíbrio do meio seja alcançado, não deixam resíduos químicos, pois são moléculas existentes no meio, que degradam rapidamente e têm baixa toxicidade ao homem.

No primeiro capítulo, constatamos que *Annona mucosa* apresenta atividade inseticida sobre *C. includens* pelos dois métodos avaliados, apresentando características de mortalidade que indicam que o modo de ação das moléculas bioativas, pode estar relacionado aos hormônios da ecdise, que são do complexo de hormônios do crescimento. Já no capítulo dois, *A. crassiflora* não mostrou resultado imediato de mortalidade, principalmente pelo método de ingestão, mas sim ao longo do desenvolvimento do inseto, diminuindo a próxima geração da praga.

Os dois modos de aplicação são importantes aliados, pois *C. includens* tem o hábito de permanecer na face abaxial das folhas de soja e de outras culturas onde é praga. Então, no momento da aplicação, caso o produto não entre em contato diretamente com a lagarta, através da ingestão das folhas tratadas haverá a intoxicação e consequente redução nos danos causados, eliminando a ocorrência de uma nova geração da praga. Cabe mencionar ainda que os extratos apresentam atividade inseticida para todos os instares, de modo que, no momento da aplicação, todas as lagartas, independente da idade, estão susceptíveis à ação do extrato.

Apesar dos bons resultados aqui obtidos, é necessário que mais estudos sejam realizados, principalmente em semi campo e campo a fim de comprovar a eficácia dos extratos em condições naturais e estudos de seletividade aos inimigos naturais. Outrossim, no âmbito da bioquímica torna-se necessário que estas moléculas sejam isoladas e posteriormente sintetizadas para serem produzidas em larga escala, ou que mais estudos sejam realizados para cultivar *A. mucosa* e *A. crassiflora* de forma que estas sejam mais utilizadas na indústria alimentícia e seus resíduos sejam destinados à produção de fitoinseticidas.