

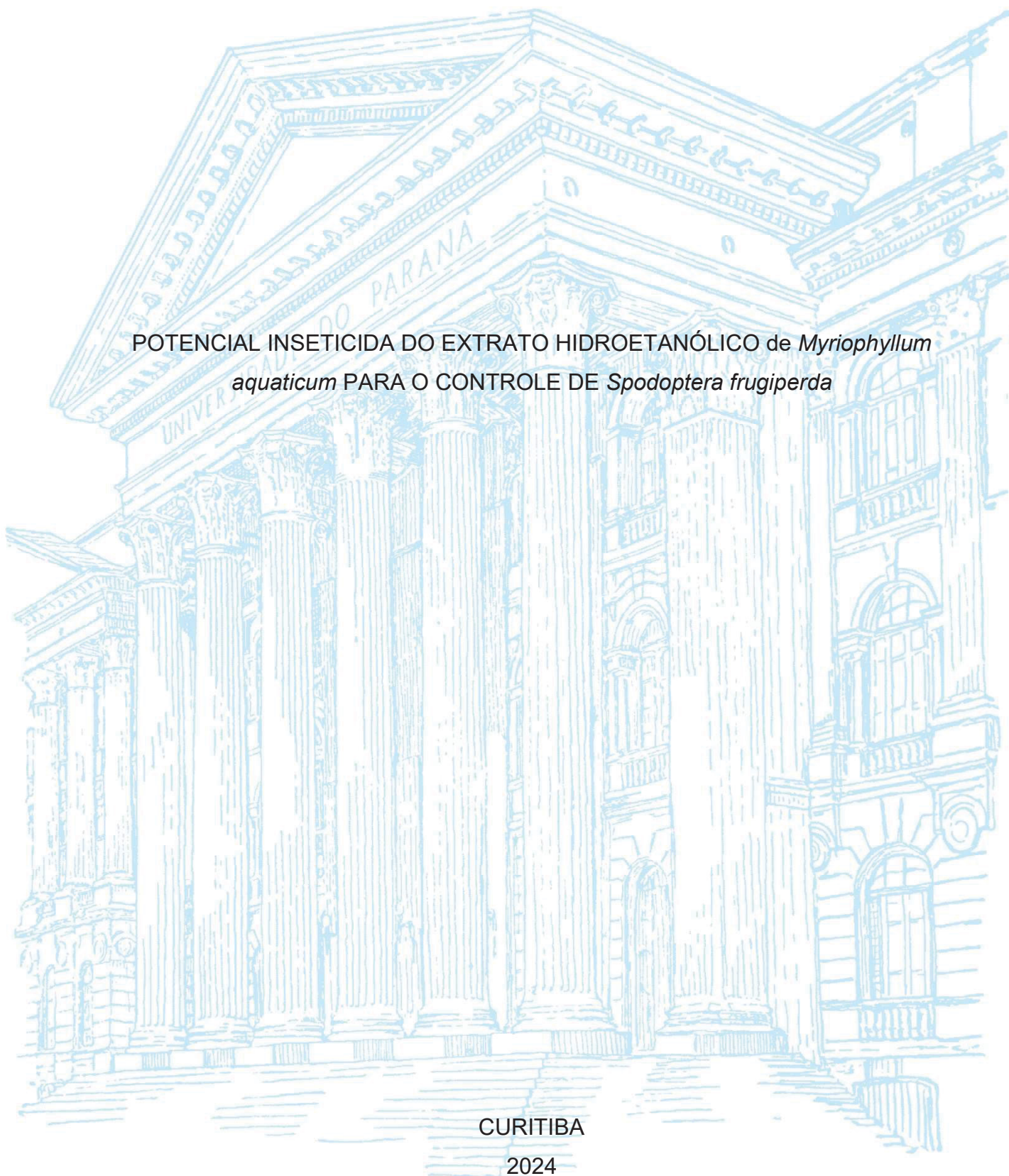
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAÍS DE SOUZA

POTENCIAL INSETICIDA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO de *Myriophyllum aquaticum* PARA O CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda*

CURITIBA

2024



THAÍS DE SOUZA

POTENCIAL INSETICIDA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO de *Myriophyllum aquaticum* PARA O CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda*

Trabalho de Conclusão apresentado ao curso de Pós-Graduação Lato Sensu em Fitossanidade, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Especialista em Fitossanidade.

Orientador: Dr. Rafael Shinji Akiyama Kitamura.

CURITIBA

2024

## RESUMO

A lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) é considerada uma das principais pragas que afetam a produção de milho no Brasil. Este trabalho teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a eficiência ovicida e larvicida do extrato aquoso de *Myriophyllum aquaticum* sobre a lagarta *S. frugiperda*. Macrófitas aquáticas da espécie *M. aquaticum* foram coletadas no reservatório do rio Verde, posteriormente limpas, secas e processadas para extração em dois diferentes líquidos extratores (aquoso e hidroetanólico 80% v/v). Após a extração, os extratos líquidos foram liofilizados e armazenados até o uso. Para determinar a atividade inseticida, quantificou-se o teor de compostos fenólicos totais, sendo selecionado o extrato com maior concentração desses compostos para o experimento. Em um bioensaio, foi utilizado um delineamento experimental inteiramente randômico, expondo as lagartas a sete concentrações do extrato de *M. aquaticum* (0 – testemunha, 1, 5, 10, 100, 500 e 1000 mg/L) para avaliar o potencial ovicida e larvicida, utilizando exposição tópica e de superfície (n= 5 por tratamento). O extrato hidroetanólico apresentou maior rendimento e teor de compostos fenólicos, quando comparados ao extrato aquoso. Apesar da presença de compostos fenólicos, não foi observada atividade ovicida ou larvicida em *S. frugiperda* após o período de exposição, independentemente do tipo de exposição (tópica ou de superfície). Desta forma, sugere-se a investigação de outras soluções extratoras em estudos futuros, considerando também a extração de plantas em diferentes estações do ano, uma vez que isso pode influenciar na composição fitoquímica e no potencial efetivo de extratos na atividade inseticida

**Palavras-chave:** bioinseticidas, pragas do milho, extratos vegetais

## ABSTRACT

The fall caterpillar (*Spodoptera frugiperda*) is considered one of the main pests directly impacting corn production in Brazil. The aim of this study was to in vitro assess the ovicidal and larvicidal efficacy of aqueous extract from *Myriophyllum aquaticum* on the *S. frugiperda* caterpillar. Aquatic macrophytes of the *M. aquaticum* species were collected from the rio Verde Reservoir, cleaned, dried, and processed for extraction using two different solvents (aqueous and hydroethanolic 80% v/v). After extraction, the liquid extracts were lyophilized and stored until use. To investigate potential insecticidal activity, the total phenolic compound content was quantified, and the extract with the highest phenolic content was selected for the experiment. In a bioassay, a completely randomized experimental design exposed caterpillars to seven concentrations of *M. aquaticum* extract (0 – control, 1, 5, 10, 100, 500, and 1000 mg/L) to test ovicidal and larvicidal potential, using both topical and surface exposure (n=5 per treatment). The hydroethanolic extract showed higher yield and phenolic compound content when compared to the aqueous extract. Despite the presence of phenolic compounds, no ovicidal or larvicidal activity was observed in *S. frugiperda* after the exposure period, regardless of the type of exposure (topical or surface). Thus, it is suggested to explore other extracting solutions in future studies, also considering the extraction of plants in different seasons, as this may influence the phytochemical composition and the effective potential of extracts in insecticidal activity.

**Keywords:** Bioinsecticides, corn pest, vegetal extracts.

## 1 INTRODUÇÃO

A lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) é considerada como uma das principais pragas que afetam diretamente na produção de milho no Brasil, causando elevados custos uma vez que é necessário realizar muitas aplicações de inseticidas ao longo do ciclo da cultura (LIBERA et al. 2022; NGEGBA et al. 2022; PHAMBALA et al. 2020; RIOBA et al. 2020). E, ainda, o uso de pesticidas químicos para o controle desses organismos tem afetado diretamente a saúde de diferentes organismos não-alvo, incluindo o ser humano, demandando pela busca por novas alternativas de controle (BREVÁULT; CLOUVEL, 2019; COSSOLIN et al. 2019).

Desta forma, o uso de soluções baseadas na natureza (SbN) tem contribuído com os setores agrícolas no desenvolvimento de técnicas sustentáveis de manejo, segurança alimentar e viabilidade econômica, controle de pragas agrícolas e redução dos impactos da contaminação química dos ambientes (ARNES-GARCÍA, SANTIVANEZ, 2021; BREVÁULT; CLOUVEL, 2019). As SbN são definidas, como: "Ações de proteção, gestão sustentável e restauração de ecossistemas naturais ou modificados que abordam os desafios sociais de forma eficaz e adaptativa, proporcionando simultaneamente benefícios ao bem-estar humano e à biodiversidade" (COHEN-SCHACHAM et al. 2016).

O uso de extratos vegetais pode ser considerada uma SbN eficiente para o combate de patógenos e pragas (SONG et al. 2019; KITAMURA et al. 2021; KITAMURA et al. 2023; NGEGBA et al. 2022). Tal tecnologia sustentável é considerada eficiente, visto que é uma tecnologia de controle que não elimina subprodutos tóxicos ao ambiente e que apresentam manejos ecológicos que contribuem para a preservação da biodiversidade, pois reduzem o uso de substâncias com potenciais ecotoxicológicos (SONG et al. 2019; BRITTO et al. 2021). Ainda, os extratos de plantas podem apresentar constituintes que podem ser consideradas alternativas para a redução do uso/substituição de compostos químicos sintéticos utilizados no manejo de insetos pragas. (BRITTO et al. 2021; NGEGBA et al. 2022).

Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo avaliar *in vitro* a eficiência ovicida e larvicida de extrato aquoso de *Myriophyllum aquaticum* sobre as lagartas *S. frugiperda*. A hipótese do presente trabalho é que os extratos de *M. aquaticum* apresentem potencial inseticida, visto que é uma espécie conhecida pelo alto teor de

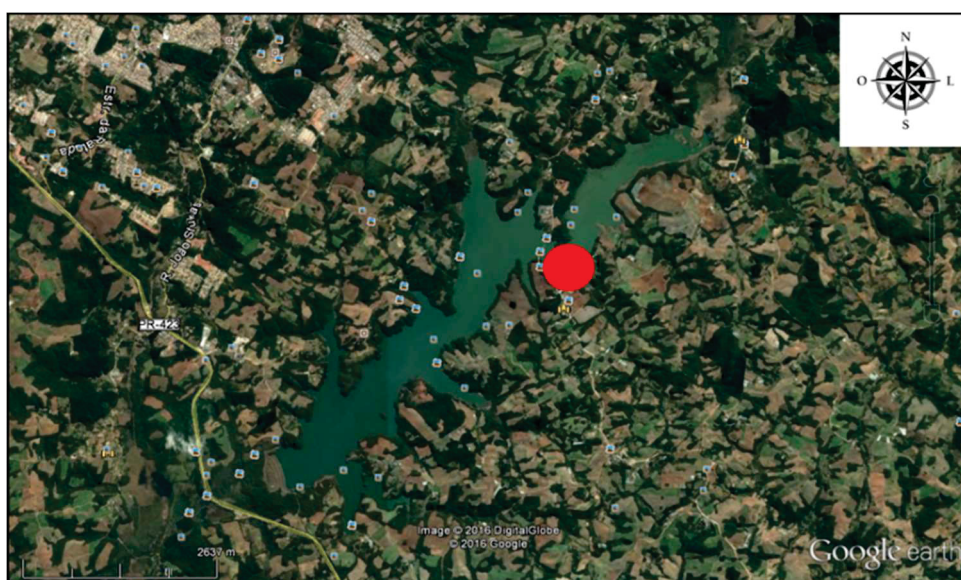
compostos fenólicos, principalmente quando extraídas utilizando a água como solvente (KITAMURA et al. 2023). Sabe-se que os compostos fenólicos é uma classe de substâncias produzidas pelo metabolismo secundário que podem apresentar potencial inseticida (BAUER et al. 2009; BREVÁULT; CLOUVEL, 2019). Desta forma, espera-se que o extrato aquoso de *M. aquaticum* seja eficaz para combater ovos e/ou larvas de *S. frugiperda*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção, coleta e processamento de amostras vegetais de *M. aquaticum*

Para a obtenção dos extratos vegetais foram coletadas macrófitas da espécie *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc no reservatório do Rio Verde, localizado na região do município de Araucária, Paraná, nas coordenadas 25 S 908.1 49 W 28 03.1 (Fig. 1).

Figura 1. Ponto de coleta de *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc, município de Araucária, PR.



Fonte: Adaptado de Google Earth

As plantas foram coletadas manualmente e transportadas para o laboratório. Posteriormente o material vegetal foi lavado em água corrente para a remoção de impurezas ou sujeiras grosseiras e, foram secas a  $30^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  em estufa por 15 dias para a completa desidratação. Após a secagem, o material foi triturado em liquidificador e peneirado para a padronização granulométrica (malha de 0,5 mm).

### 2.2 Preparo dos extratos vegetais

Para a obtenção dos extratos vegetais, o material vegetal pulverizado foi pesado (20 g) e posteriormente foi adicionado o líquido extrator na proporção de 20%

(20 g para 100 mL de solvente). A extração foi realizada em banho ultrassônico por três ciclos de 45 minutos. A cada ciclo, o solvente de extração foi filtrado e os resíduos vegetais retornavam ao frasco, para que uma nova etapa fosse realizada pela renovação do solvente. Ao final dos três ciclos, obteve-se aproximadamente 300 mL de extrato líquido. Foram utilizados dois tipos de líquidos extratores: água purificada em sistema de osmose reversa e solução hidroetanólica 80% (v/v), que forneceram respectivamente o extrato aquoso e o extrato hidroetanólico. Após a extração, os extratos líquidos foram filtrados e, os materiais contendo etanol foram rotavevaporados para a remoção do solvente (KITAMURA et al. 2021).

Após a obtenção dos extratos, foi feito o congelamento a -80 °C em ultrafreezer e posteriormente foi realizada a liofilização. Os extratos liofilizados foram armazenados a -20 °C, até o preparo das amostras para os testes de inibição.

### **2.3 Análise de compostos fenólicos dos extratos vegetais**

A determinação de fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu (AMERINE; OUGH, 1976). Para tanto, foram preparadas soluções-estoque de 100 mg.L<sup>-1</sup> dos extratos liofilizados de *M. aquaticum* para a investigação preliminar fitoquímica.

Em um balão volumétrico (volume de 10 mL), foram adicionados 5 mL de água de osmose, 150 µL dos extratos de *M. aquaticum* e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (SigmaAldrich®). A solução foi mantida por três minutos em repouso e, posteriormente, foram adicionados 2 mL de solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 15% e água de osmose até completar o volume de 10 mL. Após o preparo, os balões foram armazenados em locais protegidos de luz para evitar a fotodegradação dos compostos, por um período de duas horas.

Após as duas horas, a análise foi realizada pela leitura em espectrofotômetro UV-Vis (UV-1800®, SHIMADZU). Foi utilizado o comprimento de onda de 765 nm para as leituras em cubetas de 10 mm. Para a quantificação dos compostos fenólicos totais foi utilizada a curva de calibração a partir de soluções de ácido gálico, conforme regressão linear obtida de R<sup>2</sup>= 0,999.

### **2.4 Bioensaios**



Os bioensaios foram conduzidos no laboratório de Inovação da empresa Total Biotecnologia e Comércio (BIOTROP) em Curitiba (Paraná), durante o período de março a junho de 2023.

Sementes de milho comerciais foram semeadas em vasos plásticos de 5L contendo fibra de coco, areia e vermiculita e foram mantidos em casa de vegetação (empresa Total Biotecnologia e Comércio (BIOTROP) em Curitiba – Paraná) para produção de biomassa para alimentação das lagartas.

As lagartas e ovos de *S. frugiperda* foram obtidas de criação da empresa Pragas.com. Os bioensaios foram conduzidos sob delineamento inteiramente com distribuição randômica, com sete tratamentos, onde foram avaliadas as concentrações de 0 (testemunha) 1, 5, 10, 100 e 500 e 1000 mg/L.

A atividade ovicida foi determinada utilizando papel cartão azul (4 x 2 cm) contendo ovos com até 24 horas de idade, colados equidistantes com solução de goma arábica 20% com auxílio de um pincel fino e lupa. Nos cartões foram borrifadas as soluções preparadas dos extratos vegetais com um borrifador plástico (30 mL). Após a secagem, os cartões foram colocados em placas de Petri e fechadas com filme plástico PVC. A deterioração ou eclosão dos ovos foram avaliadas diariamente durante sete dias.

A atividade larvicida foi avaliada de duas maneiras: por aplicação tópica e por exposição de superfície. Para a aplicação tópica, as lagartas foram colocadas individualmente sobre folhas de milho não tratadas, que foram previamente colocadas em bandejas plásticas de 16 poços, contendo ágar-água para manter a umidade (n= 1 lagarta por poço) e então 2 uL das soluções do extrato vegetal (ou controle) foram aplicados topicamente com o auxílio de uma micropipeta no mesotórax de lagartas de *S. frugiperda*. Para a avaliação de exposição de superfície, discos de papel filtro foram umedecidos com 0,8 mL das soluções do extrato vegetal (ou controle) e após a secagem foram colocados em placas de Petri, juntamente com um cubo de dieta artificial (Greene et al., 1976) para alimentação das lagartas. Em cada placa foram colocadas 5 lagartas.

A avaliação da atividade larvicida constou na contagem de número de dias necessários para causar a mortalidade das lagartas, e foi considerada morta as

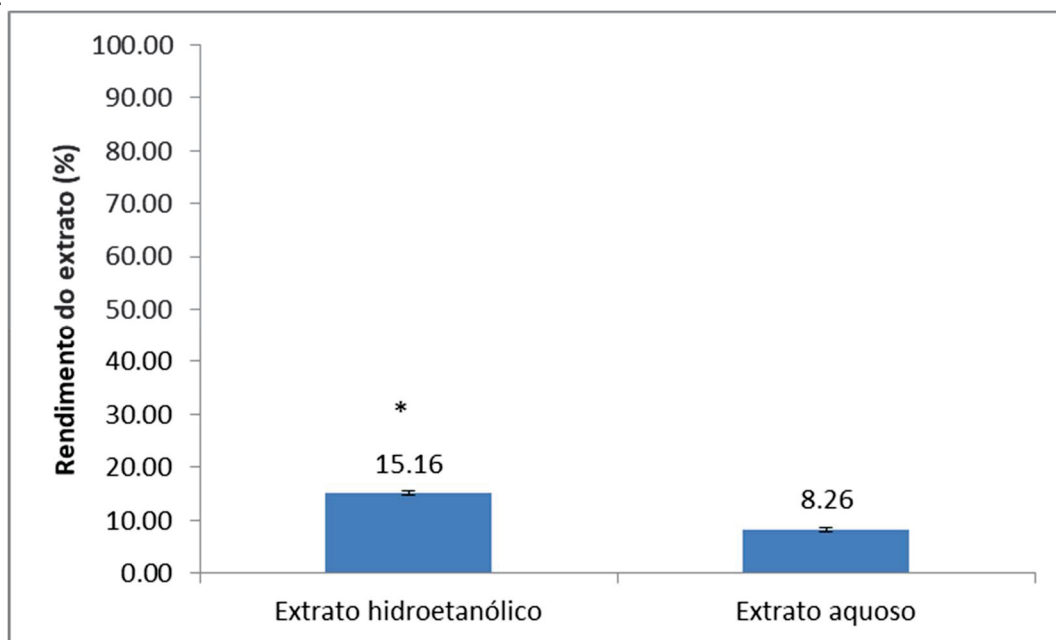
lagartas que permaneceram mortas após serem tocados/estimulados com o auxílio de uma pinça.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Rendimento dos extratos obtidos de *M. aquaticum*

O extrato hidroetanólico apresentou maior rendimento, quando comparado ao extrato aquoso ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 2). Sabe-se que o rendimento de extratos provenientes de macrófitas aquáticas, podem se diferir devido às diferenças de extração dos compostos solúveis pelo líquido extrator (SILVEIRA, 2012). Desta forma, compostos mais polares e hidrofílicos podem ser extraídos com maior facilidade com a utilização de soluções etanólicas e metanólicas (MATOS, 2009).

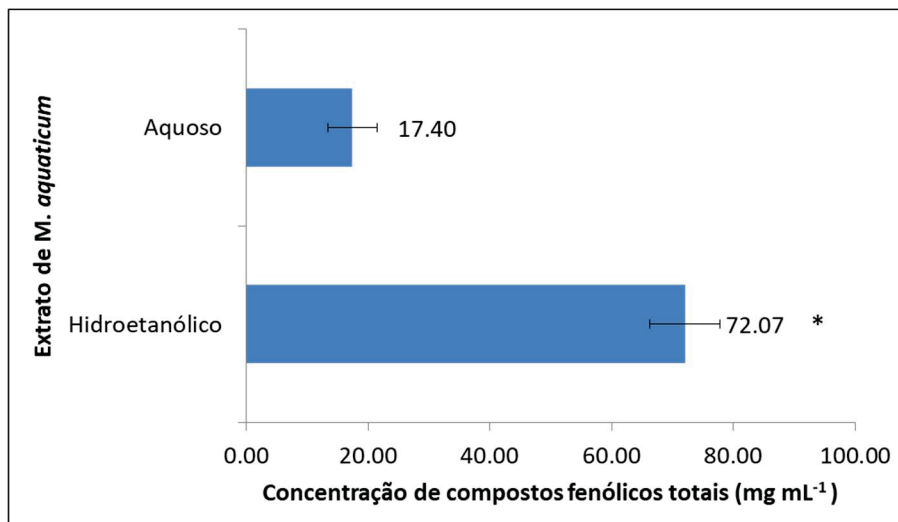
Figura 1. Rendimento dos extratos hidroetanólicos e aquosos liofilizados de *Myriophyllum aquaticum*. \*Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste Anova de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey ( $n=3$ ).



#### 3.2 Concentração de compostos fenólicos totais dos extratos de *M. aquaticum*

O extrato hidroetanólico e aquoso apresentaram em sua composição a presença de compostos fenólicos. No entanto, o extrato hidroetanólico apresentou maiores teores de fenólicos totais, quando comparadas ao extrato aquoso ( $p < 0,001$ ) (Fig. 3).

Figura 3. Teor de compostos fenólicos totais ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de extratos hidroetanólico e aquoso de *Myriophyllum aquaticum* (n=3). \*Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ), quando comparados por Anova de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey.



Sabe-se que as soluções de solventes orgânicos misturados com água, aumentam o rendimento de extração de compostos fenólicos (SIMÕES, 2010). Isso pode corroborar para os valores de rendimentos e de teor de fenólicos totais para o extrato hidroetanólico. Tais características são de interesse, visto que a presença de compostos fenólicos é uma forma de defesa contra predadores de macrófitas do gênero *Myriophyllum* (BAUER et al. 2009). Diante disso, esses resultados corroboram para as investigações de testes inseticidas contra a lagarta *Spodoptera frugiperda*.

### 3.3 Avaliação do potencial inseticida de *M. aquaticum*

Após o período experimental não foram constatadas alterações na eclosão dos ovos para nenhum dos tratamentos, demonstrando que não houve potencial ovicida (Tabela 1). Similarmente, nenhuma das concentrações do extrato hidroetanólico causaram a mortalidade de lagartas de *S. frugiperda*, seja para a exposição tópica, quanto para a exposição de superfície, evidenciando que não houve atividade larvicida (Tabela 1). Tal resultado pode sugerir uma falta de eficácia das concentrações testadas ou indicar uma possível resistência dos ovos de *S. frugiperda* aos compostos presentes nos extratos de *M. aquaticum*.

**Tabela 1. Potencial inseticida de diferentes concentrações de extrato hidroetanólico de *Myriophyllum aquaticum* (0, 1, 5, 10, 100, 500 e 1000 mg/L) sobre ovos e lagartas de *Spodoptera frugiperda*.**

Tratamentos (mg/L)	Taxa de sobrevivência após exposição ao extrato hidroetanólico (%)		
	Ovicida	Larvicida (tópico)	Larvicida (superfície)
0/Testemunha	100	100	100
1	100	100	100
5	100	100	100
10	100	100	100
100	100	100	100
500	100	100	100
1000	100	100	100

O uso de extratos vegetais para o controle de pragas agrícolas tem gerado interesse para diferentes estudos, pois podem ser alternativas viáveis para a redução de custos para a produção agrícola, pode reduzir danos ambientais e efeitos para organismos não-alvo além de reduzir a dependência por inseticidas químicos (RIOBA et al. 2020, NGEGBA et al. 2022). Estudos já evidenciam o potencial de extratos vegetais contra *S. frugiperda*, com potenciais inseticidas acima de 66% (PHAMBALA et al. 2020; RIOBA et al. 2020). Entretanto, no presente estudo, o extrato hidroetanólico de *M. aquaticum* não apresentou atividade ovicida e/ou larvicida sobre *S. frugiperda*.

Biopesticidas derivados de plantas podem apresentar mecanismos de ação para a inibição de desenvolvimento de ovos e larvas, causar a mortalidade de lagartas e/ou interferir na taxa de fecundidade e na ovoposição de indivíduos adultos (NGEGBA et al., 2022). Dentre algumas classes de compostos que apresentam bioatividade inseticida contra *S. frugiperda*, destacam-se: compostos fenólicos e óleos essenciais (RIOBA et al. 2020, NGEGBA et al. 2022; PAREDES-SÁNCHEZ et al. 2021). Os metabólitos que podem apresentar efeitos ovicidas e larvicidas, induzindo toxicidade celular, inibição de crescimento e mortalidade de *S. frugiperda* são: alcalóides, triterpenóides, saponinas e taninos (PAREDES-SÁNCHEZ et al. 2021).

Apesar de *M. aquaticum* apresentar compostos fenólicos (KITAMURA et al. 2021; KITAMURA et al. 2023), como alcalóides, terpenóides, saponinas e taninos (CHENG et al. 2008; KITAMURA et al. 2023; WANG et al. 2017; ZHU et al. 2021), não foi observada atividade bioinseticida. Entretanto, tal resultado pode estar relacionado

com a mudança de composição de fitoquímicos, visto que os compostos fenólicos podem variar no decorrer das diferentes estações do ano em *M. aquaticum*, podendo alterar a bioatividade de extratos dessa planta (KITAMURA et al. 2023). Sabe-se que plantas do gênero *Myriophyllum* podem apresentar variações na sua composição fitoquímica, sendo uma das justificativas, a proteção contra a herbivoria por alguns insetos (BAUER et al., 2009). Desta forma, a falta de resultados obtidos no presente estudo pode estar relacionada com o período da coleta realizada e, por isso, estudos futuros devem levar em consideração a sazonalidade de coleta das plantas para investigar o potencial inseticida de plantas, como *M. aquaticum*.

#### 4 CONCLUSÃO

O uso de extratos hidroetanólicos de *M. aquaticum* para combater ovos e lagartas de *S. frugiperda* não foi eficiente. Apesar do extrato apresentar maiores teores de compostos fenólicos, não foi possível observar nenhuma atividade inseticida para as condições testadas no presente estudo. Desta forma, sugere-se para estudos futuros o teste com extratos de plantas coletadas em diferentes estações do ano e com diferentes soluções extratoras, visto que isso pode alterar a fitoquímica das plantas e, conseqüentemente, interferir na maior atividade inseticida dos produtos testados.

## REFERÊNCIAS

AMERINE, M. A.; OUGH C. S. **Análisis de Vinos y Mostos**. Zaragoza: Acribia, 1976.

ARNÉS GARCÍA, M.; SANTIVAÑEZ, T. **Hand in hand with nature–Nature-based Solutions for transformative agriculture: A revision of Nature-based Solutions for the Europe and Central Asia region, supported by Globally Important Agricultural Heritage Systems (GIAHS) examples**. Food & Agriculture Org., 2021.

BAUER, Nadine et al. Seasonal and interannual dynamics of polyphenols in *Myriophyllum verticillatum* and their allelopathic activity on *Anabaena variabilis*. **Aquatic Botany**, v. 91, n. 2, p. 110-116, 2009.

BRÉVAULT, Thierry; CLOUVEL, Pascal. Pest management: reconciling farming practices and natural regulations. **Crop Protection**, v. 115, p. 1-6, 2019.

CHENG, Wu et al. Allelopathic inhibitory effect of *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. on *Microcystis aeruginosa* and its physiological mechanism. **Acta Ecologica Sinica**, v. 28, n. 6, p. 2595-2603, 2008.

COHEN-SHACHAM, Emmanuelle et al. Nature-based solutions to address global societal challenges. **IUCN: Gland, Switzerland**, v. 97, p. 2016-2036, 2016.

KITAMURA, Rafael et al. BIOATIVIDADE ALELOPÁTICA DE EXTRATOS METANÓLICOS DE *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. SOBRE *Microcystis aeruginosa*. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v. 18, n. 37, 2021.

KITAMURA, Rafael Shinji Akiyama et al. Enhancing Biocontrol of Harmful Algae Blooms: Seasonal Variation in Allelopathic Capacity of *Myriophyllum aquaticum*. **Water**, v. 15, n. 13, p. 2344, 2023.



LIBERA, Davi Souza Della et al. Controle biológico da cigarrinha (*Dalbulus aidis*) e da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) do milho com *Beauveria* SSP. **Brazilian Journal of Development**, v.8, n. 5, 2022.

MATOS, F.V.A. **Introdução à fitoquímica experimental** (2009), 3ª Edição, Ceará: Edições UFC, 128p.

NGEGBA, Patrick Maada et al. Prospects of botanical compounds and pesticides as sustainable management strategies against *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Economic Entomology**, v. 115, n. 6, p. 1834-1845, 2022.

PAREDES-SÁNCHEZ, Francisco A. et al. Advances in control strategies against *Spodoptera frugiperda*. A review. **Molecules**, v. 26, n. 18, p. 5587, 2021.

PHAMBALA, Kelita et al. Bioactivity of common pesticidal plants on fall armyworm larvae (*Spodoptera frugiperda*). **Plants**, v. 9, n. 1, p. 112, 2020.

RIOBA, Naomi B.; STEVENSON, Philip C. Opportunities and scope for botanical extracts and products for the management of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) for smallholders in Africa. **Plants**, v. 9, n. 2, p. 207, 2020.

SANTOS, Wander Laizo dos et al. Effect of the aqueous extracts of the seeds of *Talisia esculenta* and *Sapindus saponaria* on fall armyworm. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 373-383, 2008.

SILVEIRA, A. L. **AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS SOBRE O CRESCIMENTO DE *Microcystis aeruginosa* Kützing**. (2012), 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR.

SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMSNN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento** (2010).6ª. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS, 1104 p.

SONG, Yinan et al. Nature based solutions for contaminated land remediation and brownfield redevelopment in cities: A review. **Science of the Total Environment**, v. 663, p. 568-579, 2019.

WANG, Haiping et al. Allelopathic effects of *Myriophyllum aquaticum* on two cyanobacteria of *Anabaena flos-aquae* and *Microcystis aeruginosa*. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 98, p. 556-561, 2017.

ZHU, Xiaoqin et al. A review on control of harmful algal blooms by plant-derived allelochemicals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 401, p. 123403, 2021.