

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS – UNISINOS
UNIDADE ACADÊMICA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
NÍVEL DOUTORADO

Marianna Pilla D’Incao

Metabólitos secundários de plantas nativas e exóticas, com potencial inseticida, ao polífago, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae).

São Leopoldo
2013

Marianna Pilla D'Incao

Metabólitos secundários de plantas nativas e exóticas, com potencial inseticida, ao polífago, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae).

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção título de Doutor, pelo Programa de Pós Graduação em Biologia da Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS.

Área de Concentração: Diversidade e Manejo da Vida Silvestre

Orientadora: Dr. Lidia Marina Fiuza

Coorientador: Dr. Luis Fernando Medina

São Leopoldo

2013

Marianna Pilla D’Incao

Metabólitos secundários de plantas nativas e exóticas, com potencial inseticida, ao polífago, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae).

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção título de Doutor, pelo Programa de Pós Graduação em Biologia da Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS.

Área de Concentração: Diversidade e Manejo da Vida Silvestre

Aprovado em _____

BANCA EXAMINADORA

Neiva Monteiro de Barros – Universidade de Caxias do Sul

Grace Gormann – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rubem Vargas – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Tiago De Marchi – Universidade do Vale do Rio dos Sinos

D278m D’Incao, Marianna Pilla.

Metabólitos secundários de plantas nativas e exóticas, com potencial inseticida, ao polífago, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae), São Leopoldo - RS / por Marianna Pilla D’Incao. – 2013.

88 f.: il., color. ; 30 cm.

Tese (doutorado) — Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Programa de Pós-Graduação em Biologia, São Leopoldo, RS, 2013.

“Orientação: Prof^a. Dr^a. Lidia Marina Fiuza”.

1. Biologia. 2. Química vegetal. 3. Inseticida vegetal. I. Título.

CDU: 573

Catálogo na Publicação:
Bibliotecário Thiago Lopes da Silva Wyse - CRB 10/2065

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus Pais Tety e Jana pelo amor, carinho, puxões de orelha quando necessário, colo quando eu não estava muito bem, conselhos, orientações, e tudo mais, mas principalmente, por terem me apoiado incondicional e incansavelmente até hoje.

Ao meu Pai Fernando pelo apoio e incentivo nessa carreira que, como ele sabe, nem sempre é fácil, mas que traz inúmeras satisfações.

A minha irmã caçula, que meu coração não consegue decidir se é minha amigona ou minha filha amada, por todas as vezes que me ouviu com muita calma e carinho e sempre tinha uma palavra pra apaziguar meus conflitos.

Aos meus irmãos Daniela e Rafael por serem pessoas tão maravilhosas e tornarem a minha vida muito mais colorida.

Aos meus Dindos Tony e Zander por me ajudar a passar por todos os obstáculos da vida de uma maneira mais leve e feliz, por me ouvirem sempre que eu preciso, inclusive no meio da madrugada, e sempre terem a solução pra tudo. Por rir comigo, chorar comigo, passear comigo, subir e descer a serra comigo e por mim. Por pararem suas vidas para estar ao lado meu lado sempre que foi necessário. Por serem os MELHORES amigos que alguém pode sonhar em ter. Espero um dia poder retribuir tudo que vcs fazem por mim.

A professora Lidia Mariana Fiuza e ao professor Luis Fernando Medina pela orientação e pelos incentivos para que a tese acontecesse.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Toxicologia, em especial: Catusca Reali, pelo imenso apoio com a estatística, Shana Felice, Irene Olkoski, Gabriela Alles, Raquel Castilhos, Laura Massochin, Natália Dorr e Vilmar Machado

pelo auxílio, apoio, amizade, carinho, e principalmente pelo ombro amigo nas horas não tão fáceis.

À Dra Neiva Knaak pela imensa ajuda nessa reta final.

Às minhas filhas científicas Paula Soares e Bárbara Quadros, pela amizade, carinho, momentos maravilhosos montando bioensaios, pelos passeios em “tão, tão distante” para coletar plantas, pelos almoços e cafés na biblioteca, pelos finais de semana, festas, “visitas ao irga”, por cada gargalhada que demos com os nossos xucrismos e arriações. Sinto muita falta de vocês.

Aos professores e funcionários do Pós Graduação em Biologia da Unisinos.

Aos meus amigos do coração que tornaram estes quatro anos mais leves me apoiando, incentivando, ouvindo sobre os bioensaios e metabólitos secundários e na maioria das vezes não entendendo nada, mas fazendo de conta que sabiam tudo, sempre muito companheiros e carinhosos.

Aos novos amigos da EMEF Dr. Nelson Paim Terra, em Canoas, pela compreensão e apoio nestes últimos seis meses, mas principalmente nas últimas semanas, para que eu tivesse condições de terminar e entregar a tese.

RESUMO

Spodoptera frugiperda, um lepidóptero polífago que provoca grandes reduções na produtividade das monoculturas de arroz e milho. Diante destas perdas, os produtores agrícolas procuram diversos métodos de controle, como o controle biológico, genético e cultural, além das táticas convencionais, como aplicações periódicas de inseticidas químicos. O crescente aumento das perdas por ataque de pragas é acompanhado pela diminuição da eficiência dos produtos químicos. A busca de medidas de controle que causem menor impacto ambiental é de primordial importância, o que vem estimulando o ressurgimento do uso de plantas inseticidas como promissora ferramenta no controle de insetos. Nesse contexto, a presente pesquisa teve como objetivo geral realizar uma seleção quanto ao potencial inseticida, avaliando 27 plantas nativas e exóticas quanto ao seu potencial inseticida. A partir dos resultados obtidos, foram selecionadas 3 plantas para melhor avaliação do efeito letal, subletal e histopatológico de seus metabólitos secundários, quando extraídos por 4 processos diferentes. Com os extratos aquoso, infusão e polipeptídico de *Euphorbia pulcherrima*, *Rhododendron simsii* e *Maytenus ilicifolia* não foi possível se estabelecida uma CL₅₀, pois os mesmos não causaram 100 % de mortalidade das lagartas expostas durante 7 dias. Sendo assim foram realizados bioensaios para a avaliação dos efeitos subletais destes extratos. O extrato polipeptídico de *E. pulcherrima* causou uma diminuição no tempo de desenvolvimento larval deste lepidóptero. O extrato supercrítico de *E. pulcherrima* e *R. simsii* causaram mortalidade corrigida de 51 % e 73 %, respectivamente. A mortalidade corrigida de *S. frugiperda*, quando exposta ao extrato obtido via extração supercrítica de *M. ilicifolia* foi de 100 %, possibilitando que fossem realizados bioensaios para a definição da CL₅₀, a qual foi determinada em 0,104 mg_{de}

extrato/ml de acetona. Os extratos supercríticos de *E. pulcherrima* e *R. simsii* causaram danos no epitélio gastrointestinal das lagartas expostas.

Palavras-chave: Extratos vegetais, Bioensaios, Histopatologia, CO₂ Supercrítico.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	10
CAPÍTULO 1 – ARTIGO DE REVISÃO.....	15
Abstract.....	16
Introduction.....	17
Plant secondary metabolites.....	17
Terpenes.....	19
Phenolic compounds.....	20
Nitrogen compounds.....	22
Using extracts on the biological control of <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae).....	23
<i>Spodoptera frugiperda</i>	23
Extracts on management of <i>S. frugiperda</i>	24
Perspectives.....	26
References.....	28
CAPÍTULO 2 – ARTIGO DE PESQUISA: Lethal and sublethal effects of leaves extracts, from native and exotic plants in Southern Brasil, against <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lep., Noctuidae) caterpillars.....	
Abstract.....	35
1. Introduction.....	36
2. Materials and Methods.....	38
2.1 Rearing and conservation of insects (<i>Spodoptera frugiperda</i>).....	38
2.2 Plants extracts.....	39
2.3 Screening of plants and solvents for secondary metabolites extraction.....	40
2.4 Obtaining aqueous and proteic plant extracts.....	41
2.5 Bioassays for determinations of acute effect.....	41
2.6 Bioassays for estimate the sublethal effect.....	42
2.7 Statistical analysis.....	42
3 Results.....	42
4 Discussion.....	47
5 References.....	49
CAPÍTULO 3 – ARTIGO DE PESQUISA: Efeitos letais e histopatológicos de extratos supercríticos de <i>Euphorbia pulcherrima</i> Willd. Ex Klotzsch, <i>Rhododendron simsii</i> Planch. e <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. Ex Reissek sobre lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).....	54
RESUMO	55
1 Introdução.....	56
2 Material e Métodos.....	58
2.1 Coleta e criação dos insetos.....	58
2.2 Coleta e preparação do material vegetal.....	59
2.3 Obtenção dos extratos vegetais por supercrítico.....	59
2.4 Análise para determinação de polifenóis totais.....	59
2.5 Análises para a determinação da atividade antioxidante.....	61
2.6 Bioensaios para determinação de efeito letal.....	62
2.7 Determinação da CL ₅₀	62
2.8 Análises histopatológicas.....	63

2.9 Análise estatística.....	64
3 Resultados.....	64
3.1 Extrato supercrítico.....	64
3.2 Metabólitos secundários.....	64
3.3 Efeito letal.....	66
3.4 Concentração letal média.....	66
3.5 Efeitos histopatológicos.....	67
4. Discussão.....	71
5. Referências.....	76
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
ANEXO – PUBLICAÇÕES DA AUTORA NO PERÍODO DA TESE	87

1 INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, de acordo com o informativo publicado pelo CEPEA (USP/CNA) (Esalq, 2010), o agronegócio, ou seja, a soma total de todas as atividades relacionadas à agricultura alcança 25 % do PIB brasileiro e gera 37 % das vagas de empregos (CANAL DO PRODUTOR, 2009). As principais culturas são algodão, arroz, feijão, milho, trigo, soja, mandioca, batata-inglesa, café, cana-de-açúcar, laranja, fumo e celulose (MAPA, 2010). Segundo a mesma fonte, as culturas em que o Rio Grande do Sul mais se destaca são arroz, soja e trigo.

No Rio Grande do Sul, 45 % do PIB está vinculado ao agronegócio, com uma área cultivável de 20,68 milhões de hectares (SAA, 2009). A agricultura se destaca principalmente na produção de soja, milho, arroz e cereais de inverno. No ano de 2009, a produção de arroz chegou a 7,28 t/ha, de soja 2 t/ha, trigo a 2,1 t/ha e de milho 3,22 t/ha (SEAPPA/DPFA, 2009).

Os danos causados pelo ataque de insetos considerados pragas provocam grandes reduções na produtividade das monoculturas de arroz e milho, onde se destaca o lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (lagarta-do-cartucho-do-milho ou lagarta militar), como uma das principais pragas da fase vegetativa.

Diante das perdas de produção provocadas pelas pragas, os produtores agrícolas procuram diversos métodos de controle, como o controle biológico, genético e cultural, além das táticas convencionais, como aplicações periódicas de inseticidas químicos (Estrela et al., 2003).

A contínua utilização do controle químico, sem alternância com outros tipos de controle, causa desequilíbrios populacionais, eliminação de insetos não-alvo ou inimigos naturais, perda de eficácia dos inseticidas mediante seleção de populações resistentes (Lima et al., 2008; Rizwan-ul-Haq et al., 2009), acúmulo de resíduos nos

alimentos, intoxicação dos operadores, além da contaminação do ambiente (Lima et al., 2008). O uso de agrotóxicos na produção agrícola e a consequente contaminação têm sido alvo de constante preocupação no âmbito da saúde pública, exigindo dos diversos níveis de investimento e organização governamental para desenvolver programas e ações de controle do uso destes compostos químicos, de modo a eliminar ou mitigar os riscos à saúde humana, quanto à presença destes resíduos na água e nos alimentos (ANVISA, 2010).

O crescente aumento das perdas por ataque de pragas é acompanhado pela diminuição da eficiência dos produtos químicos. Esse fato revela que a indústria química não tem conseguido acompanhar a velocidade com que as populações de pragas têm se adaptado, tornando-se resistentes aos agroquímicos, através de seleções de mutantes pré-existentes nas populações, ou mesmo por processos de detoxificação, como pode ocorrer com artrópodes fitófagos (Mairesse, 2005).

A busca de medidas de controle que causam menor impacto ambiental é de primordial importância, o que vem estimulando o ressurgimento do uso de plantas inseticidas como ferramenta promissora no controle de insetos, pois estas evoluíram junto com os insetos herbívoros, desenvolvendo mecanismos que interagem e as defendem dos ataques destes organismos (Borgoni & Vendramim, 2003, Zapata et al., 2009).

Alguns exemplos das diversas adaptações desenvolvidas pelas plantas, como resposta ao constante ataque dos herbívoros, referem-se à presença de modificações morfológicas e à produção de componentes químicos tóxicos, como as substâncias secundárias que não participam diretamente do processo metabólico primário (Ehrlich & Raven, 1965). Estes compostos químicos podem ser de dois tipos: substâncias que repelem a herbivoria pela (i) toxicidade direta, ou (ii)

indiretamente, pela indigestibilidade dos tecidos, a qual é induzida por substâncias sintetizadas em resposta aos danos nos tecidos vegetais (Mello & Silva-Filho, 2002).

Princípios ativos de inseticidas botânicos são compostos resultantes do metabolismo secundário das plantas, sendo acumulados em pequenas porções no tecido vegetal (Gonzaga et al., 2008), estes compostos estão se mostrando bons repelentes, inibidores de oviposição, alimentação e crescimento, além de apresentarem atividade inseticida para adultos e larvas (Gutiérrez & Villegas, 2008). Alguns compostos secundários que exercem esta função são fenóis, alcalóides, terpenóides, tanino, limonóides, lectinas, entre outros (Tagliari et al., 2004).

A interação inseto-planta tem sido uma das áreas mais estudadas na ecologia química, trazendo grandes ganhos e perspectivas interessantes para o desenvolvimento de biopesticidas vegetais. Essas interações envolvem numerosos metabólitos secundários que podem vir a interferir no comportamento, crescimento e/ou desenvolvimento dos insetos (Rharrabe et al., 2010).

Mais de 2000 espécies de plantas são conhecidas por possuírem alguma atividade inseticida. Em muitos casos, as plantas têm um histórico como fitoterápicos ou inseticidas e repelentes de insetos. As famílias botânicas mais conhecidas por possuírem propriedades inseticidas são Fabaceae, Boraginaceae, Malvaceae, Meliaceae, Rutaceae e Asteraceae (Tagliari et al., 2004).

A revalorização das plantas, como fontes de substâncias inseticidas, vem se difundindo nos últimos 35 anos, principalmente no Brasil, México, Equador e Chile, motivados pelo contínuo crescimento dos cultivos orgânicos, onde não é permitido o uso de produtos químicos sintéticos. Estão surgindo linhas de pesquisa que buscam nas plantas compostos químicos com potencial para o controle de pragas agrícolas

que apresentem menor impacto ambiental que os compostos sintéticos comercializados atualmente (Gutiérrez & Villegas, 2008).

O emprego de substâncias extraídas de plantas silvestres com poder inseticida apresenta algumas vantagens quando comparado aos inseticidas sintéticos: são renováveis, possuem um espectro de toxicidade mais restrito e são facilmente degradáveis, com menor impacto ambiental. O desenvolvimento de resistência dos insetos a estas substâncias é lento (Borgoni & Vendramim, 2003). Além de não deixarem resíduos nos alimentos, são seguros aos operadores. São de baixo custo, tornando-se acessíveis aos pequenos produtores, pois podem ser coletadas na flora autóctone da região onde está sendo produzido (Borgoni & Vendramim, 2003; Gutiérrez & Villegas, 2008).

Apesar disto, ainda são poucos os estudos sobre os efeitos dos metabólitos secundários vegetais em insetos-praga. Nesse contexto, a presente pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Microbiologia e Toxicologia da Universidade do Vale do Rio dos Sinos, em São Leopoldo, RS (Brasil), tendo como objetivo geral identificar os efeitos letais, subletais e histopatológicos dos metabólitos secundários vegetais, sintetizadas pelas plantas com potencial inseticida, sobre um dos principais lepidópteros pragas das monoculturas de grande importância econômica nacional, especialmente do Rio Grande do Sul, *Spodoptera frugiperda*. Estes estudos poderão fazer parte dos métodos de controle aplicados no Manejo Integrado de Pragas das culturas em estudo, sendo os dados apresentados na forma de artigos científicos e a tese estruturada nos seguintes capítulos:

- **Capítulo 1:** Artigo Revisão Bibliográfica “Phytochemicals taken from plants with potential in Management of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)”. (submetido ao Journal of Biopesticide)

O objetivo deste capítulo é realizar um apanhado geral sobre o uso de fitoquímicos vegetais no controle de *Spodoptera frugiperda*, um importante lepidóptero polífago, causador de grandes prejuízos em monoculturas de importância econômica no Brasil.

- **Capítulo 2:** Artigo de pesquisa” Lethal and sublethal effects of leaves extracts, from native and exotic plants in southern Brazil, against *Spodoptera frugiperda* (Lep., Noctuidae) caterpillars” (submetido ao Journal of Agricultural Science and Technology).

O objetivo deste trabalho é realizar um screening de plantas e métodos de extração de metabólitos secundários com potencial ação inseticida e avaliar os efeitos letais e sub letais destes extratos vegetais sobre *Spodoptera frugiperda*.

- **Capítulo 3:** Efeitos letais e histopatológicos de extratos supercríticos de *Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzsch, *Rhododendron simsii* Planch. e *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). (em preparo para a Biological Control).

Este capítulo tem como objetivo avaliar os efeitos letais e histopatológicos de extratos vegetais, extraídos pelo método CO₂ supercrítico, sobre *S. frugiperda*.

Os três capítulos estão formatados de acordo com as orientações das revistas a que foram, ou serão submetidos.

CAPÍTULO 1

**Phytochemicals taken from plants with potential in Management of
Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae).**

Phytochemicals taken from plants with potential in Management of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).

MARIANNA P. D'INCAO¹, NEIVA KNAAK¹ & LIDIA M. FIUZA¹

¹ Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), PPG em Biologia, Laboratório de Microbiologia e Toxicologia, Av. Unisinos, 950. São Leopoldo, RS.

ABSTRACT

In agriculture, there is a constant search for natural products with biological activities that minimize the environmental impact of various pesticides used such as insecticides. The chemical constituents present in plants have these activities and show promise in fighting pests in agriculture. An approach to the selection of new insecticides that fulfill the requirements of safety, efficacy and selectivity, can be through the study of defense mechanisms of plants. Recent studies have shown the potential insecticide substances and extracts isolated from plants against various insect pests that cause serious damage to crops or stored grain. These active ingredients are distributed by different plant organs and involved in secondary metabolism, are divided into three major groups: terpenes, phenols and nitrogenous compounds. Thus, this review aims to give an overview of the active ingredients obtained from plant extracts with potential insecticidal to *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae).

Keywords: Secondary metabolites, insecticidal effect, armyworm, plant extracts, Lepidoptera.

INTRODUCTION

Since ancient times in history the use of plant extracts is present not only because of his food character, but also to its herbal, cosmetic and agrochemical properties (Júnior and Bolzani, 2006). Biodiversity Brazilian genetics is very complicated, with more than 55,000 species cataloged from a total estimated between 350000 to 550000, which popularly have several biological activities (Simões and Schenkel, 2001).

A Country like Brazil, with many climatic and geographical peculiarities, is home to a very big diversity of insects and plants. Besides the native species and the portion cultivated for commercial purposes, both for domestic consumption and for export, many plant species have been introduced by settlers and immigrants, being responsible for the introduction of exotic predators phytophagous. For many decades, Brazil has had its economy based on primary production sector and even today occupies a prominent position in the global supply of cereals, fruits and other products of plants and therefore pest control native or exotic is one challenge that remains and has gotten worse year after year (Roel, 2001).

In agriculture, there is a constant search for natural products with biological activities that minimize the environmental impact of various pesticides used such as insecticides. The chemical constituents present in plants have these activities and show promise in fighting pests in agriculture (Brito *et al.*, 2006). An approach to the selection of new insecticides that fulfill the requirements of safety, efficacy and selectivity, can be through the study of defense mechanisms of plants. Plant extracts have been used by man since the ancient world, a practice that continues today. Commercially, however, only few of these plants, including those that contain pyrethrins, rotenoids and alkaloids are used as a source of insecticides (Marangoni *et al.*, 2012).

Recent studies have shown the potential insecticide substances and extracts isolated from plants against various insect pests that cause serious damage to crops or stored grain (Matos *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2009; Nebo *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2010). These active ingredients are distributed by different plant organs and involved in secondary metabolism (Oliveira *et al.*, 2006). Thus, this review aims to give an overview of the active ingredients obtained from plant extracts with potential insecticidal to lepidopteran *Spodoptera frugiperda*.

PLANT SECONDARY METABOLITES

We give the name metabolism to the whole of chemical reactions that are continually taking place in each cell. Chemical compounds are formed, degraded or transformed by the action of enzymes, supplying the body with energy and compounds. The presence of specific

enzymes ensures a certain direction to these reactions, establishing what is called the metabolic pathways (Lenhinger *et al.*, 2002). Plants have two types of metabolism: at first a metabolism which synthesizes the major macromolecules (proteins, carbohydrates, lipids and nucleic acids, which are the same in a plant or animal organism) and the secondary, which produces multiple compounds that are not considered essential, however guarantee the survival advantage to the plant (Simões *et al.*, 2004). These reactions aim, at first, the use of nutrients to satisfy the fundamental requirements of the cell (primary metabolism) (Simões *et al.*, 2007).

Plants, micro-organisms and, in less extent, animals, have a whole arsenal metabolic able to produce, process and accumulate a lot of other substances not necessarily linked directly to maintaining the life of the organism producer (secondary metabolism) (Taiz and Zeiger, 2013; Simões *et al.*, 2007, Panizzi and Parra, 1990).

Secondary metabolites have their source from the metabolism of glucose via two intermediaries main shikimic acid and ethyl acetate. They produce large molecules with functional groups such as fatty acids, esters, hydrocarbons, alcohols, aldehydes, ketones, acetylenic compounds, alkaloids, phenols and coumarins (Santos, 2001).

Secondary metabolites are dissimilar from primary metabolites, because besides not being directly linked to the function of sustaining life, they have restricted distribution within and between plants (Taiz and Zeiger, 2013, Gonzaga *et al.*, 2008).

These metabolites have already been considered as plant excretion products. Currently it is known that many of these substances are directly involved in the mechanisms that allow the adaptation of the producer in the environment where they live. Already they have been recognized several adaptive functions of these metabolites as defense against herbivores and microorganisms, UV protection, attraction of pollinators and attraction of seed dispersers animals, besides, functions allelopathic (Simões *et al.*, 2007, Schoonhoven *et al.*, 1997, Panda and Khush, 1995, Panizzi and Parra, 1990). The formation and storage of secondary metabolites are restricted to certain stages of plant development, organ and tissue-specific or specialized cells (Panda and Khush, 1995).

With regard to defense against herbivores, plants have developed two types of defenses, direct and indirect. In the direct defense, there are involved substances such as silica, secondary metabolites, enzymes and proteins, and organs such as trichomes and thorns that directly affect the performance of the insect. In the indirect defense, there are involved substances emitted by the plant itself that attract parasites and predators of phytophagous

insect. Volatile terpenes and phenylpropanoids synthesized by plant species can have, depending the insect in case, attractive properties (supply, pollination) and / or deterrents and insecticides (Simas *et al.*, 2004). It can affect herbivores in several ways, such as deterrence, indigestible, inhibitors of oviposition and mortality of young adults (Gutiérrez and Villegas, 2008).

Some authors associate the fact that plants produce many different secondary metabolites to the fact that they do not have the ability to move on, being an easy target for herbivores (Panda and Khush, 1995, Schoonhoven *et al.*, 1997, Simões *et al.*, 2007, Taiz and Zeiger, 2013). The ability of competition and survival of plants is therefore deeply affected by the ecological functions of these metabolites (Taiz and Zeiger, 2013). The secondary metabolites that exhibit biological activity are known as active ingredients and have aroused interest for a promising market for the discovery of therapeutic activities.

Secondary metabolites are divided into three major groups: terpenes, phenols and nitrogenous compounds (Schoonhoven *et al.*, 1997, Taiz and Zeiger, 2013).

Terpenes

Terpenes cover a wide variety of substances of plant origin and its ecological importance as defensive plants are well established. According to Garcia and Carril (2009), terpenoids constitute the largest group of secondary metabolites, with more than 40,000 different molecules (Figure 1), which function in plant is to protect or to attract beneficial organisms (Tholl and LEE, 2011). They are generally insoluble in water and connected to defense against herbivore due to the fact of conferring bitter or having the same molecular structure of the molting hormone of insects, to interrupt that process function, or by making complex sterol precursors of animal hormones (Ziger and Taiz, 2013).

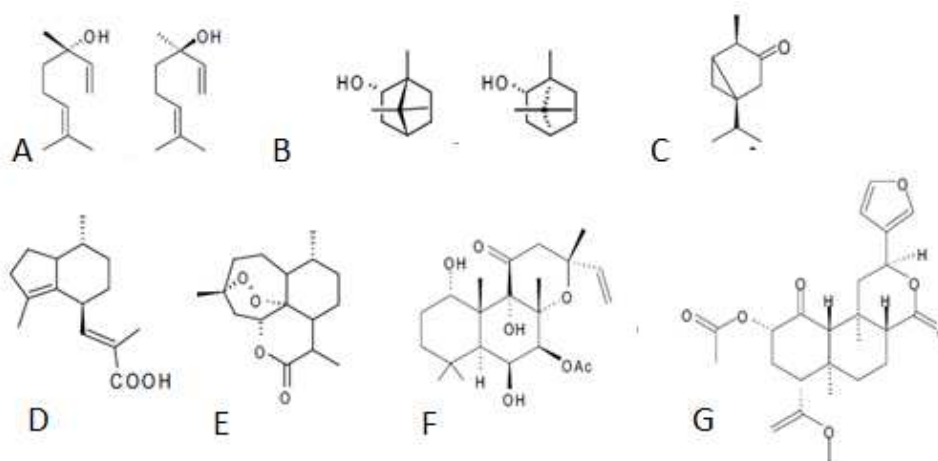


Figure 1. Chemical structure terpenoids (A) Linalool, (B) Borneol, (C) α -thujone, (D) valerenic acid, (E) artemisia, (F) Forskolin, (G) A. Salvinorin. Adapted from Passos *et al.* (2009).

Several monoterpenes were isolated and evaluated for toxicity to different insects. These studies involved α -pinene, β -pinene, 3-carene, limonene, myrcene, α -terpinene and camphene (Junior, 2003).

On the lower level, the relatively simple structure of monoterpenes such as limonene, myrcene and the 1,2-epoxy-pulegone, they have protective functions to the plants that produce them. Apparently its insecticidal activity was due to inhibition of acetylcholinesterase in insects, which is the case of 1,2-epoxy-pulegone, which causes effects such as retardation or growth inhibitor, maturation damages, reduction of reproductive capacity, appetite suppressants and may lead the predatory insects to death by starvation or direct toxicity (Marangoni *et al.*, 2012).

Phenolic Compounds

Among the products of secondary metabolism of plants, phenolic or polyphenols are present themselves as one of the most numerous groups of substances, with more than 8,000 phenolic structures known and widely distributed throughout the plant kingdom (Harborne, 1993).

They are a class of very diversified natural products, presenting like common characteristic the presence of at least one aromatic ring, wherein at least one hydrogen is substituted by one free hydroxyl group or other derivative function as ester or heteroside (Carvalho *et al.*, 2007). They can be from simple molecules, such as phenolic acids, to

highly polymerized compounds such as tannins. They appear primarily in the conjugated form with one or more sugar residues linked to hydroxyl groups, although there have direct connections from a a sugar unit with an aromatic carbon (Bravo, 1998).

The phenolic compounds are chemically a heterogeneous group, with some soluble in water and others not; in general molecules are very unstable, easily oxidized, and susceptible to degradation. While some phenolic compounds have attractive function to pollinators or to fruit dispersers, other have refuse function to herbivores. They also act as protection against UV radiation or to have alelochemistry function in competing adjacent plants (Ziger and Taiz, 2013).

Several groups of plant secondary metabolites are classified like phenolic compounds such as phenolic acids, coumarins, xanthones, flavonoids, anthocyanins, tannins and lignans polymers (Bruneton, 2001, Carvalho *et al.* 2007). Flavonoids and phenolic compounds act in plants like antioxidants, antimicrobials, photoreceptors, visual appeal and as a repellent. Many studies suggest that these compounds exhibit several biological activities. The ability of polyphenolic compounds to act as antioxidants in vitro has been the subject of several studies in the last years (Pieta, 2000).

Flavonoids (Figure 2) represent one of the most important and diverse groups among the products of plant origin and are widely distributed in the plant kingdom. The biochemical activities of flavonoids and their metabolites depend on their chemical structure, which can vary with substitutions including hydrogenation, hydroxylation, methylation, malonilation, sulfatation and glycosylation. Flavonoids and isoflavones commonly occur as esters, ethers or derivatives of glycosides or yet mixture of them (Birt *et al.*, 2001).

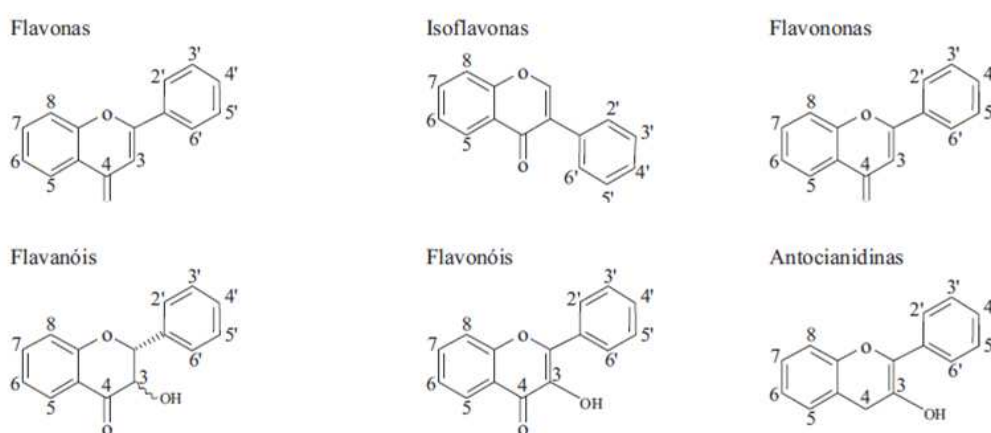


Figure 2. The main Flavonoids found in the plant kingdom. Adapted from Silva and Jorge (2011).

Nitrogen compounds

Nitrogenous compounds are well known in plant defense against herbivory, mainly alkaloids and cyanogenic glycosides. These compounds have toxic or medicinal action for humans (Ziger and Taiz, 2013). Alkaloids constitute a wide group of secondary metabolites with structural diversity (Figure 3) and they can be defined as "cyclic organic compounds of natural origin containing one nitrogen in a negative oxidation state with limited distribution among organisms" as methylxanthine, theophylline, theobromine, codeine, thebaine, papaverine and narcotine caffeine (Pelletier, 1983).

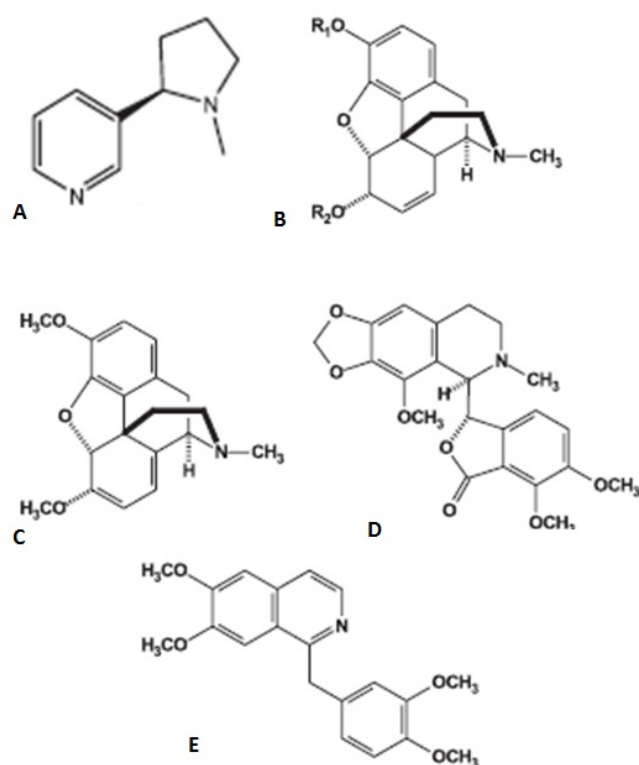


Figure 3. Chemical structure of alkaloids. (A) nicotine, (B) codeine; (C) thebaine; (D) narcotine; (E) Papaverine. Adapted from Viegas Jr. (2006).

Among the most important natural alkaloid used to control pests are nicotine and nor-nicotine. The use of these alkaloids began in the sixteenth century and reached 2,500 tons in the middle of the nineteenth century. Since then, the annual production has been declining and currently covers about 1,250 tons of nicotine sulphate and 150 tons of nicotine, because of their high cost of production, bad odor, extreme toxicity to mammals and limited insecticidal activity (Viegas Jr., 2003).

USING EXTRACTS ON THE BIOLOGICAL CONTROL OF *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Spodoptera frugiperda

The fall armyworm corn, (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) is a polyphagous insect widely distributed in tropical and subtropical regions of the Americas, being found from southern Canada to southern South America (Uruguay and Argentina) (Ashley *et al.*, 1989, Sarmiento *et al.*, 2002, Alves *et al.*, 2012). It is frequently observed attacking crops of maize, rice, cotton, sorghum and soybean, where causes significant defoliation. They feed more than 80 species of plants, distributed over 20 families (Cruz, 1995, Barros *et al.*, 2010), predominantly in grasses (Sarmiento *et al.*, 2002). Crop rotation is favoring the movement of *S. frugiperda* between crops due to being considered a minor pest, previously, in some cultures (Barros *et al.*, 2010). The larvae feed on the leaves, leaf area and reducing the photosynthetic capacity of the plant and, consequently, the production of crop (Sarmiento *et al.*, 2002).

The rice (*Oryza sativa* L.), a plant belonging to the family Poaceae, is considered the most important cereal in the world, since this is a staple food for a third of world population. It presents an enormous economic importance for the Country, since in Brazil are planted annually 2,454,700 hectares, which about 1,053,0000 are in the state of Rio Grande do Sul State, which has an area of 43% of all acreage in Brazil, participated with 32% of this reduction, the remaining balance due to the reduction of other states (Conab, 2012). In rice, *S. frugiperda* is considered plague of early stage because it attacks seedlings at the beginning of their development, feeding onwith the leaves and cut the new stems, close to the ground (Sosbai, 2005), causing loss of 14 to 24% of the grains. Depending on the population level, the destruction of the crop can be full (Busato *et al.*, 2006).

The area planted with maize (*Zea mays* L. (Poaceae)), first harvest in the period 2011/12 was set at 7,52 million hectares, and Rio Grande do Sul responsible for 1,153,70000 hectares (Conab, 2012) The economic importance of maize is characterized by various forms of use, which varies from the feed to the high-technology industry. In fact, the use of maize grain as animal food is consumption of most of the cereal, i.e. about 70% of the world. In the United States, about 50% is used for this purpose, while in Brazil ranges from 60 to 80%, depending on the source of the estimate and from year to year (Embrapa, 2011). In corn, the attack of *S. frugiperda* can occur from the seedling stage until tasseling and the formation of

spikes. In the later attacks can be found between individuals and thatched cob, which pierce the female inflorescence destroying grains (Oliveira *et al.*, 2007). There have been losses of 20% to 100% in the production of this crop, only caused by this insect (Rossi *et al.*, 2012).

Associated with the occurrence of pests there are still risks of environmental impact rising from the growing irrational use of chemical insecticides applied to control. The market for agrochemicals in Brazil, driven by sales of insecticides, the Brazilian market of agrochemicals increased 14.4%, or \$ 1,2 billion, and reached a record of US\$ 9,71 billion (about R\$ 19,5 billion) in 2012. Altogether we sold 823,220 tons of chemicals to control pests and weeds in crops, an increase of 12.6% (FNP, 2013).

With this, Brazil maintains its position as the second largest world market for pesticides. The country lags behind the United States, where sales totaled US\$ 12.9 billion (about US\$ 26 billion) last year, according to the U.S. Department of Agriculture (USD) (FNP, 2013).

Chemical insecticides are widely used for the control of pests and are used improperly, leading to the development of resistant populations of the insect, the emergence of new pests or other upwelling (Mária and Rosilda, 2010). The phytotoxicity of chemical insecticides on other non-target organisms, besides the increase in the cost of pesticides, the cost for the development of chemical pesticides is high and has increased over the years due to the need for new molecules and formulations more appropriate, what has led to an increased interest in research of alternative insecticides (Raguraman and Singh, 1999, Almeida and Batista Filho, 2001). Among these alternatives, we highlight the use of allelochemicals extracted from plants (Jacobson, 1989).

Extracts on the Management of *S. frugiperda*

The use of plant extracts in the control of pests is growing positively in light of the requirement of consumers in having the product available free of pesticides, awareness is contributing to the continuity of local biodiversity and enabling a better quality of life for the farmers (Veiga, 2003). Many studies have demonstrated the effect of the use of plant extracts, which are a source of secondary metabolic compounds such as natural insecticides in the management of *S. frugiperda* (Table 1). The deleterious effects on insects may be toxicity, growth inhibition, reduced fecundity, fertility and repellency.

Table 1. Deleterious effects on *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) after ingestion of different plant extracts.

Plant	Action	Reference
<i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Berth.) Brenan (Fabaceae)	Reduction of larval and larval viability (%) increase in the number of eggs/egg mass was higher in treatments plus extract.	De Moura <i>et al.</i> (2012)
<i>Artemisia verlotorum</i> Lamotte (Asteraceae), <i>Malva sylvestris</i> L. (Malvaceae), <i>Petiveria alliacea</i> L. (Phytolaccaceae) and <i>Zingiber officinale</i> (Zingiberaceae)	>80% Mortality	Tagliari <i>et al.</i> (2010)
<i>Trichilia pallida</i> Swartz (Meliaceae)	100% Mortality	Roel <i>et al.</i> (2000)
<i>Cabralea canjerana</i> (vell.) Mart. (Meliaceae), <i>Trichilia palida</i> Swartz (Meliaceae), <i>Cedrela fissilis</i> (vell.) (Meliaceae) and <i>Melia azedarach</i> L. (Meliaceae)	100% Mortality	Hernandez and Vendramim (1996)
<i>C. canjerana</i> (vell.) Mart. (Meliaceae) and <i>Swietenia macrophylla</i> King (Meliaceae)	Reduction in weight of larvae.	Hernandez and Vendramim 1997
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss (Meliaceae)	100% Mortality	Hernandez and Vendramim 1997
<i>Melia azedarach</i> L. (Meliaceae)	100% Mortality	Brito <i>et al.</i> (2004)
<i>Trichilia pallens</i> C.DC. (Meliaceae)	98,7% Mortality	Borgoni and Vendramim (2005)
<i>Carapa guianensis</i> Aubl. (Meliaceae)	Stretching larval, pupal weight reduction in mortality of 50%.	Sarria <i>et al.</i> (2007)
<i>Lupinus estipula</i> J. Agardh (Fabaceae)	83% Mortality	Bermúdez-Torres <i>et al.</i> (2009)
Saponina - <i>Passiflora alata</i> Curtis (Passifloraceae).	Prolongation of the larval period.	D' Incao <i>et al.</i> (2012)
<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. (Fabaceae)	60% Mortality	Alves <i>et al.</i> (2012)
<i>Ricinus communis</i> L. (Euphorbiaceae)	89.9% Mortality	Rossi <i>et al.</i> (2012)
<i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae) and <i>Trichilia pallida</i> (Meliaceae).	Mortality, weight and length of the tracks and head capsules were significantly affected.	Conceschi <i>et al.</i> (2012)
<i>Malva sylvestris</i> (Malvaceae), <i>Canavalia ensiformes</i> (Phaseaceae), <i>Cordia verbenacea</i> (Boraginaceae), <i>Curcuma zedoaria</i> (Zingiberaceae), <i>Cymbopogon citratus</i> (Poaceae), <i>Symphitum officinalis</i> (Boraginaceae), <i>Ruta graveolens</i> (Rutaceae), <i>Baccharis genistelloides</i> (Asteraceae), <i>Zingiber officinale</i> (Zingiberaceae), <i>Artemisia verlotorum</i> (Asteraceae) and <i>Melissa officinalis</i> (Lamiaceae).	Prolongation of larval and pupal stages, reduction in size and weight of pupae, negative effects on oviposition and fertility and abnormalities in the formation.	Knaak <i>et al.</i> (2012)
<i>Cedrela fissilis</i> and <i>Cipadessa fruticosa</i> (Meliaceae)	Elongation of the larval stage, followed by a decrease in pupal weight, larval mortality of 63.3%.	Matos <i>et al.</i> (2010)
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss. (Meliaceae)	All concentrations tested negatively affect larval development.	Viena <i>et al.</i> (2007)
<i>Ochroma pyramidalis</i> (Bombacaceae), <i>Schinus terebinthifolius</i> (Anacardiaceae), <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Fabaceae) and <i>Peltophorum dubium</i> (Fabaceae)	Reduction in weight of larvae and pupae, decreased survival during the larval and pupal stages, extending the duration of the immature stages.	Tirelli <i>et al.</i> (2010)
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss. (Meliaceae).	CL ₅₀ = 2,67 mg mL ⁻¹	Teixeira <i>et al.</i> (2003)

Encouraging research on interactions plants / insects in recent decades reveals the potential use of plant metabolites or allelochemicals as agents for this purpose (Pavela, 2004). Phytochemicals taken from plants with potential for insect control can be used as an alternative to synthetic chemicals or added to other insecticides in pest control programs.

On demand for the development of new active agents based on natural products, efforts are made to select, isolate, and develop phytochemicals with pesticidal activity (Mulla and Tianyun, 1999). Several strategies are able to determine the activity of natural products against insects. In general, the use of substances extracted from plants, as insecticides, has numerous advantages compared to synthetic materials: natural insecticides are obtained from renewable resources and are rapidly degradable; development of insect resistance to these substances, comprising the association of several active principles is slow, these pesticides are easy to access and obtain and leave no residues in food, in addition to having low production cost (Roel, 2001).

The toxicity of a chemical in insects does not necessarily qualify it as an insecticide. Several properties must be associated to activity, such as effectiveness at low concentrations, lack of toxicity against mammals and higher animals, absence of phytotoxicity, to be easily obtained, easy handling and application, and economic feasibility not be accumulated in the adipose tissue of human and animal household. It is evident that the characteristics listed refer to that insecticide considered ideal, which is rarely the case. Within the classification of insecticides are also included substances that repel and attract insects (Mariconi, 1984; Addor, 1994).

However, Isman (1997) reported some barriers to the commercialization of phytochemicals. Among these, we have (1) the scarcity of botanical resources, necessitating the production of botanical insecticides on a large scale for the market, unless the plant in question is extremely abundant in nature or have already been produced for other purposes; (2) standardization of extracts and quality control, based on the active ingredients, and (3) difficulties in recording these phytochemicals. This can prevent many botanical pesticides reaching the commercial sphere in countries where they have a great demand for these products.

PERSPECTIVES

The pest control, using plants with insecticidal activity, is a promising, feasible and environmentally friendly and as we can see, has increased importance and attention of the

various segments of science, for its various effects on insects. But there are other plants that have not yet been studied their activities insecticides, opening the door for several other researches. New substances are therefore required for effective pest control, offering greater safety, selectivity, biodegradability, economic feasibility, applicability in integrated pest management of insect control and low environmental impact.

The use of botanical insecticides as a strategy within the Pest Management is promising, however, must to be extended the research on plant extracts, in field trials and studies of quality control to enable greater adoption of these natural products for farmers and technicians.

Currently, there is a promising market for biopesticides and natural insecticides. The production of natural chemicals represents 7.5% of the market for chemicals, pharmaceuticals, veterinary and plant protection. In this sense, to develop tests, isolate, characterize and synthesize or finally biosynthesize compounds of interest in insect control becomes a constant challenge.

Nevertheless, the search for new insecticides constitutes a field of research open, broad and continuous. A wide variety of substances present in the flora remains huge attraction in the area of insect control, specially taking into account that only a small portion of these plants was investigated with such a purpose (Simões and Spitzer, 2004).

REFERENCES

- Addor, R.W. Agrochemical from Natural Products; Godfrey, C.R.A. (ed.) Marcel Dekker Inc.: New York, 1994.
- Almeida, J.E.M. and Batista Filho, A. 2001. Banco de microrganismos entomopatogênicos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, **21**: 30-33.
- Alves, D.S., Carvalho, G.A., Oliveira, D.F., Sâmia, R.R., Villas-Boas, M.A., Carvalho, G.A. and Corrêa, A.D. 2012. Toxicity of copaíba extracts to armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *African Journal of Biotechnology*, **11**(24): 6578-6591.
- Ashley, T.R., Wiseman, B.R., Davis, F.M. and Andrews, K.L. 1989. The fall armyworm: a bibliography. *Fla Entomology*, **72**: 152-202.
- Barros, E.M., Torres, J.B. and Bueno, A.F. 2010. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. *Neotropical Entomology*, **39**(6): 996-1001.
- Birt, D.F., Hendrich, S. and Wang, W. 2001. Dietary agents in cancer prevention: flavonóides and isoflavonoids. *Pharmacology Therapeutics*, **90**: 157-177.
- Borgoni, P.C. and Vendramim, J.D. 2003. Bioatividade de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. *Neotropical Entomology*, **32**: 665-669.
- Busato, G.R., Garcia, M.S., Loeck, A.E., Zart, M., Nunes, A.M., Bernardi, R. and Andersson, F. S. 2006. Adequação de uma dieta artificial para os biótipos “milho” e “arroz” de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bragantia*, **65**(2): 317-323.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, **56**(11): 317-333.
- Brito, J.P., Oliveira, J.E.M. and Bortoli, S.A. 2006. Toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). *Revista de Biologia e Ciência da Terra*, **6**(1): 96-103.
- Bruneton, J. 2001. Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales, 2ª Ed. Zaragoza: Acribia. 1100 **PP**.
- Carvalho, J.C.T., Gosmann, G. and Schenkel, E.P. 2007. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. **In**: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., de Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (org.). Farmacognosia: da planta ao Medicamento. 6ª Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 519-536 **PP**.

- Conab-Companhia Nacional de Abastecimento. 2012. Acompanhamento da safra 2011/12- 2º Levantamento de Avaliação da Safra de 2011/12, Junho de 2012. Disponível em <<http://www.conab.gov.Br>> Acesso em Agosto de 2012.
- Conceschi, M.R., Ansante, T.F., Mazzonetto, F., Vendramin, J.D., Sossai, V.L.M. and Pizetta, L.C., Corbani, R.Z. 2011. Efeito de Extratos Aquosos de *Azadirachta indica* e de *Trichilia pallida* sobre Lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em Milho. *BioAssay*, **6**: 1-6.
- Cruz, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1995. 45PP. (EMBRAPA-CNPMS.Circular Técnica, 21).
- D’Incao, M.P., Gosmann, G., Machado, V., Fiuza, L.M. and Moreira, G.R.P. 2012. Effect of saponin extracted from *Passiflora alata* Dryander (Passifloraceae) on development of the *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *International Journal of Plant Research*, **2**(5): 151-159.
- de Moura, J.Z., de Moura Pádua, L.E., Ramalho, P.R., Silva, A.A. and Maggioni, K. 2012. Extrato de folhas de *Anadenanthera macrocarpa* sobre a biologia de *Spodoptera frugiperda* criada em dieta artificial. *Comunicata Scientiae*, **3**(4): 249-254
- Embrapa. 2011. Cultivo de Arroz Irrigado no Brasil. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap01.htm>. Acesso em 31 de maio de 2011.
- FNP – Informa economics South America. Vendas batem novo recorde: Defensivos agrícolas. Disponível <http://informaecon-fnp.com/noticia/9033>. Acessado em 16/06/2013.
- García, A.A. and Carril, E.P.U. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal, **2**(3), 119-145 PP.
- Gonzaga, A.D., Garcia, M.V.B., Souza, S.G.A., Py-Daniel, V., Correa, R.S. and Ribeiro, J.D. 2008. Toxicidade de manipueira de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e erva-de-rato (*Palicourea marcgravii* St. Hill) a adultos de *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae). *Acta Amazônica*, **38**(1): 101-106.
- Gutiérrez, G.P.A. and Villegas, M.C. 2008. Efecto tóxico de *Verbena officinalis* (familia verbenaceae) em *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). *Rev. Lasallista Investig.*, **5**(2): 1-7.
- Harborne, J.B. 1993. The flavonoids: advances in research since 1986. London: Chapman and hall, 1993.

- Hernández, C.R. and Vendramim, J.D. 1997. Avaliação da bioatividade de extratos aquosos de Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Revista de Agricultura*, **72**: 305-318.
- Hernández, C.R. and Vendramim, J.D. 1996. Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Manejo Integrado de Plagas*, **42**: 14-22.
- Isman, M.B. 1997. Neem and other botanical insecticides: Barriers to commercialization. *Phytoparasitica*, **25**: 339-344.
- Júnior, C.V. and Bolzani, V.S. 2006. Os produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. *Química Nova*, São Paulo, 29, 326-337 **PP**.
- Júnior, V. 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, **26**(3): 390-400.
- Knaak, N., Tagliari, M.S., Machado, V. and Fiuza, L.M. 2012. Atividade Inseticida de Extratos de Plantas Medicinais sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *BioAssay*, **7**:1-6.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. 2002. Princípios de Bioquímica. 3ª edição. São Paulo: Sarvier, 975 PP.
- Lima, R.K., Cardoso, M.G., Moraes, J.C., Andrade, M.A., Melo, B.A. and Rodrigues, V.G. 2010. Caracterização Química e Atividade inseticida do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. sobre a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Bioscience Journal*, **26**: 1-5.
- Lima, R.K., Cardoso, M.G., Moraes, J.C., Melo, B.A., Rodrigues, V.G. and Guimarães, P.L. 2009. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1791) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Amazonica*, **39**(2): 377-382.
- Marangoni, C., Moura, N.F. and Garcia, F.R.M. 2012. Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. *Revista de Ciências Ambientais*, **6**(2): 95-112.
- Mária, C.S.D. and Rosilda, M.M. 2010. Avaliação do efeito deterrente de extratos vegetais sobre *Papilio thoas* brasiliensis (Lepidoptera: Papilionidae) Rothschild & Jordan, 1906. *J Selva Andina Res Soc.*, **1**(1): 50-56.
- Mariconi, F.A.M. 1981. Inseticidas e seu Emprego no Combate às Pragas, 5ª ed., Nobel, São Paulo, vol. 1.

- Matos, A.P., Nebo, L., Vieira, P.C., Fernandes, J.B., Silva, M.F.G.F. and Rodrigues, R.R. 2009. Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* e *T. catigua* (Meliaceae). *Química Nova*, **32** (6): 1553-1556.
- Matos, A.P., Myamoto, D.T., Alves A.R., Leite, A.C., Vieira, P.C., Fernandes, J.B. and Silva, M.F.G.F. 2010. Atividade de *Cedrela fissilis* e *Cipadessa fruticosa* (Meliaceae) sobre a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) *BioAssay*, **5**: 1-7.
- Mulla, M.S. and Tianyun, S. 1999. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medicinal and veterinary importance. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **15**(2): 133-152.
- Nebo, L., Matos, A.P., Vieira, P.C., Fernandes, J.B., Silva, M.F.G.F. and Rodrigues, R.R. 2010. Atividade inseticida dos frutos de *Trichilia clausensi* (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda*. *Química Nova*, **33**(9): 1849-1852.
- Oliveira, R.A.G., Lima, E.O., Vieira, W.L., Freire, K.R.L., Trajano, V.N., Lima, I.O., Souza, E L., Toledo, M.S. and Silva-Filho, R.N. 2006. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **16**(1): 77-82.
- Oliveira, M.S.S., Roel, A.R., Arruda, E.J. and Marques, A.S. 2007. Efficiency of extracts of plants in control of fall armyworm in corn *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciênc Agrotec.*, **31**(2): 326-331.
- Panda, N. and Khusch, G.S. 1995. Host plant resistance to insects. CAB International. Wallingford. Oxon, UK, in association with international Rice Research Institute. 431 **PP**.
- Panizzi, A.R. and PARRA, J.R.P. (eds). 1990. *Ecologia Nutricional de Insetos e Suas Implicações no Manejo de Pragas*. Editora Manole/CNPq, São Paulo.
- Passos, C.S., Arbo, M.D., Rates, S.M.K. and Von Poser, G.L. 2009. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **19**(1A): 140-149.
- Pavela, R. 2004. Insecticidal activity of certain medicinal plants. *Fitoterapia*, **75**: 745-749.
- Pelletier, S.W. 1983. The nature and definition of and alkaloid. **In**: Pelletier, S.W. (Ed). *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. New York: John Wiley & Sons Inc., v. 1, 1-31 **PP**.
- Pieta, P. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal Natural Products*, **63**: 1035-1042.

- Raguraman, S. and Singh, R.P. 1999. Biological effects of neem (*Azadirachta indica*) seed oil on an egg parasitoid, *Trichogramma chilonis*. *J Econ Entomology*, **92**: 1274-1280.
- Roel, A.R. 2001. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. *Revista Internacional de Desenvolvimento Local*, **1**: 43-50.
- Rossi, G.D., Santos, C.D., Carvalho, G.A., Alves, D.S., Pereira, L.L.S. and Carvalho, G.A. 2012. Biochemical analysis a castor bean leaf extract and its insecticidal effects against *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera:Noctuidae). *Neotropical Entomology*, **41**: 503-509.
- Santos, V.A.F.F.M., Santos, D.P., Castro-Gamboa, I., Zanoni, M.V.B. and Furlan, M. 2010. Evaluation of antioxidant capacity and synergistic associations of quinonemethide triterpenos and phenolic substances from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *Molecules*, **15**: 6956-6973.
- Silva, A.C. and Jorge, N. 2011. Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*, **13**(Esp): 375-384.
- Sarmiento, R.A., Aguiar, R.W. S., Aguiar, R.A.S.S., Vieira, S.M.J., Oliveira, H.G. and Holtz, A.M. 2002. Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em milho no Brasil. *Bioscience Journal*, **18**(2): 41-48.
- Sarria, A.L.F. 2007. Atividade inseticida de limonóides isolados de *Carapa guianensis* sobre a lagarta-do-cartucho-do-milho e a formiga cortadeira. In: Reunião Anual da SBQ, 30. Águas de Lindóia. 30^a. Reunião Anual da SBQ. São Paulo: SBQ. **30**: 112.
- Schoonhoven, L.M., Jermy, T. and Van Loon, J.J.A. 1998. Insect and flowers: The beauty of mutualism. **In**: *InsectPlant Biology: From Physiology to Evolution*. Chapman & Hall, London, New York, Tokyo, **PP**. 315-342.
- Simas, N.K. , Lima, E.C., Conceição, S.R., Kuster, R.M., Filho, A.M.O. and Lage, C.L.S. 2004. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenoides e fenilpropanoides. *Química Nova*, **27**(1): 46-49.
- Simões, C.M.O. [org.]; Schenkel, E.P. [org.]; Gosmann, G. [org.]; de Mello, J.C.P. [org.]; Mentz, L.A. [org.] and Petrovick, P.R. [org.]. *Farmacognosia – da planta ao medicamento*. 6^o edição. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. 1102 **PP**.

- Simões, C.M.O. and Schenkel, E.P. 2001; A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *NEXUS Ciência e Tecnologia*, **1**(1): 24-27.
- Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A. and Petrovick, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª Edição. Porto Alegre, RS: Ed. da UFSC, 2004. 1102 **PP**.
- Sosbai - Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. 2012. Reunião Técnica da Cultura do Arroz Irrigado (29: 2012: Gravatal, SC) Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil /Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. Itajaí, SC:SOSBAI. 179 **PP**.
- Tagliari, M.S., Knaak, N. and Fiuza, L.M. 2010. Efeito de extratos de plantas na mortalidade de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (j. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Arquivos do Instituto Biológico*, **77**(2): 259-264.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 2013. Fisiologia vegetal. 5ª Ed. Editora Artmed, 954 **PP**.
- Teixeira, P.H., Viana, P.A. and Waquil, J.M. 2003. Atividade de extrato aquoso de folhas de nim (*Azadirachta indica*) sobre *Spodoptera frugiperda*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **38**(3): 437-443.
- Tirelli, A.A., Alves, D.S., Carvalho, G.A., Sâmia, R.R., Brum, S.S. and Guerreiro, M.C. 2010. Efeito de frações tânicas sobre parâmetros biológicos e nutricionais de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciênc. agrotec.*, **34**(6): 1417-1424.
- Viana, A., Prates, H.T. and Ribeiro, P.E.A. 2007. Efeito de extratos de nim e de métodos de aplicação sobre o dano foliar e o desenvolvimento da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, em milho. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, **6**(1): 17-25.
- Veiga, E.A. 2003. Agricultura no mundo moderno: diagnóstico e perspectivas. **In**: Trigueiro A. Meio ambiente no século 21: 21 especialistas falam de questão ambiental nas suas áreas de conhecimento. Rio de Janeiro: Sextante.
- Viegas Jr., C., Bolzani, V.S. and Barreiro, E.J. 2006. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, **29**(2): 326-337.

CAPÍTULO 2

Lethal and sublethal effects of leaves extracts, from native and exotic plants in southern Brazil, against *Spodoptera frugiperda* (Lep., Noctuidae) caterpillars

Lethal and sublethal effects of leaves extracts, from native and exotic plants in southern Brazil, against *Spodoptera frugiperda* (Lep., Noctuidae) caterpillars

MARIANNA P. D'INCAO¹, BÁRBARA C. DE QUADROS¹, PAULA SOARES¹ & LIDIA M. FIUZA¹

¹ Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), PPG em Biologia, Laboratório de Microbiologia e Toxicologia, Av. Unisinos, 950. São Leopoldo, RS.

ABSTRACT

Spodoptera frugiperda is an important pest of several crops, due to the damage it causes and the difficulty of its control. The most commonly used method to control these pests is synthetic insecticides, but the use of pesticides causes many adverse effects to biotic and abiotic environment. The selection of new insecticides that meet the requirements of efficacy, safety, selectivity and those are economically viable, is highlighting the study of mechanisms of plant defense. The present study aimed to verify the insecticide effect of 27 plants, *Aloe ferox*, *Aloe vera*, *Anchietea salutaris*, *Artemisia camphorate*, *Casearia sylvestris*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Cordia monosperma*, *Equisetum arvense*, *Eugenia uniflora*, *Euphorbia milii*, *Euphorbia pulcherrima*, *Ficus pumila*, *Ginkgo biloba*, *Jodina rhombifolia*, *Maytenus ilicifolia*, *Mikania laevigata*, *Nerium oleander*, *Pachystroma longifolium*, *Pereskia grandifolia*, *Phyllanthus niruri*, *Piper umbellata*, *Plectranthus neochilus*, *Rhododendron simsii*, *Schinus molle*, *Schinus terebinthifolius*, *Solanum sisymbriifolium* and *Syzygium cumini* in three different types of plants extracts: aqueous, decoction and polypeptide on *S. frugiperda*. In preliminaries bioassays 25 plants caused corrected mortality less than 50 %. *E. pulcherrima* e *R.simsii* showed 68 % and 51 % of corrected mortality, respectively. Three plants were chosen to carry out bioassays: the two plants with the highest corrected mortality (*E. pulcherrima* e *R.simsii*) and another plant (*M.*

ilicifolia) with corrected mortality similar to control. Only *R. simsii* aqueous and the three extracts of *E. pulcherrima* differ significantly from control ($p < 0,05$). *E. pulcherrima* polypeptide had the lowest larval period about 11 days. The results obtained in this study demonstrate the potential insecticide *Euphorbia pulcherrima* and *Rhododendron simsii*.

KEY-WORDS: *Spodoptera frugiperda*, plant extracts, bioassays.

1 INTRODUCTION

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) is an important pest of several crops such as corn, rice, soybeans, peanuts, sorghum, among others, due to the damage it causes and the difficulty of its control (Yu et al. 2003; Roel and Vendramim 2006). Currently, the most commonly used method to control these pests are synthetic insecticides, which yields effective results in a short time, but the development of resistance to these insecticides by insects is also very fast, leading farmers to increase dosages or changing the active principle most frequently (Castillo et al. 2009; Zapata et al. 2009; da Silva et al. 2012). Brazil is the largest consumer of pesticides in the world, with one third of the food consumed by Brazilians is contaminated by these substances. Over the past decade, while the global consumption of pesticides has increased by 93 %, the Brazilian has increased 190 %, surpassing consumption in the United States. In 2010, Brazil spent approximately US\$ 7.3 billion in pesticides, including insecticides, herbicides, fertilizers, fungicides, bactericides, among others (Carneiro et al. 2012).

The use of pesticides causes many adverse effects to biotic and abiotic environment, such as accumulation of residues in soil, water, air and, consequently,

animals and plants, including humans (Rizwan-ul-Haq et al. 2009; Zapata et al. 2009; Pavela et al. 2010). In this context, the selection of new insecticides that meet the requirements of efficacy, safety, selectivity and that are economically viable, is highlighting the study of mechanisms of plant defense. They defend themselves from herbivore attacks by different methods such chemical, through the secondary metabolites, one of the most used.

Plant extracts have been used by man since 4000 b.C., a practice that continues today, with over 2000 species of plants known for their insecticidal properties (Bertholdo-Vargas et al. 2009; Pavela et al. 2010; da Silva et al.; 2012; D'Incao et al. 2012; Knaak et al.; 2012).

The use of substances from botanic sources, as an insecticide, has many advantages compared to the use of synthetic products, as natural insecticides are readily degradable, not remaining in the environment long enough to contaminate it, minimizing the development of resistance by insects target and also leaving no residues in food. Bermúdez-Torres et al. (2009) reported 83 % mortality of *S. frugiperda* when exposed to extract *Lupinus stipulates* J. Agardh (Fabales: Fabaceae) at a dose of 25 µg.ml⁻¹. Alves et al. (2012) achieved a 60 % mortality of *S. frugiperda* after 7 days of exposure copaiba leaf extract (*Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabales: Fabaceae)). Rossi et al. (2012) exposed larvae of *S. frugiperda* the *Ricinus communis* L. (Malpighiales: Euphorbiaceae) 10 % extract and obtained 89.9 % mortality. Muñoz et al. (2013) observed 58.3 % mortality by exposing larvae of *S. frugiperda* to *Calceolaria talcana* J. Grau & C. Ehrh (Lamiales: Calceolariaceae) extracts.

Thus, the present study aimed to identify the lethal and sublethal effects of 27 leaf extracts of native and exotic plants against the polyphagous species, *Spodoptera frugiperda*, major insect pest of the most relevant economic agroecosystems.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1. Rearing and conservation of insects (*Spodoptera frugiperda*):

The insect colonies of *S. frugiperda*, derived from corn and rice, have been established in controlled conditions in the Room for Insect Rearing, at the Laboratory of Microbiology and Toxicology, UNISINOS (São Leopoldo, RS), and were maintained until the full development of this project.

The caterpillars were reared at 25 °C, 12 h photoperiod and 70 % relative humidity. They were fed with Poitout's artificial diet (Poitout & Bues, 1970), pupae segregated by sex and adults obtained placed in cages with glucose solution (10 %) and oviposition substrate.

The laboratory colonies were mixed with other populations from annual samples of larvae of the same species collected in South Brazil crops. The sampling of *S. frugiperda*, in the field, were carried out in the irrigated rice crops with the collaboration of researchers from the Instituto Riograndense do Arroz (IRGA) in the Estação Experimental do Arroz (EEA), in Cachoeirinha, RS, Brazil.

2.2. Plants Extracts

The leaves of native and exotic plants were collected according to the availability of the species listed in Table 1, on the campus of UNISINOS (29 ° 47 ' 47,

90 " South latitude and 51 ° 09 ' 24, 93 " West longitude) in São Leopoldo, RS. Samples were collected in the early morning, noting the absence of rain, flowering and fruiting. The species identification was performed with the aid of a specialist in the area (Dr. João Larocca) and also with the consultation of herbarium specimens in the herbaria of UNISINOS and UFRGS.

Tabela 1: Native and exotic plants collected on the campus of Unisinos, São Leopoldo, RS (29 ° 47 '47, 90 " South latitude and 51 ° 09 '24, 93 ' West longitude), for assessing the potential insecticide.

Scientific names	families	Active Ingredients
<i>Aloe ferox</i>	Aloeaceae	Antracenic Compounds ¹
<i>Aloe vera</i>	Aloeaceae	Antracenic Compounds ¹
<i>Anchietea salutaris</i> A. St.-Hil.	Violaceae	Alkaloids ⁵
<i>Artemisia camphorate</i> Vill.	Asteraceae	Terpens ¹
<i>Casearia sylvestris</i> Sw.	Flacourtiaceae	Flavons, saponins, tannins ¹
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	Lauraceae	Phenolic Compounds
<i>Cordia monosperma</i> (Jacq.) Roem. & Schult.	Boraginaceae	Flavonoids ¹
<i>Equisetum arvense</i> L.	Equisetaceae	Cumarins, alkaloids ⁶
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Myrtaceae	Tannins ¹
<i>Euphorbia millii</i> Des Moulins	Euphorbiaceae	Diterpens ¹
<i>Euphorbia pulcherrima</i> Willd.	Euphorbiaceae	Diterpene esters ¹
<i>Ficus pumila</i> L.	Moraceae	Furanocumarins ¹
<i>Ginkgo biloba</i> L.	Ginkgoaceae	Flavonoids ¹
<i>Jodina rhombifolia</i> (Hook & Ain)	Santalaceae	Tannic acid, flavonoids
<i>Maytenus ilicifolia</i> (Schrad) Planch	Celastraceae	Poliphenols
<i>Mikania laevigata</i> Sch. Bip. Ex Backer	Asteraceae	Poliphenols, tannins e cumarins ¹
<i>Nerium oleander</i> L.	Apocynaceae	Cardenolids ¹
<i>Pachystroma longifolium</i> (Nees) I.M. Johnst	Asteraceae	Flavons, labdan diterpene, phenols e clerodans ⁴
<i>Pereskia grandifolia</i> Haw.	Cactaceae	Alkaloids ⁷
<i>Phyllanthus niruri</i> L.	Phyllanthaceae	Flavonoids ⁸
<i>Piper umbellata</i>	Piperaceae	Terpens ¹ , phenols ⁶
<i>Plectranthus neochilus</i> Schltr.	Lamiaceae	Quinones ¹
<i>Rhododendron simsii</i> Planch.	Ericaceae	Diterpens ¹ , graianotoxins ²

<i>Schinus molle</i> L.	Anacardiaceae	Uruchols ¹
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Anacardiaceae	Uruchols ¹
<i>Solanum sisymbriifolium</i> Lam.	Solanaceae	Alkaloids ¹
<i>Syzygium cumini</i> (L.)	Myrtaceae	Phenylpropanoid

¹Simões et al., 2007. ²Lopes et al., 2009. ³Pinto et al., 2005. ⁴Ferrante et al., 2007. ⁵dos Santos, 2005.

⁶Kaziyama et al., 2012. ⁷Souza et al., 2009. ⁸Maia-Almeida et al., 2011.

2.3. Screening of plants and solvents for secondary metabolites extraction

For this study, we selected 27 native and exotic plants collected on the campus of UNISINOS (São Leopoldo, RS), possessing any ethnobotanical record, scientific reference or known in the popular culture of the State of Rio Grande do Sul, Brazil.

The plant extracts were pre-selected in preliminary biological assays, using 15 larvae of *S. frugiperda*. Second instar larvae were used, kept individually in mini-acrylic plates (35 mm diameter) containing a thin layer of agar gel and one perennial soybean's leaf disc (*Neonotonia wightii*) with 18 mm diameter and 48 h. 50 µl of the extracts were placed on the leaf disc (18 mm). In the control samples, the volume of the extracts was replaced by sterile distilled water, and for extracts bioassays with another solvent was included a control sample with the diluted solvent as used in the extractions. Each preliminary bioassay consisted of three replicates for each type of extract.

The treatments were kept in a climatic chamber at 25 °C, 70 % relative humidity and photoperiod of 12 h. Mortality was checked on day 7 after treatment application, then corrected using Abbott's formula (Abbott, 1925).

2.4. Obtaining aqueous and proteic plant extracts:

The plant extracts were obtained by maceration of leaves with liquid nitrogen to obtain a fine powder. The re-suspension of this powder was performed with five different solvents for the extraction of secondary metabolites, in a ratio of 1 w: 5 v (5 ml of solvent for each plant powder gram) and kept 24 h at 4 °C and subsequently filtered through sterile filter paper. After filtration, the extract was divided into eppendorfs with the amount used in each test and kept at -18 ° C.

Five extracts were prepared: cold aqueous extract (aqueous), hot aqueous extract (infusion), alcoholic extract (70 % alcohol), methanol extract and an extract with buffer solution for extraction of polypeptides (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0; 5 % Glycerol v:v; 1 mM DTT; 0,1 % Triton).

2.5. Bioassays for determination of acute effect:

From the results obtained in preliminary tests we selected three plants to conduct acute bioassays. Second instar larvae were used, kept individually in mini-acrylic plates (35 mm diameter) containing a thin layer of agar gel and 4 perennial soybean's leaf disc (*Neonotonia wightii*) with 18 mm diameter by 7 days. 50 µl of extracts were deposited on each leaf disc.

2.6. Bioassays for estimate the sublethal effect:

The tests for the sublethal effects of botanical extracts for *S. frugiperda* were performed by transferring all the surviving worms in bioassays for acute effect to disposable cups with artificial diet without the addition of treatments, which were monitored, individually, until the F1. The insects were kept in a room at 25 °C, 70 % relative humidity and photoperiod of 12 h. Probable deformities, loss in pupae weight,

change in sex ratio or increase in development time and aspects related to fertility were observed. Pupae were weighed on an analytical balance and measured with analogical pachymeter, on the second day after molting.

2.7. Statistical Analysis.

Statistical analysis was performed with the aid of the Systat 12 computer program. The mortality values obtained in bioassays were corrected by Abbott's formula (Abbott, 1925) and then subjected to ANOVA followed by Tukey ($p < 0,05$). The values of other parameters were also subjected to ANOVA followed by Tukey ($p < 0,05$).

3 RESULTS

Results of preliminary bioassays and the 27 plants used are described in Table 2, where 25 plants caused corrected mortality less than 50 %. *E. pulcherrima* e *R.simsii* showed 68 % e 51 % of corrected mortality, respectively. Three plants were chosen to carry out bioassays: the two plants with the highest corrected mortality (*E. Pulcherrima* e *R.simsii*) and a plant with low corrected mortality (*M. ilicifolia*).

Table 2. Screening data of potential insecticide leaf extracts from 27 native and exotic plants against 2nd instar larvae of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae).

Plants Scientific name	Corrected Mortality (%)		
	aqueous	decoction	polypeptide
<i>Aloe ferox</i>	20,0	28,9	11,1
<i>Aloe vera</i>	2,2	22,2	2,2
<i>Anchietea salutaris</i>	15,6	2,2	4,4
<i>Artemisia camphorata</i>	8,9	22,2	2,2
<i>Casearia sylvestris</i>	13,3	20,0	28,9
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	6,7	4,4	11,1
<i>Cordia monosperma</i>	4,4	13,3	0,0
<i>Equisetum arvense</i>	20,0	13,3	0,0
<i>Eugenia uniflora</i>	11,1	6,7	20,0
<i>Euphorbia milii</i>	2,2	6,7	13,3
<i>Euphorbia pulcherrima</i>	22,2	17,8	68,9
<i>Ficus pumila</i>	6,7	13,3	0,0
<i>Ginkgo biloba</i>	8,9	17,8	6,7
<i>Jodina rhombifolia</i>	4,4	46,7	11,1
<i>Maytenus ilicifolia</i>	6,7	17,8	0,0
<i>Mikania laevigata</i>	2,2	31,1	8,9
<i>Nerium oleander</i>	11,1	11,1	17,8
<i>Pachystroma longifolium</i>	6,7	4,4	2,2
<i>Pereskia grandifolia</i>	17,8	11,1	2,2
<i>Phyllanthus niruri</i>	6,7	4,4	20,0
<i>Piper sp.</i>	2,2	17,8	8,9
<i>Plectranthus neochilus</i>	4,4	6,7	15,6
<i>Rhododendron simsii</i>	11,1	31,1	51,1
<i>Schinus molle</i>	8,9	20,0	15,6
<i>Schinus terebinthifolius</i>	13,3	2,2	22,2
<i>Solanum sisymbriifolium</i>	13,3	13,3	4,4
<i>Syzygium cumini</i>	11,1	4,4	8,9

In Table 3, the data presented correspond to the three plants chosen for the analysis of larval lethality and sublethal effects throughout the life cycle of *S. frugiperda*.

The results obtained in mortality bioassays were 6 % for the control, 45.94 % for *R. simsii* aqueous, 21.3 % for *R. simsii* decoction, 15.2 % for *R. simsii* polypeptide, 65.2 % for *E. pulcherrima* aqueous, 64.47 % for *E. pulcherrima* decoction, 76.11 % for *E. pulcherrima* polypeptide, 7.33 % for *M. ilicifolia* aqueous, 12.62 % for *M. ilicifolia* decoction and 4.73 % for *M. ilicifolia* polypeptide. The three extracts of *E. pulcherrima* differed significantly from all other extracts, with the exception of the aqueous extract of *R. simsii* ($p < 0,05$) (Table 3). The aqueous extract of *R. simsii* differed significantly only of aqueous and polypeptide extract of *M. ilicifolia* ($p < 0,05$) (Table 3).

The larval period in control was approximately 21 days, *M. ilicifolia* aqueous showed similar larval duration (20.5 days) and *E. pulcherrima* polypeptide had the lowest larval period about 11 days.

In control, the pre-pupal period was 1.33 days. The extract which exhibited the shortest duration in this period was *M. ilicifolia* decoction (1.12 days) and the longest was *M. ilicifolia* polypeptide (1.78 days).

The aqueous extract of *E. pulcherrima* showed pupal period similar to control (*E. pulcherrima* - 10.85 days and Control - 10.46 days). The shortest pupal period was recorded in *R. simsii* polypeptide extract (6.43 days).

The weight of larvae in the control group was 0.2135 g, the lowest weight was recorded in the treatment with *M. ilicifolia* aqueous (0.1970 g) and the treatment with highest weight was *M. ilicifolia* polypeptide (0.2376 g). In contrast to these data, the smallest pupae were observed in *R. simsii* aqueous treatment (14, 58 mm) and the

largest recorded in the *E. pulcherrima* decoction extract (16.22 mm). The mean size in control pupae was 15.58 mm

The total number of adults observed in the control treatment was 20.6 insects, with 10.4 males and 10.2 females, composing 6.8 couples. The treatment with the highest number of adults was *M. ilicifolia* polypeptide with 24.2 insects, with 13 males and 11.2 females, forming approximately 9.2 couples. The *E. pulcherrima* polypeptide extract showed the lowest number of adults in all repetitions (4 adults). There was a difference in the sex ratio of adults in this treatment, with 3 males and 1 female per repetition, it is not possible to form couples in all bioassays.

The number of couples that have made postures in the control group was 6.4, but only about 4.8 postures hatched. The treatment with the lowest number of eggs was *E. pulcherrima* polypeptide, with 2.6 postures per repeat, which 0.2 erupted by bioassay. And the group which had the highest number of eggs was *M. ilicifolia* polypeptide with 7.6 postures per bioassays, where only 5 hatched.

Table 3. Effect data of potential sublethal pesticide plant extracts, three native and exotic plants against larvae of 2nd instar *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae).

Extrats	Corrected mortality (%)	Development time – Days			Measures – Pupae		Adults		Fertility and Fecundity			
		Larva	Pre-Pupae	Pupae	Weight (g)	Length (mm)	Males	Females	Total	N° couples	N° postures	N° postures
Control		20,99	1,33	10,46	0,2135	15,58	10,4	10,2	20,6	6,8	6,4	4,8
<i>Rhododendron simsii</i> - A	45,94 A C	12,83	1,63	8,82	0,2049	14,58	5,4	5,2	10,6	4	3	2
<i>Rhododendron simsii</i> - D	21,3 A B	17,57	1,25	10,01	0,2094	15,35	5,2	5,4	10,6	3,4	2,6	1,2
<i>Rhododendron simsii</i> - P	15,20 A B C	19,4	1,5	6,43	0,2159	15,04	8,4	8	16,4	5,8	4,8	3,2
<i>Euphorbia pulcherrima</i> – A	65,2 A D	13,02	1,42	10,85	0,2254	16,18	5,75	5	10,5	4	3,25	2,25
<i>Euphorbia pulcherrima</i> - D	64,47 A D E	13,73	1,23	9,3	0,2190	16,22	3,8	4	7,8	2,6	2,2	1,8
<i>Euphorbia pulcherrima</i> - P	76,11 A D E	10,43	1,24	9,39	0,2344	15,94	3	1	4	0,8	0,4	0,2
<i>Maytenus ilicifolia</i> – A	7,33 B C F	20,53	1,67	9,80	0,1970	14,84	9,8	9	18,8	5	4	3
<i>Maytenus ilicifolia</i> – D	12,6 A B C F	18,97	1,12	9,94	0,1997	15,26	8,2	7,4	15,2	5,6	4,2	2,4
<i>Maytenus ilicifolia</i> - P	4,73 B C F	19,47	1,78	10,12	0,2376	15,72	13	11,2	24,2	9,2	7,6	5

A – Aqueous, D – Decoction, P – Polypeptide. A, B, C, D, E AND F: Diferent letters among the values mean significant difference at 95 % level ($p < 0.05$)

4 DISCUSSION

In this study the extracts of *E. pulcherrima* caused higher corrected mortality than *M. ilicifolia* and *R. simsii* extracts. The toxicity caused by extracts of this plant could be explained by the presence of phenolic compounds such as quercetin and kaempferol (Mariot & Barbieri, 2007; Alonso & Desmarchelier, 2007; Jesus & Cunha, 2012). Nenaah (2012) reported mortality between 54 and 64% of *Sitophilus oryzae* and *Rhyzopentha dominica*, both beetles, when fed with *Calotropis procera* (Ait.) (Gentianales: Asclepiadaceae) extracts, whose the major secondary metabolites are phenolic compounds such as kaemferol. Moraes-Braga et al. (2013) observed 68% mortality of *Trypanosoma cruzi* exposed to *Lygodium venustum* extract which presents kaempferol and quercetin amonh its main secondary metabolites.

The acute effect of aqueous extract of *R. simsii* may be due to the presence of diterpenes that are powerful deterrents to many species of insects (Schoonhoven et al. 1997). These diterpenoid found in all species of *R. simsii*, are termed graianotoxins and bind to sodium channels in cell membranes increasing permeability of this ion in excitable membranes. This binding is reversible, but can cause serious damage to the affected cells (Felippe, 2009; Lopes et al., 2009). Klocke et al. (1991) obtained LC₅₀ of 8.8 ppm by exposing *S. frugiperda* to the rhodojaponin III, a type of graiatoxina extracted from *Rhododendron molle*.

D’Incao et al. (2012) observed an increase in the larval period by exposing larvae of *S. frugiperda* to 312 ppm saponin extracted from *Passiflora alata* Curtis (1788) (Violales: Passifloraceae). In this work, the pre-pupa and pupa showed no significant difference in duration of treatment compared to the control, a result which confirms the results obtained by D’Incao et al. (2012). The weights and lengths of larvae, as well as the number of couples showed no significant difference between

treatments and control. Ramos-López et al. (2010) observed a gradual decrease in pupal weight of *S. frugiperda* exposed to different extracts of *R. communis*. The present work, the average numbers of eggs and the number of hatched larvae in the treatments did not differ significantly from control.

The results obtained in this study demonstrate the potential insecticide *Euphorbia pulcherrima* and *Rhododendron simsii*. *Maytenus ilicifolia* showed no significant insecticidal effect when used cold aqueous extracts and decoction, and polypeptide extract.

5 REFERENCES

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol., 18: 265 – 267.
- Alonso, J.; C. Desmarchelier. 2007. *Maytenus ilicifolia* Martius (Cangorosa). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 6(1): 11 – 22.
- Alves, D.S., G.A. Carvalho, D.F. Oliveira, R.R. Sâmia, M.A. Villas-Boas, G.A. Carvalho & A.D. Corrêa. 2012. Toxicity of copaíba extracts to armyworm (*Spodoptera frugiperda*). African Journal of Biotechnology, 11: 6578 – 6591.
- Bermúdez-Torres, K., J.M. Herrera, R.F. Brito, M. Wink & L. Legal. 2009. Activity of quinolizidine alkaloids from three Mexican *Lupinus* against the lepidopteran crop pest *Spodoptera frugiperda*. BioControl, 54: 459 – 466.
- Bertholdo-Vargas, L.R., J.N. Martins; D. Bordin, M. Salvador, A.E. Schafer; N.M. de Barros, L. Barbieri, F. Stirpe & C.R. Carlini. 2009. Type 1 ribosome-inactivating proteins-Entomotoxic, oxidative and genotoxic action on *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). J. of Insect Physiol., 55: 51 – 58.
- Castillo, L., A. González-Coloma, A. Gonzáles, M. Días; E. Santos, E. Alonso-Paz, M.J. Bassagoda & C. Rossini. 2009. Screening of Uruguayan plants for deterrent activity against insects. Industrial Crops and Products, 29: 235 – 240.
- Carneiro, F.F.; W. Pignati; R.M. Rigotto; L.G.S. Augusto; A. Rizzolo; N.M. Muller; V.P. Alexandre; K. Friedrich & M.S.C. Mello. 2012. Dossiê ABRASCO – Associação Brasileira de Saúde Coletiva – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1: Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. World Nutrition, Rio de Janeiro.

- da Silva, J.L, R.N.V. Teixeira, D.I.P. Santos & J.O. Pessoa. 2012. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o crescimento in vitro de fitopatógenos. *Revista Verde*, 7: 80 – 86.
- D’Incao, M.P., G. Gosmann, V. Machado, L.M. Fiuza, G.R.P. Moreira. 2012. Effect of Saponin Extracted from *Passiflora alata* Dryander (Passifloraceae) on development of the *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Intern. J. Plant Res.*, 2: 151 – 159.
- dos Santos, N. P. 2005. Theodoro Peckolt: The scientific work of a pioneer in phytochemistry in Brazil. *HHistória, Ciências, Saúde*; 12(2): 515 – 533.
- Felippe, G. 2009. Venenosas: plantas que matam e também curam. Editora Senac São Paulo. São Paulo. 352 p.
- Jesus, W. M. M.; T. N. da Cunha. 2012. Estudo das propriedades farmacológicas da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek) e de duas espécies adulterantes. *Revista Saúde e Desenvolvimento*, 1(1): 20 – 46.
- Kaziyama, V. M.; M. J. B. Fernandes; I. C. Simoni. 2012. Atividade antiviral de extratos de plantas medicinais disponíveis comercialmente frente aos herpesvírus suíno e bovino. *Ver. Bras. Pl. Med.*, 14(3): 522 – 528.
- Knaak, N., M.S. Tagliari, V. Machado & L.M. Fiuza. 2012. Atividade inseticida de extratos de plantas medicinais sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Bioassay*, 7: 1 – 6.
- Klocke, J.A., M.Y. Hu, S.F. Chiu & I. Kubo. 1991. Grayanoid diterpene insect antifeedants and insecticides from *Rhododendron molle*. *Phytochem.*, 30: 1797 – 1800.

- Lopes, R.K., M.R. Ritter & S.M.K. Rates. 2009. Revisão das atividades biológicas e toxicidade das plantas ornamentais mais utilizadas no Rio Grande do Sul. R. Bras. Bioci., 7: 305 – 315.
- Maia-Almeida, C. I., L. C. Ming, M. O. M. Marques, P. M. Magalhães, S. C. N. Queiroz, S. Scramim, M. M. Mischán, I. Montanari-Jr., M. I. Ferreira. 2011. Densidade de plantio e idade de colheita de quebra-pedra [*Phyllanthus amarus* (Schumacher & Thonning) genótipo Unicamp-CPQBA 14] na produtividade de filantina. Ver. Bras. Pl. Med., 13: 633 – 641.
- Mariot, M. P., R. L. Barbieri. 2007. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss e *Maytenus aquifolium* Mart.). Ver. Bras. Pl. Med., 9(3): 89 – 99.
- Moraes-Braga, M. F. B., T. M. Souza, K. K. A. Santos, G. M. M. Guedes, J. C. Andrade, C. Veja, M. Rolón, J. G. M. Costa, A. A. F. Saraiva, H. D. M. Coutinho. 2012. Phenol composition, cytotoxic and anti-kinetoplastidae activities of *Lygodium venustum* SW. (Lygodiaceae). Biochemical Systematics and Ecology, 42: 128 – 133.
- Muñoz, E., C. Lamilla, J.C. Marin, J. Alarcon, C.L. Cespedes. 2013. Antifeedant, insect growth regulatory and insecticidal effects of *Calceolaria talcana* (Calceolariaceae) on *Drosophila melanogaster* and *Spodoptera frugiperda*. Industrial Crops and Products, 42: 137 – 144.
- Nenaah, G. E. 2013. Potential of using flavonoids, látex and extracts from *Calotropis procera* (Ait.) as grain protectants against two coleopteran pests of stored rice. Experimental Parasitology, 134(2): 178 – 182.

- Pavela, R., M. Sajfrtová, H. Sovová, M. Bárnét & J. Karban. 2010. The insecticidal activity of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. Extracts obtained by supercritical fluid extraction and hydrodistillation. *Industrial Crops and Products*, 31: 449 – 454.
- Pouitout, S. & Bues, R. 1970. Élevage de plusieurs espèces de Lépidoptères Noctuidae sur milieu artificiel riche et sur milieu simplifié. *Ann. Ecol. Anim.* 2: 79-91.
- Ramos-López, M.A., S.Pérez, C. Rodriguez-Hernández, P. Guevara-Fefer & M.A. Zavala-Sánchez. 2010. Activity of *Ricinus communis* (Eupobiaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *AJB*, 9: 1359 – 1365.
- Rizwan-ul-Haq, M., Hu, Q. B, Hu, M. Y., Lin, Q. S. & Zhang, W. L. 2009. Biological impact of harmaline, ricine and their combined effects with *Bacillus thuringiensis* on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Pest. Sci.*, 82, 327 – 334.
- Roel, A.R. & J.D. Vendramim. 2006. Efeito residual do extrato acetato de etila de *Trichillia pallida* Swartz (Meliaceae) para lagartas de diferentes idades de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciência Rural*, 36: 1049 – 1054.
- Rossi, G.D., C.D. Santos, G.A. Carvalho, D.S. Alves, L.L.S.Pereira & G.A. Carvalho. 2012. Biochemical analyses os a castor bean leaf extract and its insecticidal effects against *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop. Entomol.*, 41.
- Schoonhoven, L. M.; T. Jermy; J. J. A. van Loon. ????. *Insect – Plant Biology: From physiology to evolution*. Chapman & Hall, London. 409p.

- Simões, C. M. O. [org.], Schenkel, E. P. [org.], Gosmann, G. [org.], de Mello, J. C. P. [org.], Mentz, L. A. [org.] & Petrovick, P. R. [org.]. 2007. Farmacognosia – da planta ao medicamento. 6º edição. Porto Alegre: Editora da UFRGS. 1102 pp.
- Souza, M. R. M.; E. J. A. Correa; G. Guimarães; P. R. G. Pereira. 2009. The Ora-pro-nobis potential as yield diversification to small farmers. Rev. Bras. De Agroecologia, 4(2).
- Yu, S.J., S.N. Nguyen & G.E. Abo-Elghar. 2003. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Pest. Biochem. and Physiol., 77: 1 – 11.
- Zapata, N., F. Budia, E. Viñuela & P. Medina. 2009. Antifeedant and growth inhibitory effects of extracts and drimanes of *Drimys winteri* stem bark against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). Industrial Crops and Products, 30: 119 – 125.

CAPÍTULO 3

Artigo de Pesquisa

Efeitos letais e histopatológicos de extratos obtidos via CO₂ supercrítico de *Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzsch, *Rhododendron simsii* Planch. e *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).

Efeitos letais e histopatológicos de extratos obtidos via CO₂ supercrítico de *Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzsch, *Rhododendron simsii* Planch. e *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).

MARIANNA P. D'INCAO¹, CRISTIANE ALANO¹, RAFAEL NOLIBOS ALMEIDA², CAROLINE G. FINKLER², LUIS F. C. MEDINA¹, EDUARDO CASSEL² & LIDIA M. FIUZA¹

1 Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), PPG em Biologia, Laboratório de Microbiologia e Toxicologia, Av. Unisinos, 950. São Leopoldo, RS.

2 - Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande Do Sul – Puc-RS, Av. Ipiranga, 6681 – Partenon – Porto Alegre. CEP 90619-900

RESUMO

Insetos são a maior fonte de perda de produção na agricultura em todo o mundo. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) é um inseto polífago, que pode ocasionar perdas de 20% a 100% em lavouras de milho, arroz e soja. Portanto o controle desta praga é de extrema importância para agricultura. O método mais utilizado para este controle são os pesticidas químicos, os quais causam poluição dos solos e rios, intoxicação de animais e de agricultores e seus familiares. O uso de plantas com propriedades inseticidas tem se mostrado uma promissora ferramenta no controle de insetos, por causar menor impacto ambiental. Um aspecto muito importante na obtenção de metabólitos secundários de plantas diz respeito ao método de extração empregado. Neste sentido, a aplicação de fluidos pressurizados, em especial CO₂, é uma alternativa na obtenção de extratos vegetais para serem aplicados sobre às lavouras. No presente trabalho foram avaliados extratos obtidos via extração supercrítica de 3 plantas cultivadas no Rio Grande do Sul, Brasil; quanto a sua atividade inseticida. Nos ensaios com *Euphorbia*

pulcherrima observou-se mortalidade corrigida de 51,1 % de *Spodoptera frugiperda*, *Rhododendron simsii* causou mortalidade corrigida de 73,3 % e *Maytenus ilicifolia* 100 %. A CL₅₀ de *M. ilicifolia* foi de 0,104 mg extrato/ml de acetona. *R. simsii* apresentou o maior teor de polifenóis totais (21,19 %), seguido por *M. ilicifolia* (14,49 %) e *E. pulcherrima* (13,82 %). *M. ilicifolia* apresentou a maior capacidade de oxidação do DPPH dentre os três extratos (30,46 g_{extrato}/g_{DPPH}), enquanto *E. pulcherrima* e *R. simsii* apresentaram 65,11 g_{extrato}/g_{DPPH} e 51,35 g_{extrato}/g_{DPPH}, respectivamente. A análise histopatológica do trato gastrointestinal das lagartas mostrou que *R. simsii* e *E. pulcherrima* causam danos ao epitélio do sistema digestivo e que os danos causados por *E. pulcherrima* são mais severos.

KEY-WORDS: insetos-praga, extratos vegetais, histopatologia, bioensaios.

1 INTRODUÇÃO

Spodoptera frugiperda (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), um inseto polífago que se alimenta preferencialmente de plantas da família Poaceae (Sarmiento et al., 2002; D'Incao et al., 2012), é encontrado do sul do Canadá ao o sul do Uruguai e Argentina (Ashley et al., 1989, Sarmiento et al., 2002, Alves et al., 2012). Há registros de ataques da lagarta deste lepidóptero em mais de 80 espécies de plantas, onde, muitas vezes, causam grandes desfolhamentos (Cruz, 1995, Barros et al., 2010).

A rotação de culturas favorece o acesso de *S. frugiperda* em cultivos onde eram consideradas como praga secundária e acabam se tornando uma das pragas principais (Barros et al., 2010). As lagartas se alimentam das folhas, reduzindo a área foliar e afetando a capacidade fotossintética da planta, e conseqüentemente, a produção do cultivo (Sarmiento et al., 2002). A perda na produção de milho, por

ataque de insetos, chega a 31 % em todo o mundo (Rossi et al., 2012). Já no arroz, onde *S. frugiperda* é considerada uma praga de fase inicial, essa perda pode variar de 24 % até a perda total na produção final de grãos (D’Incao et al., 2012).

O controle desta praga é de grande importância para a agricultura. O uso de pesticidas químicos é o método mais utilizado para o controle destas pragas, os quais causam poluição do ambiente, intoxicação de agricultores e seus familiares, prejudicam insetos polinizadores, além de deixarem resíduos no alimento e solo. O uso indiscriminado destas substâncias acaba por desenvolver resistência nos insetos alvo (Oliveira et al., 2007, Senthil-Nathan et al., 2008; Pavela, 2010, Rossi et al., 2012; Muñoz et al., 2013).

O uso de plantas com propriedades inseticidas tem se mostrado uma promissora ferramenta no controle de insetos, por causar menor impacto ambiental (Oliveira et al. 2007; Matos et al., 2009, Pavela et al. 2010, Muñoz et al. 2013,). Um aspecto muito importante na obtenção de metabólitos secundários vegetais, diz respeito ao processo de extração empregado. Alguns dos processos usados são a destilação, tanto direta, quanto por arraste a vapor e solventes orgânicos. Ambos podem produzir extratos de muita qualidade, entretanto a alta temperatura da destilação ou os solventes orgânicos podem gerar alterações no produto final (Maul, 1999).

A extração com fluidos pressurizados supercríticos é uma técnica onde um solvente tem suas propriedades físicas modificadas devido à manipulação da temperatura e da pressão, a qual o mesmo encontra-se submetido. O CO₂ é muito utilizado para este fim, pois é um elemento que não contamina as amostras a serem extraídas, não polui o ambiente e possui uma seletividade de extração maior que os demais solventes utilizados nos diversos métodos de extração. Em se tratando de

metabólitos secundários vegetais, este sistema de extração possui vantagens, pois não modifica ou desnatura as moléculas extraídas devido à baixa temperatura utilizada no processo (aproximadamente 40 °C) (Cassel e Vargas, 2008; Sovová, 2012). Este tipo de extração retira majoritariamente compostos apolares do material, como óleos essenciais, ésteres ou compostos lipofílicos. Para a extração de compostos polares é necessário que se utilize co-solventes como água ou etanol (Maul, 1999; Mazutti et al., 2006, Barroso et al., 2011, Huang et al., 2012).

Assim, este trabalho tem como objetivo principal verificar a letalidade e os efeitos histopatológicos de extratos obtidos via extração supercrítica de três plantas cultivadas no Rio Grande do Sul, *Euphorbia pulcherrima*, *Rhododendron simsii* e *Maytenus ilicifolia* sobre *Spodoptera frugiperda*.

2 MATERIAL E METODOS

2.1 Coleta e criação dos insetos

As colônias de insetos da espécie *S. frugiperda*, oriundas das culturas de milho e arroz, foram criadas condições controladas na Sala de Criação de Insetos, junto ao Laboratório de Microbiologia e Toxicologia da UNISINOS, e foram mantidas até o completo desenvolvimento do presente estudo.

As lagartas foram criadas em sala climatizada a 25 °C, 12 h de fotofase e 70 % de umidade relativa do ar. Foram alimentadas com dieta artificial de Poitout (Poitout & Bues, 1970), sendo as crisálidas separadas por sexo e os adultos obtidos, acondicionados em gaiolas, com solução glicosada e substrato de oviposição.

As colônias de laboratório foram misturadas com populações oriundas de coletas anuais de lagartas da mesma espécie em lavouras da região Sul.

2.2 Coleta e preparação do material vegetal

As folhas das plantas selecionadas para este estudo foram coletadas no Campus da UNISINOS (29 ° 47 ' 47,90 " de latitude Sul e 51 ° 09 ' 24,93 " de longitude Oeste) em São Leopoldo, RS. As coletas foram realizadas no início da manhã, observando-se a ausência de chuva, floração e frutificação.

As folhas foram lavadas com hipoclorito a 10 %, por 10 min, logo após enxaguadas e secas em estufa a 60 °C por 48 h. Depois de secas foram trituradas em moinho de facas até obter-se um pó fino.

2.3 Obtenção dos extratos vegetais via extração com CO₂ Supercrítico

O material vegetal seco e moído foi colocado em cilindros extratores na quantidade de 150 g de pó de cada planta. A extração com CO₂ fluido supercrítico ocorreu à pressão de 250 Bar e temperatura de 40 °C, para a primeira extração. Na segunda extração o processo se repetiu, mas com a adição de 10 % de co-solvente água, para a extração metabólitos polares.

Este processo foi realizado na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, no Laboratório de Operações Unitárias – LOPE.

O material obtido destas extrações foi ressuspenso com acetona para ser aplicado nos bioensaios.

2.4 Análises para determinação de polifenóis totais

A determinação dos polifenóis totais dos extratos obtidos via extração supercrítica de *R. simsii*, *E. pulcherrima* e *M. ilicifolia* foi realizada pelo método de

Folin-Ciocalteu (1927). É um método colorimétrico, onde os resultados são obtidos por leituras de absorvância ($\lambda = 725 \text{ nm}$) em espectrofotômetro comparadas a respostas fornecidas por substâncias padrão. O reagente de Folin-Ciocalteu consiste em uma mistura de ácidos fosfotúngicos e fosfomolibdico, que reduzem-se, em meio básico, ao oxidar os polifenóis, dando origem a óxidos azuis (Singleton & Rossi, 1965). Como padrão foi utilizado o ácido gálico.

Uma massa de 0,015 g de cada extrato foi diluída em 5 ml de etanol 99,5 % e 5ml de água destilada, devido a alta polaridade dos mesmos. Essa solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 ml e o volume foi completado com etanol. Uma alíquota de 0,5 ml desta solução foi transferida para um tubo de fundo cônico, onde foi adicionado 0,5 ml de etanol a 10 % e 1 ml do reagente de Folin-Ciocalteu 1 N. Após agitação foi adicionado 1 ml de carbonato de cálcio a 17 %, sendo agitado novamente. Na testemunha a amostra foi substituída por 0,5 ml de água destilada. Os tubos permaneceram em repouso por 90 min em local protegido da luz. A quantificação foi realizada comparando as leituras dos tubos de amostra e testemunha a uma curva padrão de ácido gálico ($R^2 = 0,9904$). O comprimento de onda utilizado para as leituras foi de $\lambda = 725 \text{ nm}$. A equação gerada a partir dos resultados da curva de calibração para o ácido gálico está apresentada a seguir:

$$y = 240,88x - 0,0287$$

onde: y corresponde à absorvância e x ao valor da concentração de polifenóis totais em mg/ml em relação ao padrão utilizado.

2.5 Análises para a determinação da atividade antioxidante

A determinação do poder antioxidante dos extratos de *R. simsii*, *E. pulcherrima* e *M. ilicifolia* obtidos pelo método de CO₂ super crítico foi realizada através do método definido por Rufino et al. (2007), que é na captura do radical DPPH (2,2 – difenil – 1 – picril - hidrazil) por antioxidantes, o que produz um decréscimo da absorbância.

Os extratos foram diluídos em três concentrações: 1,0 mg/ml, 0,5 mg/ml e 0,25 mg/ml. Em paralelo foi preparada uma solução de DPPH com 0,06 M e distribuída, de 3 em 3 ml, em cubetas. Em ambiente escuro, foram adicionadas às cubetas alíquotas das diluições dos extratos. A leitura da absorbância durou cerca de 2 h, criando uma curva que decai com o tempo até se estabilizar. A partir destes dados foi possível determinar a atividade antioxidante total, expressa em $g_{\text{extrato}}/g_{\text{DPPH}}$, assim como o IC₅₀, expressa em mg/ml, que corresponde a quantidade de cada extrato necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial do radical de DPPH. A equação gerada a partir dos resultados da curva de calibração para uma solução etanólica de DPPH a uma concentração de 0,06 M está apresentada a seguir:

$$y = 0,0146x - 0,0041$$

onde: y corresponde à absorbância e x ao valor da concentração de antioxidantes dos extratos em mg/ml em relação ao padrão utilizado. O comprimento de onda utilizado foi de $\lambda=515$ nm.

2.6 Bioensaios para determinação de efeito letal

Os bioensaios para a determinação do efeito letal dos extratos compreenderam apenas a concentração máxima obtida ao diluir os extratos obtidos via extração supercrítica (*E. pulcherrima* – 0,0525 g/ml; *M. ilicifolia* – 0,00867 g/ml e *R. simsii* – 0,01958 g/ml), 30 insetos por tratamento e três repetições, totalizando 360 insetos por extrato. Os experimentos foram mantidos em incubadora tipo BOD a 25 °C, 70 % de umidade relativa e fotofase de 12 h.

Lagartas de 2 ° ínstar foram mantidas individualmente em mini-placas de acrílico (5 cm de diâmetro), contendo uma fina camada de gel de ágar-ágar e quatro discos foliares de soja perene (*Neonotonia wightii*), com 18 mm de diâmetro, por 7 dias. Em cada disco foliar foi depositado 50 µL do extrato. Foram feitas três testemunhas, com 30 insetos cada; uma com água destilada estéril, uma com acetona e um controle positivo utilizando o bioinseticida Agree® a base de *Bacillus thuringiensis*.

2.7 Determinação da CL₅₀

Os bioensaios para a determinação da Concentração Letal Média (CL₅₀) compreenderam dez concentrações seriadas, partindo do extrato a 100 % até 0,195 %, 30 insetos por tratamento e três repetições, totalizando 540 insetos. Os experimentos foram mantidos em incubadora a 25 °C, 70 % de umidade relativa e fotofase de 12 h.

Lagartas de 2 ° ínstar foram mantidas individualmente em mini-placas de acrílico (5 cm de diâmetro), contendo uma fina camada de gel de ágar ágar e quatro discos foliares de soja perene (*Neonotonia wightii*), com 18 mm de diâmetro por 7

dias. Em cada disco foliar foi depositado 50 µL do extrato. A mortalidade foi avaliada diariamente.

2.8 Análises histopatológicas

Os ensaios para determinação dos efeitos histopatológicos foram conduzidos em incubadora a 25 °C, 70 % de umidade relativa e fotofase de 12 h. Os tratamentos compreenderam apenas os extratos de *R. simsi* e *E. pulcherrima*. A aplicação dos tratamentos foi realizada em mini placas de acrílico com 5 cm de diâmetro com uma fina camada de gel de ágar-ágar, onde foram depositado dois discos foliares tratados com 50 µL de cada extrato vegetal. A duração dos bioensaios foi de 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 horas. Após este intervalo de tempo as lagartas foram fixadas em *Bouin Holande Sublime* (BHS) por 24 h e desidratadas em séries crescentes de etanol (10, 96 e 100 %) seguida por diafanização em xilol, e incluídas em blocos de paraplástico (Brandtzaeg, 1982). Os cortes histológicos longitudinais foram realizados a 5 µm de espessura, com auxílio do Micrótomo de navalha de aço (Zeiss® HM 355).

Na remoção do paraplástico, as lâminas contendo os tecidos passaram por banhos de xilol e etanol, em ordem decrescente de graduação. A coloração dos tecidos de *S. frugiperda*, foi realizada com *Azul de Heidenhain* e as lâminas montadas com Etellan e lamínulas de vidro.

Os tecidos passaram por análise histológica comparada, em microscopia óptica, para avaliação dos tecidos do trato digestório, especialmente na região do mesêntero, de *S. frugiperda*, contrapondo com as lagartas não tratadas com os extratos. As análises foram realizadas em Microscópio de Contraste Interferencial de Fase, com ampliação de 400 vezes (Zeiss® Axio Scope A1). A análise digital e as fotos do mesêntero das lagartas de *S. frugiperda* foram efetuadas e registradas pelo software Axio Vision LE (Zeiss®).

2.9 Análise estatística

A mortalidade obtida a partir dos bioensaios agudos foi corrigida pela fórmula de Abbott (1925). A Concentração Letal (CL₅₀) fora determinada pela análise de Probit (Finney, 1971). Os resultados foram submetidos à análise de Kruskal-Wallis e as médias comparadas por Dwass – Steel – Chritchlow - Flingner a 5 % de probabilidade.

As análises estatísticas foram realizadas com o programa computacional Systat 12.0.

3 RESULTADOS

3.1 Extrato Supercrítico

As concentrações obtidas após a diluição dos extratos com acetona foram: *E. pulcherrima* – 0,0525 g/ml; *M. ilicifolia* – 0,00867 g/ml e *R. simsi* – 0,01958 g/ml. As concentrações se repetiram nos extratos obtidos com e sem co-solvente

3.2 Metabólitos secundários:

- Polifenóis totais

Os resultados da quantificação do teor polifenóis totais, utilizando o método de Folin – Ciocalteau para os extratos supercríticos com co-solvente de *E. pulcherrima*, *M. ilicifolia* e *R. simsi* estão apresentados na Tabela 1. Observa-se que o extrato de *R. simsi* apresentou maior quantidade de polifenóis totais (21,19 %), seguido por *M. ilicifolia* (14,49 %). *Euphorbia pulcherrima* apresentou 13,82 % de polifenóis totais.

Tabela 1. Resultados o teor de polifenóis totais nos extratos supercríticos de *Rhododendron simsii*, *Euphorbia pulcherrima* e *Maytenus ilicifolia*

Extrato	Repetição	Teor de polifenóis totais (%)	Média	Desvio
<i>Rhododendron simsii</i>	1	21,13	21,19	0,23
	2	21,68		
	3	21,19		
<i>Euphorbia pulcherrima</i>	1	13,74	13,82	0,45
	2	14,78		
	3	13,82		
<i>Maytenus ilicifolia</i>	1	14,36	14,49	0,11
	2	14,68		
	3	14,49		

- Polifenóis com atividade antioxidante

Os extratos supercríticos com co-solvente de *E. pulcherrima*, *M. ilicifolia* e *R. simsii* apresentaram ação antioxidante, os valores de IC₅₀ (quantidade de extrato necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial de DPPH) estão na Tabela 2. *E. pulcherrima*, apesar de ter apresentado o menor valor de polifenóis totais, apresentou a maior capacidade antioxidante de DPPH (65,11 g_{extrato}/gDPPH), seguida por *R. simsii*, a qual apresentou maior teor de polifenóis totais (51,35 g_{extrato}/gDPPH). *M. ilicifolia* apresentou a menor capacidade antioxidante dentre as 3 plantas avaliadas.

Tabela 2. Resultados obtidos nos ensaios que avaliam a atividade antioxidante dos extratos obtidos via CO₂ supercrítico de *Rhododendron simsii*, *Euphorbia pulcherrima* e *Maytenus ilicifolia*

Extrato	Repetição	IC ₅₀ (g _{extrato} /g _{DPPH})	Média	Desvio
<i>Rhododendron simsii</i>	1	40,38	51,35	8,14
	2	64,18		
	3	51,35		
<i>Euphorbia pulcherrima</i>	1	61,86	65,11	4,47
	2	65,11		
	3	73,54		
<i>Maytenus ilicifolia</i>	1	30,46	30,46	0,05
	2	30,46		
	3	30,35		

3.3 Efeito letal

Os extratos obtidos via extração supercrítica sem adição de co-solvente de *E. pulcherrima*, *M. ilicifolia* e *R. simsi* não causaram mortalidade significativa de *S. frugiperda* (dados não apresentados).

O extrato obtido via CO₂ supercrítico com adição de co-solvente água, obtido a partir de *M. ilicifolia*, causou mortalidade corrigida de 100 % dos organismos expostos, em 7 dias. Os extratos obtidos via CO₂ supercrítico com adição de co-solvente água de *E. pulcherrima* e *R. simsii* causaram 51,1 % e 73,3 % de mortalidade corrigida respectivamente. Devido a isso apenas a CL₅₀ do extrato de *M. ilicifolia* foi determinada.

3.4 Concentração Letal Média

A CL₅₀ estimada para o extrato obtido via extração supercrítica com adição de co-solvente água de *M. ilicifolia* é de 1,1943 % da concentração inicial do extrato solubilizado, o que equivale a 0,104 mg de extrato/ml de acetona. O intervalo de confiança foi de 0,940 % a 1,507 %.

3.5 Efeitos histopatológicos

As lagartas de *S. frugiperda* tratadas com o extrato obtido via extração supercrítica de *R. simsii* apresentaram alterações morfológicas no mesêntero, que variaram com a cinética dos tratamentos (tempo de exposição), as quais foram observadas 24 horas após a aplicação dos tratamentos (HAT). Nos demais períodos avaliados (48 e 72 h) as diferentes classes de células epiteliais não mantiveram integridade suficiente para comparação ao grupo controle, sendo que a atividade secretora nos tratamentos não diferenciou da testemunha (Figura 1). Foi possível verificar um aumento no número de células projetadas no lúmen juntamente com o produto de secreção a partir de 24 HAT quando utilizado o extrato de *R. simsii*. (Figura 1B).

Após 48 e 72 HAT foram visualizadas modificações teciduais no epitélio intestinal das lagartas de *S. frugiperda* tratadas com *R. simsii*, pois a lâmina epitelial apresentou células delgadas e alongadas quando comparadas com as testemunhas (Figura 1C e 1D), além disso, foi observada a ruptura do epitélio (Figura 1D). Nos tempos de exposição analisados não foi possível observar nitidamente as microvilosidades intestinais, no entanto, a membrana peritrófica se manteve presente em todos os períodos avaliados.

As alterações morfológicas do sistema digestório das lagartas de *S. frugiperda* tratadas com o extrato obtido via CO₂ supercrítico de *Euphorbia pulcherrima* apareceram a partir de 6 HAT (Figura 2B). Nos períodos de 24, 48 e 72 HAT houve ruptura do epitélio (Figura 2C, 2D e 2E) e também foi possível verificar um aumento do volume celular quando comparado a testemunha (Figura 2C). A partir de 24 HAT, a camada epitelial apresentou afastamento da camada muscular (Figura 2C, 24D e 2E). Nos tempos de exposição analisados não foram observadas microvilosidades íntegras nas extremidades das células epiteliais do intestino médio, no entanto, a membrana peritrófica se manteve presente somente até 12 HAT, porém após esse período houve o rompimento dessa estrutura.

Figura 1: Secções longitudinais do intestino médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda* tratadas com *Rhododendron simsii*: testemunha (A), 24HAT (B) e 48 HAT (D). Epitélio (e), Lumén (L), Tecido conjuntivo (tc), Microvilosidades (m), célula caliciforme (cc), Célula colunar (CC). Aumento de 400 vezes. Setas = alterações, HAT = horas após aplicação dos tratamentos.

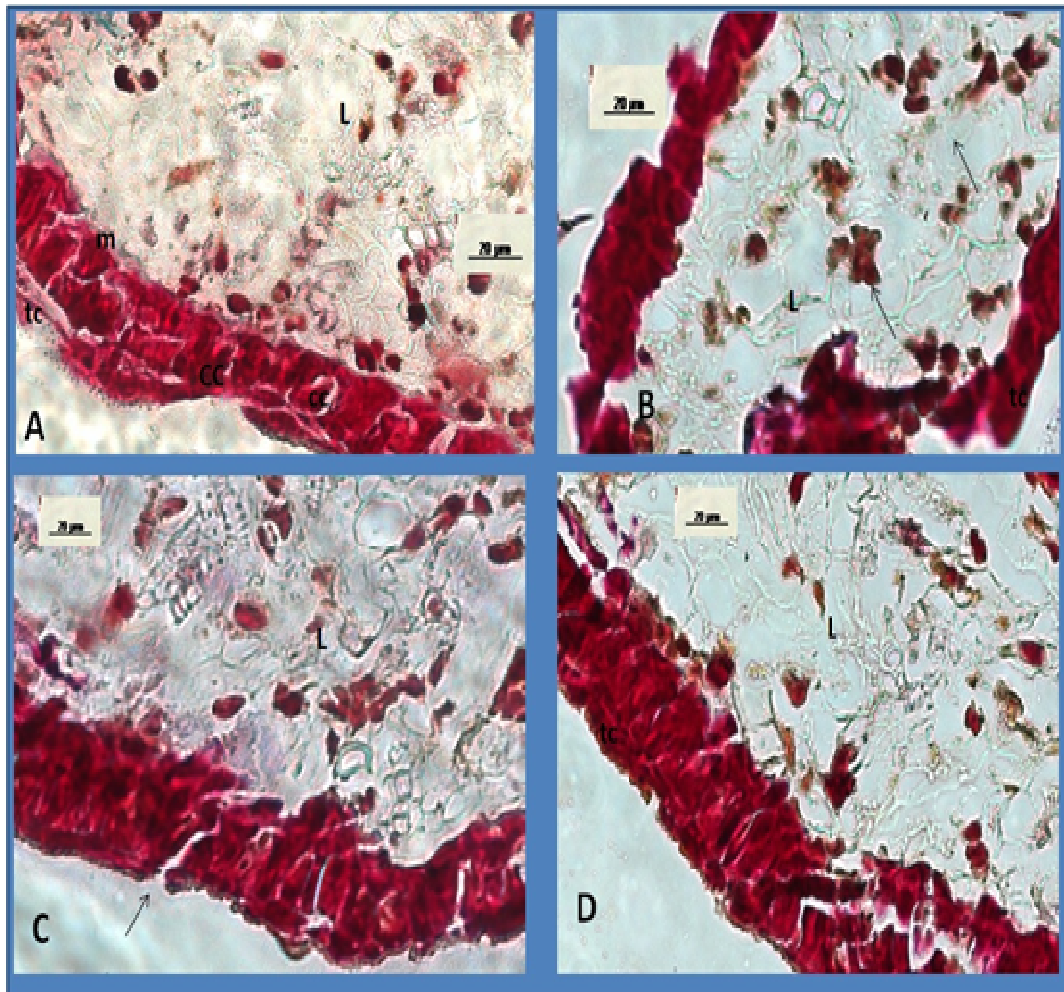
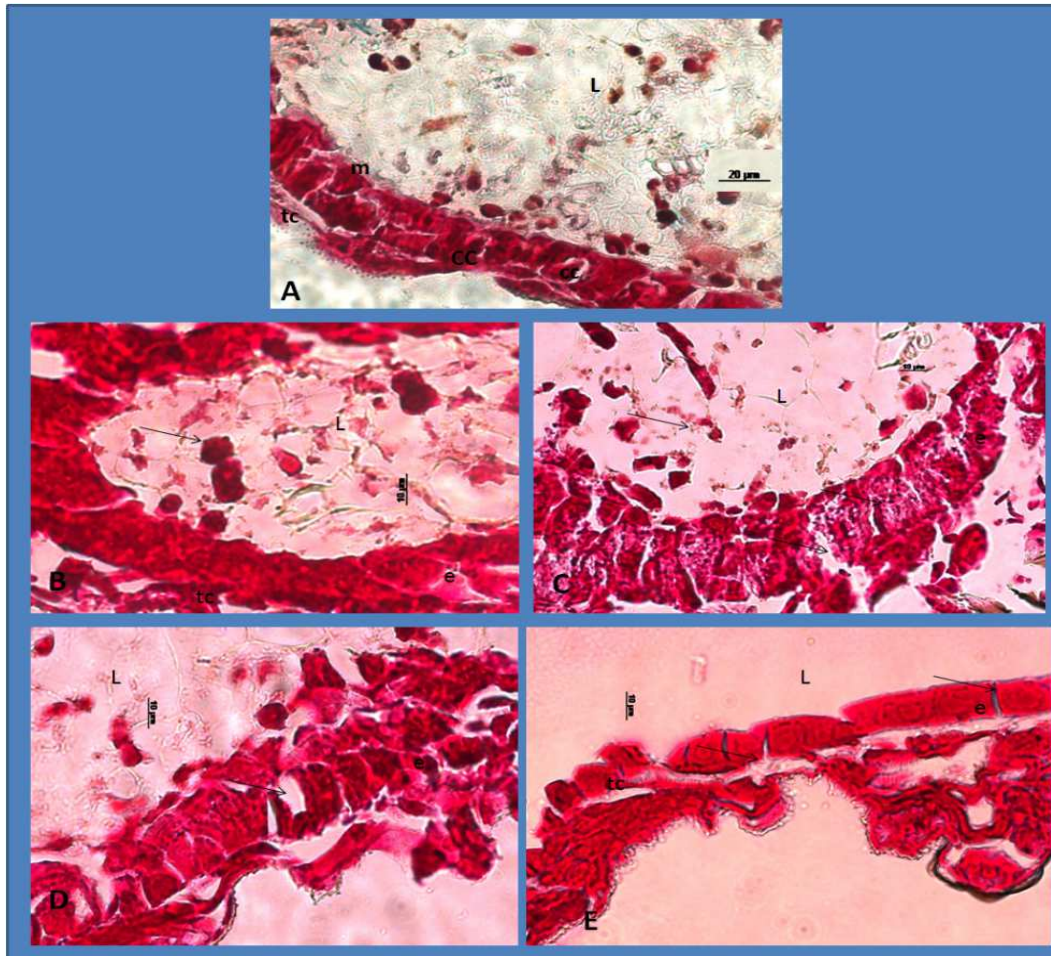


Figura 2: Secções longitudinais do mesêntero de lagartas de *Spodoptera frugiperda* tratadas com *Euphorbia pulcherrima*: testemunha (A), 6 HAT (B), 24 HAT (C), 48 HAT (D) e 72 HAT (E). Epitélio (e), Lúmen (L), Tecido conjuntivo (tc), Microvilosidades (m), célula caliciforme (cc), célula colunar (CC). Aumento de 400 vezes. Setas = alterações, HAT = horas após a aplicação dos tratamentos.



4 DISCUSSÃO

O emprego de extratos vegetais para o controle biológico é uma prática antiga, podendo ter ação deterrente ou causar lesões, reversíveis ou não, que podem resultar na morte do organismo. O fluido supercrítico com CO₂ apresenta algumas vantagens sobre os métodos convencionais de extração, pois não modifica ou desnatura as moléculas, além de não gerar resíduos. Com este método obtém-se principalmente compostos apolares. Para extrair compostos polares é necessária a adição de um co-solvente que possua esta característica.

Neste estudo, os extratos supercríticos, sem a adição de co-solvente, das plantas *Euphorbia pulcherrima*, *Rhododendron simsii* e *Maytenus ilicifolia* não apresentaram atividade biológica sobre as lagartas de *S. frugiperda*. No entanto, com o emprego de água como co-solvente foi observada mortalidade nos bioensaios com os três extratos. A partir disso, podemos inferir que os metabólitos secundários extraídos majoritariamente destas plantas são compostos fenólicos, pois estes compostos apresentam polaridade.

Este fato é confirmado pelos resultados observados nos testes de quantificação de polifenóis totais (Tabela 1) e de ação antioxidante (Tabela 2). A presença de compostos fenólicos nas três espécies botânicas utilizadas para o presente estudo é citada por diversos autores, bem como a ação tóxica destes metabólitos para microrganismos e animais herbívoros (De Loose, 1979; Xavier & D'angelo, 1996; Bittner et al, 2001; Takahashi et al, 2001; Mariot & Barbieri, 2007; Alonso & Desmarchelier, 2007; Jesus & Cunha, 2012).

Segundo De Loose (1979) e Takahashi et al (2001) *Rhododendron simsii* possui como compostos fenólicos majoritários matteucinol, ácido protocatecuico e quercetina. *Euphorbia pulcherrima* apresenta cumarinas, taninos hidrolisáveis

(incluindo ácido gálico) e quinonas dentre os seus metabólitos secundários (Bittner et al, 2001). *Maytenus ilicifolia* contém catequina, epicatequina, ácido tânico, apigenina, cianidina, malvidina, entre outros (Xavier & D'angelo, 1996; Mariot & Barbieri, 2007; Alonso & Desmarchelier, 2007; Santos-Oliveira et al, 2008; Mossi et al, 2009; Pessuto et al, 2009; Jesus & Cunha, 2012). As três espécies apresentam os flavonóis quercetina e kaempferol (De Loose, 1979; Xavier & D'angelo, 1996; Bittner et al, 2001; Takahashi et al, 2001; Mariot & Barbieri, 2007; Alonso & Desmarchelier, 2007; Jesus & Cunha, 2012). Compostos fenólicos são descritos na literatura como barreiras contra a herbivoria de diversas maneiras, inibindo a alimentação, influenciando no ritmo de crescimento e desenvolvimento, alterando a digestibilidade do alimento, sendo letal ao herbívoro ou apenas conferindo um gosto ruim ao vegetal (Harborne, 2001; Simões et al, 2007; Jesus & Cunha, 2012; Taiz & Ziger, 2013; War et al, 2013).

O efeito letal observado na maioria das lagartas de *S. frugiperda* expostas ao extrato de *M. ilicifolia*, no presente estudo, pode ser devido à presença de compostos fenólicos, tais como quercetina, kaempferol e catequina. Estas moléculas são citadas na literatura por possuírem efeito inseticida (Xavier & D'angelo, 1996; Mariot & Barbieri, 2007; Alonso & Desmarchelier, 2007; Santos-Oliveira et al, 2008; Mossi et al, 2009; Pessuto et al, 2009; Jesus & Cunha, 2012).

Nos bioensaios com *E. pulcherrima* e *R. simsi* a mortalidade pode não ter alcançado 100 % devido à concentração de metabólitos secundários nos extratos utilizados, pois estas plantas produzem diversos compostos com ação inseticida (De Loose, 1979; Xavier & D'angelo, 1996; Bittner et al, 2001; Takahashi et al, 2001; Mariot & Barbieri, 2007; Alonso & Desmarchelier, 2007; Jesus & Cunha, 2012).

No sistema digestório das formas imaturas dos lepidópteros, a região epitelial do mesêntero dos insetos apresenta células colunares, caliciformes, regenerativas e endócrinas (Cavalcante & Cruz-Landim, 1999; Pinheiro et al., 2003). No presente estudo, as análises de histopatologia comparada foram direcionadas na integridade das células colunares e caliciformes que são recobertas por prolongamentos celulares denominados microvilosidades, pois as células endócrinas são de difícil identificação com a metodologia utilizada (Cassier & Frain-Maurel, 1977; Montuega et al, 1989; Jimenez & Gilliam, 1990; Correia et al., 2009).

Na análise dos dados, verificou-se que a ingestão dos aleloquímicos pode diminuir o consumo alimentar das lagartas (Knaak et al., 2012). Visto que, essas substâncias são caracterizadas como não nutritivas produzidas por espécies vegetais, geradoras de alterações no crescimento, comportamento e biologia do organismo de quem se nutre dela (Slansky, 1982; Slansky, 1993; Vendramim & Castiglioni, 2000).

O gênero *Rhododendron* possui entre os seus metabólitos secundários o matteucinol, um flavonóide que pode se ligar fortemente aos canais de sódio da membrana plasmática, podendo aumentar a permeabilidade desse íon em membranas excitáveis, além de inibir a atividade da acetilcolinesterase (Lopes et al, 2009; Takahashi et al, 2001). Consequentemente, as lagartas tratadas com esses compostos vegetais cessam a alimentação devido a estas substâncias tóxicas; porém, as toxinas continuam a agir e algumas modificações estruturais são evidenciadas conforme a Figura 1, a partir das 24 horas, como por exemplo: aumento de células projetadas no lúmen, ruptura do epitélio, células delgadas e alongadas, que podem resultar do enfraquecimento das lagartas de *S. frugiperda*, submetidas ao tratamento com *R. simsii*. Apesar das alterações citadas, a

membrana peritrófica se manteve intacta em todos os períodos de tratamento com este extrato corroborando os dados de Correia et al (2009) que evidenciaram inalterações da membrana peritrófica das lagartas de *S. frugiperda* tratadas com Nim (*Azadirachta indica*). Contudo, mesmo evidenciando a presença da membrana peritrófica íntegra em todos os intervalos dos tratamentos, essa estrutura não foi suficiente para impedir a ação do extrato supercrítico de *R. simsii* sobre o epitélio e evitar os danos ocasionados no mesêntero das lagartas de *S. frugiperda*.

No caso do tratamento com *E. pulcherrima*, a membrana peritrófica sofreu degradação, desaparecendo a partir das 12 HAT (Figura 2). Esta membrana, de acordo com diversos autores (Terra, 1988; Chapman, 1988; Terra, 2001; Bolognesi et al, 2008) tem a função de proteção para o epitélio contra os danos mecânicos e químicos provocados pelo alimento, atuando como uma barreira física contra microrganismos e na compartimentalização da digestão.

Os resultados da análise do mesêntero de *S. frugiperda* tratadas com os extratos obtidos com dióxido de carbono supercrítico de *E. pulcherrima* mostraram que este tratamento foi mais eficiente quando comparado ao extrato supercrítico de *R. simsii*, pois as alterações morfológicas iniciaram 2 períodos antes (6 horas após aplicação dos tratamentos).

Não foram visualizados prolongamentos celulares do tipo microvilosidades em nenhuma das lagartas submetidas aos tratamentos analisadas no presente estudo. Nos insetos, as microvilosidades são consideradas muito importantes, pois estão envolvidas na digestão, absorção de nutrientes, água e secreção de líquidos (Terra et al, 1996). A ruptura das células epiteliais observada no tratamento com *E. pulcherrima*, a partir das 24 HAT, e com *R. simsii*, a partir das 48 HAT, pode estar associada a redução no gradiente eletroquímico de K na célula (Liebig et al, 1995).

Da mesma forma, Baines et al. (1997) constataram que o colapso provocado no gradiente eletroquímico no epitélio do intestino médio causa a morte do inseto. Nesse sentido, quando utilizados extratos supercríticos de *E. pulcherrima* e *R. simsii*, estes também podem provocar um desequilíbrio iônico entre as células e o meio externo que leva o inseto a morte.

Knaak et al. (2010) analisando o mesêntero das lagartas de *S. frugiperda*, tratadas com macerado e infusão de diversos extratos vegetais, encontraram diversas alterações como projeções de células epiteliais na luz intestinal, degradação da membrana peritrófica e das microvilosidades, resultados que também foram encontrados nesta pesquisa, confirmando o potencial de utilização de extratos vegetais para o controle da praga-alvo.

O extrato obtido com dióxido de carbono supercrítico de *E. pulcherrima* foi mais ativo quando comparado ao de *R. simsii*, pois acelerou o processo de histólise no mesêntero das lagartas de *S. frugiperda*, o que leva, provavelmente, ao funcionamento anormal dos tecidos alterando a secreção de enzimas e a absorção dos nutrientes. De acordo com D’Incao et al. (2013) (artigo submetido), os extratos aquosos e polipeptídicos destas mesmas espécies botânicas, não causaram taxas de mortalidade tão elevadas quanto as observadas no presente trabalho, o que indica que o processo de extração com CO₂ supercrítico é mais eficiente na obtenção dos metabólitos secundários com ação inseticida produzidos pelas plantas utilizadas nesse estudo.

5 REFERENCIAS

- Abbott, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticida. J. Econ. Entomol., 18, 265 – 267, 1925.
- Alonso, J.; C. Desmarchelier. 2007. *Maytenus ilicifolia* Martius (Cangorosa). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 6(1): 11 – 22.
- Jesus, W. M. M.; T. N. da Cunha. 2012. Estudo das propriedades farmacológicas da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek) e de duas espécies adulterantes. Revista Saúde e Desenvolvimento, 1(1): 20 – 46.
- Alonso, J.; C. Desmarchelier. 2007. *Maytenus ilicifolia* Martius (Cangorosa). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 6(1): 11 – 22.
- Alves, D.S., G.A. Carvalho, D.F. Oliveira, R.R. Sâmia, M.A. Villas-Boas, G.A. Carvalho & A.D. Corrêa. 2012. Toxicity of copaíba extracts to armyworm (*Spodoptera frugiperda*). African Journal of Biotechnology, 11: 6578 – 6591.
- Ashley, T.R.; B.R. Wiseman; F.M. Davis & K.L. Andrews. 1989. The Fall Armyworm: A Bibliography. Florida Entomologist, 72, 152 – 202.
- Barros, E.M., J.B. Torres, J.R. Ruberson, M.D. Oliveira. 2010. Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. Entomologia Experimentalis et Applicata, 137: 237 – 245.
- Barroso, M.S.T., G Villanueva, A.M. Lucas, G.P. Perez, R.M.F. Vargas, G.W. Brun, E. Cassel. 2011. Supercritical fluid extraction of volatile and non volatile compounds from *Schinus molle* L.. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 28(2): 305 – 312.

- Bittner, M., J. Alarcón, P. Aqueveque, J. Becerra, V. Hernández, M. Hoeneisen, M. Silva. 2001. Estudio químico de espécies de la família Euphorbiaceae em Chile. Boletín de la Sociedade Chilena de Química, 46(4).
- Bolognesi, R., W. R. Terra, C. Ferreira. 2008. Peritrophic membrane role in enhancing digestive efficiency: Theoretical and experimental models, 54: 1413 – 1422.
- Brandtzaeg, P. Tissue preparation methods for imunocytochemistry. In: Bullock G., Petruz P. Techniques in imunocytochemistry. Londres: *Academic Press*, 1982.
- Cassel, E., R. Vargas. 2008. Supercritical Extraction of Essential Oil From *Ilex Paraguariensis* Leaves. Natural Product Communications. Vol. 3(3), pp. 373 – 378.
- Cassier, P.; Frin-Maruel, M. A. 1977. Sur la présence d`um système endocrine diffus dans le mésenteron de quelques insectes. Archs Zool Exp Gén, 118:197-209.
- Cavalcante, V.M.; Cruz-Landim, C. 1999. Types of cells presente in the midgut of the insects. Naturalia, 24: 19-39.
- Chapman, R. F. 1998. The insects: structure and function. 4ed. Cambridge: Cambridge University Press, 770p.
- Correia, Alicely A; Teixeira, Valéria W; Teixeira, Álvaro A. C.; Oliveira, José V. de; Torres, Jorge B. 2009. Morfologia do Canal Alimentar de Lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Alimentadas com Folhas de Nim. Neotropical Entomology, 38(1):083-091.
- Cruz, I. 1995. A Lagarta do Cartucho do Milho. EMBRAPA/CNPMS, 45p. (EMBRAPA/CNPMS. Circular técnica, 21).
- de Loose, R. 1979. Characterization of *Rhododendron simsii* Planch. Cultivars by flavonoid and isoenzyme markers. Scientia Horticulture, 11: 175 – 182.

- Dietrich, J.P., C. Schmitz, C. Müller, M. Fader, H. Lotze-Campen, A. Popp. 2012. Measuring agricultural land-use intensity – A global analysis using a model-assistant approach. *Ecological Modelling*, n: 232, p: 109 – 118.
- D’Incao, M.P., G. Gosmann, V. Machado, L.M. Fiuza, G.R.P. Moreira. 2012. Effect of Saponin Extracted from *Passiflora alata* Dryander (Passifloraceae) on development of the *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Intern. J. Plant Res.*, 2: 151 – 159.
- D’Incao, M. P., B. C. de Quadros, P. Soares, L. M. Fiuza. 2013. Lethal and sublethal effects of leaves extracts, from native and exotic plants in Southern Brazil, against *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) caterpillars. *J. Agr. Sci and Technology*, submetido.
- Finney, D. J. Probit Analysis. Cambridge, Cambridge University Press, 255p, 1971.
- Folin, O; Ciocalteau, V. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *Journal of Biology and Chemistry*, v. 73, p.424-427, 1927.
- Harborne, J. B. 2001. Twenty-five years of chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.* 18: 361 – 379.
- Huang, Z., X. Shi, W. Jiang. 2012. Theoretical models for supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 1250: 2 – 26.
- Jesus, W. M. M.; T. N. da Cunha. 2012. Estudo das propriedades farmacológicas da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek) e de duas espécies adulterantes. *Revista Saúde e Desenvolvimento*, 1(1): 20 – 46.
- Jimenez, D.; Gilliam M. 1990. Ultrastructure of the ventriculus of the honey bee, *Apis mellifera* L.: cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase, and non specific esterase. *Cell Tiss Res.* 261: 431:443.

- Knaak, N.; Tagliari, M. S.; Fiuza, L. M. 2010. Histopatologia da interação de *Bacillus thuringiensis* e Extratos Vegetais no Intestino Médio de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Arq. Inst. Biol. 77: 83-89, n.1.
- Knaak, N.; Tagliari, M. S.; Machado, V.; Fiuza, L. M. 2012. Atividade Inseticida de Extratos de Plantas Medicinais sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Revista BioAssay, 7:1-6.
- Liebig, B.; Stetson, D. L.; Dean, D.H. 1995. Quantification of the effects of *Bacillus thuringiensis* toxins on shortcircuit current in the midgut of *Bombyx mori*. Journal of Insect Physiology. V. 41, 17:22.
- Lopes, R. K; Ritter, M. R.; Rates, S. M. K. 2009. Revisão das atividades biológicas e toxicidade das plantas ornamentais mais utilizadas no Rio Grande do Sul. Revista Brasileira de Biociências, 7 (3): 305-315.
- Mariot, M. P., R. L. Barbieri. 2007. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss e *Maytenus aquifolium* Mart.). Ver. Bras. Pl. Med., 9(3): 89 – 99.
- Matos, A.P., L. Nebo, P.C. Vieira, J.B. Fernandes, M.F.G. Fernandes. 2009. Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichillia elegans* e *T. catiguá* (Meliaceae). Química Nova, 32(6): 1553 – 1556.
- Maul, A. A. 1999. Fluidos supercríticos: situação atual e futura da extração supercrítica. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, 2(11): 42 – 46.
- Mazutti, M., B. Beledelli, A.J. Mossi, R.L. Cansian, C. Dariva, J.V. Oliveira. 2006. Caracterização química de extratos de *Ocimum basilicum* L. obtidos através de extração com CO₂ a altas pressões. Química Nova, 29(6): 1198 – 1202.

- Montuega, L. M.; Barrenechea, M.A.; Sesma, P.; Vásquez, J.J. 1989. Ultrastructure and immunocytochemistry of endocrine cells in the midgut of desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *Cell Tissue Res.* 258: 577-583.
- Mossi, A. J., M. Mazutti, N. Paroul, M. L. Corazza, C. Dariva, R. L. Cansian, J. V. Oliveira. 2009. Chemical variation of tannins and triterpenes in Brazilian populations of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. *Braz. J. Biol.*, 69(2): 339 – 345.
- Muñuz, E., C. Lamilla, J.C. Marin, J. Alarcon, C.L. Cespedes. 2013. Antifeedant, insect growth regulatory and insecticidal effects of *Calceolaria talcana* (Calceolariaceae) on *Drosophila melanogaster* and *Spodoptera frugiperda*. *Industrial Crops and Products*, 42: 137 – 144.
- Oliveira, M.S.S., A.R. Roel, E.J. Arruda, A.S. Marques. 2007. Eficiência de produtos vegetais no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciênc. Agrotec.*, 31(2): 326 – 331.
- Pavela, R., M. Sajfrtová, H. Sovová, M. Bárnét & J. Karban. 2010. The insecticidal activity of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. Extracts obtained by supercritical fluid extraction and hydrodistillation. *Industrial Crops and Products*, 31: 449 – 454.
- Pessuto, M. B., I. C. Da Costa, A. B. De Souza, F. M. Nicoli, J. C. P. De Mello. 2009. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. *Quim. Nova*, 32(2): 412 - 416.
- Pinheiro, D. O.; Silva, R. J.; Quagio-Grassiotto I.; Gregorio E. A. 2003. Morphometric study of the midgut epithelium in larvae of *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae). *Neotropical Entomology*, 32: 453-459.

- Pouitout, S.; Bues, R. 1970. Élevage de plusieurs espèces de Lépidoptères Noctuidae sur milieu artificiel riche et sur milieu simplifié. *Ann. Ecol. Anim.* 2: 79-91.
- Rossi, G.D., C.D. Santos, G.A. Carvalho, D.S. Alves, L.L.S.Pereira & G.A. Carvalho. 2012. Biochemical analyses of the castor bean leaf extract and its insecticidal effects against *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop. Entomol.*, 41.
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. D., Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH, *Comunicado Técnico On-line*, Fortaleza-CE, junho, 2007.
- Santos-Oliveira, R.; S. Coulaud-Cunha, W. Colaço. 2008. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. *Rev. Bras. De Farmacognosia*, 19(2B): 650 – 659.
- Sarmiento, R. A., R. W. S. Aguiar, R. A. S. S. Aguiar, S. M. J. Vieira, H. G. Oliveira, A. M. Holtz. 2002. Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em milho no Brasil. *Biosci. J.*, 18(2): 41 – 48.
- Senthil-Nathan, S., M.Y. Choi, C.H. Paik, K. Kalaivani. 2008. The toxicity and physiological effect of goniothalamine, a styryl-pyrone, on the generalist herbivore, *Spodoptera exigua* Hübner. *Chemosphere*, 72: 1393 – 1400.
- Simões, C. M. O. [org.]; Schenkel, E. P. [org.]; Gosmann, G. [org.]; De Mello, J. C. P. [org.]; Mentz, L. A. [org.]; Petrovick, P. R. [org.]. 2007. Farmacognosia – da planta ao medicamento. 6 ed. Porto alegre: UFRGS, 1102p.

- Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acids reagents. American Journal of grape marc phenolics *Journal of Food Engineering*, v.81, p.200-208, 1965.
- Slansky-Jr., F. 1982. Insect nutrition: An adaptationist's perspective. Florida Entomologist, 65(1): 45 – 71.
- Slansky-Jr., F. 1993. Nutritional Ecology: The fundamental quest for nutrients. In: Caterpillars ecological and evolutionary constraints in foraging. Stamp, N. G., T. M. Casey. New York. 587p.
- Sovová, H. 2012. Modeling the supercritical fluid extraction of essential oils from plant material. *Journal of Chromatography A*, 1250: 27 – 33.
- Takahashi, H.; Hirata, S; Minami, H.; Fukuyama, Y. 2001. Triterpene and flavone glycoside from *Rhododendron simsii*. *Phytochemistry*, 56 (8): 875-879.
- Terra, W. R. 1988. Physiology and biochemistry of insect digestion: a evolutionary perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 21, 675-734.
- Terra, W. R.; Ferreira, C.; Baker, J.E. 1996. Compartmentalizations of digestion. *In*: Lehane, M. J.; Billingsly, P. F. *Biology of the Insect Midgut*. London: Chapman and Hall. 206-235.
- Terra, W. R. 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 47: 47 – 61.
- Vendramim, J. D.; Castiglioni, E. 2000. Aleloquímicos, Resistência de Plantas e Plantas Inseticidas. *In*: Guedes, J. C.; Costa, I. D.; Castiglioni, E. *Bases e Técnicas do Manejo de Insetos*. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 113-128.

- War, A. R., M. G. Paulraj, B. Hussain, A. A. Buhroo, S. Ignacimuthu, H. C. Sharma. 2013. Effect of plant secondary metabolites on legume pod borer, *Helicoverpa armigera*. J. Pest. Sci., 1(86).
- Xavier, H. S., L. C. A. D'angelo. 1996. Perfil cromatográfico dos componentes polifenólicos de *Maytenus ilicifolia* Mart. (Celastraceae). Rev. Bras. De Farmacognosia, 1: 20 – 28.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir das pesquisas realizadas no presente estudo, pode-se afirmar que as plantas *Euphorbia pulcherrima*, *Rhododendron simsii* e *Maytenus ilicifolia* apresentam potencial ação inseticida contra *Spodoptera frugiperda*.

Observa-se que os diferentes métodos de extração dos metabólitos secundários resultaram em extratos vegetais com respostas diversas quanto ao potencial inseticida.

E, apesar de serem necessários mais estudos para o isolamento e a identificação das moléculas ativas destas plantas, é possível inferir a classe química das mesmas, como os compostos fenólicos, pois os mesmos são polares e apresentam ação antioxidante, além da presença de polifenóis totais.

Além dos dados obtidos nessa pesquisa recomenda-se a continuidade e o aprofundamento na investigação dos sítios de ação destes metabólitos secundários sistema digestivo do inseto-praga alvo do presente estudo, *Spodoptera frugiperda*, e outros de importância agrícola, na saúde humana e animal.

REFERÊNCIAS

- ANVISA, 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br> Acessado em: 24 nov. 2010.
- Ashley, T.R.; B.R. Wiseman; F.M. Davis & K.L. Andrews. 1989. The Fall Armyworm: A Bibliography. **Florida Entomologist**, 72, 152 – 202.
- Borgoni, P.C.; Vendramim, J. D. 2003. Bioatividade de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **Neotropical Entomology**, 32: 665-669.
- Canal do Produtor, 2009. Disponível em:
<<http://www.cna.org.br/site/noticia.php?ag=1&n=16760>> Acessado em: 06 out. 2009.
- Ehrlich, P.R.; Raven, P. H. 1965. Butterflies and plants: a study in coevolution. **Evolution**, 18, 586-608.
- Esalq, 2010. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/pib/>> Acessado em: 03 ago 2010.
- Estrela, J.L.V.; Guedes, R.N.C; Maltha, C.R.A.; Fazolin, M. 2003. Toxicidade de Amidas Análogas à Piperina a Larvas de *Ascia monuste orseis* Godart (Lepidoptera: Pieridae) e *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, 32: 343-346.
- Gonzaga, A. D.; Garcia, M. V. B; De Souza, S. G. A.; Py D.; Correa, R. S.; Ribeiro, J. D. 2008. Toxicity of *cassava manipueira* (*Manihot esculenta* Crantz) and erva-de-rato (*Palicourea marcgravii* St Hill) to adults of *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae). **Acta Amazonica**, 38: 101-106.
- Gutiérrez, G. P. A; Villegas, M. C. V. 2008. Efecto tóxico de *Verbena officinalis* (familia verbenaceae) em *Sitophilus granarius* (coleoptera: curculionidae). **Revista Lasallista de Investigación**, 5: 74 – 82.
- Lima, J. F. M.; A. D. Grützmecher; U. S. da Cunha; M. P. Porto; J. F. S. Martins & G. O. Dalmazo. 2008. Ação de inseticidas naturais no controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho cultivado em agroecossistema de várzea. **Ciência Rural** 38: 607-613.
- Mairesse, L. A. S. 2005. Avaliação da bioatividade de extratos de espécies vegetais, enquanto excipientes de aleloquímicos. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Maria.

- Mello, M.O.; Silva-Filho, M.C. 2002. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 14: 71-81.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. 2010. **Projeções do Agronegócio – Brasil – 2000/10 a 2019/20**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Assessoria de Gestão Estratégica. Brasília: MAPA/ACS, 2010: 76p.
- Rharrabe, K.; Sayah, F.; LaFont, R. 2010. Dietary effects of four phytoecdysteroids on growth and development of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. **Journal of Insect Science**, 10.
- Rizwan-ul-Haq, M.; Hu, Q. B; Hu, M. Y.; Lin, Q. S.; Zhang, W. L. 2009. Biological impact of harmaline, ricine and their combined effects with *Bacillus thuringiensis* on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **J. Pest. Sci.**, 82, 327 – 334.
- Secretaria da Agricultura, Pecuária, Pesca e Agronegócio – SEAPPA. 2009. **Agricultura em Destaque – Produtos Selecionados**. Secretaria da Agricultura, Pecuária, Pesca e Agronegócio – Departamento de Planejamento e Fomento Agropecuário – SEAPPA/DPFA. Governo do Estado do Rio Grande do Sul.
- Secretaria de Agricultura e Abastecimento - SAA, 2009. Disponível em: <http://www.saa.rs.gov.br/portal/index.html> Acesso em: 04 out. 2009.
- Tagliari, M.S.; Knaak, N.; Fiuza, L.M. 2004. Plantas inseticidas: interações e compostos. **Pesq. Agrop. Gaúcha** 10: 101-111.
- Zapata, N.; Budia, F.; Viñuela, E.; Medina, P. 2009. Antifeedant and growth inhibitory effects and drimanes of *Drimys winteri* stem bark against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). **Industrial Crops and Products**, 30, 119 – 125.

ANEXO - PUBLICAÇÕES DA AUTORA NO PERÍODO DA TESE

- Apresentações de trabalho em congressos:

- D’Incao, M. P., P. Soares, B. Quadros, J. V. de Oliveira, L. M. Fiuza. 2011. Potencial inseticida de *Rhododendron simsii* e *Euphorbia pulcherrima* à *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lep., Noctuidae). 12º Simpósio de Controle Biológico, São Paulo. Julho de 2012.
- Soares, P., M. P. D’Incao, M. Cassal, J. V. de Oliveira, L. M. Fiuza. 2011. Efeito de extratos de folhas de *Euphorbia milii*, *Eugenia uniflora* e *Pachystrome longifolium* às lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lep., Noctuidae). 12º Simpósio de Controle Biológico, São Paulo. Julho de 2012.
- D’Incao, M. P., P. Soares, L. M. Fiuza. 2011. Inseticidas naturais contra pragas de lavoura. IV Seminário sobre Tecnologias Limpas e VI Fórum Internacional de Produção mais Limpa. – Porto Alegre – Junho de 2011.
- D’Incao, M. P., P. Soares, B. C. de Quadros, J. V. Oliveira, L. M. Fiuza. 2011. Toxicidade de diferentes extratos de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss à lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797). VII Congresso Brasileiro do Arroz Irrigado: Racionalizando recursos e ampliando oportunidades – Balneário Camburiu – Agosto de 2011.
- Soares, P., M. P. D’Incao, B. C. de Quadros, J. V. Oliveira, L. M. Fiuza. 2011. Eficiência de extratos vegetais de *Euphorbia pulcherrima* no controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera, Noctuidae). VII Congresso Brasileiro do Arroz Irrigado: Racionalizando recursos e ampliando oportunidades – Balneário Camburiu – Agosto de 2011.
- D’Incao, M. P., B. C. de Quadros, L. M. Fiuza. 2012. Efeito agudo e crônico de três diferentes extratos de *Euphorbia pulcherrima* sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae). I Simpósio de Integração das Pós Graduações do CCB – Florianópolis – Agosto de 2012.
- D’Incao, M. P., B. C. de Quadros, L. M. Fiuza. 2012. Efeito de extratos por decocção de *Maytenu ilicifolia* e *Euphorbia pulcherrima* sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera, Noctuidae). II CICPG – Congresso de Iniciação Científica e Pós-graduação: pesquisa e inovação – os caminhos para o desenvolvimento e sustentabilidade. – São Leopoldo – Setembro de 2012.

- Resumos publicados em anais de congressos

- D’Incao, M. P., P. Soares, B. Quadros, J. V. de Oliveira, L. M. Fiuza. 2011. Potencial inseticida de *Rhododendron simsii* e *Euphorbia pulcherrima* à *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lep., Noctuidae). 12º Simpósio de Controle Biológico, São Paulo. Julho de 2012.
- Soares, P., M. P. D’Incao, M. Cassal, J. V. de Oliveira, L. M. Fiuza. 2011. Efeito de extratos de folhas de *Euphorbia milii*, *Eugenia uniflora* e *Pachystrome longifolium* às lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lep., Noctuidae). 12º Simpósio de Controle Biológico, São Paulo. Julho de 2012.
- D’Incao, M. P., P. Soares, L. M. Fiuza. 2011. Inseticidas naturais contra pragas de lavoura. IV Seminário sobre Tecnologias Limpas e VI Fórum Internacional de Produção mais Limpa. – Porto Alegre – Junho de 2011.
- D’Incao, M. P., P. Soares, B. C. de Quadros, J. V. Oliveira, L. M. Fiuza. 2011. Toxicidade de diferentes extratos de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss à lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797). VII Congresso Brasileiro do Arroz Irrigado: Racionalizando recursos e ampliando oportunidades – Balneário Camburiu – Agosto de 2011.
- Soares, P., M. P. D’Incao, B. C. de Quadros, J. V. Oliveira, L. M. Fiuza. 2011. Eficiência de extratos vegetais de *Euphorbia pulcherrima* no controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera, Noctuidae). VII Congresso Brasileiro do Arroz Irrigado: Racionalizando recursos e ampliando oportunidades – Balneário Camburiu – Agosto de 2011.
- D’Incao, M. P., B. C. de Quadros, L. M. Fiuza. 2012. Efeito agudo e crônico de três diferentes extratos de *Euphorbia pulcherrima* sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae). I Simpósio de Integração das Pós Graduações do CCB – Florianópolis – Agosto de 2012.
- D’Incao, M. P., B. C. de Quadros, L. M. Fiuza. 2012. Efeito de extratos por decocção de *Maytenu ilicifolia* e *Euphorbia pulcherrima* sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera, Noctuidae). II CICPG – Congresso de Iniciação Científica e Pós-graduação: pesquisa e inovação – os caminhos para o desenvolvimento e sustentabilidade. – São Leopoldo – Setembro de 2012.