

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Busca por compostos de *Trichilia pallida* Swartz, *Trichilia pallens* C. DC.
e *Toona ciliata* M. Roemer com bioatividade sobre *Spodoptera frugiperda*
(J. E. Smith, 1797)**

Angelina Maria Marcomini Giongo

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora
em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2014**

Angelina Maria Marcomini Giongo
Bióloga

**Busca por compostos de *Trichilia pallida* Swartz, *Trichilia pallens* C. DC. e *Toona ciliata*
M. Roemer com bioatividade sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797)**

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ DJAIR VENDRAMIM**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora
em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Giongo, Angelina Maria Marcomini

Busca por compostos de *Trichilia pallida* Swartz, *Trichilia pallens* C. DC. e *Toona ciliata* M. Roemer com bioatividade sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) / Angelina Maria Marcomini Giongo.- - Piracicaba, 2014.
104 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Meliaceae 2. Frações 3. Cedrelona 4. Índices nutricionais 5. Fagodeterrência
6. Atividade enzimática I. Título

CDD 632.78
G496b

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte -O autor"

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me deu saúde, força e sempre colocou pessoas boas em meu caminho, que de uma forma ou de outra me ajudaram a realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. José Djair Vendramim, pela orientação, confiança e oportunidade de realizar este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao INCT Controle Biorracional de Insetos Pragas, do qual este trabalho faz parte, principalmente à Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva e à doutoranda Sâmia Danielle Lima de Freitas, do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), com quem o trabalho foi desenvolvido diretamente.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, por todos os ensinamentos e conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Fernando Luis Consoli, por me ceder espaço em seu laboratório para realizar os ensaios enzimáticos e por me auxiliar em várias etapas desta pesquisa; ao Prof. Dr. José Roberto Postalí Parra, pelo auxílio na interpretação dos índices nutricionais, e ao Prof. Celso Omoto, pelo empréstimo do aparelho microaplicador para os testes de contato.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, pelos serviços prestados.

À Dra. Marineia Lara Haddad e à Profa. Sônia Maria Stefano Piedade, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À técnica do laboratório de Biologia de Insetos, Neide Zério, sempre prestativa, e a todos os funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia que, direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho.

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, pelo aprendizado, convívio e momentos compartilhados, em especial à Elisângela Novaes Lopes e Gleidyane Novaes Lopes Mielezrski.

A todos que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas, Eliane Grisoto, Fátima Teresinha Rampelotti Ferreira, Gabriel Luís Padoan Gonçalves, Gerane Celly Dias Bezerra Silva, Kaira Samaini Pauli, Leandro Prado Ribeiro, Marcos Aurélio de Araújo Lima, Rafael Major Pitta, e em particular à Mônica Silva

Santos, pela amizade e companheirismo, ao Thiago Felipe Ansante, pelo auxílio prestado em vários momentos, ao Paulo Bogorni e ao Márcio Alves Silva, pela ajuda na coleta das espécies vegetais.

A todos do Laboratório de Interações em Insetos, em particular a Guilherme Duarte Rossi, hoje professor da UNESP-Jaboticabal, pela paciência e inestimável auxílio na condução dos testes enzimáticos, mesmo à distância, e a Felipe Antônio Domingues, pela ajuda na realização de alguns testes enzimáticos.

A Oderlei Bernardi, pelo auxílio com as análises de concentração efetiva, e à Rebeca Ribeiro e Eloisa Salmeron, pelo auxílio na condução dos testes de contato.

À doutoranda em Genética e Melhoramento de Plantas, Poliene Martins Costa, pelo auxílio na utilização do espectrofotômetro.

A todos os amigos do Grupo de Oração Universitário Água Viva, em especial a Ana Paula Neto, Andrea Ribeiro Domingues, Camila Silva, Dalilla Rezende, Lorena Nunes, Mariana Pontin, Mateus Silva, Renata Alvarenga, Tatiane Tokairin e Tiago Costa, pelo agradável convívio e apoio em vários momentos.

À bibliotecária Silvia Zinsly, pelo auxílio na formatação da tese.

Aos meus pais Luis Carlos Marcomini e Vera Gomes Marcomini, e ao meu irmão, Luiz Henrique Marcomini, por tudo que me ensinaram, pelo apoio incondicional e pelo amor que sempre me dedicaram, e ao meu esposo Pedro Rogerio Giongo, pelo incentivo, carinho e compreensão.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, e que porventura não estão aqui mencionados, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Compostos inseticidas de origem vegetal.....	13
2.2 Mecanismos de ação de compostos vegetais.....	18
2.2.1 Neurotóxicos.....	18
2.2.2 Moduladores de canais de cálcio	19
2.2.3 Inibidores da respiração celular	19
2.2.4 Fagodeterrentes.....	20
2.2.5 Reguladores de crescimento	21
2.2.6 Inibidores e indutores enzimáticos	22
2.3 Busca por novos compostos em Meliaceae	25
2.5 Praga alvo do estudo, <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) .	27
2.6 Perspectivas para o uso de inseticidas botânicos.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Criação de <i>S. frugiperda</i>	29
3.2 Coleta do material vegetal e obtenção dos extratos e frações	29
3.3 Bioatividade das frações de <i>T. pallida</i> , <i>T. pallens</i> e <i>T. ciliata</i> sobre <i>S. frugiperda</i>	31
3.4 Parâmetros biológicos de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com as frações mais ativas de <i>T. pallida</i> , <i>T. pallens</i> e <i>T. ciliata</i>	32
3.5 Determinação de índices nutricionais de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta contendo as frações mais ativas de <i>T. pallida</i> , <i>T. pallens</i> e <i>T. ciliata</i>	32
3.6 Isolamento de compostos presentes nas frações de <i>T. pallida</i> , <i>T. pallens</i> e <i>T. ciliata</i>	33
3.7 Isolamento de cedrelona a partir do extrato bruto em hexano do caule de <i>T. ciliata</i>	33
3.8 Bioatividade dos compostos isolados sobre <i>S. frugiperda</i>	34
3.8.1 Ingestão.....	35
3.8.2 Contato	35
3.9 Estudo da bioatividade do limonoide cedrelona.....	36
3.9.1 Fagodeterrência e consumo em folhas de milho tratadas com cedrelona.....	36
3.9.2 Estimativa da CL ₅₀ , CL ₉₀ e CE ₅₀ de cedrelona incorporada à dieta.....	36

3.9.3 Parâmetros biológicos de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta contendo cedrelona	37
3.9.4 Determinação de índices nutricionais de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta contendo cedrelona	37
3.9.5 Ensaio enzimático com lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta contendo cedrelona	38
3.10 Análise dos dados.....	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Bioatividade das frações de <i>T. pallida</i> , <i>T. pallens</i> e <i>T. ciliata</i> sobre <i>S. frugiperda</i>	43
4.2 Parâmetros biológicos de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com as frações mais ativas de <i>T. pallida</i> , <i>T. pallens</i> e <i>T. ciliata</i>	47
4.3 Determinação de índices nutricionais de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta contendo as frações mais ativas de <i>T. pallida</i> , <i>T. pallens</i> e <i>T. ciliata</i>	49
4.4 Compostos isolados das frações de <i>T. pallida</i> , <i>T. pallens</i> e <i>T. ciliata</i>	53
4.5 Bioatividade dos compostos isolados	56
4.5.1 Ingestão	56
4.5.2 Contato	60
4.5 Estudo da bioatividade do limonoide cedrelona	63
4.5.1 Preferência alimentar e consumo de folhas de milho	63
4.5.2 Estimativa da CL ₅₀ e CE ₅₀ de cedrelona incorporada à dieta artificial	65
4.5.3 Parâmetros biológicos de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta contendo cedrelona	67
4.5.4 Determinação de índices nutricionais de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta contendo cedrelona	69
4.5.5 Ensaio enzimático	73
4.5.6 Considerações sobre a bioatividade da cedrelona.....	78
CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS.....	83

RESUMO

Busca por compostos de *Trichilia pallida* Swartz, *Trichilia pallens* C.DC. e *Toona ciliata* M. Roemer com bioatividade sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797)

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de frações (em hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica) de extratos etanólicos de *Trichilia pallida* Swartz, *Trichilia pallens* C.DC. e *Toona ciliata* M. Roemer sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), e isolar, identificar e avaliar o efeito dos compostos dessas três meliáceas sobre o desenvolvimento e o metabolismo do inseto, com ênfase para o limonoide cedrelona. As frações causaram baixa mortalidade, mas houve grande redução de peso das lagartas com as frações em diclorometano de folhas e de ramos de *T. pallida*, de ramos de *T. pallens* e de folhas e de frutos de *T. ciliata*, além de maior duração da fase larval, redução do peso de pupas e alteração dos índices nutricionais, sendo a fração de ramos de *T. pallida* a de maior efeito tóxico e com fagodeterrência secundária, e a fração de folhas de *T. ciliata* sem efeito tóxico, mas apresentando fagodeterrência possivelmente primária. A partir da fração em diclorometano de frutos de *T. ciliata* obteve-se um triglicerídeo; da fração em acetato de etila de ramos de *T. ciliata* obteve-se o flavonoide (+/-)-catequina; da fração em hexano de folhas de *T. pallida* obteve-se o triterpeno damaradienol e da fração em diclorometano de ramos de *T. pallens* obteve-se a cumarina escopoletina. O triglicerídeo e a escopoletina causaram pequena mortalidade e redução de peso das lagartas por ingestão, enquanto a catequina causou apenas redução de peso. Por contato, a escopoletina também afetou a sobrevivência. O limonoide cedrelona, isolado do extrato bruto em hexano de caules de *T. ciliata*, apresentou o maior efeito, tanto por ingestão quanto por contato. Por ingestão, os valores estimados de CL₅₀, CL₉₀ e CE₅₀ para a cedrelona aplicada sobre a dieta foram 365,33, 659,62 e 95,02 ppm, respectivamente, e após incorporação na dieta, os valores foram 119,05, 491,14 e 45,13 ppm, respectivamente. A cedrelona causou fagodeterrência em teste com chance de escolha e redução no consumo foliar no teste sem chance de escolha. A ingestão de cedrelona causou menor peso de lagartas e de pupas, aumento da duração da fase larval e da mortalidade de modo dose dependente, com efeitos subletais observados a partir de 24 ppm. Lagartas de quarto ínstar que ingeriram dieta contendo cedrelona a 300 ppm tiveram redução na eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) e digerido (ECD) e na taxa de crescimento relativo (RGR), enquanto o custo metabólico (MC), a taxa metabólica relativa (RMR) e a digestibilidade aproximada (AD) aumentaram, e a taxa de consumo relativo (RCR) não foi alterada, indicando efeitos tóxicos pós-ingestão e efeito fagodeterrente secundário, com a maior parte do alimento assimilado sendo utilizada no metabolismo. A atividade de proteases no mesêntero das lagartas que ingeriram dieta contendo cedrelona foi reduzida, assim como a quantidade de grupos heme, relacionados às monoxigenases do citocromo P450, enquanto a atividade de glutathione-S-transferases não foi alterada. A atividade de acetilcolinesterase no extrato enzimático de lagartas inteiras aumentou. A bioatividade da cedrelona e os possíveis modos de ação são discutidos.

Palavras-chave: Meliaceae; Frações; Cedrelona; Índices nutricionais; Fagodeterrência; Atividade enzimática

ABSTRACT

Search for *Trichilia pallida* Swartz, *Trichilia pallens* C.DC. and *Toona ciliata* M. Roemer compounds with bioactivity on *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797)

This work was carried out to evaluate the effect of fractions (in hexane, dichloromethane, ethyl acetate and hydroalcoholic) of ethanolic extracts of *Trichilia pallida* Swartz, *Trichilia pallens* C.DC. and *Toona ciliata* M. Roemer to *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), and to isolate, identify and evaluate the effect of the compounds from the three Meliaceae on the larvae development and metabolism, with emphasis on the cedrelone limonoid. The fractions caused low mortality, but there was a great reduction in weight of larvae with dichloromethane leaves and stems fractions of *T. pallida*, stems of *T. pallens* and leaves and fruits of *T. ciliata*, in addition to longer duration of the larval stage, pupae weight reduction and changes on nutritional indices. The fraction of *T. pallida* stems caused the highest toxic effects and secondary phagodeterrence, and the fraction of *T. ciliata* leaves showed probably primary phagodeterrence, but no toxic effect. From the dichloromethane fraction of *T. ciliata* fruits was obtained a triglyceride (unidentified), from the ethyl acetate fraction of *T. ciliata* stems was obtained the flavonoid (+/-)-catechin, from the hexane fraction of *T. pallida* leaves was obtained the triterpene dammaradienol and from the dichloromethane fraction of *T. pallens* stems was obtained the coumarin scopoletin. Scopoletin and triglyceride caused low mortality and larval weight reduction after ingestion, catechin caused only larval weight reduction. Scopoletin either affect survival by contact. The limonoid cedrelone, isolated from the crude hexane extract of stems of *T. ciliata*, was the most effective compound, either by ingestion or by contact. After ingestion, the estimated LC₅₀, LC₉₀ and EC₅₀ values for cedrelone applied onto the diet were 365.33, 659.62 and 95.02 ppm, respectively, and after diet incorporation, the values were 119.05, 491.14 and 45.13 ppm, respectively. Cedrelone caused feeding deterrence on choice test and reduced leaf consumption in the no-choice test. Cedrelone intake caused low weight gain by larvae and pupae, increased mortality and duration of larval stage in a dose-dependent manner, with sublethal effects observed at 24 ppm. Fourth instar larvae that ingested diet containing 300 ppm cedrelone showed reduced efficiency conversion of ingested (ECI) and digested food (ECD), reduced relative growth rate (RGR), increased metabolic cost (MC), relative metabolic rate (RMR) and approximate digestibility (AD), but no change in relative consumption rate (RCR), suggesting toxic effects post ingestion and secondary phagodeterrence, in which most of the assimilated food was used in metabolism. The protease activity in the midgut of the larvae that ingested diet containing 300 ppm of cedrelone was reduced, as well the amount of heme groups related to cytochrome P450 monooxygenases in the midgut, but there was no change in the glutathione S-transferases activity. There was an increase of acetylcholinesterase activity in the larvae bodies. Cedrelone bioactivity and the possible modes of action are discussed.

Keywords: Meliaceae; Fractions; Cedrelone; Nutritional indices; Phagodeterrence; Enzyme activity

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país com uma flora vasta, com grande potencial para utilização nas mais diversas áreas, mas que tem sido relativamente pouco estudada do ponto de vista químico e farmacológico. Nos últimos anos tem se tornado cada vez maior o interesse no desenvolvimento de pesquisas visando avaliar extratos de plantas quanto ao seu efeito sobre insetos, havendo um grande número de espécies vegetais com potencial para serem utilizadas no controle de pragas. Os inseticidas botânicos, como são chamados, têm sido apontados como uma alternativa aos inseticidas químicos sintéticos, por supostamente representarem menor risco para o meio ambiente e para a saúde humana (AKHTAR et al., 2012). A família botânica Meliaceae é atualmente muito investigada, por possuir muitas espécies que são fonte de princípios ativos com propriedades inseticidas e diferentes modos de ação em relação a muitas espécies de insetos. Nesse grupo se destacam *Azadirachta indica* A. Juss., *Melia azedarach* L., *Trichilia* spp., *Toona* spp. e *Cedrela* spp. Seus extratos podem causar os mais variados efeitos sobre os insetos, tais como repelência, inibição de oviposição e de alimentação, alterações no sistema hormonal, causando distúrbios no desenvolvimento, deformações, infertilidade e mortalidade nos diversos estágios. Entretanto, as informações disponíveis sobre a composição e os mecanismos de ação desses inseticidas botânicos ainda são escassas. O nim, *A. indica*, é uma das poucas espécies que tem compostos isolados bem identificados e alguns com o mecanismo de ação bastante investigado, como a azadiractina. Conhecendo os compostos inseticidas presentes no extrato vegetal e o seu mecanismo de ação, é possível saber se o composto poderia também ser prejudicial a humanos e outros animais, bem como determinar a melhor forma e momento de aplicação, além de ser fundamental para programas de manejo da resistência de pragas a insetos.

Os extratos de *Trichilia pallida* Swartz, *Trichilia pallens* C. DC. e *Toona ciliata* M. Roemer apresentam efeito sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), principalmente redução do peso de lagartas e atraso no desenvolvimento (RODRÍGUEZ, 1995; ROEL et al., 2000; BOGORNI; VENDRAMIM, 2003, 2005). Embora alguns compostos já tenham sido identificados (CHATTERJEE; CHAKRABORTTY; CHANDRASEKHARAN, 1971; ROCHA, 2004; CHEN et al., 2009), ainda há muito a ser estudado, principalmente em relação à ação específica de cada um, que ainda é desconhecida. É o caso do limonoide cedrelona, presente no caule de *Toona ciliata*, que demonstrou atividade sobre os lepidópteros *Peridroma saucia* (Hübner), *Mamestra configurata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) (KOUL, ISMAN, 1992), *Spodoptera litura*

(Fabricius) (KOUL, 1983), *S. frugiperda*, *Heliothis* (= *Helicoverpa*) *zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae), *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae) (KUBO, KLOCKE, 1986), e *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) (ARNASON et al., 1987), porém sem modo de ação conhecido.

Considerando o potencial dessas três meliáceas para o controle de insetos, este estudo foi desenvolvido, em parceria com o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Controle Biorracional de Insetos Pragas (INCT-CBIP), com a colaboração da Prof.^a Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva e da doutoranda Sâmia Danielle Lima de Freitas, do Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), SP, com os seguintes objetivos:

- Aprofundar o estudo dos extratos de *Trichilia pallida*, *Trichilia pallens* e *Toona ciliata* sobre *S. frugiperda*, por meio de avaliação do efeito das frações sobre parâmetros biológicos e sobre índices nutricionais;
- Isolar e identificar os compostos das três meliáceas com efeito sobre o desenvolvimento e o metabolismo de *S. frugiperda*, com ênfase para o limonoide cedrelona, caracterizando os efeitos biológicos;
- Avaliar o efeito dos compostos ativos sobre o metabolismo do inseto, investigando a atuação sobre importantes enzimas digestivas e de detoxificação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Compostos inseticidas de origem vegetal

Um dos desafios atuais do controle de insetos-praga é o desenvolvimento de estratégias mais seguras para o homem, ambiente e inimigos naturais do que os inseticidas químicos, além de mais eficazes, visto que há populações de insetos resistentes a grande parte dos compostos sintéticos atualmente utilizados (RATTAN, 2010). Alguns aleloquímicos de plantas provenientes do metabolismo secundário são responsáveis pela sua defesa contra herbivoria, e podem ser utilizadas para controle de pragas na forma de extratos vegetais, que são os chamados inseticidas botânicos (SILVA-AGUAYO, 2002). Eles podem ser utilizados diretamente como inseticidas, na forma de extratos, pós ou óleos essenciais, ou ainda para obtenção de compostos ativos. Esses extratos apresentam rápida degradação pela ação da luz e da temperatura, tendo, portanto, baixa permanência no ambiente, o que é vantajoso já que não deixam resíduos, porém pode tornar necessário um maior número de aplicações (VENDRAMIM; CASTIGLIONI, 2000; SILVA-AGUAYO, 2002). A busca por produtos para controlar pragas que sejam mais seguros para o homem, sem efeito neurotóxico, com baixa persistência no ambiente e com menores chances de seleção de populações resistentes de insetos, fez com que aumentasse o interesse por novas fontes de produtos naturais biologicamente ativos (JACOBSON, 1989; SINGH et al., 1997). Por isso, muitos trabalhos têm sido realizados com produtos naturais como modelos potenciais para obtenção de substâncias defensivas contra insetos e outras pragas (CROMBIE, 1999).

As principais classes químicas de compostos de plantas envolvidos na defesa contra insetos são os alcaloides, compostos fenólicos e terpenos. A nicotina foi o primeiro e mais importante alcaloide com atividade inseticida que chegou a ser utilizado extensivamente, e é um dos inseticidas botânicos mais tóxicos para seres humanos. A nicotina é encontrada em solanáceas do gênero *Nicotiana*, principalmente *Nicotiana tabacum* L. e *Nicotiana rustica* L. Outros alcaloides relacionados à nicotina são encontrados nessas espécies, como a nornicotina e a anabasina, que também possuem atividade inseticida, porém ocorrem em menor concentração (SAITO, LUCCHINI, 1998; AGUIAR-MENEZES, 2005). A partir da estrutura da nicotina foi obtida uma cópia sintética em laboratório, que deu origem aos inseticidas neonicotinoides, como imidacloprid e tiametoxan. Outro exemplo é a fisostigmina, encontrada

em *Physostigma venenosum* Balfour (Fabaceae), que serviu como modelo para a síntese de carbamatos (AGUIAR-MENEZES, 2005).

Grande parte dos alcaloides com atividade inseticida não foram sintetizados devido à sua complexidade, fotolabilidade e, em alguns casos, pela possibilidade de serem altamente tóxicos para mamíferos. Exemplos de tais compostos são os alcaloides inseticidas veratrina e rianodina (CASIDA, 1974). A veratrina é encontrada em sementes de *Schoenocaulon officinale* (Schltdl. & Cham.) A. Gray (Melanthiaceae), e embora o pó das sementes tenha baixa toxicidade para mamíferos, o composto isolado é altamente tóxico e irritante para a pele (SILVA-AGUAYO, 2002). A rianodina, obtida de ramos e raízes de *Ryania speciosa* Vahl. (Salicaceae), é relativamente estável, tendo por isso maior efeito residual, entretanto ainda não foi completamente sintetizada (AGUIAR-MENEZES, 2005).

Entre os compostos fenólicos com atividade inseticida, o mais conhecido é a rotenona, um flavonoide extraído de raízes de espécies dos gêneros *Derris*, *Lonchocarpus* e *Tephrosia* (Leguminosae). A rotenona é comercializada geralmente em forma de pó contendo 1 a 5% de ingrediente ativo para uso doméstico e em jardins, mas formulações líquidas para uso na agricultura orgânica podem conter até 8% de rotenona e 15% de rotenoides no total (ISMAN, 2006). É o único composto fenólico utilizado comercialmente como inseticida, embora outros compostos desse grupo tenham sido relacionados à resistência de plantas a insetos (DUKE, 1990). Um exemplo é o tanino, que pode estimular ou inibir a alimentação dos insetos, dependendo da espécie, podendo também causar efeitos fisiológicos pós-ingestão (BERNAYS, 1981).

No grupo dos terpenos destacam-se as piretrinas, extraídas de flores secas de piretro, *Chrysanthemum cinerariaefolium* Visiani (= *Tanacetum cinerariifolium*) (Asteraceae). Por apresentarem amplo espectro de atividade, eficiência em doses baixas, ação rápida (*knock down*), baixa toxicidade para mamíferos e baixo poder residual, tais compostos foram os mais importantes economicamente e mais utilizados no controle de insetos. Porém, a pouca estabilidade, especialmente em razão do fotodegradação, e o alto custo do material vegetal originado do cultivo levaram à obtenção de análogos sintéticos, os piretroides, para uso em campo (SAITO; LUCCHINI, 1998). As piretrinas são ésteres formados pela combinação dos ácidos crisantêmico e pirétrico com os álcoois piretrolona, cinerolona e jasmolona. Os crisantematos compreendem a piretrina I, cinerina I e jasmolina I, formando a fração piretrinas I, e os piretratos compreendem a piretrina II, cinerina II e jasmolina II, formando a fração piretrinas II (JACOBSON, 1971; TYLER; BRADY; ROBBERS, 1979).

Muitos outros terpenos apresentam efeito inseticida ou inibidor de atividade em insetos. Por exemplo, a azadiractina, do grupo dos limonoides, extraído principalmente de sementes de nim, *Azadirachta indica* A. Juss., mas também de *Melia azedarach* L. e *Melia toosendan* Sieb. et Zucc. (DUKE, 1990, VIEGAS JR, 2003), é um potente inibidor do crescimento de várias espécies de insetos. A azadiractina é um dos compostos naturais mais estudados atualmente em relação à sua atividade biológica, toxicidade, biodegradação e relação estrutura-atividade (VIEGAS JR, 2003). Infelizmente, o sucesso comercial de nim tem ficado muito aquém da propaganda inicial feita em torno dele, o que se deve, em parte, ao custo relativamente elevado do produto refinado e à ação relativamente lenta em insetos (ISMAN, 2006). O óleo extraído de sementes de nim contém muitos limonoides bioativos, além da azadiractina, sendo os mais importantes a salanina, nimbina, 3-tigloilazadiractol (“azadiractina-B”) e 1-tigloil-3-acetil-11-hidroximeliacarpina (“azadiractina D”) (GOVINDACHARI et al., 1996, 2000; KUMAR; SRINIVAS; YAKKUNDI, 1996; MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993; MORGAN, 2009; MITCHELL et al., 1997).

Os terpenos são também os principais componentes dos óleos essenciais de plantas, que são muito utilizados como atraentes ou repelentes de insetos (PRATES, SANTOS, 2000). Óleos essenciais são definidos como quaisquer voláteis que possuem componentes aromáticos e que dão odor, sabor ou aroma característicos a uma planta. A maioria dos óleos essenciais são monoterpenos, com 10 átomos de carbono frequentemente arranjados em um anel ou em forma acíclica, e sesquiterpenos, com 15 átomos de carbono. Terpenos maiores podem também estar presentes como constituintes minoritários (KOUL, WALIA, DHALIWAL, 2008). Eles são obtidos por destilação a vapor de folhas de plantas, principalmente das famílias Myrtaceae e Lamiaceae. Tanto os óleos como as próprias folhas das plantas aromáticas têm sido utilizados para proteger grãos armazenados e leguminosas contra insetos-praga, e para repelir insetos em ambientes domésticos (ISMAN, 2000). Alguns deles são bastante conhecidos, como o óleo de citronela (*Cymbopogon* spp., Poaceae), que é usado há mais de 50 anos. Ele possui efeito repelente de insetos, atribuído ao seu principal composto monoterpênico, o citronelal, além de ação larvicida (ZARIDAH et al., 2003). As espécies mais ricas em citronelal são *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle e *C. winterianus* Jowitt., além de uma espécie de eucalipto (*Eucalyptus* (= *Corymbia*) *citriodora* Hook, Myrtaceae), mas pode também estar presente em menor concentração em plantas de outras famílias (SAITO, 2004). O limoneno é um terpeno volátil obtido do óleo da casca do fruto de diversas espécies de *Citrus* (Rutaceae) e também encontrado em *Mentha* spp. (Lamiaceae). Trata-se de uma molécula quiral (molécula cuja imagem especular não pode ser sobreposta

à molécula original), sendo que em *Citrus* encontra-se o D-limoneno e em *Mentha* o L-limoneno (FERRARINI et al., 2008). O linalol também está presente no óleo essencial de *Citrus*, e assim como o d-limoneno, dissolve os lipídios da cutícula do exoesqueleto das pulgas, causando morte por desidratação (SCHICK; SCHICK, 1986). Outros exemplos são os α - e β -pinenos presentes nos óleos extraídos da resina de pinheiro, *Pinus* sp. (Pinaceae); o nerol extraído do óleo essencial do capim-limão, *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. (Poaceae); o eugenol do cravo-da-índia, *Eugenia caryophyllata* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae); o mentol da hortelã, *Mentha piperita* L., (Lamiaceae); a piperina da pimenta-do-reino, *Piper nigrum* L. (Piperaceae) e as substâncias sulfuradas obtidas do extrato do alho, *Allium sativum* L. (Liliaceae) (SAITO, 2004).

Os óleos essenciais podem ter efeitos tóxicos diretos sobre os insetos, via contato, ingestão ou fumigação, apresentando rápida ação (efeito de choque ou *knockdown*) e podem também causar efeitos comportamentais, como repelência e fagodeterrência (ISMAN; MIRESMAILLI, MACHIAL, 2011). Os óleos parecem ter múltiplos modos e sítios de ação no sistema nervoso de insetos e em outros locais, o que explica os variados efeitos observados (ENAN, 2001, 2005a, b; KOSTYUKOVSKY et al., 2002; PRIESTLEY et al., 2003).

Os inseticidas botânicos mais utilizados atualmente são o piretro, o nim, a rotenona e os óleos essenciais. Rianodina e nicotina ainda são utilizadas, porém de forma mais restrita (ISMAN, 2006).

Os estudos com plantas têm revelado novos compostos com atividade inseticida. Moléculas com sítios de ação específicos ou múltiplos podem ser uma opção para a mitigação da evolução da resistência de insetos a inseticidas. Além disso, compostos ainda não explorados podem ter diferentes sítios de ação, podem ser seletivos e seguros ao homem e ambiente (RATTAN, 2010). As espécies de plantas que se mostraram mais promissoras como fonte de compostos inseticidas pertencem às famílias Meliaceae, Rutaceae, Annonaceae, Asteraceae, Labiatae (= Lamiaceae) e Piperaceae (JACOBSON, 1989; SCHMUTTERER, 1992). Extratos e compostos de espécies dessas famílias têm mostrado efeito sobre o desenvolvimento e comportamento de insetos, atuando como reguladores de crescimento, fagodeterrentes e tóxicos (CHAMPAGNE et al., 1992).

Em Rutaceae, as espécies de *Citrus* são ricas em terpenos, compondo o óleo essencial, e há também muitos limonoides, como em Meliaceae (MOREIRA et al., 2006). Um limonoide que vem sendo bastante estudado nessa família é a fraxinelona, que ocorre principalmente nas espécies *Dictamnus dasycarpus* Trucz. (LIU et al., 2002) e *Dictamnus angustifolius* G. Don ex Sweet (HU et al., 1989). A fraxinelona foi isolada também da

meliácea *M. azadarach* (NAKATANI et al., 1998), e possui atividade fagodeterrente sobre os lepidópteros *Spodoptera littoralis* (Boisduval), *Spodoptera exigua* (Hübner) e *Mythimna separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) e sobre os coleópteros *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) (NAKATANI et al., 1998; LIU et al., 2002; WEI, YUAN, 2006). A molécula foi totalmente sintetizada por Okamura et al. (1997) e está disponível comercialmente na China e nos Estados Unidos, como composto isolado.

Nas piperáceas do gênero *Piper* encontram-se as piperamidas, sendo a piperina o alcaloide de maior destaque (SCOTT et al., 2008). Na família Annonaceae são encontradas as acetogeninas, que são derivados de ácidos graxos de cadeia longa. A principal acetogenina obtida de sementes de *Annona squamosa* L. é a anonina I (ou esquamocina) e um composto similar, asimicina, é encontrado na casca de *Asimina triloba* (L.) Dunal (JOHNSON et al., 2000; McLAUGHLIN et al., 1997). Algumas acetogeninas puras são tóxicas para mamíferos, o que é um impedimento para regulamentação, embora os extratos padronizados de sementes de *A. squamosa* e de casca de *A. triloba* sejam bem menos tóxicos (ISMAN, 2006).

Reguladores do crescimento de insetos, como análogos e antagonistas de hormônios, também já foram identificados em Asteraceae. No óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. e de *A. houstonianum* Mill. são encontrados os precocenos (cromenos) que são antagonistas do hormônio juvenil de insetos (BOWERS et al., 1976; BOWERS, 1981). A atividade inseticida de muitas espécies de *Tagetes*, também da família Asteraceae, tem sido relatada contra pragas de grãos armazenados (KEITA et al., 2000; RESTELLO; MENEGATT, MOSSI, 2009) e mosquitos (GREEN et al., 1991; MACEDO et al., 1997). *Tagetes minuta* L. é rica em compostos secundários, incluindo monoterpenos, sesquiterpenos, flavonoides e tiofenos (ZYGADLO et al., 1990).

Análogos do hormônio juvenil de insetos também foram encontrados em plantas, incluindo os terpenos juvocimeno de *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) e a juvabiona de *Abies balsamea* (L.) Mill. (Pinaceae). Embora não tenham sido usados comercialmente, serviram como modelos para o desenvolvimento de análogos do hormônio juvenil, como metoprene e kinoprene, que estão disponíveis para o controle de mosquitos, moscas e algumas pragas de produtos armazenados (STAAL, 1975). O óleo essencial de *Ocimum suave* Wild. apresentou efeito repelente para *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) superior ao óleo de citronela, sendo o composto eugenol o principal componente e o responsável pelo efeito repelente (CHOGO, CRANK, 1981). Os três principais componentes do óleo essencial de *O. basilicum*, trans-anetol, estragol (metil-chavicol) e linalol, apresentaram efeito inseticida de

choque contra as moscas-das-frutas *Ceratitis capitata* (Wiedemann), *Bactrocera dorsalis* (Hendel) e *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) (CHANG; CHO; LI, 2009).

2.2 Mecanismos de ação de compostos vegetais

A maioria dos estudos tem focado os efeitos de extratos e óleos essenciais, dose letal e tempo para alcançar os efeitos letais, mas os compostos responsáveis pela atividade e os mecanismos de ação sobre o inseto, em geral, não são completamente elucidados. Há uma grande quantidade de compostos de defesa conhecidos em plantas, mas muito pouco se conhece em relação ao seu modo de ação a nível molecular (RATTAN, 2010). Em geral, metabólitos secundários interferem em certos componentes vitais do sistema de sinalização celular, no sistema nervoso (como síntese de neurotransmissores, armazenamento, liberação, ligação e remoção, ativação de receptores, enzimas envolvidas na transdução do sinal), bloqueio de vias metabólicas e na atividade de diversas enzimas (WINK, 2000).

2.2.1 Neurotóxicos

Alguns compostos que atuam no sistema nervoso são as piretrinas, veratridina, nicotina e fisostigmina. As piretrinas e a veratridina têm efeito de choque e podem causar paralisia, devido à hiperexcitação dos neurônios. Ambas atuam nos canais de sódio quando abertos, durante a transmissão do impulso nervoso, mantendo-os abertos por um período prolongado e assim aumentando o influxo de íons sódio no neurônio (EVANS, 1984; BLOOMQUIST, 1996; OHTA, 1973). A nicotina mimetiza o neurotransmissor acetilcolina, interagindo com o seu receptor nicotínico no neurônio, ativando-o e transmitindo impulsos nervosos de forma intermitente, uma vez que a acetilcolinesterase não pode degradar a nicotina. O efeito resultante é hiperexcitação, paralisia e morte do inseto (RICHARDS, CUTKOMP, 1945). Já a fisostigmina atua inibindo a enzima acetilcolinesterase de forma reversível, impedindo que ela degrade acetilcolina na fenda sináptica, que permanece se ligando aos receptores na membrana pós-sináptica e disparando vários potenciais de ação, causando também hiperexcitação e morte (DUKE, 1990; AGUIAR-MENEZES, 2005).

Alguns estudos com óleos essenciais apontam para um sítio de ação neurotóxico, pelo seu rápido efeito. O efeito de choque e a toxicidade letal por contato foi demonstrada sobre as baratas *Periplaneta americana* (L.) (Blattaria: Blattidae) (NGOH et al., 1998) e *Blattella germanica* (L.) (Blattaria: Blattelidae), e a mosca-doméstica (*Musca domestica* L.) (Diptera: Muscidae) (RICE; COATS, 1994; COATS; KARR; DREWES, 1991). Alguns óleos essenciais são monoterpenos inibidores competitivos da acetilcolinesterase *in vitro* (GRUNDY; STILL, 1985; MIYAZAWA et al., 1997). Estudos de Enan et al. (1998) com *P. americana* indicam como sítio de ação o sistema nervoso octopaminérgico. Como vertebrados não têm receptores de octopamina, os óleos essenciais inseticidas com esse modo de ação são seletivos a mamíferos.

2.2.2 Moduladores de canais de cálcio

Entre os compostos que atuam sobre os canais de cálcio, a rianodina tem grande destaque, pois permitiu a identificação e caracterização parcial de uma família de canais de liberação de cálcio intracelular, denominada receptores de rianodina (RyRs). Esse alcaloide se liga irreversivelmente aos canais de cálcio das fibras musculares, que permanecem abertos, deixando os ions Ca^{++} livres para inundar o interior das fibras, induzindo a contração dos músculos esqueléticos e causando paralisia muscular (ROGERS et al., 1948; NAUEN, 2006). Logo após a ingestão, o inseto cessa a alimentação e, aos poucos, os movimentos. A rianodina age lentamente, mas é altamente efetiva (SATTELLE; CORDOVA; CHEEK, 2008).

2.2.3 Inibidores da respiração celular

A rotenona é um inibidor de uma das enzimas do Complexo I da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, a NADH desidrogenase. Na presença desse inseticida, os elétrons provenientes do NADH não podem entrar na cadeia de transporte de elétrons, o que resulta na incapacidade de produzir ATP a partir da oxidação do NADH, afetando assim a respiração celular. Insetos intoxicados por rotenona apresentam dificuldades de coordenação muscular, cessando lentamente seus movimentos até a morte (SILVA AGUAYO, 2002; SAITO, LUCCHINI, 1998).

As acetogeninas de Annonaceae atuam da mesma forma que a rotenona, inibindo a enzima NADH desidrogenase, porém com efeito ainda maior, bloqueando a produção de energia na mitocôndria em insetos e mamíferos (LONDERSHAUSEN et al., 1991; COLOM et al., 2007).

2.2.4 Fagodeterrentes

Alguns compostos podem interferir na seleção hospedeira dos insetos, atuando nos seus quimiorreceptores, presentes geralmente nas peças bucais, podendo estar presentes também nos tarsos e antenas (PICKETT et al., 1997; CHAPMAN, 2003). Quando esses compostos reduzem a alimentação do inseto pela atuação nos quimiorreceptores, são chamados fagodeterrentes (FRAZIER, 1986; ISMAN, et al., 1996). Essa definição exclui as substâncias que reduzem a alimentação do inseto após a ingestão e absorção da mesma, por ação no sistema nervoso central ou por efeito subletal, que muitos autores consideram como sendo também fagodeterrentes (ISMAN, 2002). Mordue (Luntz) e Blackwell (1993), por exemplo, classificaram a fagodeterrência em primária e secundária. A primária ocorre quando o composto afeta a alimentação agindo nos quimiorreceptores, e a secundária quando o insetoingere o composto, causando assim efeitos tóxicos secundários. Esses efeitos podem ser distúrbios hormonais e/ou de outros sistemas fisiológicos, como dos movimentos peristálticos do intestino, inibição da produção de enzimas digestivas, efeitos sobre o sistema nervoso estomatógástrico etc. (MORDUE (LUNTZ); COTTEE; EVANS, 1985; KOUL; ISMAN, 1991; TIMMINS; REYNOLDS, 1992; TRUMM; DORN, 2000).

Os terpenos são a classe de compostos que apresentam as formas mais potentes e diversas de fagodeterrentes (ISMAN, 2002). A azadiractina é um exemplo clássico de terpeno que atua como fagodeterrente, pela ação nos quimiorreceptores, porém causa também efeitos secundários após a ingestão (MORDUE (LUNTZ), BLACKWELL, 1993). Outros terpenos que apresentam fagodeterrência para insetos são o timol, de *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae); a ajugarina I, de *Ajuga remota* Benth (Lamiaceae); o glaucolídeo A, de *Vernonia* spp. (Asteraceae), e o agrinosídeo, de *Allium porrum* L. (Liliaceae). Há também alguns compostos fenólicos com efeito fagodeterrente, como a furanocumarina xantotoxina, de *Pastinaca sativa* L. (Apiaceae), e alcaloides de solanáceas, como a tomatina, de *Lycopersicon esculentum* Mill. (= *Solanum lycopersicum*) (ISMAN, 2002).

Os fagodeterrentes apresentam grandes diferenças de bioatividade dependendo da espécie de inseto. Por exemplo, a azadiractina é extremamente potente para o gafanhoto *Schistocerca gregaria* Forsskal (Orthoptera: Acrididae), mas para outro gafanhoto, *Locusta migratoria* L. (Orthoptera: Acrididae), é necessária uma dose 10 vezes maior para que haja efeito (CHAMPAGNE et al., 1989). Há ainda a possibilidade de o inseto rapidamente se habituar ao composto fagodeterrente após exposição prolongada. A toosendanina perde totalmente o efeito fagodeterrente sobre *S. litura* após 4,5 horas (ISMAN, 2002), e a azadiractina perde metade do efeito após 5 horas (BOMFORD; ISMAN, 1996).

2.2.5 Reguladores de crescimento

Os precocenos, antagonistas do hormônio juvenil de insetos presentes em asteráceas, destróem os corpos alados de insetos sensíveis, que produzem o hormônio juvenil. Na ausência desse hormônio, ocorre a metamorfose precoce em insetos imaturos, e em adultos os precocenos causam esterilidade (BOWERS, 1981). Os análogos do hormônio juvenil, juvocimeno e juvabiona, mimetizam a ação do referido hormônio e podem, em teoria, interferir em todas as suas funções (RETNAKARAN et al., 1985).

A azadiractina tem despertado grande interesse nas últimas décadas devido principalmente à sua complexidade e aos variados efeitos que causa em insetos. Foi demonstrado que a azadiractina pode ser quebrada em dois fragmentos e que cada um deles atua de maneira distinta. A porção decalínica interrompe o crescimento e desenvolvimento do inseto, enquanto a porção hidroxifurânica atua como fagodeterrente (VEITCH et al., 2007). A interferência no desenvolvimento do inseto é resultado da atuação no processo de divisão celular dos corpos cardíacos, onde é produzido o hormônio protoracicotrópico, que regula a síntese e liberação de ecdisteroides (ecdisônio e 20-hidroxicdisônio) pelas glândulas protorácicas, e que também liberam a alatotropina, que induz a produção de hormônio juvenil nos corpos alados. O efeito resultante é a ausência de ecdisteroides e de hormônio juvenil e, conseqüentemente, alterações no processo de ecdise e de maturação dos ovos (REMBOLD; SUBRAHMANYAM; MÜLLER, 1989; MORDUE (LUNTZ); NISBET, 2000; SALEHZADEH et al., 2003). Mitchell et al. (1997) verificaram que a azadiractina, assim como a salanina e outros limonoides isolados das sementes de *A. indica*, atuam também inibindo a enzima ecdisônio-20-monoxigenase, que catalisa a reação que converte o ecdisônio em sua forma ativa, o 20-hidroxicdisônio. Por todas essas características, a azadiractina é um

composto de grande interesse comercial. Porém, a molécula é tão complexa que somente 22 após sua descoberta é que ela foi finalmente sintetizada em laboratório, embora com baixo rendimento (VEITCH et al., 2007; LEY et al., 2008), o que torna muito difícil a sua síntese em escala comercial. Assim, os produtos à base de azadiractina mais utilizados para comercialização são aqueles preparados a partir do produto natural (ISMAN, 1997).

2.2.6 Inibidores e indutores enzimáticos

Algumas proteínas de plantas são capazes de formar complexos com proteases e inibir a sua atividade proteolítica de forma competitiva (RYAN, 1990). Esses inibidores de proteases podem ser usados pelas plantas como defesa direta, constitutiva ou induzida, contra insetos, inibindo as enzimas proteásicas no intestino destes (BOULTER, 1993; LAWRENCE; KOUNDAL, 2002). A maioria dos inibidores de proteases estudados está presente nas plantas das famílias Leguminosae, Solanaceae e Gramineae (RICHARDSON, 1991).

O inibidor se liga ao sítio ativo da enzima, formando um complexo com constante de dissociação muito baixa, bloqueando efetivamente o sítio ativo, impedindo o mecanismo normal da enzima, que é a clivagem das ligações peptídicas das proteínas ingeridas pelo inseto, tornando os aminoácidos disponíveis (WALKER et al., 1998). Assim, a inibição de proteases irá diminuir a biodisponibilidade de aminoácidos para a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução do inseto, comprometendo esses processos e podendo causar a morte do inseto (JONGSMA; BOLTER, 1997).

Há compostos de origem vegetal capazes de agir como sinergistas de outros compostos, se ligando a enzimas específicas e interferindo com vias metabólicas gerais de detoxificação (BERNARD; PHILOGÈNE, 1993). Após a descoberta de que o óleo de sementes de gergelim, *Sesamum indicum* (L.) (Pedaliaceae), aumentava o efeito das piretrinas (EAGLESON, 1940), o composto fenólico sesamina foi identificado como composto responsável por esse sinergismo, e a presença do grupo metilendioxifenil intacto no composto foi indicado como essencial para a atividade sinérgica da sesamina (HALLER et al., 1942). Posteriormente, nesse mesmo óleo foi identificado outro sinergista de piretrinas, a sesamolina, cerca de cinco vezes mais potente que a sesamina (BEROZA, 1954). Curiosamente, a sesamina foi encontrada também nas flores de piretro, *C. cinerariaefolium*, sinergizando a atividade das piretrinas (DOSKOTCH; EL-FERALY, 1969). Ela ocorre, ainda, juntamente com os compostos inseticidas olefínicos e amidas acetilênicas em várias espécies

de *Achillea* (GREGER, 1981), em *Otanthus maritimus* (L.), ou com lactonas sesquiterpênicas em *Anacyclus pyrethrum* D.C., todas asteráceas (BURDEN; CROMBIE, 1969).

Dilapiol, um monômero de um lignano, é outro sinergista eficaz de piretrinas (HANDA; DEWAN, 1974), assim como do inseticida carbaril (TOMAR et al., 1978). É encontrado nas sementes da planta indiana *Anethum sowa* Kurz. (Apiaceae) (SINGH, 2012, na piperácea *Piper novae-hollandiae* Miq. (LODER et al., 1969), e em duas espécies de Asteraceae, *Erigeron philadelphicus* L. e *Erigeron annuus* L. (VILLANI; GOULD, 1985; WADDELL et al., 1983), que contêm outros aleloquímicos com atividade inseticida. O safrol, encontrado na canela sassafrás *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (Lauraceae) e na piperácea *Piper hispidinervum* C. DC., entre outras, também é um composto natural com efeito sinergista, a partir do qual foi preparado o butóxido de piperonila, um sinergista sintético muito usado comercialmente com inseticidas químicos (CASIDA, 1970; RIVA et al. 2011).

Todos esses compostos têm em comum o anel metilenodioxifenil, que é importante para o seu efeito, sendo por isso chamados sinergistas MDP (CASIDA, 1970). Ao serem ingeridos pelo inseto, esses compostos formam um complexo com importantes enzimas de detoxificação, as monoxigenases dependentes do citocromo P450 (WILKINSON et al., 1984). Essas enzimas, também denominadas simplesmente de P450, são proteínas com grupamento heme ligado a um ânion tiolato, que participam de muitos processos de transformação, incluindo tanto reações de biossíntese de ecdisteroides e do hormônio juvenil de insetos, quanto de detoxificação de compostos de plantas e inseticidas (BERENBAUM, 2002). Quando os sinergistas MDP se ligam às P450, ocorre metabolismo oxidativo do grupo metileno, levando à formação de um produto reativo (carbeno) que se complexa irreversivelmente ao ferro heme da enzima, inativando-a. Se houver uma molécula inseticida, a enzima fica impedida de se ligar a ela e de metabolizá-la (TESTA; JENNER, 1981; HODGSON, 1985). Esse é um mecanismo de inibição, que pode ocorrer de forma competitiva ou não competitiva (BENET; KROETZ; SHEINER, 1996).

Alguns compostos podem causar indução das P450 nos insetos, em que geralmente há aumento da expressão gênica e da atividade enzimática, podendo alterar a eliminação da molécula, acelerando o processo de detoxificação, levando inclusive ao desenvolvimento de tolerância àquele composto (BENET; KROETZ; SHEINER, 1996; PARKINSON, 2001). Esse mecanismo de indução muitas vezes é a chave para a adaptação dos insetos herbívoros às suas plantas hospedeiras (FEYEREISEN, 2005). Um exemplo é a indução das P450 pela nicotina na lagarta-do-tabaco, *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae), que então metabolizam o composto, sendo essencial para a capacidade do inseto se alimentar de tabaco

(SNYDER; WALDING; FEYEREISEN, 1993; SNYDER; GLENDINNING, 1996). Lagartas que nunca se alimentaram de nicotina são severamente afetadas por esse composto na dieta (SNYDER; HSU; FEYEREISEN, 1993). Outro exemplo é a indução das P450 no lepidóptero *Papilio polyxenes* Fabricius (Lepidoptera: Papilionidae), pelas furanocumarinas presentes na sua planta hospedeira, *Pastinaca sativa* L. (Apiaceae) (HARRISON et al., 2001; PETERSEN et al., 2001).

As glutathione-S-transferases (GST) também são importantes enzimas envolvidas em processos de detoxificação de xenobióticos, que catalisam a conjugação de glutathione reduzida (GSH) com compostos endógenos e xenobióticos que possuem um centro eletrofílico (ARMSTRONG, 1991). A indução de GST foi observada em espécies generalistas de Lepidoptera como *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com dieta contendo xantotoxina ou 3-indol-acetonitrila (YU, 1984). A xantotoxina é uma furanocumarina encontrada em plantas das famílias Rutaceae e Apiaceae (BERENBAUM, 1978), que também pode induzir as P450 em *P. polyxenes* (COHEN; BERENBAUM; SCHULER, 1989). As GST também foram induzidas em *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) pela isoflavona coumestrol, encontrada em uma cultivar resistente de soja (ROSE et al., 1989), e pelos aleloquímicos do algodão α -pineno, β -cariofileno, umbeliferona e escopoletina em lagartas de *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) e em adultos de *Anthonomus grandis grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) (BRATTSTEN, 1987).

Alguns compostos fenólicos de plantas causaram inibição de GST em lagartas de *S. frugiperda*, como os flavonoides pigenina, luteolina, acacetina, diosmina, miricetina, quercetina, morina, rutina, naringenina, taxifolina, e os fenóis ácido tânico, ácido elágico, juglona, dicumarol, alizarina, menadiona, plumbagina e floretina. Esses aleloquímicos poderiam servir como sinergistas, interferindo na detoxificação mediada por GST em insetos fitófagos (YU; ABO-ELGHAR, 2000). O ácido elágico inibiu de forma não competitiva a GST em relação ao substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e de forma competitiva em relação ao GSH em *S. frugiperda* (YU; ABO-ELGHAR, 2000) e em *P. polyxenes* (LEE, 1991).

2.3 Busca por novos compostos em Meliaceae

A bioatividade singular da azadiractina levou à busca por inseticidas naturais em outras Meliaceae, primeiramente no gênero mais próximo, *Melia*. Sementes de cinamomo, *Melia azedarach* L., contêm muitos triterpenoides similares à azadiractina, as meliacarpinas, que têm também efeito regulador de crescimento (KRAUS, 2002). Porém, as sementes têm também triterpenoides tóxicos para mamíferos, as meliatoxinas, o que tem inviabilizado o seu uso comercial como inseticida (ASCHER et al., 2002). Outro triterpenoide ativo, encontrado na casca de *Melia toosendan* Sieb. et Zucc. (que alguns taxonomistas consideram sinônimo de *M. azedarach*), é a toosendanina, um limonoide que atua como fagodeterrente e também como sinergista para inseticidas, com menor toxicidade para mamíferos (CHIU, 1988; CHEN, ISMAN, CHIU, 1995). A toosendanina é usada comercialmente como inseticida na China. É extraída da casca das meliáceas *M. toosendan* e *M. azedarach* (CHIU, 1995; ZHANG et al., 1992), mas também foi isolada de *Toona ciliata* Roemer (KRAUS; GRIMMINGER; SAWITSKI, 1978).

Além de *A. indica* e *Melia* spp., têm sido bastante estudadas as espécies *Trichilia* spp., *Cedrela* spp. e *Toona ciliata*, também conhecida como *Cedrela toona* Roxb. e *Toona sureni* (Bl.) Merr. Céspedes et al. (2000) isolaram a gedunina, uma mistura epimérica de protogedunina e uma mistura de acetatos de protogedunina do extrato em diclorometano de *Cedrela salvadorensis* Standl. e *Cedrela dugesii* S. Watson, verificando sua atividade inseticida e efeito sobre o crescimento de lagartas neonatas de *S. frugiperda*. Também o limonoide cedrelanolídeo, de *C. salvadorensis*, causou mortalidade larval e redução de crescimento de *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae), assim como os humilanolídeos A, B, C e D de outra meliácea, *Swietenia humilis* Zucc. (JIMENEZ et al., 1997).

Uma potente atividade fagodeterrente sobre *Spodoptera eridania* (Cramer) foi relatada para as triquilinas, limonoides encontrados em espécies do gênero *Trichilia* (KUBO; KLOCKE, 1982; NAKATANI et al., 1985). A partir do extrato metanólico de folhas de *Trichilia pallida* Swartz, foram isolados também flavonoides, identificados como quercetina e quercetrina, que a 100 ppm causaram mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* de 78 e 85%, respectivamente. Do extrato em diclorometano de frutos foram indicados como ativos os limonoides gedunina, 7-desacetilgedunina e limonina, causando 69, 78 e 82% de mortalidade (ROCHA, 2004).

Toonacilina e 6-acetoxitoonacilina de *Toona ciliata* apresentaram propriedades fagodeterrentes sobre *Epilachna varivestis* Muls. (Coleoptera: Coccinellidae) (KRAUS; GRIMMINGER; SAWITSKI, 1978). Koul (1983) observou redução no crescimento de *S. litura* a 0,1% com cedrelona, um limonoide extraído de *T. ciliata*. Kubo e Klocke (1986) também observaram ação de redução do crescimento desse composto sobre os lepidópteros *S. frugiperda*, *Heliothis* (= *Helicoverpa*) *zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae) e *P. gossypiella*. Arnason et al. (1987) verificaram que os limonoides antotecol e cedrelona, de *Khaya anthotheca* (Welw.) C. DC. e *T. ciliata*, respectivamente, afetaram o desenvolvimento de *O. nubilalis*, provocando redução do peso e prolongamento da fase larval, redução das viabilidades larval e pupal e menor número de ovos por fêmea. Além disso, reduziram a eficiência de conversão do alimento ingerido e do alimento digerido, não havendo alteração na digestibilidade aproximada e no índice de consumo, o que, segundo os autores, sugere interferência desses compostos no metabolismo do inseto.

A fim de identificar se o efeito da cedrelona sobre lepidópteros seria comportamental ou tóxico, Koul e Isman (1992) realizaram experimentos de análise nutricional com lagartas de *Peridroma saucia* (Hübner) e de *Mamestra configurata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae), por ingestão de dieta tratada, aplicação tópica e por administração via injeção. A atividade fagodeterrente foi avaliada oferecendo-se discos de folhas tratados para as lagartas e avaliando o consumo após seis horas. Para as duas espécies, tanto no teste de ingestão quanto de aplicação tópica, as eficiências de conversão do alimento ingerido e do digerido foram reduzidas, assim como a taxa de crescimento relativo e a taxa de consumo relativo, porém, a digestibilidade aproximada aumentou. Também foi constatada deterrência alimentar para as duas espécies no teste com disco foliar.

A cedrelona também apresentou atividade sobre o cupim *Heterotermes tenuis* Hagen (Isoptera, Rhinotermitidae), causando mortalidade de 100% após os insetos terem recebido discos de papel filtro tratados com o composto nas concentrações 0,1 e 1,0 mg/ml, além de causar fagodeterrência (SEVERINO et al., 2007). Os autores relacionaram o efeito fagodeterrente à estrutura do composto, que possui todos os anéis intactos (14,15s-epóxido).

Embora esses e outros compostos tenham sido isolados, identificados e avaliados positivamente quanto ao seu potencial inseticida, pouco se conhece sobre seus mecanismos de ação. O conhecimento das propriedades químicas dos novos compostos com atividade inseticida é necessário para determinar a segurança e economia de seu uso na agricultura (RATTAN, 2010).

2.5 Praga alvo do estudo, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

A lagarta-do-cartucho *S. frugiperda* é considerada uma das mais importantes pragas da cultura do milho. É uma espécie polífaga, que pode ocorrer também em algodão, amendoim, arroz, trigo, soja, hortaliças, e cana-de-açúcar, tendo assim ampla distribuição no Brasil (GALLO et al., 2002), embora seja marcante a preferência do inseto por plantas de milho (LARA, 1979).

As lagartas de primeiro ínstar raspam as folhas, devendo ser tomadas medidas de controle logo que esses primeiros sinais aparecem (CRUZ, 1995). Quando chegam ao terceiro ínstar penetram no cartucho, comendo as folhas centrais, deixando as áreas atacadas visíveis quando as folhas se abrem (SOUZA; SOUZA, 2002). Lagartas de quarto a sexto ínstars podem destruir completamente as plantas pequenas e causar severos danos em plantas maiores (CRUZ, 1995). Em estádios mais adiantados, pode-se encontrar a lagarta-do-cartucho atacando o pendão e até mesmo espigas em formação (WAQUIL et al., 1982). O dano causado pelo ataque é variável em função da idade da planta, sendo a redução máxima atingida no estágio de 8-10 folhas, aproximadamente 40 dias após o plantio (CRUZ; TURPIN, 1982).

Após o completo desenvolvimento, a lagarta deixa a planta e vai pupar no solo ou sob a palha de milho, onde permanece até a emergência do adulto. Após o acasalamento, as fêmeas colocam seus ovos em massas nas folhas, em número variável de 50 a 300, em camadas superpostas (LEIDERMAN; SAUER, 1953; CRUZ, 1995). À temperatura acima de 25°C, o ciclo total do inseto pode ser completado em menos de 30 dias, possibilitando a essa espécie a produção de várias gerações durante o ano (CRUZ; MONTEIRO, 2004).

O manejo da *S. frugiperda* por muito tempo foi feito basicamente com o uso de inseticidas sintéticos pertencentes a diferentes grupos químicos, com predominância de benzoilureias nos estados de Goiás, Paraná e Mato Grosso do Sul, seguido por organofosforados, carbamatos e piretroides (TOMQUELSKI, MARTINS, 2007), mas há relatos de que a suscetibilidade da lagarta-do-cartucho e outros insetos a esses inseticidas foi afetada (DIEZ-RODRIGUEZ, OMOTO, 2001; RAMASUBRAMANIAN, REGUPATHY, 2004; SUMAN et al., 2010). Na região oeste do Paraná, por exemplo, a maioria dos produtores adotava métodos de controle químico para essa praga, no entanto menos de 20% obtinham eficiência. Além disso, não havia métodos eficientes de controle de duas outras pragas do milho, *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae) e *Diatraea saccharalis*

(Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae). Em 2008, porém, com a liberação do milho transgênico Bt no Brasil, com a expressão de proteínas obtidas da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner em seus tecidos, a dependência dos produtores por inseticidas químicos ficou muito reduzida, já que a nova tecnologia mostrou-se muito eficiente para controle das lagartas e passou a dominar o mercado (WAQUIL, MENDES, 2013). Entretanto, o maior risco dessa tecnologia está na sua utilização de forma inadequada, pois a não observação das áreas de refúgio pode levar ao surgimento de indivíduos resistentes e, conseqüentemente, à falha da tecnologia (MENDES, WAQUIL, 2009). De fato, cinco anos após a primeira utilização do milho Bt no Brasil, vários registros de quebra de funcionalidade, sobretudo para a lagarta-do-cartucho, têm sido detectados pelos produtores, embora ainda não haja nenhuma confirmação científica de resistência das pragas aos eventos Bt. Deve-se compreender o papel do milho Bt - e de qualquer outra tecnologia ou método de controle - como uma ferramenta dentro do Manejo Integrado de Pragas e não como uma única estratégia de controle de pragas a ser implementada nas lavouras (WAQUIL, MENDES, 2013).

2.6 Perspectivas para o uso de inseticidas botânicos

A compreensão dos mecanismos de defesa das plantas tem auxiliado no desenvolvimento de métodos de controle de pragas menos agressivos ao ambiente. O conhecimento da composição e função dos metabólitos secundários de plantas é importante não somente para sua aplicação direta no controle de pragas, mas também para obtenção de modelos para síntese de novos princípios ativos. Muitas dessas substâncias têm ação específica para determinados organismos, o que é desejável para que sejam preservados os organismos não alvo (SAITO, 2004).

Além disso, o uso intensivo de inseticidas sintéticos acarretou em os riscos ambientais e toxicológicos, além da perda de eficiência pela seleção de populações de insetos resistentes, o que tem gerado um aumento do interesse no desenvolvimento de fontes alternativas de compostos, que possam ser utilizados de forma segura e eficiente no manejo de pragas (ISMAN, 2006). Esses fatores fazem com que seja contínua e crescente a busca de novos inseticidas com modos alternativos de ação, assim como o interesse em promover o uso daqueles que já estão bem estabelecidos (BERNARD; PHILOGÈNE, 1993; GRDIŠA; GRŠIĆ, 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido como parte das atividades do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Controle Biorracional de Insetos Pragas, com sede na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), onde foram realizadas as extrações, fracionamentos e isolamento de compostos, com a colaboração da Prof.^a Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva e da aluna de Doutorado em Química Sâmya Danielle Lima de Freitas (Departamento de Química, Laboratório de Produtos Naturais), em parceria com o Laboratório de Plantas Inseticidas do Departamento de Entomologia e Acarologia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), onde foram conduzidos os ensaios biológicos.

3.1 Criação de *S. frugiperda*

A criação de *S. frugiperda* foi mantida no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas em condições controladas ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$, UR = $60\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas). Foram feitas reintroduções de indivíduos de campo a cada seis meses, a fim de evitar a degeneração da população. As lagartas foram mantidas em tubos de vidro fechados com algodão hidrófugo e alimentadas com dieta artificial (GREENE; LEPLA; DICKERSON, 1976). As pupas foram retiradas dos tubos e colocadas em gaiolas de tubos de PVC, e após a emergência dos adultos, foi colocado em cada gaiola um frasco contendo solução de mel a 1%.

3.2 Coleta do material vegetal e obtenção dos extratos e frações

As espécies de Meliaceae estudadas, com os respectivos números de tombo, foram: *Trichilia pallida* Swartz (ESA 81288), *Toona ciliata* M. Roemer (ESA 78420) e *Trichilia pallens* C. DC. (ESA 81286). As exsiccatas encontram-se depositadas no Herbário ESA da ESALQ/USP.

Ramos e folhas de *T. pallida* foram coletados em outubro de 2010, no setor de Entomologia do campus da ESALQ, em Piracicaba-SP. A coleta de ramos, folhas e frutos de *T. ciliata* foi realizada em janeiro de 2011, também no campus da ESALQ, no Departamento de Engenharia Florestal. Para obtenção de cedrelona, a partir de *T. ciliata*, foram utilizados os

caules (nos quais o composto se encontra em abundância) obtidos de plantas coletadas na empresa de reflorestamento Tropical Flora, no município de Garça-SP, em setembro de 2011. Ramos e folhas de *T. pallens* foram coletados em abril de 2011, no Lajeado das Orquídeas, em Sapopema-PR.

Os materiais foram levados ao Laboratório de Plantas Inseticidas da ESALQ, onde foram secos em estufa com circulação de ar a 40°C até completa secagem, moídos em moinho de facas e armazenados em frascos de vidro. Posteriormente, os pós resultantes foram encaminhados para o Laboratório de Produtos Naturais (UFSCar) para o processo de extração e fracionamento.

Os extratos brutos etanólicos de ramos e folhas de *T. pallida*, ramos e folhas de *T. pallens* e de ramos, folhas e frutos de *T. ciliata* foram preparados utilizando um dispersor Ika Ultra Turrax (T25). Foram feitas cinco extrações (cinco minutos cada, a 8.000 rpm e temperatura ambiente) adicionando-se 1 L de etanol a cada 200 g de pó do material vegetal. Os extratos etanólicos obtidos foram filtrados em funil com papel filtro, e o solvente foi eliminado sob vácuo em um rotaevaporador (45°C). As amostras foram transferidas para pequenos frascos e deixadas em capela com circulação de ar para eliminação do restante do solvente, e armazenadas em refrigerador (-20°C).

O fracionamento dos extratos foi feito através de partição líquido-líquido, com os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila. Para isso, 10 g de cada extrato bruto etanólico foram inicialmente dissolvidos em 100 mL de metanol e, em seguida, foram adicionados 300 mL de água (proporção água e metanol 3:1). O fracionamento foi então realizado com solventes de polaridade crescente. O extrato dissolvido em água e metanol (400 mL) foi colocado em um funil de separação, e sobre ele foi colocado o solvente hexano. O funil foi agitado para misturar o solvente ao extrato e deixado em repouso para separação das fases. O hexano, por ser menos denso, ficou na fase superior, juntamente com os compostos extraídos por ele. Essa fração em hexano foi retirada do funil. O hexano foi adicionado e o funil agitado até atingir a capacidade máxima de extração (observada pela alteração da coloração do solvente). Em seguida foi adicionado o solvente diclorometano e o procedimento foi repetido. Por ser mais denso, o diclorometano formou a camada inferior. O último solvente utilizado foi o acetato de etila, menos denso, formando a camada superior. A massa restante após as extrações consistiu na fração hidroalcoólica, ou residual (restante do extrato em água e metanol na proporção 3:1) (Figura 1). As frações foram rotaevaporadas para eliminação dos solventes e armazenadas em refrigerador. Assim, foram obtidas as frações em hexano, em

diclorometano, em acetato de etila e hidroalcoólica de folhas e de ramos de *T. pallida* e de *T. pallens*, e de folhas, ramos e frutos *T. ciliata*, totalizando 24 frações.

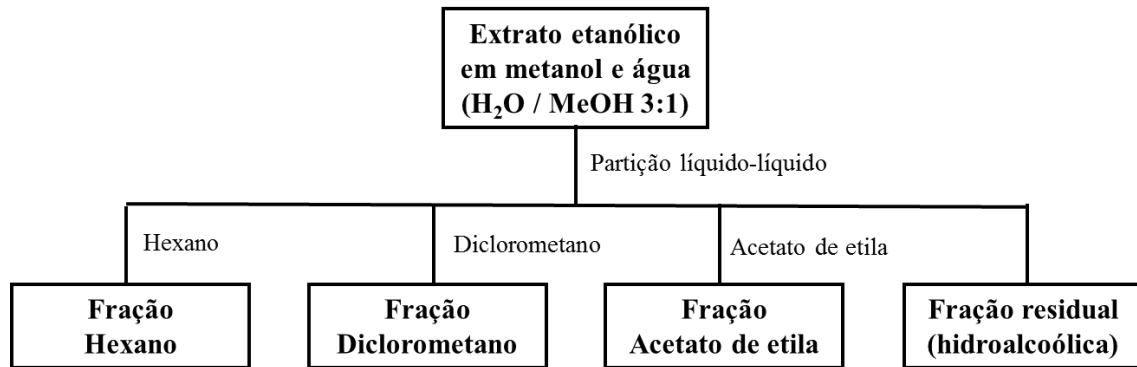


Figura 1 - Fracionamento do extrato bruto etanólico de folhas e de ramos de *Trichilia pallida* e de *Trichilia pallens*, e de folhas, de ramos e de frutos de *Toona ciliata*

3.3 Bioatividade das frações de *T. pallida*, *T. pallens* e *T. ciliata* sobre *S. frugiperda*

As frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica das três espécies vegetais foram submetidas a um teste de bioatividade. Para isso, as três primeiras foram dissolvidas em acetona e água (1:1), e a fração hidroalcoólica dissolvida em etanol e água (1:1), todos na concentração de 1% (10.000 ppm). As soluções a 1% foram aplicadas sobre dieta artificial em placas tipo Elisa, cada uma contendo 24 células. Para cada uma das espécies vegetais, foi realizado um bioensaio separado. Foram utilizadas quatro placas com 24 lagartas cada, totalizando 96 lagartas por tratamento para todas as frações, exceto para as frações de folhas de *T. pallens*, em que foram utilizadas cinco placas com 12 lagartas cada, totalizando 60 lagartas por tratamento, devido à menor quantidade disponível dessa fração. Em cada célula foram colocados 2 mL de dieta artificial, e 30 µL de extrato foram aplicados na superfície com uma micropipeta. Foram feitos três controles: água e acetona (1:1), água e etanol (1:1), e somente água, para verificar algum possível efeito dos solventes. Lagartas de primeiro ínstar foram inoculadas, uma por célula, após a superfície da dieta ter secado. Foram feitas avaliações diárias de mortalidade, sendo ao final de 10 dias registrado o peso das lagartas. Os bioensaios com as frações de cada espécie vegetal foram realizados independentemente. Como as frações de folhas e de ramos de *T. pallens* foram obtidas em períodos diferentes, foram avaliadas em ensaios separados.

3.4 Parâmetros biológicos de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com as frações mais ativas de *T. pallida*, *T. pallens* e *T. ciliata*

A fim de determinar os efeitos sobre alguns parâmetros biológicos das lagartas, as frações de *T. pallida*, *T. pallens* e *T. ciliata* mais ativas no teste anterior foram aplicadas na superfície da dieta em tubos de ensaio (40 µL da fração a 1% por tubo contendo 3 g de dieta), e após a superfície secar, lagartas de primeiro ínstar foram individualizadas nos tubos. Para cada fração foram utilizadas 20 lagartas, em quatro repetições de cinco lagartas cada. Os parâmetros avaliados foram duração e viabilidade da fase larval, sendo considerada viável a lagarta que chegasse à fase de pupa, e o peso de pupas com 24 horas.

3.5 Determinação de índices nutricionais de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta contendo as frações mais ativas de *T. pallida*, *T. pallens* e *T. ciliata*

As frações que apresentaram maior efeito sobre o desenvolvimento das lagartas, observado pelo menor ganho de peso, foram selecionadas para determinação de índices nutricionais. Para isso, as frações foram preparadas em acetona ou etanol e incorporadas à dieta na concentração de 1.000 ppm (1 mg / g dieta), com lagartas de quarto ínstar alimentadas por quatro dias. As lagartas foram individualizadas em tubos de vidro (8,5 × 2,5cm), que haviam sido pesados antes e depois da colocação da dieta artificial. O peso inicial (matéria fresca) de cada lagarta foi determinado, sendo também estimados os pesos iniciais de matéria fresca e matéria seca de uma alíquota de lagartas de mesmo ínstar. Como controle, foi utilizada dieta contendo apenas o solvente (etanol ou acetona). Foram utilizadas 20 lagartas por tratamento. Após quatro dias, as lagartas e as fezes foram separadas das sobras de dieta e as lagartas foram mortas por congelamento. Todo o material foi colocado em estufa de secagem a 50°C, durante sete dias, para obtenção do peso de matéria seca, sendo, em seguida, os referidos materiais pesados e utilizados para determinação dos índices nutricionais.

A partir desses dados foi possível obter, no período de alimentação, o peso do alimento fornecido (Af), o peso do alimento restante (Ar), o peso das fezes (F), o ganho de peso das lagartas (B), o peso médio das lagartas (C) e o peso do alimento ingerido (I). Foram calculadas, então, a taxa de consumo relativo (RCR) (form.1), a taxa metabólica relativa (RMR) (form.2), a taxa de crescimento relativo (RGR) (form. 3), as eficiências de conversão do alimento ingerido (ECI) (form. 4) e digerido (ECD) (form. 5), a digestibilidade aproximada (AD) (form. 6) e o custo metabólico (MC) (form. 7), além do peso do alimento

assimilado (form.8) e o peso do alimento metabolizado (form. 9) (SCRIBER; SLANSKY JR., 1981).

$$\text{RCR} = I / (C \times T) \quad (1)$$

$$\text{RMR} = M / (C \times T) \quad (2)$$

$$\text{RGR} = B / (C \times T) \quad (3)$$

$$\text{ECI} = (B / I) \times 100 \quad (4)$$

$$\text{ECD} = (B / (I - F)) \times 100 \quad (5)$$

$$\text{AD} = ((I - F) / I) \times 100 \quad (6)$$

$$\text{MC} = 100 - \text{ECD} \quad (7)$$

$$I - F \quad (8)$$

$$M = (I - F) - B \quad (9)$$

3.6 Isolamento de compostos presentes nas frações de *T. pallida*, *T. pallens* e *T. ciliata*

As frações obtidas a partir da partição líquido-líquido dos extratos etanólicos brutos de *T. pallida* (folhas e ramos), *T. ciliata* (folhas, ramos e frutos) e *T. pallens* (folhas e ramos) foram subfracionados para o isolamento dos compostos majoritários. Para isso, foi utilizada cromatografia de coluna, com solventes em ordem crescente de polaridade como eluentes (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol); cromatografia por adsorção, utilizando sílica gel como fase estacionária e como fase móvel o mesmo gradiente de solventes utilizado para a cromatografia de coluna, e cromatografia por exclusão com fase estacionária Sephadex LH-20 e fase móvel metanol.

3.7 Isolamento de cedrelona a partir do extrato bruto em hexano do caule de *T. ciliata*

O limonoide cedrelona foi obtido de forma independente dos outros compostos, uma vez que é conhecido que ele ocorre em maior concentração no caule de *T. ciliata* e possui método definido de obtenção (SILVA et al., 1999). Cada 200 g de pó de caule de *T. ciliata* foram submetidos a três extrações em hexano, em aparelho Ika Ultra Turrax (T25) por 5 minutos, a 8.000 rpm e à temperatura ambiente. O extrato hexânico obtido foi filtrado com

funil simples com auxílio de papel de filtro e evaporado à secura sob vácuo em evaporador rotativo. O extrato foi então submetido à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em modo analítico (Coluna C-18 Phenomenex-Luna (150 x 4,6 nm, 5 µm); fase móvel: H₂O:ACN: MeOH (modo gradiente exploratório); vazão: 1mL/min; detecção UV- 262 nm, juntamente com o limonoide cedrelona previamente isolado, a fim de comparar os cromatogramas nas mesmas condições analíticas e verificar a presença da cedrelona no extrato. Verificada a presença da cedrelona, o extrato foi submetido a sucessivas lavagens com hexano gelado (10°C) para a separação dos cristais depositados no fundo do vidro até eliminação parcial dos pigmentos e ácidos graxos. O sobrenadante dessa lavagem dos cristais foi submetido à cromatografia em coluna e CLAE, em condições analíticas e modo preparativo, a fim de se isolar a cedrelona residual (Figura 2). A partir de análise por cromatografia de camada delgada (CCD) e espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN ¹H), confirmou-se que o precipitado era o limonoide cedrelona.

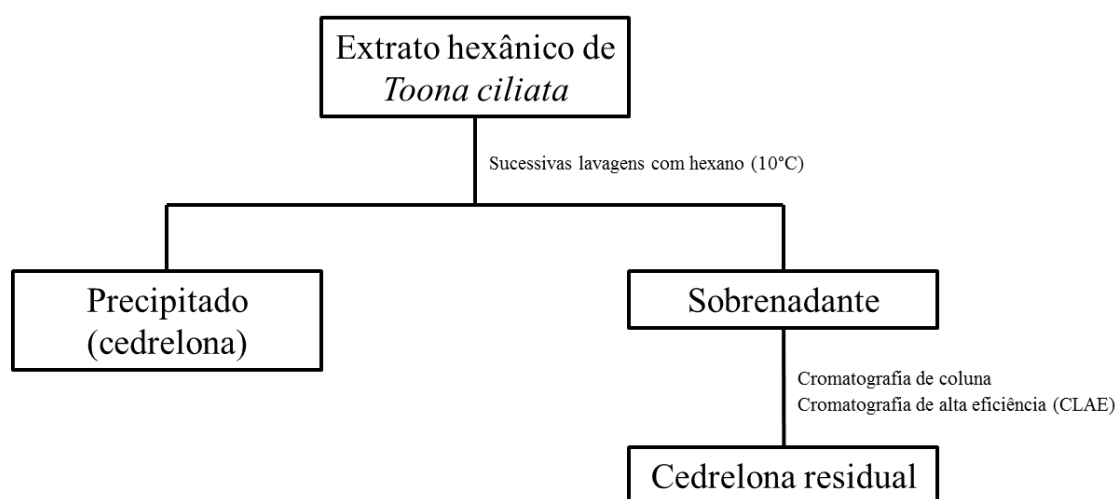


Figura 2 - Metodologia de extração do limonoide cedrelona a partir do extrato hexânico do caule de *Toona ciliata*

3.8 Bioatividade dos compostos isolados sobre *S. frugiperda*

Os compostos isolados a partir das frações das meliáceas em estudo e a cedrelona obtida de extrato hexânico de *T. ciliata* foram avaliados em relação ao efeito de ingestão e de contato sobre lagartas de *S. frugiperda*, e o composto mais promissor foi selecionado para estudos mais detalhados.

3.8.1 Ingestão

Para a detecção do efeito após ingestão, os compostos foram dissolvidos e aplicados superficialmente em dieta artificial. Os compostos foram preparados na concentração 1% (10.000 ppm), com o solvente mais adequado para cada um (etanol ou acetona, pura ou em mistura com água). O controle para cada composto foi o respectivo solvente usado para ressuspensão. Foram aplicados 30 µl de composto na superfície da dieta artificial em placas acrílicas (2 ml de dieta por célula). Após três horas, tempo suficiente para evaporação do solvente, foram inoculadas lagartas de primeiro ínstar nas células das placas acrílicas. No caso de a massa de composto obtida ser muito pequena, a concentração para teste foi reduzida para 0,1% (1.000 ppm). A cedrelona foi avaliada em várias concentrações abaixo de 0,1%, pois em testes preliminares houve mortalidade total das lagartas nessa concentração. Assim, foi possível estimar a concentração letal 50 (CL₅₀) e 90 (CL₉₀) para cedrelona, e também a concentração efetiva 50 (CE₅₀), com base no peso médio das lagartas ao final do bioensaio. Foram utilizadas 10 repetições de 12 lagartas cada para cada tratamento, exceto para cedrelona, em que foram utilizadas quatro repetições de 16 lagartas para cada concentração. Foram feitas avaliações diárias de mortalidade até o sétimo dia, ocasião em que as lagartas sobreviventes foram pesadas.

3.8.2 Contato

Para o teste de contato, os compostos foram preparados em acetona na concentração de 0,1% (1.000 ppm), e aplicados no dorso de lagartas em início de terceiro ínstar com o auxílio de um microaplicador automático (modelo Arnold LV6 Burkard Manufacturing Company Ltd.). Compostos com baixa solubilidade em acetona foram primeiramente ressuspensos com o solvente mais adequado, e posteriormente diluídos em acetona, até atingir a concentração de teste. Antes da aplicação dos tratamentos, as lagartas foram pesadas. No dorso de cada lagarta foi aplicado 1 µL do composto diluído, equivalente a 1 µg de composto. As lagartas controle foram tratadas com o mesmo volume de acetona. Após a aplicação, as lagartas foram colocadas em placas do tipo Elisa contendo dieta artificial sem tratamento, e foram observadas durante cinco dias para registro da mortalidade. Após esse período, as lagartas sobreviventes foram pesadas novamente, para cálculo do ganho de peso.

O número de lagartas e repetições variou em cada tratamento, de acordo com a disponibilidade de lagartas em início de terceiro ínstar em cada dia de bioensaio.

3.9 Estudo da bioatividade do limonoide cedrelona

3.9.1 Fagodeterrência e consumo em folhas de milho tratadas com cedrelona

A atividade fagodeterrente de cedrelona foi avaliada sobre lagartas de quarto ínstar de *S. frugiperda* em testes com e sem chance de escolha. Discos de folha de milho com 4,26 cm² foram pulverizados com 100 µL de acetona (controle) ou cedrelona dissolvida em acetona nas concentrações equivalentes à CL₅₀ e CL₉₀ determinadas no ensaio superficial em dieta. Como arenas foram utilizadas placas de Petri de 15 cm de diâmetro com gesso umedecido no fundo. No teste com chance de escolha, foram dispostos dois discos de folha na mesma placa, um controle e outro tratado com cedrelona, e no teste sem chance de escolha foi colocado apenas um dos dois discos, com 10 repetições para cada teste. Em cada placa foi liberada uma lagarta de quarto ínstar e após 16 horas foi determinada a área foliar restante com um medidor da área foliar (Li-Cor, modelo LI-3000A). A área foliar consumida em cada disco foi então calculada pela subtração da área foliar restante da área foliar fornecida. O índice de deterrência foi calculado pela fórmula $ID = (C-T / C+T) \times 100$, em que C é o consumo nos discos controle e T o consumo nos discos tratados com cedrelona (ISMAN et al., 1990). Para o teste sem chance de escolha, foi feita análise de variância e comparação entre as médias de consumo.

3.9.2 Estimativa da CL₅₀, CL₉₀ e CE₅₀ de cedrelona incorporada à dieta

Com base em testes preliminares, foi determinado um intervalo de concentrações de cedrelona incorporada à dieta para estimativa da CL₅₀, CL₉₀ e da CE₅₀. A cedrelona foi dissolvida em acetona e adicionada à dieta após o preparo, antes de solidificar, e à dieta controle foi adicionada apenas acetona. As concentrações utilizadas foram 3, 6, 12, 24, 48, 96, 144 e 288 µg/g (ppm) de dieta. A dieta foi colocada em tubos de ensaio, e em cada tubo foi colocada uma lagarta de primeiro ínstar. Para cada concentração foram utilizadas 30 lagartas. Após sete dias foi obtida a mortalidade para determinação da CL₅₀, e as lagartas sobreviventes foram pesadas, para estimativa da CE₅₀.

3.9.3 Parâmetros biológicos de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta contendo cedrelona

A fim de verificar os efeitos subletais da cedrelona sobre o desenvolvimento de *S. frugiperda* durante toda a fase larval, o composto foi dissolvido em acetona e adicionado à dieta nas concentrações 3, 6, 12, 24, 48, 96, 144 e 288 $\mu\text{g/g}$ (ppm) de dieta. Em cada tubo de ensaio foram colocados 3 g de dieta, e foi colocada uma lagarta de primeiro ínstar por tubo. À dieta controle foi adicionada apenas acetona. Para cada tratamento foram utilizadas 30 lagartas, em cinco repetições de seis lagartas cada, com observação diária até a formação de pupas. Os parâmetros avaliados foram peso de lagartas aos sete dias, mortalidade durante toda a fase larval, duração da fase larval e peso médio de pupas com 24 horas.

3.9.4 Determinação de índices nutricionais de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta contendo cedrelona

Para melhor compreensão dos efeitos da cedrelona sobre os processos de digestão e metabolismo das lagartas, foram determinados os índices nutricionais após a ingestão de dieta contendo o composto. Lagartas de quarto ínstar foram individualizadas em tubos de vidro (8,5 \times 2,5cm), que foram pesados antes e depois da colocação da dieta artificial contendo cedrelona na concentração 300 $\mu\text{g/g}$ (300 ppm) de dieta, determinada em testes preliminares para lagartas de quarto ínstar. A cedrelona foi dissolvida em 1 mL de acetona e misturada à dieta após a preparação, antes que solidificasse, e à dieta controle foi adicionado o mesmo volume de acetona. Após quatro dias, as lagartas e as fezes foram separadas das sobras de dieta e as lagartas foram mortas por congelamento. Todo o material foi colocado em estufa de secagem a 50°C, durante sete dias, para obtenção do peso de matéria seca, sendo, em seguida, os referidos materiais pesados e utilizados para determinação dos índices nutricionais.

A partir desses dados foi possível obter, no período de alimentação, o peso do alimento fornecido (Af), o peso do alimento restante (Ar), o peso das fezes (F), o ganho de peso das lagartas (B), o peso médio das lagartas (C) e o peso do alimento ingerido (I). Os índices nutricionais foram calculados conforme descrito no item 3.5.

3.9.5 Ensaios enzimáticos com lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta contendo cedrelona

Foram realizados testes para verificação de alterações na quantidade/atividade de algumas importantes enzimas das lagartas: atividade total de proteases, responsáveis pela digestão de proteínas (TERRA; FERREIRA, 2005), atividade de glutathione-S-transferases (GST) e quantificação de monooxigenases do citocromo P450, duas importantes enzimas de detoxificação de aleloquímicos presentes nos insetos (SCOTT; LIU; WEN, 1998; SALINAS; WONG, 1999), e atividade de acetilcolinesterase, enzima responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas por degradar o neurotransmissor acetilcolina (SIEGFRIED; SCOTT, 1990).

3.9.5.1 Obtenção dos extratos enzimáticos

Para a realização dos ensaios enzimáticos, lagartas de quarto ínstar foram alimentadas com dieta contendo cedrelona incorporada a 300 µg/g dieta (300 ppm), ou somente acetona (controle). Após cinco horas de alimentação, as lagartas foram dissecadas em solução salina 0,8% para retirada do intestino médio (com conteúdo), que foi colocado imediatamente em microtubo mantido em gelo. Em cada microtubo foram colocados cinco intestinos, sendo cada microtubo uma repetição. Para cada enzima avaliada, foram feitas três repetições por tratamento (cedrelona e controle).

Para o ensaio de atividade de proteases, os intestinos de cada repetição foram macerados em tampão TRIS-HCl 0,1M pH=8,0 usando um macerador Potter-Elvehjen e centrifugadas (10.000 × g, 10 minutos, 4°C). O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo, consistindo no extrato enzimático, que foi armazenado a -20°C.

Para quantificação das P450, a maceração foi feita em tampão fosfato de potássio 90 mM pH 7,2 e as amostras foram centrifugadas (12.000 × g, dois minutos, 4°C). O sobrenadante foi coletado e transferido para novos microtubos e armazenados a -20°C até o momento do uso.

Para o ensaio de atividade de GST, os intestinos foram macerados em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,5 contendo Triton-X 100 (0,3%) e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) (1mM) para inibir a proteólise, e as amostras foram centrifugadas (10.000 × g, 10 minutos, 4°C). O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C.

Para avaliação da atividade de acetilcolinesterase, lagartas de quarto ínstar também foram alimentadas por cinco horas com dieta com cedrelona incorporada a 300 µg/g dieta, ou somente acetona (controle), porém para obtenção do extrato enzimático foram utilizadas lagartas inteiras, mortas por congelamento (-20°C). As lagartas foram maceradas em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,5 contendo Triton-X 100 (0,3%) e PMSF (1mM) e as amostras foram centrifugadas (10.000 × g, 10 minutos, 4°C). O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C.

3.9.5.2 Proteases

Para a avaliação da atividade das proteases após a ingestão de cedrelona pelas lagartas, foi utilizada a metodologia adaptada de Siqueira et al. (2004). Em banho-maria a 30°C, foram incubados 50 µL do extrato enzimático do intestino médio, 250 µL de tampão TRIS-HCl 0,1M (pH=8,0) e 300 µL do substrato azocaseína 0,5% (preparada em tampão TRIS-HCl 0,1M pH=8,0), sendo a reação interrompida com adição de 250 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (preparado em água destilada), em intervalos de 30 minutos (0, 30, 60, 90 e 120 minutos). Ao final das reações, o volume foi transferido para microtubos e a azocaseína não digerida foi precipitada por centrifugação (10.000 × g, 10 minutos, 25°C). O sobrenadante (azocaseína digerida) foi coletado e colocado em novos tubos. A leitura de absorbância foi feita em espectrofotômetro (Thermo Electron Corporation, BioMate 3) em comprimento de onda de 440 nm. Para o controle de hidrólise espontânea da azocaseína nas condições do ensaio, o extrato enzimático na reação foi substituído pela solução tampão (TRIS-HCl 0,1M pH=8,0). A amostra para calibração do espectrofotômetro (branco) foi composta somente por 600 µL da solução tampão (TRIS-HCl 0,1M pH=8,0). Para os cálculos de atividade, considerou-se a variação de 0,01 de absorbância por minuto como uma unidade de atividade enzimática (1 U), e a atividade foi expressa em U/intestino equivalente

3.9.5.3 Enzimas de detoxificação

A atividade de GST foi avaliada usando como substrato o 1-cloro-2-4-dinitrobenzeno (CDNB) (Sigma Aldrich) (HABIG et al., 1974). A reação consistiu de 12,5 µL de extrato enzimático do intestino de lagartas; 2,5 µL de CDNB 100 mM (preparado em etanol) e 235 µL de glutatona (GSH) 1,06 mM (preparado em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5). O

extrato enzimático foi substituído pela solução tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,5 contendo Triton-X 100 0,3% e PMSF 1mM para a calibração do espectrofotômetro (“branco”). A atividade foi determinada pela alteração na absorbância a 340 nm, durante 5 minutos em intervalos de 30 segundos (30°C), em espectrofotômetro de placa SpectraMax Plus, com o programa Soft Max Pro. A atividade enzimática foi corrigida pelo metabolismo não enzimático no controle, uma vez que o substrato utilizado apresenta pequena hidrólise espontânea. Para os cálculos de atividade, considerou-se a variação de 0,01 de absorbância por minuto como uma unidade de atividade enzimática (1 U), e a atividade foi expressa em U/intestino equivalente.

Para avaliar a atividade das monooxigenases do citocromo P450, foi utilizado um método indireto, que consiste em medir o nível de enzimas contendo grupos heme, incluindo as citocromo oxidases. O nível dessas enzimas pode ser correlacionado com a atividade de peroxidase do grupo heme (BROGDON, McALLISTER, VULULE, 1997). Portanto, esse teste não permite medir diretamente a atividade de monooxigenação da P450 sobre um substrato; em vez disso, quantifica-se o conteúdo de grupos heme presentes no extrato enzimático do inseto, o que permite inferir sobre a quantidade da enzima presente na amostra (BRASIL, 2006). A reação consistiu de 60 µL extrato enzimático, 100 µL do tampão de extração, 400 µL de 3,3',5,5'-tetra-metilbenzidina (TMBZ) (Sigma Aldrich) (0,012 g dissolvido em 6 mL de etanol e diluído em 18 mL de tampão acetato de sódio 0,25 M pH 5,0 e 50 µL de H₂O₂ 3%. Para calibrar o espectrofotômetro (“branco”), a enzima foi substituída pelo tampão de extração, e como controle positivo, foi feita uma reação utilizando 20 µL de citocromo-C de coração de cavalo (Sigma Aldrich) 0,01 mg/mL em tampão acetato de sódio 0,25 M pH 5,0 no lugar da enzima. Após cinco minutos de incubação, foi feita a leitura da absorbância a 650 nm em espectrofotômetro (Thermo Electron Corporation, BioMate 3). Uma curva padrão, obtida pela média de três curvas, foi preparada utilizando-se diferentes concentrações de citocromo C, que permite converter em conteúdo de citocromo os valores de absorbância obtidos com o extrato enzimático do intestino das lagartas. A quantidade de citocromo P450 foi expressa como µg de citocromo por intestino equivalente das lagartas, utilizando a curva padrão do citocromo C como referência (BRASIL, 2006).

3.9.5.4 Acetilcolinesterase

A atividade de acetilcolinesterase foi determinada pelo método de Ellman et al. (1961). Para a reação, foram utilizados 50 µL de extrato enzimático de lagartas de quarto ínstar inteiras alimentadas com cedrelona, 175 µL de iodeto de acetiltiocolina (ATCI) 0,57mM e 175 µL de ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) 0,914mM. Para a reação controle, o extrato enzimático foi substituído pelo mesmo volume de solução tampão (fosfato de sódio 0,1M pH 7,5 contendo Triton-X 100 0,3% e PMSF 1mM). A atividade foi determinada pela alteração na absorbância a 412 nm, durante 5 minutos em intervalos de 30 segundos e temperatura ambiente, em espectrofotômetro (Thermo Electron Corporation, BioMate 3), considerando-se a variação de 0,01 de absorbância por minuto como uma unidade de atividade enzimática (1 U), e a atividade foi expressa em U/lagarta equivalente.

3.9.5.5 Determinação do conteúdo proteico

A concentração de proteína em todas as amostras foi obtida pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando-se como padrão uma solução de albumina de soro bovina (BSA) a 0,2 mg/mL (Thermo Scientific). Para isso, 50 µL do extrato enzimático foram misturados a 1500 µL de Coomassie Blue G-250 (Thermo Scientific). Como branco, foi utilizada a solução tampão de extração enzimática no lugar da enzima. A leitura de absorbância foi feita a 595 nm em espectrofotômetro (Thermo Electron Corporation, BioMate 3).

3.10 Análise dos dados

Para estimativa da CL_{50} e CL_{90} foi utilizado o programa PoloPlus versão 1.0 (LEORA SOFTWARE, 2003). Para estimativa da CE_{50} foi utilizado o método de Gauss-Newton, através do modelo: $\text{peso} = W_0 / [1 + (\text{dose}/EC_{50})^b]$, em que W_0 = peso larval esperado no tratamento controle; dose = concentração de cedrelona por grama de dieta artificial; EC_{50} = concentração efetiva de cedrelona que reduz o peso larval em 50%, e b = parâmetro de inclinação, ângulo da função logística (SIMS et al., 1996) por meio do procedimento NLIN do programa SAS 9.2 (SAS STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 2009). Os índices nutricionais foram submetidos à análise de covariância (RAUBENHEIMER; SIMPSON,

1992), em que, para cada índice, o denominador foi usado como covariável. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer (5%).

Para as demais análises, foi utilizado o programa estatístico R versão 3.0.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013). Todos os bioensaios seguiram o delineamento inteiramente casualizado. Os dados de mortalidade seguiram distribuição binomial e, portanto, foram analisados por GLM (Modelos Lineares Generalizados) por meio do procedimento `cbind`, utilizando o teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$) para comparação de médias; os demais dados foram submetidos ao teste de Bartlett para verificação da homocedasticidade das variâncias dos tratamentos e ao teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade dos resíduos. Em seguida foi feita análise de variância pelo teste F ($p \leq 0,05$). Nos casos em que os dados não se adequaram à análise paramétrica, foi feita análise por GLM, com distribuição de Poisson, usando o procedimento `glht` do pacote `multcomp` do programa R, com análise de variância pelo teste F ($p \leq 0,05$). Nos casos em que foi detectada superdispersão, os erros padrão foram corrigidos usando um modelo Quasi-GLM (variância calculada por média \times parâmetro de dispersão). Nos casos em que havia mais de dois tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Bioatividade das frações de *T. pallida*, *T. pallens* e *T. ciliata* sobre *S. frugiperda*

Entre as frações de folhas e ramos de *T. pallida* aplicadas sobre a dieta oferecida às lagartas de *S. frugiperda* (Tabela 1), a fração em diclorometano de ramos foi a única que causou mortalidade larval maior (12,50%) que as registradas nos controles etanol, acetona e água (1,04%). No tratamento com a fração em diclorometano de folhas, o valor de mortalidade (9,38%) não diferiu da fração em ramos desse mesmo solvente, mas também não diferiu dos controles. Nas demais frações (em acetato de etila, em hidroálcool e em hexano), tanto de ramos como de folhas, a mortalidade variou de 0 a 1,04%, não diferindo também dos controles. Não houve diferença entre o controle água e os controles com os solventes etanol e acetona, usados para diluir as frações, indicando ausência de efeito dos mesmos sobre as lagartas. Apesar de a mortalidade larval nas dietas contendo frações em diclorometano de folhas e de ramos de *T. pallida* terem atingido no máximo 12,5%, o efeito sobre o peso ao 10º dia foi bastante intenso, verificando-se, para os insetos sobreviventes, pesos de 14,38 e 22,13 mg, respectivamente, os quais representaram menos de 10% daqueles registrados nos demais tratamentos (frações e controles), nos quais os valores variaram entre 288,16 e 392,10 mg.

Resultados semelhantes foram observados com as frações de ramos de *T. pallens*. Apenas na dieta contendo a fração diclorometano, a mortalidade das lagartas (30,21%) foi superior aos valores registrados nos três controles, nos quais a mortalidade não passou de 1,04%. Para as frações em acetato de etila, hidroálcool e hexano, a mortalidade larval atingiu no máximo 6,25% não diferindo dos controles. A fração em diclorometano não causou apenas mortalidade das lagartas, mas também afetou drasticamente o crescimento, sendo que, após 10 dias, as lagartas sobreviventes pesavam apenas 4,31 mg, diferindo de todas as demais frações e dos controle, nos quais o peso variou de 289,46 a 375,62 mg (Tabela 2).

Tabela 1 – Médias de peso e mortalidade (\pm erro padrão da média) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta tratada com frações de extrato etanólico de folhas e ramos de *Trichilia pallida* a 1%, após 10 dias

Tratamento	Peso \pm EP (mg) ¹	Mortalidade \pm EP (%) ²
Fração Diclorometano - Ramos	14,38 \pm 1,62 a	12,50 \pm 0,38 a
Fração Diclorometano - Folhas	22,13 \pm 2,25 a	9,38 \pm 1,04 ab
Fração Acetato de etila - Ramos	290,99 \pm 32,14 b	1,04 \pm 1,04 bc
Fração Hexano - Folhas	288,16 \pm 20,25 b	0,00 \pm 0,00 c
Fração Acetato de etila - Folhas	375,87 \pm 24,06 bc	1,04 \pm 1,04 bc
Fração Hexano - Ramos	303,78 \pm 14,35 bc	1,04 \pm 1,04 bc
Controle Etanol	340,66 \pm 18,00 bc	1,04 \pm 1,04 bc
Controle Acetona	351,87 \pm 24,70 bc	1,04 \pm 1,04 bc
Controle Água	374,26 \pm 26,40 bc	1,04 \pm 1,04 bc
Fração Hidroalcoólica - Ramos	325,61 \pm 14,19 bc	0,00 \pm 0,00 c
Fração Hidroalcoólica - Folhas	392,10 \pm 27,32 c	0,00 \pm 0,00 c
F	73,96	-
p	< 0,001	< 0,001

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si (Tukey, $p \leq 0,05$)

¹ GLM, teste F ($p \leq 0,05$); ² GLM, teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$)

Tabela 2 – Médias de peso e mortalidade (\pm erro padrão da média) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta artificial tratada com frações de extrato etanólico de ramos de *Trichilia pallens* a 1%, após 10 dias

Tratamento	Peso \pm EP (mg) ¹	Mortalidade \pm EP (%) ²
Fração Diclorometano	4,31 \pm 0,30 a	30,21 \pm 2,62 a
Fração Acetato de etila	289,46 \pm 21,94 b	3,13 \pm 1,99 b
Controle Etanol	294,36 \pm 5,89 b	1,04 \pm 1,04 b
Controle Acetona	314,06 \pm 12,47 b	0,00 \pm 0,00 b
Fração Hidroalcoólica	326,97 \pm 14,21 bc	1,04 \pm 1,04 b
Fração Hexano	374,71 \pm 10,46 c	6,25 \pm 3,61 b
Controle Água	375,62 \pm 13,18 c	0,00 \pm 0,00 b
F	186,33	-
p	< 0,001	< 0,001

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si (Tukey, $p \leq 0,05$)

¹ GLM, teste F ($p \leq 0,05$); ² GLM, teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$)

Embora os controles etanol e acetona tenham diferido do controle água em relação ao peso de lagartas (Tabela 2), isso não foi verificado nos demais ensaios, o que fez com que se desconsiderasse a possibilidade de aqueles solventes apresentarem efeito sobre o inseto.

Não houve diferença de mortalidade entre os tratamentos com as frações de folhas de *T. pallens*, com valores variando de 1,67 a 11,67% para as lagartas que ingeriram dieta com as frações, e de 3,13 a 6,67 nos controles. Para o peso larval, o valor obtido na fração em hexano

(344,06 mg) diferiu do obtido no controle água (443,56 mg), apesar de não diferir dos controles etanol e acetona e, tampouco, das demais frações (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias de peso e mortalidade (\pm erro padrão da média) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta artificial tratada com frações de extrato etanólico de folhas de *Trichilia pallens* a 1%, após 10 dias

Tratamento	Peso \pm EP (mg) ¹	Mortalidade \pm EP (%) ²
Fração Hexano	344,06 \pm 17,31 a	1,67 \pm 1,67
Fração Diclorometano	372,57 \pm 28,61ab	11,67 \pm 4,25
Fração Acetato de etila	399,22 \pm 24,54 ab	10,00 \pm 4,86
Fração Hidroalcoólica	405,60 \pm 25,42 ab	8,33 \pm 0,00
Controle Etanol	414,96 \pm 13,20 ab	3,13 \pm 1,20
Controle Acetona	435,30 \pm 24,35 ab	6,67 \pm 1,67
Controle Água	443,56 \pm 10,56 b	6,67 \pm 4,86
F	2,63	-
p	0,0375	0,3482

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey, $p \leq 0,05$)

¹ ANAVA, teste F ($p \leq 0,05$); ² GLM, teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$)

As frações de ramos, de folhas e de frutos de *T. ciliata* não causaram mortalidade significativa das lagartas, com valores atingindo no máximo 2,08%. O efeito sobre o desenvolvimento, porém, foi observado, de forma mais acentuada, sendo os valores obtidos com a fração em diclorometano de folhas e com a fração em diclorometano de frutos (114,25 e 146,86 mg, respectivamente) menores que os obtidos nos três controles, nos quais os pesos variaram entre 210,36 e 237,15 mg (Tabela 4). Os pesos larvais obtidos com as outras frações não diferiram entre si nem dos controles.

Considerando-se as três plantas testadas, verifica-se que, com *T. ciliata*, nenhum tratamento provocou efeito sobre o peso tão pronunciado como as frações em diclorometano de ramos e de folhas de *T. pallida* e de ramos de *T. pallens*.

Tabela 4 - Médias de peso e mortalidade (\pm erro padrão da média) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta tratada com frações de extrato etanólico de folhas, ramos e frutos de *Toona ciliata* a 1%, após 10 dias

Tratamento	Peso \pm EP (mg) ¹	Mortalidade \pm EP (%) ²
Fração Diclorometano - Folhas	114,25 \pm 11,10 a	1,04 \pm 0,10
Fração Diclorometano - Frutos	146,86 \pm 4,65 ab	1,04 \pm 0,10
Fração Acetato de etila - Ramos	158,20 \pm 6,63 abc	1,04 \pm 0,10,
Fração Diclorometano – Ramos	169,33 \pm 12,30 abcd	0,00 \pm 0,00
Fração Hidroalcoólica - Folhas	183,95 \pm 15,07 bcde	0,00 \pm 0,00
Fração Acetato de etila - Folhas	191,41 \pm 9,15 bcde	0,00 \pm 0,00
Fração Hexânica - Ramos	193,47 \pm 10,42 bcde	0,00 \pm 0,00
Fração Hexânica - Folhas	194,70 \pm 9,53 bcde	0,00 \pm 0,00
Fração Hexânica - Frutos	197,06 \pm 13,84 bcde	0,00 \pm 0,00
Fração Acetato de etila - Frutos	198,16 \pm 20,30 bcde	0,00 \pm 0,00
Fração Hidroalcoólica - Frutos	201,90 \pm 5,46 bcde	1,04 \pm 0,10
Controle Água	210,36 \pm 10,22 cde	0,00 \pm 0,00
Fração Hidroalcoólica - Ramos	221,51 \pm 13,17 cde	0,00 \pm 0,00
Controle Etanol	231,88 \pm 14,16 de	1,04 \pm 0,10
Controle Acetona	237,15 \pm 22,42 e	2,08 \pm 0,14
F	2,63	-
p	0,0375	0,3482

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey, $p \leq 0,05$)

¹ GLM, teste F ($p \leq 0,05$); ² GLM, teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$)

A bioatividade de extratos dessas meliáceas sobre *S. frugiperda* já tinha sido relatada (RODRIGUEZ, 1995; ROEL et al., 2000; TORRECILLAS; VENDRAMIM, 2001; BOGORNÍ; VENDRAMIM, 2003, 2005). Os métodos de obtenção de extratos e de avaliação da bioatividade em tais trabalhos, entretanto, diferem bastante dos utilizados na presente pesquisa, o que dificulta a comparação com os dados aqui obtidos. Alguns trabalhos se referem a extratos aquosos e outros a extratos orgânicos obtidos por meio de diferentes formas de extração. As técnicas experimentais, por outro lado, variam entre a utilização de folhas de milho tratadas diariamente com extratos e a adição de extratos a dieta artificiais. As concentrações utilizadas nesses experimentos também têm sido variáveis. O tempo de avaliação e a idade das lagartas também são fatores importantes. Apesar de todas essas variáveis, os efeitos gerais observados nas lagartas após a ingestão de alimento tratado com extratos dessas espécies vegetais são semelhantes: redução no ganho de peso das lagartas, alongamento da fase larval, formação de pupas menores e mortalidade dependente da concentração. Para *T. ciliata*, entretanto, os extratos causam principalmente efeitos subletais, com baixa mortalidade mesmo nas maiores concentrações, como citado por Rodríguez (1995) também para lagartas de *S. frugiperda*.

O efeito mais marcante é o menor ganho de peso larval. Algumas das frações se destacaram por provocarem grandes reduções de peso nas lagartas após alguns dias de alimentação nas dietas tratadas. Isso pode ser resultante de menor consumo, devido a um efeito fagodeterrente, ou de menor adequação nutricional do alimento, pela presença de xenobióticos. Pode também indicar efeito tóxico pós-ingestão, causando menor aproveitamento do alimento pelo inseto ou mesmo inibindo processos vitais importantes, causando atraso no desenvolvimento. Porém, a mistura de compostos presente nas frações do extrato vegetal dificulta um estudo mais detalhado do modo de ação.

O maior efeito sobre o peso de lagartas observado após ingestão das frações em diclorometano (com exceção de folhas de *T. pallens*) é um indício de que esse solvente é mais eficiente na extração de compostos ativos dessas espécies vegetais. Para *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), o extrato em diclorometano de folhas de *T. pallida* também foi o mais eficiente, quando comparado aos extratos em hexano e em metanol, tanto em relação à mortalidade quanto ao peso das lagartas após seis dias (CUNHA et al., 2005). O diclorometano é um solvente de polaridade média, extraíndo compostos de menor polaridade (hidrofóbicos) e também anfipáticos (uma parte polar e outra apolar), podendo abranger grande quantidade de compostos (FERRACINI et al., 2005). Essa característica está sujeita à composição química de cada espécie vegetal, podendo o diclorometano não ser tão eficiente quando houver abundância de compostos apolares. Para as espécies de Meliaceae estudadas, contudo, esse solvente foi bastante eficiente.

Em razão dos resultados obtidos nesta primeira etapa, as frações em diclorometano de ramos de *T. pallens*, de ramos e de folhas de *T. pallida* e de folhas e de frutos de *T. ciliata* foram selecionadas para prosseguimento dos estudos tanto para determinação dos efeitos sobre parâmetros nutricionais e biológicos de *S. frugiperda* como para caracterização de compostos ativos.

4.2 Parâmetros biológicos de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com as frações mais ativas de *T. pallida*, *T. pallens* e *T. ciliata*

Das frações mais ativas sobre *S. frugiperda* caracterizadas na primeira etapa desta pesquisa (frações em diclorometano de ramos de *T. pallens*, de folhas e de ramos de *T. pallida* e de folhas e de frutos de *T. ciliata*), apenas aquela em diclorometano de ramos de *T. pallens* causou mortalidade larval (60,00%) superior à registrada no controle, no ensaio em que as

lagartas foram expostas aos tratamentos durante toda a fase larval. Para as frações de folhas e de ramos de *T. pallida* e de folhas de *T. ciliata* os valores variaram entre 30 e 40%, não diferindo da fração de ramos de *T. pallens*, porém também não diferindo do controle (5%). A fração de ramos de *T. pallens*, juntamente com a de folhas de *T. pallida*, foram as que apresentaram efeito significativo sobre o desenvolvimento das lagartas, causando alongamento da fase larval em aproximadamente 6 a 7 dias em relação ao controle. Além disso, nesses dois tratamentos e na fração de ramos de *T. pallida*, as pupas apresentaram menor peso em relação ao controle. Conforme já tinha sido verificado no experimento anterior (item 4.1), as frações de folhas e de frutos de *T. ciliata* foram as que menos afetaram a sobrevivência e o desenvolvimento do inseto (Tabela 5).

Tabela 5 - Mortalidade larval, duração da fase larval e peso de pupas com 24 horas (\pm erro padrão da média) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta artificial tratada com frações em diclorometano de *Trichilia pallida*, *Trichilia pallens* e *Toona ciliata*

Tratamento	Mortalidade \pm EP (%) ¹	Duração \pm EP (dias) ²	Peso de pupas \pm EP (mg) ³
<i>Trichilia pallens</i> - Ramos	60,00 \pm 8,16 a	24,25 \pm 2,22 a	208,32 \pm 19,32 a
<i>Trichilia pallida</i> - Folhas	40,00 \pm 8,16 ab	23,77 \pm 0,58 a	201,73 \pm 0,91 a
<i>Trichilia pallida</i> - Ramos	35,00 \pm 17,08 ab	21,43 \pm 0,82 ab	221,75 \pm 9,84 ab
<i>Toona ciliata</i> - Folhas	30,00 \pm 10,00 ab	18,88 \pm 0,53 b	272,16 \pm 11,28 c
<i>Toona ciliata</i> - Frutos	10,00 \pm 5,77 b	18,40 \pm 0,34 b	260,48 \pm 4,27 bc
Controle	5,00 \pm 5,00 b	17,25 \pm 0,13 b	279,51 \pm 5,03 c
F	-	9,22	10,18
p	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey, $p \leq 0,05$)

¹ GLM, teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$); ² GLM, teste F ($p \leq 0,05$), considerando lagartas que completaram a fase larval, atingindo a fase de pupa; ³ GLM, teste F ($p \leq 0,05$)

Uma das características de extratos de muitas meliáceas é o efeito lento e crescente ao longo do tempo, o que explica a maior atividade observada nesse ensaio em relação aos testes de bioatividade anteriormente descritos, os quais duraram apenas 10 dias. Com aquele intervalo experimental já se observavam, em alguns tratamentos, efeitos subletais pelo menor ganho de peso das lagartas. Quando as lagartas foram avaliadas durante toda a fase larval, foi possível observar maior mortalidade, que foi crescente ao longo do tempo, principalmente para as frações de ramos de *T. pallens* e de folhas e de ramos de *T. pallida*. Esse efeito não foi observado para a fração de frutos de *T. ciliata*, em que a mortalidade foi muito baixa e as lagartas morreram apenas após 20 dias, já em fase de pré-pupa.

Como efeitos subletais, foram observados também atraso no desenvolvimento, pelo aumento da duração da fase larval, e redução do peso de pupas. Bogorni e Vendramim (2005) observaram alongamento da fase larval de *S. frugiperda* após ingestão de folhas de milho tratadas com extratos aquosos de folhas e de ramos de *T. pallida* e de folhas de *T. pallens*. Torrecillas e Vendramim (2001) também verificaram alongamento da fase larval e redução de peso desse inseto com extratos aquosos de ramos de *T. pallida*. Esses efeitos podem ser decorrentes do menor consumo de alimento, devido ao efeito de fagodeterrentes ou de inadequação nutricional do substrato alimentar (RODRÍGUEZ, 1995). Podem também ser consequência de redução na eficiência de conversão do alimento e do desvio de parte deste para o metabolismo de detoxificação das substâncias tóxicas presentes no alimento (TANZUBIL; McCAFFERY, 1990). Com menor ingestão de alimento e baixa conversão em biomassa, o inseto demora mais tempo para atingir o peso crítico, ou seja, o peso mínimo necessário para mudança de ínstar, o que aumenta a duração da fase larval.

Os efeitos subletais de extratos e/ou frações sobre esse inseto devem ser estudados de modo mais detalhado, para identificação e caracterização dos compostos que possam ser os responsáveis pela atividade.

4.3 Determinação de índices nutricionais de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta contendo as frações mais ativas de *T. pallida*, *T. pallens* e *T. ciliata*

A análise de covariância indicou efeito significativo dos tratamentos e das covariáveis, porém não houve interação entre os dois fatores, para nenhum dos índices nutricionais. Por isso, os dados foram submetidos à análise de variância.

A taxa de consumo relativo (RCR), que indica a quantidade de alimento ingerido pela lagarta por grama de peso corpóreo por dia, aumentou, em relação ao controle, após a ingestão da fração de ramos de *T. pallida*, o que pode indicar uma tentativa do inseto de compensar o efeito antinutricional da dieta contendo a fração. O RCR das lagartas que ingeriram dieta contendo a fração de folhas de *T. ciliata* reduziu, e para as outras frações (folhas de *T. pallida*, ramos de *T. pallens* e frutos de *T. ciliata*), os valores não diferiram do controle (Tabela 6). Em relação à taxa metabólica relativa (RMR), ou seja, a quantidade de alimento gasto pela lagarta em metabolismo por grama de peso corpóreo por dia, houve aumento após a ingestão de dieta contendo as frações de frutos de *T. ciliata* e de ramos de *T. pallida*, ou seja, essas frações induziram maior atividade metabólica nas lagartas. Para as

demais frações, o RMR não diferiu do controle. Entretanto, a taxa de crescimento relativo (RGR), que indica o ganho de biomassa pelo inseto em relação ao peso corpóreo por dia, reduziu após a ingestão de todas as frações, em relação ao controle, sendo a fração de folhas de *T. pallida* a que causou maior redução do crescimento (Tabela 6). Essa redução pode ser consequência da menor ingestão de alimento ou de efeito tóxico direto causado pelas frações, resultando em uso do alimento para outros fins, como produção de enzimas de detoxificação, e não para o crescimento.

A eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI), que é a porcentagem do alimento ingerido que é transformada em biomassa, reduziu-se, em relação ao controle, em todos os tratamentos, com exceção apenas da fração de folhas de *T. ciliata*, onde o referido índice não diferiu do controle (Tabela 7). A eficiência de conversão do alimento digerido (ECD), que é a estimativa da porcentagem do alimento assimilado que foi convertida em biomassa, reduziu após ingestão de dieta com a fração de frutos de *T. ciliata*, de folhas e de ramos de *T. pallida*. Nas frações de folhas de *T. ciliata* e de ramos de *T. pallens* o ECD não diferiu do controle (Tabela 7). A redução na conversão do alimento em biomassa justifica o menor crescimento das lagartas observado com a maioria das frações, e indica que elas causam efeito tóxico, com exceção da fração de folhas de *T. ciliata*, que não alterou ECI e ECD.

O custo metabólico (MC), que indica a porcentagem de alimento que é metabolizado em energia para a manutenção da vida, foi influenciado de modo semelhante, por ser o inverso de ECD ($100 - ECD$). Não houve alteração desse índice com as frações de ramos de *T. pallens* e de folhas de *T. ciliata*, porém houve aumento com as outras três frações. Apesar dessas alterações, a digestibilidade aproximada (AD), que é a porcentagem do alimento ingerido efetivamente assimilado pelo inseto, não diferiu do controle com nenhuma das frações (Tabela 7). Isso indica que, apesar da menor conversão do alimento em biomassa, o inseto assimilou bem o alimento, que foi utilizado principalmente para o metabolismo. Além disso, o alimento contendo o limonoide pode ter ficado por mais tempo no trato digestivo do inseto, para prolongar a ação de enzimas detoxificadoras, ficando assim sujeito à ação de enzimas digestivas por mais tempo, o que pode explicar o aumento observado na digestibilidade. Segundo Waldbauer (1968), a eficiência de conversão do alimento não tem relação direta com a digestibilidade aproximada, ou seja, a redução em ECI e ECD não implica em redução de AD.

Em relação à dieta consumida (Figura 3), em todas as frações houve redução da quantidade em mais da metade em relação ao controle. Como consequência da menor

ingestão de alimento, houve redução também na quantidade de fezes produzidas e no ganho de peso, assim como menor quantidade de alimento assimilado e metabolizado. As lagartas que ingeriram a dieta contendo a fração de folhas de *T. ciliata* foram as que tiveram menor quantidade de alimento metabolizado, ou seja, que utilizaram maior quantidade de alimento para o crescimento e não para o metabolismo (Figura 3). Apesar da redução de consumo total de alimento, a taxa de consumo relativo ao peso corpóreo (Tabela 6) foi alterada apenas com duas das frações, aumentando após ingestão da fração de ramos de *T. pallida* e diminuindo com a fração de folhas de *T. ciliata*. Assim, com a primeira, o aumento na ingestão relativa indica ausência de fagodeterrência primária (aquela mediada por quimiorreceptores nas peças bucais) e a redução em ECI e ECD indica que há efeito tóxico pós-ingestão, que pode ser considerada fagodeterrência secundária (redução de consumo causada por toxicidade) (MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993), enquanto para a segunda fração o efeito fagodeterrente primário provavelmente é o responsável pela redução no consumo relativo, já que não houve alteração na eficiência de conversão do alimento, no custo metabólico e na taxa metabólica relativa, excluindo a possibilidade de haver efeito tóxico. Ou seja, para as lagartas alimentadas com dieta contendo a fração de folhas de *T. ciliata*, apesar da menor ingestão de alimento, o aproveitamento desse alimento foi alto, embora não o suficiente para que o crescimento fosse igual ao das lagartas controle. Para as outras frações, as lagartas continuaram se alimentando, provavelmente como uma tentativa de compensar o custo metabólico elevado.

Tabela 6 - Índices nutricionais de lagartas de quarto ínstar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta contendo frações em diclorometano de *Trichilia pallida*, *Trichilia pallens* e *Toona ciliata* a 1000 ppm, após quatro dias

Tratamento	RCR (g/g/dia)	RMR (g/g/dia)	RGR (g/g/dia)
<i>Trichilia pallida</i> - Ramos	1,3176 ± 0,0148 a	0,2948 ± 0,0179 a	0,3464 ± 0,0045 b
<i>Trichilia pallida</i> - Folhas	1,3028 ± 0,0401 ab	0,2700 ± 0,0350 abc	0,3222 ± 0,0051 c
<i>Trichilia pallens</i> - Ramos	1,2833 ± 0,0156 ab	0,2029 ± 0,0118 bcd	0,3354 ± 0,0047 b
<i>Toona ciliata</i> - Frutos	1,2617 ± 0,0279 ab	0,2783 ± 0,0193 ab	0,3450 ± 0,0053 b
Controle	1,2070 ± 0,0288 b	0,1815 ± 0,0219 cd	0,3784 ± 0,0080 a
<i>Toona ciliata</i> - Folhas	1,0879 ± 0,0220 c	0,1592 ± 0,0205 d	0,3458 ± 0,0061 b
F	11,13	6,89	11,51
p	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si (ANAVA, Tukey, $p \leq 0,05$)

RCR = taxa de consumo relativo (gramas de alimento consumido por grama de peso corpóreo por dia); RMR = taxa metabólica relativa (gramas de alimento gasto em metabolismo por grama de peso corpóreo por dia); RGR = taxa de crescimento relativo (gramas de biomassa adquirida por grama de peso corpóreo por dia)

Tabela 7 - Índices nutricionais de lagartas de quarto ínstar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta contendo frações em diclorometano de *Trichilia pallida*, *Trichilia pallens* e *Toona ciliata* a 1000 ppm, após quatro dias

Tratamento	ECI (%)	ECD (%)	AD (%)	MC (%)
<i>Trichilia pallida</i> - Folhas	24,9440 ± 0,6137 a	56,6965 ± 2,7861 a	44,9338 ± 1,5869 ab	43,3035 ± 2,7861 a
<i>Trichilia pallens</i> - Ramos	26,2236 ± 0,6310 a	62,6631 ± 1,3451 ab	42,0304 ± 1,1207 a	37,3369 ± 1,3451 ab
<i>Trichilia pallida</i> - Ramos	26,3561 ± 0,4836 a	54,5448 ± 1,3301 a	48,6265 ± 1,0862 b	45,4552 ± 1,3301 a
<i>Toona ciliata</i> - Frutos	27,6266 ± 0,8843 a	56,2060 ± 1,8711 a	49,4727 ± 1,3171 b	43,7940 ± 1,8711 a
Controle	31,4966 ± 0,9314 b	68,5666 ± 2,5957 b	46,3361 ± 1,5526 ab	31,4334 ± 2,5957 b
<i>Toona ciliata</i> - Folhas	32,0089 ± 0,9160 b	70,1109 ± 2,7886 b	46,2736 ± 1,4530 ab	29,8891 ± 2,7886 b
F	15,62	9,75	4,00	9,75
p	< 0,001	< 0,001	0,0027	< 0,001

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si (ANAVA Tukey, $p \leq 0,05$)

ECI = eficiência de conversão do alimento ingerido; ECD = eficiência de conversão do alimento digerido; AD = digestibilidade aproximada; MC = custo metabólico (não analisado, por ser o inverso de ECD, considerou-se a mesma análise)

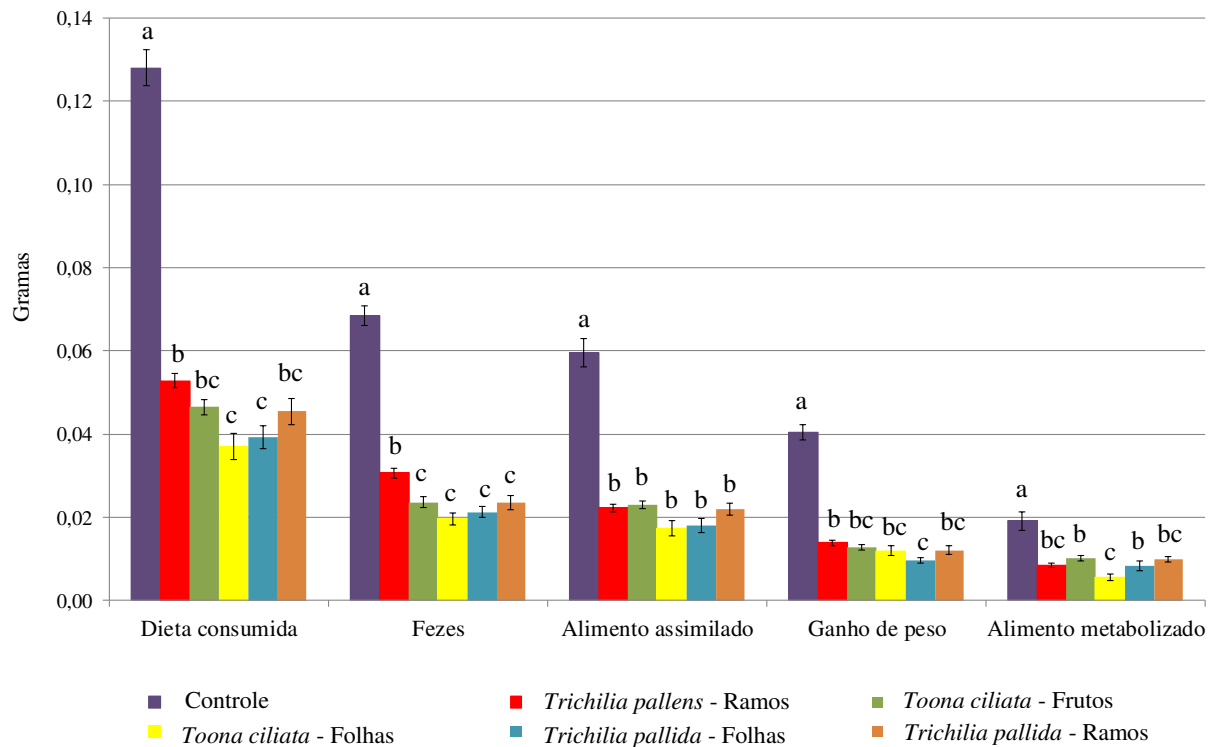


Figura 3 - Média (\pm EP) de dieta consumida ($F = 103,91$, $p < 0,0001$), fezes ($F = 101,85$, $p < 0,0001$), alimento assimilado ($F = 70,01$, $p < 0,0001$), ganho de peso ($F = 108,62$, $p < 0,0001$) e alimento metabolizado ($F = 18,42$, $p < 0,0001$) de lagartas de quarto ínstar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo frações em diclorometano de extratos de *Trichilia pallens*, *Trichilia pallida* e *Toona ciliata*. Dieta consumida = fezes + alimento assimilado; Alimento assimilado = ganho de peso + alimento metabolizado. Barras com a mesma letra, para cada parâmetro avaliado, não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$ (GLM)

Como as frações apresentam uma mistura de compostos, é possível que haja vários mecanismos de ação envolvidos nos efeitos observados, inerentes a cada composto. Um maior entendimento dos efeitos só poderá ser obtido através do estudo desses compostos isoladamente.

4.4 Compostos isolados das frações de *T. pallida*, *T. pallens* e *T. ciliata*

A fração em diclorometano de ramos de *T. pallens*, a fração em diclorometano de ramos e de folhas de *T. pallida* e de folhas e de frutos de *T. ciliata*, que apresentaram melhor atividade, foram selecionadas visando determinar os compostos responsáveis pela bioatividade. Entretanto, não foi possível isolar compostos de todas as frações em quantidade suficiente para identificação e estudo da bioatividade.

Foram obtidos quatro compostos a partir das frações das três meliáceas em estudo. Da fração em diclorometano de ramos de *T. pallens* foi isolada a cumarina escopoletina, por cromatografia de adsorção, utilizando como fase estacionária sílica gel e como fase móvel um gradiente de solventes em ordem crescente de polaridade (diclorometano, acetato de etila e metanol). A partir da fração em diclorometano dos frutos de *T. ciliata* foi obtido um triglicerídeo majoritário (não identificado), através de coluna cromatográfica filtrante, com os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol como eluentes. Da fração em diclorometano de folhas de *T. ciliata* e das frações em diclorometano de ramos e de folhas de *T. pallida* não foram obtidos compostos em quantidade suficiente para a avaliação da bioatividade. Em frações com menor bioatividade, entretanto, foram encontrados compostos em abundância. Assim, da fração em hexano das folhas de *T. pallida*, que causou pequena redução de peso larval no teste de bioatividade, foi isolado o triterpeno damaradienol, pelo mesmo método em que foi obtida a escopoletina. Da fração em acetato de etila de ramos de *T. ciliata*, que também teve baixa atividade, foi isolado o flavonoide (+/-)-catequina, através de cromatografia por exclusão com fase estacionária Sephadex LH-20 e metanol como fase móvel. Os compostos foram caracterizados a partir de dados obtidos por ressonância magnética nuclear (RMN¹H, ¹³C), pelo grupo do Laboratório de Produtos Naturais (UFSCar) (Figura 4).

A cedrelona foi obtida de forma independente dos demais compostos, já que não foi proveniente de nenhuma das frações ativas, e sim do extrato bruto em hexano de caules de *T. ciliata*, uma vez que é conhecida a maior concentração desse composto no caule da planta. A comparação dos cromatogramas do extrato bruto e da cedrelona previamente isolada indicou a presença do limonoide no referido extrato (Figuras 5 e 6).

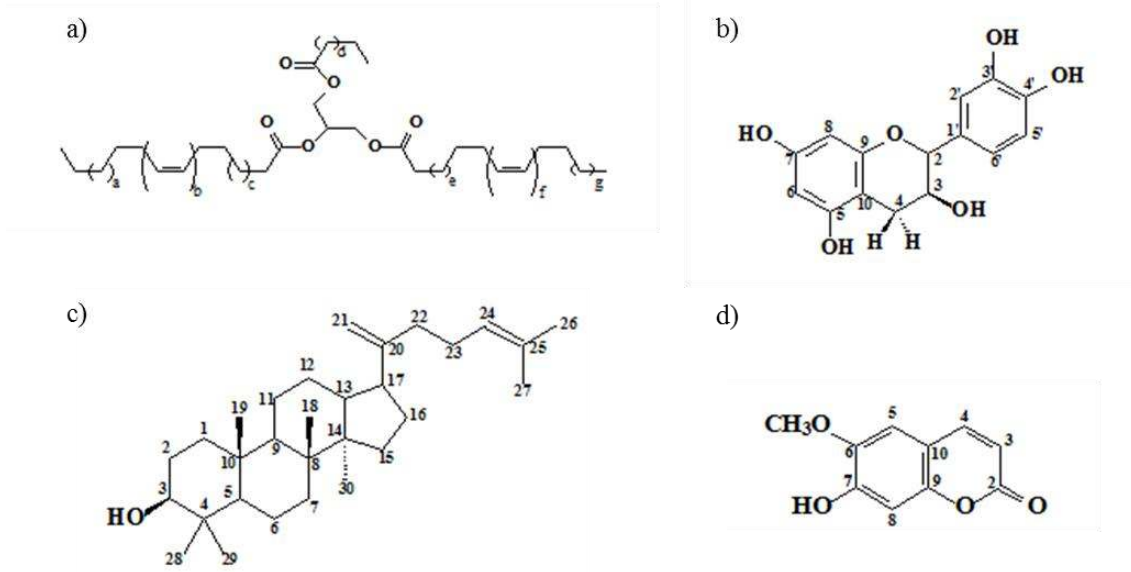


Figura 4 - Compostos obtidos a partir das frações de extrato etanólico de meliáceas: a) triglicérido, da fração em diclorometano de frutos de *Toona ciliata*; b) flavonoide (+/-)-catequina (rotação específica avaliada em α -D = 0°), da fração acetato de etila de ramos de *Toona ciliata*; c) triterpeno damaradienol, da fração hexano de folhas de *Trichilia pallida*; e d) cumarina escopoletina, da fração diclorometano da fração de ramos de *Trichilia pallens*

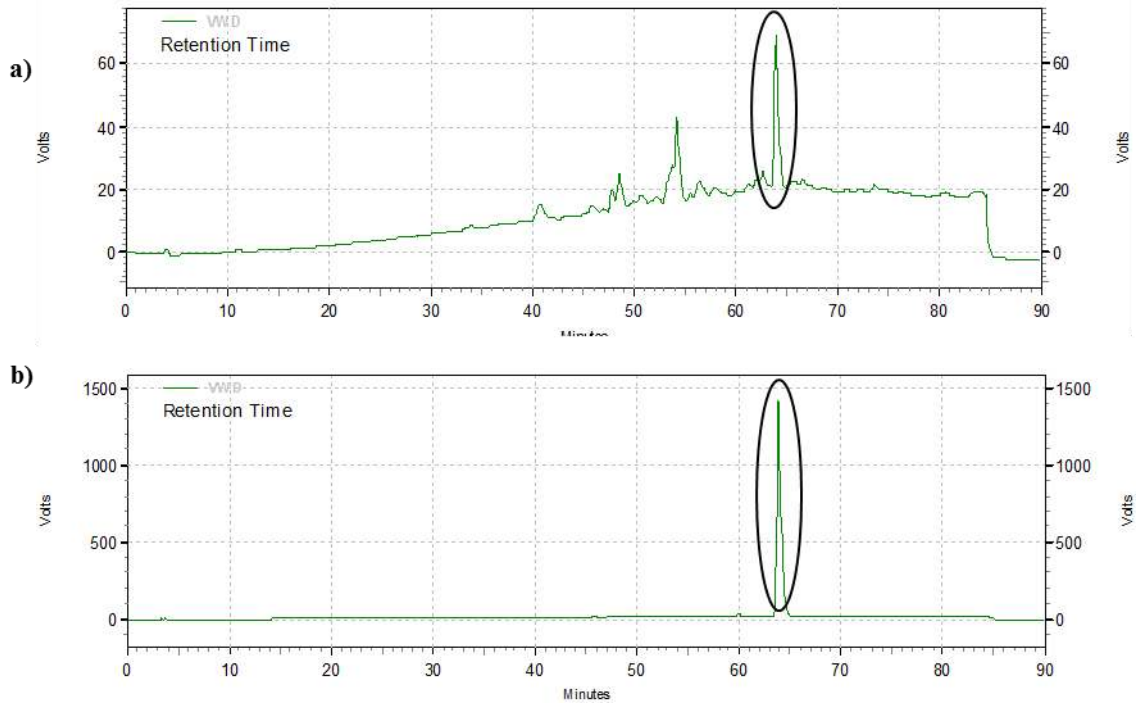


Figura 5 – Cromatogramas obtidos em condições analíticas: Coluna C-18 Phenomenex-Luna (150 x 4,6 nm, 5 μ m); fase móvel: H₂O:ACN: MeOH (modo gradiente exploratório); vazão: 1mL/min; detecção UV-262 nm. **a)** extrato hexânico do caule de *T. ciliata*; **b)** cedrelona

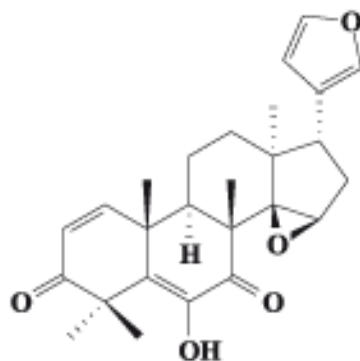


Figura 6 – Limonoide cedrelona, obtido a partir do extrato hexânico de caules de *Toona ciliata*

4.5 Bioatividade dos compostos isolados

4.5.1 Ingestão

O limonoide cedrelona, obtido do extrato em hexano de caules de *T. ciliata*, causou mortalidade total de lagartas de *S. frugiperda* quando avaliado a 1.000 ppm (0,1%), diluída em acetona e água (1:1). Por isso, foi feito um teste com concentrações menores, entre 100 e 602,56 ppm (0,01 a 0,06%), com o mesmo método de aplicação, porém com quatro repetições de 16 lagartas para cada concentração e avaliação por 10 dias. Com isso foi possível estimar a concentração letal para 50% da população (CL_{50}) e para 90% (CL_{90}), além da concentração efetiva que reduz o crescimento das lagartas em 50% (CE_{50}), com base, respectivamente, na mortalidade e no peso das lagartas após 10 dias. A CL_{50} foi estimada em 365,33 ppm e a CL_{90} em 659,62 ppm pelo método de Probit, ou seja, o equivalente a uma solução de cedrelona a 0,0365% e 0,0659%. A CE_{50} foi estimada em 95,02 ppm (0,0095% de cedrelona em acetona), obtida pelo método de Gauss-Newton (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8 - Resposta de concentração-mortalidade de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta artificial tratada superficialmente com o limonoide cedrelona em diferentes concentrações, após 10 dias de alimentação

Tratamento	N ¹	Coefficiente angular ± EP	CL ₅₀ (IC 95%) ²	CL ₉₀ (IC 95%) ²	χ ² (g.l.) ³	h ⁴
Cedrelona	503	4,994 ± 0,672	365,33 (299,95 - 416,65)	659,62 (555,46 - 943,46)	9,73 (6)	1,62

¹Número de insetos avaliados; ²Concentração letal 50 ou 90 e intervalo de confiança a 95% (em ppm), estimadas por Probit; ³Valor de qui-quadrado calculado e número de graus de liberdade; ⁴Heterogeneidade

Tabela 9 - Concentração efetiva para lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta artificial contendo diferentes concentrações do limonoide cedrelona, após sete dias de alimentação

Tratamento	N ¹	CE ₅₀ e intervalo de confiança (95%) ²	F ³	p ⁴
Cedrelona	503	95,02 (76,92 - 113,10)	313,97	< 0,001

¹Número de insetos avaliados; ²Concentração efetiva 50 e intervalo de confiança a 95% (em ppm), estimada pelo método de Gauss-Newton; ³Teste F (p ≤ 0,05); ⁴Valor de p

A atividade de cedrelona já tinha sido relatada para *S. frugiperda* (KUBO; KLOCKE, 1986; SILVA et al., 1999) e também para outros lepidópteros, como *Heliothis* (= *Helicoverpa*) *zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae), *P. gossypiella* (KUBO; KLOCKE, 1986), *S. litura* (KOUL, 1983), *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) (ARNASON et al., 1987), *Peridroma saucia* (Hübner) e *Mamestra configurata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) (KOUL; ISMAN, 1992). O modo de ação desse limonoide, entretanto, ainda não foi bem elucidado; para alguns desses insetos os estudos foram mais detalhados, mas para *S. frugiperda* ainda há muito a ser compreendido.

O triterpeno damaradienol, da fração hexano de folhas de *T. pallida*, não causou mortalidade e nem provocou redução de peso das lagartas (Tabela 10). Não há relatos de trabalhos sobre avaliação da bioatividade desse triterpeno sobre *S. frugiperda* ou outro inseto. Entretanto, dois outros triterpenos do tipo damarano, o aglaiondiol e o aglatriol, isolados de folhas de *Aglaia odorata* Lour. (Meliaceae), também não apresentaram atividade sobre lagartas de *P. saucia* quando alimentadas com dieta contendo esses compostos a 1.000 ppm (JANPRASERT et al., 1993).

Tabela 10 - Mortalidade e peso médios (\pm erro padrão da média) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta tratada com o triterpeno damaradienol a 1% (10.000 ppm), após sete dias

Tratamento	Mortalidade \pm EP (%) ²	Peso \pm EP (mg) ³
Controle ¹	0,00 \pm 0,00	59,16 \pm 3,52
Damaradienol	0,00 \pm 0,00	66,41 \pm 2,50
F	-	2,83
p	-	0,11

¹ Solvente utilizado para diluição do composto (acetona e água, 1:1). ² Dados não analisados (variância nula); ³ ANAVA, teste F ($p \leq 0,05$)

Com a (+/-)catequina, flavonoide isolado da fração acetato de etila de ramos de *T. ciliata*, a mortalidade não diferiu do controle, porém houve efeito sobre o desenvolvimento, já que as lagartas apresentaram menor peso (114,20 e 134,28 mg, respectivamente), após sete dias de alimentação na dieta contendo esse composto (Tabela 11). Leite (2005), entretanto, verificou efeito por ingestão da (-)-catequina sobre *S. frugiperda*, nas concentrações de 1, 10 e 50 mg/kg de dieta (ppm), com mortalidade larval de 50; 53,33 e 66,67%, respectivamente, enquanto a mortalidade no controle foi de 10%. Esse flavonoide apresenta quatro diastereoisômeros, com duas formas *cis* (epicatequina) e duas formas *trans* (catequina). Essas últimas são indicadas por (+)-catequina ou (-)-catequina. No presente estudo foi avaliada uma mistura racêmica das duas formas *trans* (+/-), portanto, é possível que a ausência de efeito letal para as lagartas esteja relacionada à presença de (+)-catequina. Apesar disso, a mistura racêmica causou redução de peso de lagartas.

Tabela 11 - Mortalidade e peso médios (\pm erro padrão da média) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta tratada com o flavonoide catequina 1% (10.000 ppm), após sete dias

Tratamento	Mortalidade \pm EP (%) ²	Peso \pm EP (mg) ³
Catequina	7,50 \pm 1,94	114,20 \pm 4,63
Controle ¹	5,00 \pm 1,84	134,28 \pm 1,95
F	-	27,76
p	0,4222	< 0,001

¹ Solvente utilizado para diluição do composto (etanol e água, 1:1); ² GLM, teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$); ³ ANAVA, teste F ($p \leq 0,05$)

O triglicerídeo obtido da fração em diclorometano de frutos de *T. ciliata* causou mortalidade de 35,00%, diferindo do controle (4,17%) e pequena redução do peso larval (90,67 mg em comparação a 119,83 mg no controle), porém, levando-se em conta a

concentração elevada (10.000 ppm), na qual o referido composto foi avaliado, pode se considerar que a bioatividade foi muito baixa (Tabela 12).

Tabela 12 - Mortalidade e peso médios (\pm erro padrão da média) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta tratada com um triglicerídeo a 1% (10.000 ppm), após sete dias

Tratamento	Mortalidade \pm EP (%) ²	Peso \pm EP (mg) ³
Triglicerídeo	35,00 \pm 6,78	90,67 \pm 4,22
Controle ¹	4,17 \pm 1,39	119,83 \pm 3,28
F	-	27,76
p	< 0,001	< 0,001

¹ Solvente utilizado para diluição do composto (acetona pura); ² GLM, teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$); ³ ANAVA, teste F ($p \leq 0,05$)

A cumarina escopoletina, isolada da fração em diclorometano de ramos de *T. pallens*, causou baixa mortalidade de lagartas por ingestão (14,17%), apesar de ter diferido do controle (4,17%). Também houve efeito em relação ao peso das lagartas, que foi de 64,08 mg, em comparação ao controle em que o peso foi 82,94 mg (Tabela 13). Esse composto foi testado em concentração 10 vezes menor que a catequina, o damaradienol e o triglicerídeo, devido à menor massa obtida. Apesar do efeito observado, comparando com a cedrelona, que, à concentração de a 365,33 ppm, causou mortalidade de 50% das lagartas, a escopoletina apresentou uma eficiência muito baixa, mesmo a 1.000 ppm.

Tabela 13 - Mortalidade e peso médios (\pm erro padrão da média) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta tratada com a cumarina escopoletina a 0,1% (1.000 ppm), após sete dias

Tratamento	Mortalidade \pm EP (%) ²	Peso \pm EP (mg) ³
Escopoletina	14,17 \pm 2,50	64,08 \pm 6,98
Controle ¹	1,67 \pm 1,11	82,94 \pm 7,17
F	-	7,04
p	< 0,001	0,016

¹ Solvente utilizado para diluição do composto (acetona e água 1:1); ² GLM, teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$); ³GLM, Teste F ($p \leq 0,05$)

Alguns trabalhos recentes têm demonstrado o efeito de escopoletina sobre outros insetos. Esse composto apresentou efeito por ingestão sobre o cupim *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae) (ADFA et al., 2010) e sobre *Spilarctia* (= *Spilosoma*)

obliqua Walker (Lepidoptera: Noctuidae) (TRIPATHI et al., 2001). Para esse lepidóptero, foi observado efeito fagoderrente de 50% a 96,7 µg/g de dieta (solução de cedrelona a 0,00967%) e inibição de 50% de crescimento a 20,9 µg/g (cedrelona a 0,00209%). Apesar de ter sido incorporada na dieta, a concentração das soluções utilizadas foi menor que a utilizada no presente estudo (0,1%), e as lagartas estavam mais desenvolvidas (12 dias de idade). Para *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) (PETERSON; HARRISON; JACKSON, 2003), a escopoletina também reduziu a sobrevivência e inibiu o desenvolvimento de lagartas, mas apenas em concentrações bastante elevadas de composto na dieta. A concentração de inibição de crescimento (CI₅₀) foi de 4.100 µg/ml de dieta (ppm) e a concentração letal 50 (CL₅₀) foi de 8.300 µg/mL de dieta. Assim, o efeito da escopoletina se apresenta bastante variável dependendo da espécie de inseto testado, e de acordo com os resultados obtidos para *S. frugiperda*, provavelmente haveria necessidade de concentrações muito altas para se obter eficiência.

4.5.2 Contato

Entre os cinco compostos testados (cedrelona, damaradienol, catequina, escopoletina e o triglicerídeo não identificado), a cedrelona apresentou o maior efeito por contato sobre *S. frugiperda*, provocando mortalidade de 19,17% das lagartas tratadas topicamente com o referido composto a 1µg/µL (1.000 ppm), além de um efeito subletal caracterizado pela redução no ganho de peso larval (234,96 mg em comparação a 294,12 mg no controle) (Tabela 14). Ainda não havia relatos de avaliação do efeito de contato da cedrelona sobre *S. frugiperda*. Entretanto, Koul e Isman (1992) observaram que esse limonoide apresentou efeito sobre a utilização do alimento em lagartas de quarto ínstar de *Peridroma saucia* e de terceiro ínstar de *Mamestra configurata* após aplicação tópica, nas doses 0,5-4,0 µg/lagarta em 1 µL de acetona (500 a 4.000 ppm). Segundo esses autores, mesmo sem ingerir cedrelona, houve redução no consumo e na eficiência de conversão do alimento, indicando que houve efeito tóxico por contato. Houve, ainda, pequena mortalidade para *P. saucia* nas doses 1, 2 e 4 µg (6,7; 13,3 e 20,0%, respectivamente) e para *M. configurata* somente a 4 µg (13,3%). Os dados obtidos no presente estudo demonstram que para *S. frugiperda* também houve efeito tóxico da cedrelona por aplicação tópica, resultando em pequena mortalidade e em redução no ganho de peso das lagartas na concentração de 1,0 µg/lagarta.

Tabela 14 - Mortalidade e ganho de peso (\pm erro padrão) de lagartas de terceiro ínstar de *Spodoptera frugiperda* tratadas topicamente com cedrelona isolada de *Toona ciliata* a 1.000 ppm (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), após cinco dias

Tratamento	Mortalidade \pm EP (%) ¹	Ganho de peso \pm EP (mg) ²
Cedrelona	19,17 \pm 1,67	234,96 \pm 12,42
Controle ¹	7,50 \pm 3,06	294,12 \pm 12,40
F	-	11,24
p	0,007	0,0035

¹ GLM, teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$); ² ANAVA, teste F ($p \leq 0,05$)

O triterpeno damaradienol não causou mortalidade nem redução de peso significativos (Tabela 15). Esse composto não é citado na literatura como composto inseticida, e como verificado neste estudo, esse triterpeno não apresentou efeito nem por contato e nem por ingestão.

Tabela 15 - Mortalidade e ganho de peso (\pm erro padrão) de lagartas de terceiro ínstar de *Spodoptera frugiperda* tratadas topicamente com o triterpeno damaradienol isolado de *Trichilia pallida*, a 1.000 ppm (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), após cinco dias

Tratamento	Mortalidade \pm EP (%) ¹	Ganho de peso \pm EP (mg) ²
Damaradienol	2,50 \pm 1,27	238,49 \pm 10,09
Controle	1,67 \pm 1,11	246,30 \pm 13,25
F	-	0,22
p	0,6502	0,6442

¹ GLM, teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$); ² ANAVA, teste F ($p \leq 0,05$)

A catequina e o triglicerídeo foram avaliados no mesmo bioensaio. Nenhum desses dois compostos causou efeito sobre as lagartas, quando aplicados topicamente (Tabela 16). A *ent*-catequina, ou (-)-catequina, obtida a partir do extrato metanólico das inflorescências de *Trichilia catigua* (A. Juss) por Pasqualotto et al. (2008), e aplicada topicamente sobre lagartas de *S. frugiperda* (1 $\mu\text{L}/\text{lagarta}$), na concentração 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, causou apenas 8% de mortalidade. Considerando que a concentração utilizada por esses autores foi 10 vezes maior que a empregada no presente estudo, pode-se inferir que a catequina não apresenta efeito de contato, mesmo em concentrações relativamente altas.

Tabela 16 - Mortalidade e ganho de peso (\pm erro padrão) de lagartas de terceiro ínstar de *Spodoptera frugiperda* tratadas topicamente com o flavonoide catequina e um triglicerídeo, isolados de *Toona ciliata*, a 1.000 ppm (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), após cinco dias

Tratamento	Mortalidade \pm EP (%) ¹	Ganho de peso \pm EP (mg) ²
Catequina	9,72 \pm 3,98	218,52 \pm 8,01
Triglicerídeo	5,56 \pm 1,76	219,28 \pm 11,03
Controle	4,17 \pm 1,86	223,17 \pm 6,41
F	-	0,08
p	0,3826	0,9218

¹ GLM, teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$); ² ANAVA, teste F ($p \leq 0,05$)

Apesar de o triglicerídeo obtido da fração em diclorometano dos frutos de *T. ciliata* não ter causado efeito por contato, há relatos de que triglicerídeos podem potencializar efeito de piretrinas, como adjuvantes ou como agentes coativos, apresentando pequeno efeito em determinadas concentrações. Triglicerídeos do óleo de canola a 2% causaram 30% de mortalidade de lagartas de último ínstar de *Yponomeuta malinellas* Latreille (Lepidoptera: Yponomeutidae), após quatro dias de pulverização; em associação com piretrinas, no entanto, a mortalidade causada chegou a atingir 100%. Para o ácaro *Tetranychus urticae* Koch. (Acari: Tetranychidae), os triglicerídeos de óleo de canola a 1% chegaram a causar 80% de mortalidade, que ainda aumentou com a adição de piretrinas, 48 horas após os ácaros terem sido pulverizados (PURITCH; ALMOND; PARKER, 1997). Em razão disso, muitas formulações de inseticidas apresentam óleo de canola ou de soja na sua composição. No presente estudo, entretanto, esse triglicerídeo provocou apenas efeito por ingestão e não por contato, de forma que ele pode agir de outra maneira, possivelmente como fagodeterrente.

No teste de contato, a mortalidade causada pela escopoletina embora tenha sido relativamente baixa (13,33%), ainda assim diferiu da constatada no controle (4,17%). Não houve alteração significativa no ganho de peso das lagartas, após cinco dias (Tabela 17).

Tabela 17 - Mortalidade e ganho de peso (\pm erro padrão) de lagartas de terceiro ínstar *Spodoptera frugiperda* tratadas topicamente com a cumarina escopoletina isolada de *Trichilia pallens*, a 1000 ppm (1 μ g/ μ L), após cinco dias

Tratamento	Mortalidade \pm EP (%) ¹	Ganho de peso \pm EP (mg) ²
Escopoletina	13,33 \pm 2,55	203,43 \pm 4,02
Controle	4,17 \pm 1,39	213,82 \pm 3,80
F	-	3,52
p	0,0101	0,0769

¹ GLM, teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$); ² ANAVA, teste F ($p \leq 0,05$)

A escopoletina isolada de *Stellera chamaejasme* L. (Thymelaeaceae) (LIANG et al., 2011) e isolada de *Artemisia annua* L. (Asteraceae) (YANG et al., 2012), apresentou efeito de contato sobre o ácaro *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae). A CL₅₀ para o ácaro mergulhado na solução foi de 1,267 mg/mL, e a 2 mg/mL, a mortalidade dos ácaros foi de 76,67% (LIANG et al., 2011). Para *S. frugiperda*, a concentração usada foi um pouco menor que a CL₅₀ para o ácaro (1 mg/mL), porém houve baixa mortalidade. Apesar de se tratar de organismos e métodos de aplicação diferentes, pela comparação das concentrações e pelos resultados observados no teste de ingestão, é possível reforçar a hipótese de que a escopoletina tenha efeito sobre a lagarta-do-cartucho apenas em concentrações acima de 0,1%.

A cedrelona foi o composto que apresentou a maior eficiência por ingestão e por contato, confirmando o efeito encontrado na literatura (KLOCKE, 1983; KOUL, 1983; KUBO; KLOCKE, 1986; ARNASON et al., 1987; KOUL; ISMAN, 1992). Assim, esse limonoide foi selecionado para estudos mais detalhados de bioatividade.

4.5 Estudo da bioatividade do limonoide cedrelona

4.5.1 Fagodeterrência e consumo de folhas de milho

No teste com chance de escolha, o consumo nos discos controle foi maior que nos discos tratados com cedrelona, nas duas concentrações avaliadas, correspondentes aos valores de CL₅₀ (365,33 ppm ou 0,037%) e CL₉₀ (659,62 ppm ou 0,066%), obtidos no teste de aplicação superficial em dieta artificial. A quantidade de cedrelona aplicada por cm² de disco foliar foi calculada em 8,58 e 15,47 μ g/cm², respectivamente. A porcentagem de deterrência verificada nas duas concentrações foi muito próxima (28,98 e 30,68%), apesar de uma das

concentrações ser quase duas vezes maior que a outra (Tabela 18). No teste sem chance de escolha, não houve diferença no consumo larval nos discos controle e nos tratados com cedrelona na menor concentração, porém na maior concentração o consumo foi menor nos discos tratados, com deterrência de 27,46% (Tabela 19). Esses resultados indicam que, havendo chance de escolha, as lagartas de *S. frugiperda* preferem o alimento não tratado com cedrelona, entretanto, em confinamento, a cedrelona causa fagodeterrência apenas em concentração mais elevada.

Tabela 18 – Consumo foliar e porcentagem de deterrência (\pm erro padrão da média) para lagartas de quarto ínstar de *Spodoptera frugiperda* em arenas com chance de escolha entre discos foliares de milho tratados com cedrelona ou acetona (controle), após 16 horas

Tratamento ¹	Consumo foliar \pm EP (cm ²)	Deterrência \pm EP (%)
Cedrelona 0,0365% (8,58 μ g /cm ²)	1,32 \pm 0,30	28,98 \pm 15,78
Controle	2,13 \pm 0,32	
Cedrelona 0,0659% (15,47 μ g /cm ²)	1,00 \pm 0,15	30,68 \pm 13,74
Controle	2,14 \pm 0,42	

¹ Concentrações de cedrelona correspondentes aos valores de CL₅₀ e CL₉₀ obtidos em teste de aplicação superficial em dieta artificial

Tabela 19 – Consumo foliar (\pm erro padrão da média) por lagartas de quarto ínstar de *Spodoptera frugiperda* em arenas sem chance de escolha (confinamento), com discos foliares de milho tratados com cedrelona ou acetona (controle), após 16 horas

Tratamento ¹	Consumo foliar \pm EP (cm ²)	F	p
Cedrelona 0,0365% (8,58 μ g/cm ²)	2,27 \pm 0,40	0,11	0,7473*
Controle	2,43 \pm 0,29		
Cedrelona 0,0659% (15,47 μ g/cm ²)	1,88 \pm 0,15	27,46	< 0,001**
Controle	3,07 \pm 0,17		

Concentrações de cedrelona correspondentes aos valores de CL₅₀ e CL₉₀ obtidos em teste de aplicação superficial em dieta artificial; * GLM; ** ANAVA ($p \leq 0,05$)

Não se tem conhecimento de relatos de atividade fagodeterrente de cedrelona sobre *S. frugiperda*, mas esse efeito foi demonstrado em outras espécies de insetos. A deterrência para lagartas de 12 dias de idade de *S. litura* alimentadas com discos de folhas de mamona tratadas com cedrelona a 0,025; 0,05% e 0,1% foi de 30, 50 e 100%, respectivamente, e para adultos de *Epilachna* sp. (Coleoptera: Coccinellidae), que receberam folhas de berinjela tratadas com 0,1% de cedrelona, também houve 100% de deterrência, após 72 horas (KOUL et al., 1983). No presente estudo, mesmo na concentração de 0,0659%, a deterrência para *S. frugiperda* não

passou de 30,68%, indicando que essa espécie é menos suscetível ao efeito fagodeterrente da cedrelona em relação àquelas espécies.

A cedrelona também causou efeito fagodeterrente para lagartas neonatas de *O. nubilalis*, 48 horas após receberem discos de folhas de milho tratados com o limonoide a 50 e 500 µg por grama de peso fresco de folha (ARNASON et al., 1987). Outros lepidópteros suscetíveis ao efeito fagodeterrente da cedrelona foram *P. saucia* e *M. configurata* (KOUL; ISMAN, 1992), para as quais a cedrelona aplicada em discos de folha de repolho causou, respectivamente, deterrência entre 25 e 51,7% e entre 38 e 75,9%, em concentrações variando de 11,4 a 28,6 µg/cm². Comparando com os resultados obtidos no presente estudo, verifica-se que os valores de deterrência para *P. saucia* nas menores concentrações foram próximos aos obtidos para *S. frugiperda*, mas para *M. configurata* a deterrência foi maior em todas as concentrações.

Embora muitos autores considerem qualquer redução no consumo do alimento como efeito fagodeterrente, Frazier (1986) e Isman et al. (1996) classificam como fagodeterrência os casos em que há atuação do composto nos quimiorreceptores, e Mordue (Luntz) e Blackwell (1993) classificam o efeito sobre os quimiorreceptores como fagodeterrência primária, e a redução no consumo causada após a ingestão de fagodeterrência secundária. Como a redução no consumo após ingestão de alimento pode ser consequência de efeito tóxico, a segunda classificação seria mais adequada. A diferenciação entre fagodeterrência primária e secundária, contudo, nem sempre é clara, mas com base no efeito observado para a cedrelona no teste de contato, em que houve menor ganho de peso pelas lagartas após aplicação tópica, na qual não houve envolvimento dos quimiorreceptores das peças bucais na decisão de ingerir alimento, pode-se inferir que esse limonoide causa fagodeterrência secundária para *S. frugiperda*, gerada pelo efeito tóxico do composto, o que não elimina a possibilidade de haver também fagodeterrência primária quando a via é a de ingestão. Um composto que apresente apenas fagodeterrência primária está sujeito à rápida habituação por parte do inseto (ISMAN, 2000), o que torna desejável que haja também efeito tóxico, seja via ingestão ou contato, como é o caso da cedrelona.

4.5.2 Estimativa da CL₅₀, CL₉₀ e CE₅₀ de cedrelona incorporada à dieta artificial

As concentrações letais 50 e 90 (CL₅₀ e CL₉₀) foram estimadas, respectivamente, em 119,05 e 491,14 ppm (µg/g de dieta) pelo método de Probit. A concentração efetiva de

inibição do crescimento de lagartas em 50% (CE₅₀), obtida pelo método de Gauss-Newton com base no peso das lagartas após sete dias, foi estimada em 45,13 ppm, cerca de três vezes menor que a CL₅₀ (Tabelas 20 e 21).

Tabela 20 - Resposta de concentração-mortalidade de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta artificial contendo diferentes concentrações (ppm) do limonoide cedrelona, após sete dias de alimentação

Tratamento	N ¹	Coefficiente angular ± EP	CL ₅₀ (IC 95%) ²	CL ₉₀ (IC 95%) ²	χ ² (g.l.) ³	h ⁴
Cedrelona	240	2,082 ± 0,278	119,05 (93,40 - 159,45)	491,14 (321,59 - 969,99)	3,11 (6)	0,52

¹Número de insetos avaliados; ²Concentração letal 50 ou 90 e intervalo de confiança a 95%, estimadas por Probit; ³Valor de qui-quadrado calculado e número de graus de liberdade; ⁴Heterogeneidade

Tabela 21 – Concentração efetiva para lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta artificial contendo diferentes concentrações (ppm) do limonoide cedrelona, após sete dias de alimentação

Tratamento	N ¹	CE ₅₀ e intervalo de confiança (95%) ²	F ³	p ⁴
Cedrelona	240	45,13 (40,99 – 49,28)	1359,95	< 0,001

¹Número de insetos avaliados; ²Concentração efetiva 50 e intervalo de confiança a 95%, estimada pelo método de Gauss-Newton; ³Teste F (p ≤ 0,05); ⁴Valor de p

Klocke (1983) estimou a CE₅₀ da cedrelona para *S. frugiperda* em 2 ppm, após 14 dias, valor menor que o obtido no presente estudo (45,13 ppm). Como o efeito da cedrelona aumenta ao longo do tempo de exposição, a concentração efetiva tende a diminuir, o que justifica o menor valor obtido por esse autor, que avaliou o efeito do limonoide pelo dobro do tempo que foi avaliado no presente estudo. O valor de CE₅₀ obtido após sete dias para *S. frugiperda* foi próximo ao obtido para *P. saucia* após nove dias (53,1 ppm) (KOUL; ISMAN, 1992), enquanto a CL₅₀ foi semelhante à obtida para *P. gossypiella* (120 ppm) (KUBO e KLOCKE, 1986).

4.5.3 Parâmetros biológicos de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta contendo cedrelona

No ensaio em que as lagartas foram alimentadas durante toda a fase larval com dieta contendo cedrelona em várias concentrações, o peso de lagartas aos sete dias foi menor a partir de 24 ppm, com 34,41 mg em relação a 42,01 mg do controle. O peso foi reduzido com o aumento da concentração, sendo que nas maiores concentrações (96, 144 e 288 ppm), as lagartas pesaram menos que 3 mg. Conseqüentemente, a duração da fase larval foi prolongada nessas concentrações, de forma crescente, constatando-se nas duas maiores concentrações, o dobro do tempo (34 a 35 dias) em comparação ao valor registrado no controle (17 dias). Em relação à mortalidade, também houve aumento com a concentração, mas diferiram do controle (3,33%) somente a 96, 144 e 288 ppm (50,0; 86,67 e 96,67%, respectivamente. Na maior concentração, apenas uma lagarta atingiu a fase de pupa e, ainda assim, com tamanho extremamente reduzido (21,10 mg) em relação ao controle (239,72 mg). Nas concentrações 96 e 144 ppm, também houve redução de peso de pupas, cujos valores foram 200,57 e 85,00 mg, respectivamente. Dessa forma, os efeitos subletais da cedrelona puderam ser observados a partir da concentração de 24 ppm, mas ao longo do desenvolvimento somente as concentrações acima de 96 ppm apresentam eficiência de controle, em condições de laboratório. Além disso, a mortalidade foi crescente ao longo do tempo, principalmente nas maiores concentrações (Tabela 22, Figura 7).

Esses resultados são semelhantes aos obtidos para *O. nubilalis* (ARNASON et al., 1987) e *S. litura* (KOUL, 1983), em que também houve inibição do crescimento, com menor peso de lagartas e alongamento da fase larval após ingestão de cedrelona.

Tabela 22 - Peso de lagartas após sete dias de alimentação, duração da fase larval, mortalidade total de lagartas e peso de pupas com 24 horas (\pm erro padrão da média), de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta artificial contendo cedrelona em diferentes concentrações

Concentração de cedrelona	Peso de lagartas com 7 dias \pm EP (mg) ¹	Duração \pm EP (dias) ¹	Mortalidade total \pm EP (%) ²	Peso de pupas \pm EP (mg) ³
0 ppm	42,01 \pm 1,16 a	17,00 \pm 0,18 a	3,33 \pm 3,33 a	239,72 \pm 8,23 a
3 ppm	41,07 \pm 1,22 a	17,00 \pm 0,31 a	6,67 \pm 4,08 a	229,77 \pm 6,73 a
6 ppm	41,38 \pm 1,25 a	17,92 \pm 0,23 ab	6,67 \pm 4,08 a	221,49 \pm 5,32 ab
12 ppm	38,11 \pm 1,75 ab	17,75 \pm 0,12 ab	10,00 \pm 4,08 a	220,26 \pm 9,49 ab
24 ppm	34,41 \pm 2,46 b	18,05 \pm 0,37 bc	20,00 \pm 3,33 ab	219,29 \pm 5,24 ab
48 ppm	19,75 \pm 2,11 c	19,03 \pm 0,19 c	26,67 \pm 6,67 ab	218,74 \pm 4,94 ab
96 ppm	2,48 \pm 0,15 d	31,73 \pm 0,53 d	50,00 \pm 7,45 b	200,57 \pm 7,69 b
144 ppm	1,17 \pm 0,08 d	34,00*	86,67 \pm 6,24 c	85,00*
288 ppm	0,61 \pm 0,07 e	35,00*	96,67 \pm 3,33 c	21,10*
F	263,5	293,75	-	3,14
p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,0175

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey, $p \leq 0,05$)

¹ GLM, teste F ($p \leq 0,05$); ² GLM, teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$); ³ ANAVA, teste F ($p \leq 0,05$)

* Dados não incluídos na análise (número insuficiente de indivíduos sobreviventes)

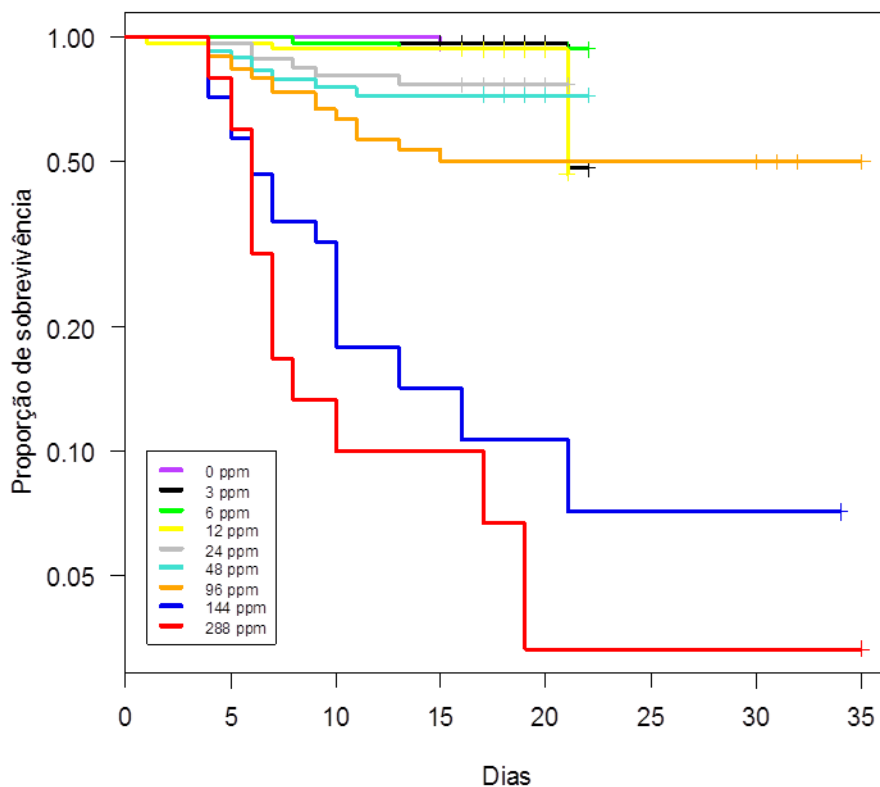


Figura 7 - Curva de sobrevivência (Kaplan-Meier, $p \leq 0,05$) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta artificial contendo diferentes concentrações de cedrelona ($\chi^2 = 190$, $p < 0,001$); curvas com letras iguais não diferem entre si, pelo teste de log-rank, com correção de Bonferroni; riscos transversais em cada curva indicam o momento em que houve pupação

Segundo Kubo e Klocke (1986), a cedrelona causou inibição da ecdise em lagartas de *P. gossypiella*. No presente estudo, entretanto, não foi observada inibição da ecdise de *S. frugiperda* e nem mesmo deformações após ingestão de cedrelona, o que também não ocorreu para *O. nubilalis* (ARNASON et al., 1987). As lagartas de *P. saucia* e *M. configurata* também não apresentaram deformações, conseguindo chegar à fase de pupa normalmente após injeção de cedrelona no último ínstar (KOUL; ISMAN, 1992). A mortalidade observada para essas duas espécies, segundo os autores, foi devida à falha das lagartas em atingir o peso mínimo necessário para pupação, e não em razão de efeito hormonal. Assim, o efeito de inibição de crescimento observado também para *S. frugiperda* não é devido ao efeito regulador de crescimento, por ação hormonal, mas em consequência do menor consumo de alimento contendo cedrelona e/ou ao efeito tóxico pós-ingestão.

Embora apresente efeito sobre as lagartas em baixas concentrações, a cedrelona não foi tão eficiente quanto o limonoide azadiractina, cuja CL_{95} para *S. frugiperda* após 10 dias foi de apenas 1 ppm, e a CE_{50} foi de 0,4 ppm (KLOCKE, 1983).

4.5.4 Determinação de índices nutricionais de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta contendo cedrelona

No ensaio para determinar os índices nutricionais em lagartas de *S. frugiperda* após ingestão de dieta contendo cedrelona a 300 $\mu\text{g/g}$ (300 ppm), verificou-se interação entre o tratamento e a covariável para eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) e digerido (ECD), custo metabólico (MC) e taxa de crescimento relativo (RGR) (Tabela 23, que por isso foram analisados por análise de covariância, que indicou diferença entre o controle e a cedrelona, com menores valores de ECI, ECD e RGR na dieta com cedrelona, ocorrendo o inverso para MC. Em relação à digestibilidade aproximada (AD), taxa de consumo relativo (RCR) e taxa metabólica relativa (RMR), não houve interação entre tratamento e covariável, sendo, portanto, feita análise de variância, que mostrou maiores valores de AD e RMR na dieta com cedrelona, não havendo diferença entre esta e o controle em relação à RCR (Tabela 24).

Tabela 23 - Índices nutricionais de lagartas de quarto instar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo cedrelona a 300 ppm, após quatro dias

Tratamento	ECI (%)	ECD (%)	MC (%)	RGR (g/g/dia)
Cedrelona	12,5191 ± 1,6896	21,6247 ± 4,0021	78,3753 ± 4,0021	0,2187 ± 0,0290
Controle	24,2205 ± 0,3357	53,7721 ± 1,8014	46,2279 ± 1,8014	0,4225 ± 0,0024
Trat	F=1581 p<0,001	F=1314 p<0,001	F=1314 p<0,001	F=5848 p<0,001
Cov	F=9,61 p=0,005	F=4,56 p=0,043	F=4,56 p=0,043	F=174 p<0,001
Cov*Trat	F=7,83 p=0,010	F=5,88 p=0,023	F=5,88 p=0,023	F=6,66 p=0,016

Análise de covariância (Trat = tratamento, Cov = covariável, Cov*Trat = interação entre covariável e tratamento), Teste F ($p \leq 0,05$); ECI = eficiência de conversão do alimento ingerido; ECD = eficiência de conversão do alimento digerido; MC = custo metabólico (por ser o inverso de ECD, foi utilizada a mesma análise); RGR = taxa de crescimento relativo (gramas de biomassa adquirida por grama de peso corpóreo por dia)

Tabela 24 - Índices nutricionais de lagartas de quarto instar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo cedrelona a 300 ppm, após quatro dias

Tratamento	AD (%)	RCR (g/g/dia)	RMR (g/g/dia)
Cedrelona	65,8086 ± 3,8152	1,9821 ± 0,2840	1,1962 ± 0,2700
Controle	45,6690 ± 1,5605	1,7482 ± 0,0234	0,3747 ± 0,0270
F	23,87	0,67	9,16
P	<0,001	0,4191	0,0055

Análise de variância, Teste F ($p \leq 0,05$); AD = digestibilidade aproximada; RCR = taxa de consumo relativo (gramas de alimento consumido por grama de peso corpóreo por dia); RMR = taxa metabólica relativa (gramas de alimento gasto em metabolismo por grama de peso corpóreo por dia)

Apesar de o consumo relativo ao peso da lagarta (RCR) não ter sido alterado na dieta com cedrelona, ela não cresceu (RGR) na mesma proporção que as lagartas controle. Como não houve diferença de consumo relativo, é possível afirmar que não houve efeito fagodeterrente primário e sim secundário, pois não houve inibição da alimentação (Tabelas 23 e 24).

A RMR das lagartas que ingeriram cedrelona aumentou em mais de três vezes em relação ao controle, havendo também aumento no MC. As eficiências de conversão do alimento ingerido (ECI) e digerido (ECD) reduziram a cerca de metade após ingestão do limonoide, embora não tenha havido diferença de consumo relativo, o que caracteriza efeito tóxico. Essa redução provavelmente ocorre pelo desvio de energia que seria utilizada para conversão em biomassa, para utilização em detoxificação, o que se confirma pelo aumento do custo metabólico (Tabelas 23 e 24).

A digestibilidade aproximada aumentou em relação ao controle, o que pode ser efeito da retenção do alimento no intestino da lagarta por mais tempo, para permitir a degradação do composto presente na dieta (MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993; RODRIGUEZ; VENDRAMIM, 1998). Assim, o tempo de contato do alimento contendo cedrelona com as enzimas digestivas foi maior, levando à maior digestibilidade em comparação com o controle.

Esses resultados indicam alterações no metabolismo das lagartas, já que as lagartas continuam se alimentando da dieta contendo cedrelona, mas não ganham peso da mesma forma como as lagartas controle, devido à redução na eficiência de conversão do alimento em biomassa.

A menor quantidade total de alimento consumido pelas lagartas que ingeriram cedrelona (Figura 8) se deve ao efeito tóxico causado pela ingestão do composto, que reduziu a conversão do alimento em biomassa e, conseqüentemente, reduziu o crescimento das lagartas. Estando menores que as lagartas controle, elas ingeriram menor quantidade de dieta, embora não tenha alterado o consumo relativo ao seu peso.

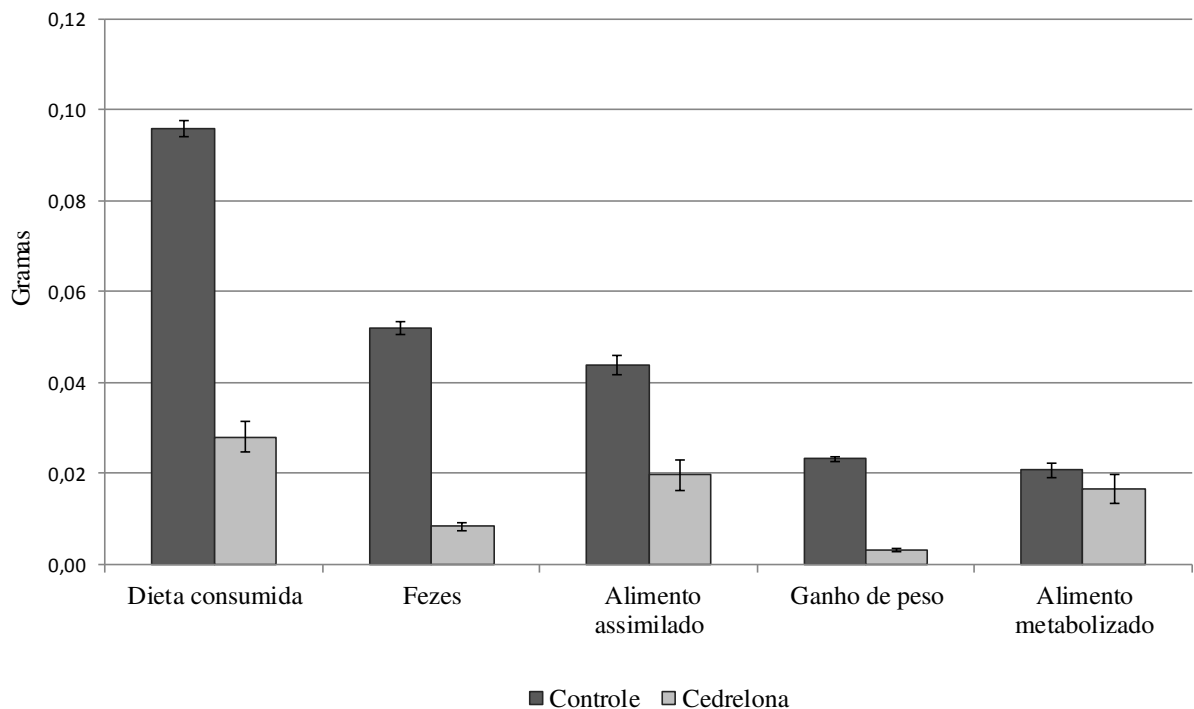


Figura 8 - Média (\pm EP) de dieta consumida ($F = 180,25$, $p < 0,0001$), fezes ($F = 465,43$, $p < 0,0001$), alimento assimilado ($F = 29,93$, $p < 0,0001$), ganho de peso ($F = 150,25$, $p < 0,0001$) e alimento metabolizado ($F = 1,17$, $p = 0,2886$) de lagartas de quarto ínstar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo cedrelona a 300 ppm (300 $\mu\text{g/g}$ dieta); GLM, Teste F ($p \leq 0,05$), Dieta consumida = fezes + alimento assimilado; alimento assimilado = ganho de peso + alimento metabolizado

Como conseqüência da menor ingestão de alimento, as lagartas que receberam dieta com cedrelona produziram menor quantidade de fezes (em torno de cinco vezes menos), e assimilaram menor quantidade de alimento do que as lagartas controle (Figura 8). Observando a quantidade de alimento excretado e de alimento assimilado, verifica-se que o alimento com cedrelona foi mais convertido em alimento assimilado do que em fezes, ao contrário da dieta controle, em que a excreção foi maior que a assimilação. Enquanto no controle o alimento

assimilado foi distribuído quase que igualmente entre ganho de peso e metabolismo, no tratamento com cedrelona apenas uma pequena quantidade foi usada para conversão em biomassa (ganho de peso), e a maior parte foi utilizada no metabolismo, como já indicavam os índices RMR e MC. Esse metabolismo elevado pode estar relacionado à tentativa de detoxificação do composto pelo inseto. A energia gerada pela ingestão de alimento poderia estar sendo desviada para maior produção de enzimas de detoxificação.

Redução em ECI, ECD e RGR também foi verificada para *P. saucia* e *M. configurata*, porém sem alteração em AD e com redução em RCR, com cedrelona entre 20 e 35 ppm na dieta (KOUL; ISMAN, 1992). Para *O. nubilalis*, em concentrações de 3 a 30 ppm também houve redução em ECI e ECD, mas com aumento em RCR e AD (ARNASON et al., 1987). A redução na eficiência de conversão do alimento se assemelha ao resultado obtido para *S. frugiperda* no presente estudo, porém há variações em relação à RCR, que não foi alterada, e à AD, que aumentou. Esses resultados sugerem que há maior probabilidade de interferência do tratamento no metabolismo do inseto do que na digestão. Para *P. saucia* e *M. configurata* (KOUL; ISMAN, 1992) a cedrelona pode ter causado efeito fagodeterrente primário, pois houve redução na taxa de consumo relativo de alimento mesmo em concentração cerca de 10 vezes menor, mas para *O. nubilalis* e *S. frugiperda* os efeitos observados provavelmente são decorrentes de efeito fagodeterrente secundário, sem atuação do composto nos quimiorreceptores, mas agindo como composto tóxico. Portanto, a ação fagodeterrente da cedrelona pode variar bastante entre espécies de insetos.

A ausência ou baixo efeito fagodeterrente primário de cedrelona para *S. frugiperda* é confirmada pelo teste de contato (item 4.5.2), em que houve menor ganho de peso das lagartas após simples contato com o composto, indicando que o efeito tóxico não é mediado apenas por ingestão. Além disso, Koul e Isman (1992) compararam os índices nutricionais de lagartas de *P. saucia* e *M. configurata* após ingestão (20 a 35 ppm) e aplicação tópica de cedrelona (0,5 a 4,0 µg/ inseto), e nas duas formas de aplicação foi observada redução de ECI e ECD, e também de RCR, indicando efeito tóxico não só por ingestão, mas também por contato.

Em conjunto, esses resultados permitem concluir que a cedrelona atua como fagodeterrente primária e/ou principalmente secundária, mas sua ação como composto tóxico se destaca, por ingestão ou contato, causando alterações metabólicas que levam à inibição de crescimento de forma indireta.

4.5.5 Ensaios enzimáticos

4.5.5.1 Proteases

No teste realizado com o intestino de lagartas que ingeriram dieta artificial com acetona (controle) ou dieta contendo cedrelona, houve redução na atividade proteolítica para lagartas que ingeriram o composto. Após cinco horas de alimentação, a atividade de proteases no controle foi de 2,26 U/intestino equivalente, enquanto no tratamento com cedrelona foi de apenas 0,42 U/intestino equivalente, havendo diferença também em relação ao conteúdo protéico das lagartas (711,11 e 470,21 mg/intestino equivalente, respectivamente) (Tabela 25). A redução no metabolismo proteico pode ser responsável pelo atraso no crescimento do inseto, observado no ensaio de avaliação de parâmetros biológicos (item 4.5.3).

Tabela 25 - Atividade de proteases e conteúdo protéico de extrato enzimático de intestino de lagartas em início de quarto ínstar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas durante cinco horas com dieta contendo acetona (controle) ou cedrelona a 300 ppm

Tratamento	Atividade (U/intestino equivalente) ¹	Conteúdo protéico (µg/intestino equivalente) ¹
Cedrelona	0,42 ± 0,09	470,21 ± 56,72
Controle	2,26 ± 0,02	711,11 ± 36,78
F	406,69	12,71
p	< 0,001	0,0235

¹ ANAVA, Teste F ($p \leq 0,05$) (1 U = 1 unidade de atividade enzimática, calculada pela variação de 0,01 de absorbância por minuto)

Outros limonoides causaram também redução na atividade de enzimas digestivas em insetos. A azadiractina reduziu a atividade de tripsina após tratamento por injeção em lagartas de *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae), porém sem inibição (TIMMINS; REYNOLDS, 1992), e reduziu a atividade de enzimas digestivas de *S. litura* e *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae), após ingestão (SENTHIL NATHAN; KALAIVANI; CHUNG, 2005; SENTHIL NATHAN et al., 2005). O limonoide fraxinelona também causou redução da atividade de proteases em lagartas de *Ostrinia furnacalis* Guenée (Lepidoptera: Pyralidae) e de *H. virescens* após 24 horas de alimentação em dieta com o composto, porém não inibiu a atividade (LIU; HO; GOH, 2008, 2009). Nesses casos, segundo os autores, a redução da atividade das enzimas não é devida ao efeito

inibitório direto do composto, sendo possível que a fraxinelona iniba a secreção das enzimas no mesêntero desses insetos, por inibição da síntese nas células secretoras da parede do mesêntero, ou por alteração de algum mecanismo de controle da secreção de enzimas (TIMMINS; REYNOLDS, 1992; LIU; HO; GOH, 2008, 2009).

A redução na atividade pode ser consequência da menor ingestão de alimento contendo cedrelona, ocasionada pelo efeito tóxico pós-ingestão (fagodeterrência secundária). Como a síntese e a secreção de enzimas digestivas são mecanismos prandiais, a menor atividade de proteases pode ser consequência de menor quantidade de alimento ingerido, como verificado em *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) (BAKER; WOO; BYRD, 1984) e *Locusta migratoria* L. (Orthoptera: Acrididae) (HILL; ORCHARD, 2005). Além disso, o conteúdo proteico do extrato enzimático do intestino de lagartas que ingeriram cedrelona foi menor que das lagartas controle, que também pode ser devido a uma redução no consumo de alimento. O composto pode também ter efeito tóxico sobre as células epiteliais do mesêntero que sintetizam essas enzimas. A azadiractina, por exemplo, causou necrose e ruptura em células e organelas de *Schistocerca gregaria* Forsskal (Orthoptera: Acrididae) e *L. migratoria* (NASIRUDDIN; MORDUE (LUNTZ), 1993). No presente estudo a citotoxicidade da cedrelona não foi avaliada, portanto essa hipótese não pode ser excluída.

O limonoide pode também atuar como um inibidor da atividade de proteases, entretanto, testes *in vitro* são necessários para que essa hipótese seja avaliada. Em *S. frugiperda*, como nos lepidópteros em geral, a atividade proteolítica se deve principalmente a serinoproteases (tripsina, quimotripsina e elastase) e exopeptidases (aminopeptidase e α e β -carboxipeptidases) (TERRA; FERREIRA, 1994). Se o efeito inibitório da cedrelona sobre a atividade de proteases for confirmada, os estudos subsequentes deverão ser direcionados à identificação do grupo de enzimas proteolíticas que está sendo alvo da ação do limonoide.

4.5.5.2 Enzimas de detoxificação

Com relação à atividade das enzimas de detoxificação glutathione-S-transferases (GST), observou-se que a atividade no extrato enzimático do intestino de lagartas que ingeriram cedrelona não foi alterada (2,51 U/intestino equivalente) em relação ao controle (2,43 U/intestino equivalente). Também não houve diferença de conteúdo proteico das lagartas tratadas (722,98 μ g/intestino equivalente) e controle (625,24 μ g/intestino equivalente) (Tabela 27).

Tabela 27 - Atividade de glutatona-S-transferases *in vivo* e conteúdo protéico de extrato enzimático de intestino de lagartas em início de quarto ínstar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas durante cinco horas com dieta contendo acetona (controle) ou cedrelona a 300 ppm

Tratamento	Atividade (U/intestino equivalente) ¹	Conteúdo protéico (µg/intestino equivalente) ¹
Cedrelona	2,51 ± 0,41	625,24 ± 60,63
Controle	2,43 ± 0,18	722,98 ± 96,05
F	0,037	0,741
p	0,8572	0,438

¹ ANAVA, Teste F ($p \leq 0,05$); (1 U = 1 unidade de atividade enzimática, calculada pela variação de 0,01 de absorbância por minuto)

As GST têm importante papel no metabolismo de inseticidas, levando à resistência de insetos a inseticidas (CHE-MENDOZA; PENILLA; RODRÍGUEZ, 2009), sendo também relacionadas com resistência a aleloquímicos em insetos (YU, 1996). Há relatos de que as GST estejam envolvidas na detoxificação dos limonoides tóxicos 1,7-di-O-acetilhavanensina e 3,7-di-O-acetilhavanensina em *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) (ORTEGO et al., 1999) e em *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) (CABALLERO et al., 2008), embora outro limonoide tóxico, a fraxinelona, não tenha alterado a atividade de GST em *H. virescens* (LIU et al., 2009), assim como a cedrelona também não alterou a atividade dessa enzima em *S. frugiperda* no presente estudo.

No teste de quantificação de monooxigenases do citocromo P450, pelo método indireto de quantificação de grupos heme (convertidos em citocromo C), observou-se que a ingestão de cedrelona causou redução na quantidade de grupos heme por intestino equivalente (0,61 µg) em relação ao controle (0,76 µg), ou seja, reduziu a quantidade de enzimas P450, porém sem redução significativa no conteúdo protéico (Tabela 29). A menor quantidade de grupos heme permite inferir que a quantidade de monooxigenases do citocromo P450 é menor nas lagartas que ingeriram o limonoide, o que pode ser resultado de redução na síntese dessa enzima por ação da cedrelona.

Tabela 29 – Quantidade de citocromo-C e conteúdo protéico de extrato enzimático de intestino de lagartas de quarto ínstar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas durante cinco horas com dieta contendo acetona (controle) ou cedrelona a 300 ppm

Tratamento	Quantidade de citocromo C (µg/intestino equivalente) ¹	Conteúdo protéico (µg/intestino equivalente) ¹
Cedrelona	0,6110 ± 0,0043	575,20 ± 55,84
Controle	0,7607 ± 0,0201	646,70 ± 22,15
F	53,18	1,416
p	0,0019	0,2998

¹ ANAVA, Teste F ($p \leq 0,05$)

Embora muitos compostos vegetais causem aumento da atividade de P450 (SNYDER; WALDING; FEYEREISEN, 1993; SNYDER; GLENDINNING, 1996; HARRISON et al., 2001; PETERSEN et al., 2001), há compostos que podem causar redução, como os terpenoides estigmasterol, sitosterol e β -caroteno (YU, 1983), grupo químico este ao qual a cedrelona pertence. Segundo Brattsten, Wilkinson e Eisner (1977), os níveis dessa enzima em insetos tendem a aumentar poucas horas após o início da ingestão de um xenobiótico, portanto, o período de alimentação das lagartas nesse ensaio (cinco horas) já seria o suficiente para indicar alteração. Como a quantidade de enzimas P450 foi menor após ingestão de cedrelona, pode-se inferir que elas não estão envolvidas no processo de detoxificação da cedrelona ou, ainda, se a produção dessa enzima estiver sendo reduzida pela cedrelona, a menor quantidade pode ser a causa de não haver detoxificação eficiente.

Como o método utilizado é de quantificação de grupos heme gerais, a menor quantidade verificada pode não estar relacionada apenas a enzimas P450, mas também a outras hemoproteínas, como peroxidases. Assim, a ingestão de cedrelona causou redução na quantidade de enzimas contendo grupos heme, entre as quais estão as P450. Apesar de não permitir que se faça essa distinção, esse método é considerado bastante útil para detecção de alterações nos níveis de hemoproteínas, podendo indicar indiretamente a redução na quantidade de enzimas P450 (BROGDON; McALLISTER; VULULE, 1997).

Uma das hipóteses para justificar o elevado custo metabólico observado em lagartas de quarto ínstar após ingestão de cedrelona (item 4.5.4) era a de aumento na produção de enzimas detoxificadoras, como uma tentativa do inseto de eliminar o composto tóxico. Porém, a partir dos resultados obtidos, o custo metabólico não pode ser atribuído a um gasto energético para síntese de GST ou de P450, na tentativa de detoxificar o composto, já que não houve aumento na atividade/quantidade dessas enzimas.

4.5.5.3 Acetilcolinesterase

Após a ingestão de cedrelona, a atividade da acetilcolinesterase aumentou em cerca de duas vezes (0,53 U/lagarta equivalente) em relação ao controle (0,25 U/lagarta equivalente), e não houve diferença no conteúdo protéico das lagartas (513,48 e 559,65 μ g/lagarta equivalente, respectivamente) (Tabela 28). Em geral, alguns aleloquímicos são relatados

como inibidores de acetilcolinesterase, como a fisostigmina (HOUGHTON; REN; HOWES, 2006), alcalóide precursor dos inseticidas carbamatos (AGUIAR-MENEZES, 2005). Os monoterpenoides fenchona, S-carvona e linalol causaram elevada inibição de acetilcolinesterase em pragas de produtos armazenados (LÓPES; PASCUAL-VILLALOBOS, 2010). O limonoide azadiractina também causou inibição da atividade de acetilcolinesterase em *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae) (SENTHIL NATHAN; HISHAM; JAYAKUMAR, 2008).

Tabela 28 - Atividade de acetilcolinesterase *in vivo* e conteúdo protéico de extrato enzimático de lagartas inteiras de quarto ínstar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta contendo acetona (controle) ou cedrelona a 300 ppm

Tratamento	Atividade (U/lagarta equivalente) ¹	Conteúdo protéico (µg/lagarta equivalente) ¹
Cedrelona	0,53 ± 0,05	513,48 ± 19,38
Controle	0,25 ± 0,02	559,65 ± 31,14
F	24,66	1,58
p	0,0077	0,2771

¹ ANAVA, Teste F ($p \leq 0,05$) (1 U = 1 unidade de atividade enzimática, calculada pela variação de 0,01 de absorbância por minuto); ² Não analisado, por se tratar das mesmas amostras

O aumento na atividade de acetilcolinesterase pode ser decorrente de efeito direto da cedrelona, mas é provável também que, em razão da atividade metabólica acelerada, conforme observado pelos índices nutricionais (item 4.5.4), os processos de sinalização química estejam aumentados. A acetilcolinesterase é a enzima que regula a transmissão do impulso nervoso nas sinapses colinérgicas (SIEGFRIED; SCOTT, 1990), pela degradação da molécula sinalizadora, a acetilcolina. O aumento no metabolismo das lagartas alimentadas com dieta contendo cedrelona pode estar relacionado a um aumento na transmissão sináptica, com aumento na liberação de acetilcolina e, conseqüentemente, com maior atividade da enzima para degradar o neurotransmissor. Outra hipótese, contrária a essa, é de que a cedrelona, direta ou indiretamente, cause aumento na atividade da enzima, com conseqüente aumento na degradação de acetilcolina, levando à redução da transmissão sináptica e assim prejudicando importantes processos de sinalização que levariam à síntese de enzimas proteases ou P450, ou até mesmo causando redução nos movimentos peristálticos, por falta de estímulo.

No contexto do Manejo Integrado de Pragas, a utilização da cedrelona em conjunto com outros métodos de controle, como inseticidas químicos, deveria ser feita com cautela,

principalmente pela questão do manejo da resistência. Esse limonoide, por elevar a atividade de acetilcolinesterase, poderia comprometer a ação de inseticidas neurotóxicos, como os carbamatos, para os quais o aumento na atividade dessa enzima é o principal mecanismo de resistência em insetos-praga (HEMINGWAY et al., 1986).

4.5.6 Considerações sobre a bioatividade da cedrelona

A determinação do modo de ação específico de um composto vegetal em insetos é um processo bastante complexo, uma vez que pode haver múltiplos modos de ação e sítios alvo (HOUSEMAN et al., 1992). Apesar disso, através de bioensaios para separar efeitos comportamentais de efeitos fisiológicos, é possível ter maior compreensão da bioatividade de um aleloquímico e direcionar o estudo.

A cedrelona apresentou efeito por contato e principalmente por ingestão, em que foi possível verificar efeito tóxico pós-ingestão, caracterizando efeito fagodeterrente secundário, ou seja, sem mediação de quimiorreceptores. A toxicidade foi caracterizada por redução no crescimento, prolongamento do período larval, mortalidade de forma dose-dependente e alterações na fisiologia nutricional. Ao longo do tempo o consumo de alimento contendo cedrelona é reduzido, mas o inseto não para de ingerir alimento, utilizando-o principalmente nos processos metabólicos ao invés de para o crescimento, com redução na conversão do alimento em biomassa, o que explica o menor ganho de peso. A cedrelona não apresenta efeito regulador de crescimento, pois não foram observadas deformações nem alterações durante o processo de ecdise das lagartas, em nenhum dos testes realizados.

O aumento no metabolismo do inseto após a ingestão não está relacionado a uma maior síntese de enzimas detoxificadoras, como tentativa de eliminar o composto, uma vez que não houve aumento da atividade de GST e da quantidade de P450. Porém, há aumento na atividade de acetilcolinesterase, o que pode estar relacionado ao aumento no metabolismo, com os processos de sinalização química acelerados. Porém, o aumento na atividade dessa enzima pode estar causando maior degradação do neurotransmissor acetilcolina, comprometendo a transmissão sináptica e retardando processos metabólicos do inseto. A atividade proteolítica, contudo, foi reduzida após a ingestão de cedrelona. As proteases podem, portanto, ser o alvo de ação do limonoide, de forma direta ou indireta, mas são necessários mais testes para que essa hipótese seja confirmada e os estudos direcionados nesse

sentido. Essa redução pode também ser resultante da menor ingestão de alimento, ocasionada pelo efeito tóxico do composto.

A histologia no mesêntero das lagartas após ingestão da cedrelona também é uma hipótese a ser verificada, pois a cedrelona pode atuar diretamente sobre células epiteliais, como ocorre com a azadiractina em *S. gregaria* e *L. migratoria* (NASIRUDDIN; MORDUE (LUNTZ), 1993). Outra possibilidade a ser incluída em estudos subsequentes é a de alteração do metabolismo respiratório do inseto. Há relatos de limonoides, como nomilina, induzindo termogênese em ratos, sendo indicado como potente agente regulador de obesidade e de glicemia (ONO et al., 2011; DEA et al., 2013). Embora não haja esse tipo de estudo em insetos, o elevado gasto do inseto em metabolismo após a ingestão do limonoide cedrelona é um efeito marcante, cujas causas devem ser investigadas.

CONCLUSÕES

- A fração em diclorometano de ramos de *T. pallens* apresenta a maior bioatividade sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda*, seguindo-se as frações em diclorometano de ramos e de folhas de *T. pallida* e de folhas e de frutos de *T. ciliata*.
- As cinco frações com maior bioatividade causam alteração no consumo e utilização do alimento por lagartas de quarto ínstar de *S. frugiperda*.
- A fração de ramos de *T. pallida* causa o maior efeito tóxico, gerando fagodeterrência secundária.
- A fração em diclorometano de folhas de *T. ciliata* não causa efeito tóxico sobre as lagartas, mas apresenta fagodeterrência primária.
- Da fração em diclorometano de frutos de *T. ciliata* se obtém um triglicerídeo majoritário; da fração em acetato de etila de ramos de *T. ciliata* se obtém o flavonoide (+/-)-catequina; da fração em hexano de folhas de *T. pallida* se obtém o triterpeno damaradienol, e da fração diclorometano de ramos de *T. pallens* se obtém a cumarina escopoletina.
- O triglicerídeo e a escopoletina causam pequena mortalidade e redução de peso das lagartas por ingestão, enquanto a catequina causa apenas redução de peso. Por contato, a escopoletina também afeta a sobrevivência das lagartas.
- O limonoide cedrelona, obtido de extrato em hexano de caule de *T. ciliata*, apresenta o maior efeito sobre lagartas de *S. frugiperda*, tanto por ingestão quanto por contato.
- Lagartas alimentadas durante toda a fase com dieta contendo cedrelona incorporada apresentam menor peso, maior duração do período larval e mortalidade de modo dose-dependente, com conseqüente formação de pupas menores.
- Os efeitos subletais da cedrelona são observados nas lagartas a partir de 24 ppm, com mortalidade de 96,67% a 288 ppm.
- A cedrelona interfere no consumo e utilização do alimento por lagartas de quarto ínstar de *S. frugiperda*, causando redução na eficiência de conversão do alimento ingerido e digerido e na taxa de crescimento relativo, com aumento no custo metabólico, na taxa metabólica relativa e na digestibilidade aproximada, sem que ocorra alteração na taxa de consumo relativo. com a maior parte do alimento assimilado sendo utilizada para metabolismo.

- A cedrelona é um composto fagodeterrente secundário, com a redução no consumo gerada pelos efeitos tóxicos pós-ingestão.
- Há redução na atividade de proteases no intestino de lagartas de *S. frugiperda* que ingerem dieta contendo cedrelona.
- Não há alteração na atividade de glutatona-S-transferases no intestino dessas lagartas, porém há redução na quantidade de grupos heme, relacionados às monoxigenases do citocromo P450 no intestino,
- Há aumento da atividade de acetilcolinesterase no extrato enzimático do corpo inteiro de lagartas de *S. frugiperda*.
- O elevado custo metabólico não está associado à maior síntese de enzimas de detoxificação.

REFERÊNCIAS

- ADFA, M.; YOSHIMURA, T.; KOMURA, K.; KOKETSU, M. Antitermite activities of coumarin derivatives and scopoletin from *Protium javanicum* Burm.F. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 36, p.720-726, 2010.
- AGUIAR-MENEZES, E.L. **Inseticidas botânicos**: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 58p. (Embrapa Agrobiologia. Série Documentos, 205).
- AKHTAR, Y.; ISMAN, M.B.; NIEHAUS, L.A.; LEE, C.; LEE, H. Antifeedant and toxic effects of naturally occurring and synthetic quinones to the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Crop Protection**, Guildford, v. 31, p.8-14, 2012.
- ARMSTRONG, R.N. Glutathione S-transferases: Reaction mechanism, structure, and function. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v.4, p.131, 1991.
- ARNASON, J.T.; PHILOGÈNE, B.J.R.; DONSKOV, N.; KUBO, I. Limonoids from the Meliaceae and Rutaceae reduce feeding, growth and development of *Ostrinia nubilalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.43, p.221-226, 1987.
- ASCHER, K.R.S.; SCHMUTTERER, H.; MAZOR, M.; ZEBITZ, C.P.W.; NAQVI, S.N.H. The Persian lilac or chinaberry tree: *Melia azedarach* L. In: SCHMUTTERER H. **The neem tree**: Source of unique natural products for Integrated Pest Management, Medicine. Weinheim, Germany: Industry and Other Purposes. VCH, 1995. p.605–642.
- BAKER, J.E.; WOO, S.M.; BYRD, R.V. Ultrastructural features of the gut of *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) with notes on distribution of proteinases and amylases in crop and midgut. **Canadian Journal of Zoology**, Vancouver, v.62, p.1251-1259, 1984.
- BENET, L.Z.; KROETZ, D.L.; SHEINER, L.B. **Farmacocinética**: a dinâmica da absorção, distribuição e eliminação dos fármacos. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 10. ed. Santiago: McGraw-Hill, 1996. p.3-20.
- BERENBAUM, M. Toxicity of a furanocoumarin to armyworms: A case of biosynthetic escape from insect herbivores. **Science**, Washington, v.201, n.4355, p. 532-534, 1978.

- BERENBAUM, M.R. Postgenomic chemical ecology: From genetic code to ecological interactions. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.28, n.5, p.873-896, 2002.
- BERNARD, C.B.; PHILOGENE, B.J. Insecticide synergists: role, importance, and perspectives. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Washington, v.38, p.199–223, 1993.
- BERNAYS, E.A. Plant tannins and insect herbivores: an appraisal. **Ecological Entomology**, London, v.6, p.353-360, 1981.
- BEROZA, M. Pyrethrum synergists in sesame oil. Sesamolin, a potent synergist. **The Journal of the American Oil Chemists' Society**, New York, v.31, p 302-305, 1954.
- BLOOMQUIST, J.R. Ion channels as targets for insecticides. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.41, p.163-190, 1996.
- BOGORNI, P.C.; VENDRAMIM, J.D. Bioatividade de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.32, n.4, p.665-669, 2003.
- BOGORNI, P.C.; VENDRAMIM, J.D. Sublethal effect of aqueous extracts of *Trichilia* spp. on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) development on maize. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.34, n.2, p.311-317, 2005.
- BOMFORD, M.K.; ISMAN, M.B. Desensitization of fifth instar *Spodoptera litura* to azadirachtin and neem. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.81, p.301–313, 1996.
- BOULTER, D. Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops. **Biochemistry**, New York, v. 34, p. 1453-1466, 1993
- BOWERS, W.S.; OHTA, T.; CLEERE, J.S.; MARSELLA, P.A. Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants. **Science**, Washington, v.193, p.542-547, 1976.
- BOWERS, W.S. How anti-juvenile hormones work. **American Zoologist**, Thousand Oaks, v.21, n.3, p. 737-742, 1981.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. **Metodologia para qualificação de atividades de enzimas relacionadas com a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti***. Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 128 p.: il. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

WILKINSON, C.F.; EISNER, T. Herbivore-plant interactions: mixed-function oxidases and secondary plant substances. **Science**, Washington, v.196, n.4296, p.1349-1352, 1977.

BRATTSTEN, L.B. Inducibility of metabolic insecticide defenses in boll weevils and tobacco budworm caterpillars. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.27, p.13-23, 1987.

BROGDON, W.G.; MCALLISTER, J.C.; VULULE, J. Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v.13, p.233-237, 1997.

BURDEN, R.S.; CROMBIE, L. Amides of vegetable origin. Part XII. A new series of alka-2,4-dienoic tyramine-amides from *Anacyclus pyrethrum* D.C. (Compositae). **Journal of Chemical Society C**, London, v.19, p.2477-2481, 1969.

CABALLERO, C.; LÓPEZ-OLGUÍN, J.; RUIZ, M.; ORTEGO, F.; CASTAÑERA, P. Antifeedant activity and effects of terpenoids on detoxication enzymes of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v.6, p.177-184, 2008.

CASIDA, E. Mixed-function oxidase of insecticide synergists involvement in the biochemistry of insecticide synergists. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.18, n.5, p.753-772, 1970.

CASIDA, J.E. Prospects for new types of insecticides. In: METCALF, R.L.; MCKELVEY JR., J.J. **The future for insecticides needs and prospects**: proceedings of a Rockefeller Foundation Conference. New York: Wiley Interscience, 1974. p.349-369.

CÉSPEDES, C.L.; CALDERO, J.S.; LINA, L.; ARANDA, E. Growth inhibitory effects on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* of some limonoids isolated from *Cedrela* spp. (Meliaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p.1903-1908, 2000.

CHAMPAGNE, D.E. **Insect antifeedant and growth regulating activity of phytochemicals and extracts from the plant family Meliaceae**. 1989. 327p. Thesis (Doctorate of Philosophy) - University of British Columbia, Vancouver, 1989.

CHAMPAGNE, D.E.; KOUL, O.; ISMAN, M.B.; SCUDDER, G.G.E.; TOWERS, G.H.N. Biological activity of limonoids from the Rutales. **Phytochemistry**, New York, v.31, n.2, p.377-394, 1992.

CHANG, C.L.; CHO, I.K.; LI, Q.X. Insecticidal activity of basil oil, trans-anethole, estragole, and linalool to adult fruit flies of *Ceratitis capitata*, *Bactrocera dorsalis*, and *Bactrocera cucurbitae*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.102, n.1, p.203-209, 2009.

CHAPMAN, R.F. Contact chemoreception in feeding by phytophagous insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.48, p.455-484, 2003.

CHATTERJEE, A.; CHAKRABORTTY, T.; CHANDRASEKHARAN, S. Chemical investigation of *Cedrela toona*. **Phytochemistry**, New York, v.10, p.2533-2535, 1971.

CHE-MENDOZA, A.; PENILLA, R.P.; RODRÍGUEZ, D.A. Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: A review. **African Journal of Biotechnology**, Abraka, v.8, n.8, p.1386-1397, 2009.

CHEN, H.; YANG, S.; WU, Y.; DONG, L.; YUE, J. Terpenoids from *Toona ciliata*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.72, p.685-689, 2009.

CHEN, W.; ISMAN, M.B.; CHIU, S.F. Antifeedant and growth inhibitory effects of the limonoid toosendanin and *Melia toosendan* extracts on the variegated cutworm, *Peridroma saucia* (Lep., Noctuidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.119, p.367-370, 1995.

CHIU, S.F. Recent advances in research on botanical insecticides in China. In: ARNASON, A.T.; PHILOGÈNE, B.J.R.; MORAND, P. **Insecticides of Plant Origin**. Washington, DC: American Chemical Society, 1988. p.69-77.

CHIU, S.F. Other meliaceous plants containing ingredients for integrated pest management and further purposes. In: SCHMUTTERER, H. **The Neem Tree: Meliaceous Plants**. VCH, Weinheim, Germany, 1995. p. 642-646.

CHOGO, J.B.; CRANK, G. Chemical composition and biological activity of the Tanzanian plant *Ocimum suave*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.44, p.308-311, 1981.

COATS, J.R.; KARR, L.L.; DREWES, C.D. Toxicity and neurotoxic effects of monoterpenoids in insects and earthworms. In: HEDIN, P.A. **Naturally Occurring Pest Bioregulators**. ACS Symposium Series, v. 449, 1991. cap.20 p. 305-316.

COHEN, M.B.; BERENBAUM, M.R.; SCHULER, M.A. Induction of cytochrome P450-mediated detoxification of xanthotoxin in the black swallowtail. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.15, n.9, p.2347-2355, 1989.

COLOM, O.A.; NESKE, A.; POPICH, S.; BARDÓN, A. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v.80, p.63-67, 2007.

CROMBIE, L. Natural product chemistry and its part in the defense against insects and fungi in agriculture. **Pesticide Science**, Oxford, v.55, p.761-774, 1999.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1995. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 21).

CRUZ, I.; MONTEIRO, M.A.R. **Controle biológico da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, utilizando o parasitóide *Trichogramma pretiosum***. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2004. 4p. (EMBRAPA-CNPMS. Comunicado técnico, 98).

CRUZ, I.; TURPIN, F.T. Efeito de *Spodoptera frugiperda* em diferentes estágios de crescimento da cultura de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, n.3, p.355-359, 1982.

CUNHA, U.; VENDRAMIM, J.D.; ROCHA, W.C.; VIEIRA, P.C. Potencial de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) Como Fonte de Substâncias com Atividade Inseticida Sobre a Traça-do-Tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.34, n.4, p.667-673, 2005.

DEA, S.; PLOTTO, A.; MANTHEY, J.A.; RAITHORE, S.; IREY, M.; BALDWIN, E. Interactions and thresholds of limonin and nomilin in bitterness perception in orange juice and

other matrices. **Journal of Sensory Studies**, Westport, v.28, p.311–323, 2013.

DIEZ-RODRIGUEZ, G.I.; OMOTO, C. Inheritance of lambda-cyhalothrin resistance in *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.30, 311-316, 2001.

DOSKOTCH, R.W.; EL-FERALY, F.S. Isolation and characterization of (+)-sesamin and β -cyclopyrethrosin from pyrethrum flowers. **Canadian Journal of Chemistry**, Ottawa, v.47, p.1139-1142, 1969.

DUKE, S.O. Natural pesticides from plants. In: JANICK, J.; SIMON, J.E. **Advances in new crops**. Portland, OR: Timber Press, 1990. p. 511-517.

EAGLESON, C.U.S. **Oil synergist for insecticides**. Patent 2.202.145, May 28, 1940.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.; FEATHERSTONE, R. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, New York, v.7, p.88-95, 1961.

ENAN, E.; BEIGLER, M.; KENDE, A. Insecticidal action of terpenes and phenols to cockroaches: effect on octopamine receptors. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PLANT PROTECTION, 1998, Gent, Belgium. **Proceedings...** Gent, Belgium, 1998, p.5-10.

ENAN, E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v.130, p.325–337, 2001.

ENAN, E. Molecular and pharmacological analysis of an octopamine receptor from American cockroach and fruit fly in response to plant essential oils. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v.59, p.161–171, 2005a.

ENAN, E. Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine response cascade to plant essential oils. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.35, p.309–321, 2005b.

EVANS, P.D. Studies on the mode of action of octopamine, 5-hydroxytryptamine and proctolin on a myogenic rhythm in the locust. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v.110, p.231-251, 1984.

FERRACINI, V.L.; QUEIROZ, S.C.N.; GOMES, M.A.F.; SANTOS, G.L. Método para a determinação de hexazinone e tebutiuron em água. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.3, p.380-382, 2005.

FERRARINI, S.R.; DUARTE, M.O.; ROSA, R.G.; ROLIM, V.; EIFLER-LIMA, V.L.; VON POSER, G.; RIBEIRO, V.L. Acaricidal activity of limonene, limonene oxide and β -amino alcohol derivatives on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.157, p.149-153, 2008.

FEYEREISEN, R. Insect P450 enzymes. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.44, p.507-533, 1999.

FEYEREISEN, R. Insect cytochrome P450. In: GILBERT, L.I.; IATROU, K.; GILL, S.S. **Comprehensive Molecular Insect Science**. Oxford: Elsevier, 2005. cap. 4.1 p.1-77.

FRAZIER, J.L. The perception of plant allelochemicals that inhibit feeding. In: BRATTSTEN, L.B.; AHMAD, S. **Molecular aspects of insect-plant associations**. Plenum Press, New York, 1986, p.1-42.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; DE BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GOVINDACHARI, T.R.; NARASIMHAN, N.S.; SURESH, G.; PARTHO, P.D.; GOPALAKRISHNAN, G. Insect antifeedant and growth-regulating activities of salannin and other C-seco limonoids from neem oil in relation to azadirachtin. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.22, p.1453-1461, 1996.

GOVINDACHARI, T.R.; SURESH, G.; GOPALAKRISHNAN, G.; WESLEY S.D. Insect antifeedant and growth-regulating activities of neem seed oil: the role of major tetranortriterpenoids. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.124, p.287-291, 2000.

GRDIŠA, M.; GRŠIĆ, K. Botanical insecticides in plant protection. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, Zagreb, v.78, n.2, p.85-93, 2013.

GREEN, M.M.; SINGER, J.M.; SUTHERLAND, D.J.; HIBBEN, C.R. Larvicidal activity of *Tagetes minuta* (marigold) toward *Aedes aegypti*. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v.7, p.282-286, 1991.

GREGGER, H. Sesamin-type lignans as chemical markers within *Artemisia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v.9, p.165-169, 1981.

GRUNDY, D.L.; STILL, C.C. Inhibition of acetylcholinesterases by pulegone-1,2-epoxide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.23, p.383-388, 1985.

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

HABIG, W.H., PABST, M.J., AND JAKOBY, W.B. Glutathione *S*-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal Biological of Chemistry**, Bethesda, v.249, p.7130-7139, 1974.

HALLER, H.L.; MCGOVRAN, E.R.; GOODHUE, L.D.; SULLIVAN, W.N. The synergistic action of sesamin with pyrethrum insecticides. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v.7, p.183-185, 1942.

HANDA, S.K.; DEWAN, R.S. Evaluation of dillapiole and dihydrodillapiole as synergists for pyrethrins in dust formulations. **Pyrethrum Post**, Nakuru, v.13, n.2, p.45-46, 1974.

HARRISON, T.L.; ZANGERL, A.R.; SCHULER, M.A.; BERENBAUM, M.R. Developmental variation in cytochrome P450 expression in *Papilio polyxenes* in response to xanthotoxin, a hostplant allelochemical. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v.48, p.179-189, 2001.

HEMINGWAY, J.; SMITH, C.; JAYAWARDENA, K.G.I.; HERATH, P.R.J. Field and laboratory detection of the altered acetylcholinesterase resistance genes which confer organophosphate and carbamate resistance in mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v.76, p.559-565, 1986.

HILL, S.R.; ORCHARD, I. *In vitro* analysis of the digestive enzymes amylase and α -glucosidase in the midguts of *Locusta migratoria* L. in response to the myosuppressin, SchistoFLRFamide. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.51, p.1-9, 2005.

HODGSON, E. Microsomal monooxygenases. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. **Complete Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v.11, p.225-321.

HOUGHTON, P.J.; REN, Y.; HOWES, M.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Natural Products Reports**, London, v.23, p.181-199, 2006.

HOUSEMAN, J. G.; CAMPOS, F.; THIE, N.M.R.; PHILOGÈNE, B.J.R.; ATKINSON, J.; MORAND, P.; ARNASON, J.T. Effect of the maize-derived compounds DIMBOA and MBOA on growth and digestive processes of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.85, n.3, p.669-674, 1992.

HU, C.Q.; HAN, J.W.; ZHAO, J.G.; SONG, G.Q.; LI, Y.H. Limonoids from *Dictamnus angustifolius*. **Journal of Integrative Plant Biology**, Malden, v.31, p.453–458, 1989.

ISMAN, M.B.; KOUL, O.; LUCZYNSKI, A.; KAMINSKIS, J. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.38, p.1406-1411, 1990.

ISMAN, M.B.; MATSUURA, H.; MACKINNON, S.; DURST, T.; TOWERS, G.H.N.; ARNASON, J.T. Phytochemistry of the Meliaceae: So many terpenoids, so few insecticides. **Recent Advances in Phytochemistry**, New York, v.30, p.155-178, 1996.

ISMAN, M.B. Neem and other botanical insecticides: barriers to commercialization. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v.25, n.4, p.339-344, 1997.

ISMAN, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, Guildford, v.19, p.603-608, 2000.

ISMAN, M.B. Insect antifeedants. **Pesticide Outlook**, London, v.13, p.152-157, 2002.

ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.51, p.45-66, 2006.

ISMAN, M.B.; MIRESMAILLI, S.; MACHIAL, C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochemistry**, New York, v.10, p.197-204, 2011.

JACOBSON, M. Botanical insecticides, past, present and future. In: ARNASON, J.T.; PHILOGÈNE, B.J.R.; MORAND, P. **Insecticides of plant origin**. Washington, D.C.: ACS 1989. p.1–10. (Symposium Series, 387)

JACOBSON, M. In: JACOBSON, M.; CROSBY, D.G. **Naturally occurring insecticides**. New York: Mareei Dekker, 1971. p.178.

JANPRASERT, J.; SATASOOK, C.H.; UKUMALANAND, P.; CHAMPAGNE, D.E.; ISMAN, M.B.; WIRIYACHITRA, P.; TOWERS, G.H.N. Rocaglamide, a natural benzofuran insecticide from *Aglaia odorata*. **Phytochemistry**, New York, v.32, n.1, p.674, 1993.

JIMENEZ, A.; MATA, R.; PEREDA-MIRANDA, R.; CALDERON, J.; ISMAN, M.B.; NICOL, R.; ARNASON, J.T. Insecticidal limonoids from *Swietenia humilis* and *Cedrela salvadorensis*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.23, n.5, p.1225-1234, 1997.

JOHNSON, H.A.; OBERLIES, N.H.; ALALI, F.Q.; MCLAUGHLIN, J.E. Thwarting resistance: annonaceous acetogenins as new pesticidal and antitumor agents. In: CUTLER, S.J.; CUTLER, J.G. **Biological Active Natural Products: Pharmaceuticals**. Washington, D.C.: CRC Press, 2000. p. 173-183.

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

KEITA, S.M.; VINCENT, C.; SCHMIT, J.; RAMASWAMY, S.; BELANGER, A. Effect of various essential oils on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v.36, p.355-364, 2000.

KLOCKE, J.A. **Natural plant products as sources and models of control agents**. 1983. 230p. Thesis (Doctorate in Entomology) - University of California, Berkeley, 1983.

KOSTYUKOVSKY, M.; RAFAELI, A.; GILEADI, C.; DEMCHENKO, N.; SHAYYA, E. Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. **Pest Management Science**, Sussex, v.58, p.1101-1106, 2002.

KOUL, O. Feeding deterrence induced by plant limonoids in the larvae of *Spodoptera litura* (F.) **Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie**, Berlin, v.95, p.166-171, 1983.

KOUL, O.; ISMAN, M.B. Effects of azadirachtin on the dietary utilization and development of the variegated cutworm *Peridroma saucia*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.37, p.591-598, 1991.

KOUL, O.; ISMAN, M.B. Toxicity of the limonoid allelochemical cedrelona to noctuid larvae. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.64, p.281-287, 1992.

KOUL, O.; WALIA, S.; DHALIWAL, G.S. Essential oils as green pesticides: potential and constraints. **Biopesticides International**, Jalandhar, v.4, n.1, p.63-84, 2008.

KRAUS, W. Azadirachtin and other triterpenoids. In: SCHMUTTERER, H. **The Neem Tree**. 2nd ed. Neem Foundation: Mumbai, 2002. p.39-111.

KRAUS, W.; GRIMMINGER, W.; SAWITSKI, G. Toonacilin and 6-acetoxy toonacilin, two novel B-seco tetranortriterpenoids with antifeedant activity. **Angewandte Chemie**, Weinheim, v.17, p.452-453, 1978.

KUBO, I.; KLOCKE, J.A. Insect ecdysis inhibitors. In: GREEN, M.B.; HEDIN, P. **Natural resistance of plants to insects**. ACS Symposium Series, v.296, p.206-219, 1986.

KUBO, I.; KLOCKE, J.A. Limonoids as insect control agents. **Colloques Institut National de la Recherche Agronomique**, Paris, v.7, p.117-129, 1982.

KUMAR, C.S.S.R., SRINIVAS M., YAKKUNDI, S. Limonoids from the seeds of *Azadirachta indica*. **Phytochemistry**, New York, v.43, p.451-455, 1996.

LARA, F.M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. Piracicaba: Livroceres, 1979. 201p.

LAWRENCE, P.K.; KOUNDAL, K.R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v.5, n.1, p.93-109, 2002.

LEE, K. Glutathione-S-Transferase activities in phytophagous insects: induction and inhibition by plant phototoxins. **Insect Biochemistry**, London, v.21, n.4, p.353-361, 1991.

LEIDERMAN, L.; SAUER, H.F.G. A lagarta dos milharais *Laphygma frugiperda* (Abbott e Smith, 1797). **O Biológico**, São Paulo, v.19, n.6, p.105-113, 1953.

LEITE, A.C. Estudo químico e atividades biológicas de *Cedrela fissilis* e *Cipadessa fruticosa* (Meliaceae). 2005. 323p.. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

LeORA SOFTWARE. **Poloplus 1.0 probit and logit analysis**. Berkeley, 2003.

LEY, S.V.; ABAD-SOMOVILLA, A.; ANDERSON, J.C.; AYATS, R.B.; BECKMANN, E.; BOYER, A. et al. The synthesis of azadirachtin: A potent insect antifeedant. **Chemistry**, London, v.14, n.34, p.10683-10704, 2008.

LIANG, W.; BAI, X.; CHENG, J. SHI, G.; WANG, Y.; WANG, Z. Isolation and identification of the principal acaricidal components from *Stellera chamaejasme*. **Acta Horticulturae Sinica**, Beijing, v.38, n.5, p.947-954, 2011.

- LIU, Z.L.; XU, Y.J.; WU, J.; GOH, S.H.; HO, S.H. Feeding deterrents from *Dictamnus dasycarpus* Turcz against two stored-product insects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.50, p.1447–1450, 2002.
- LIU, Z.L.; HO, S.H.; GOH, S.H. Effect of fraxinellone on growth and digestive physiology of Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* Guenée. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.91, p.122-127, 2008.
- LIU, Z.L.; HO, S.H.; GOH, S.H. Modes of action of fraxinellone against the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. **Insect Science**, Elmsfrod, v.16, p.147-155, 2009.
- LODER, J.M.; MOORHOUSE, A.; RÜSSEL, G.B. Tumor inhibitory plants: Amides of *Piper novae-hollandiae* (Piperaceae). **Australian Journal of Chemistry**, Melbourne, v.22, p.1531-1538, 1969.
- LONDERSHAUSEN, M.; LEIGHT, W.; LIEB, F.; MOESCHLER, H. Molecular mode of action of annonins. **Pesticide Science**, Oxford, v.33, p.427-438, 1991.
- LÓPEZ, M.D; CONTRERAS, J.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Selection for tolerance to volatile monoterpenoids in *Sitophilus oryzae* (L.), *Ryzopertha dominica* (F.) and *Cryptolestes pusillus* (Shönherr). **Journal of stored Products Research**, Oxford, v.46, p.52-58, 2010.
- MACEDO, M.E.; CONSOLI, R.A.; GRANDI, T.S.; ANJOS, A.M. dos; OLIVEIRA, A.B.; MENDES, N.M.; QUEIROZ, R.O.; ZANI, C.L. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.92, p.565-570, 1997.
- MCLAUGHLIN, J.L.; ZENG, L.; OBERLIES, N.H.; ALFONSO, D.; JOHNSON, H.A.; CUMMINGS, B.A. Annonaceous acetogenins as new natural pesticides: recent progress. In: HEDIN, P.A.; HOLLINGWORTH, R.M.; MASLER, E.P.; MIYAMOTO, J. **Phytochemicals for Pest Control**. Washington: American Chemical Society, 1997. Cap.9, p. 117-133.
- MENDES, S.M.; WAQUIL, J.M. **Uso do milho Bt no manejo integrado de lepidópteros-praga: recomendações de uso**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2009. (Comunicado Técnico, 170).
- MITCHELL, M.J.; SMITH, S.L.; JOHNSON, S.; MORGAN, E.D. Effects of the neem tree compounds azadirachtin, salannin, nimbin, and 6-desacetylnimbin on ecdysone 20-monooxygenase activity. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v.35, p.199-209, 1997.

MIYAZAWA, M.; WATANABE, H.; KAMEOKA, H. Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with a *p*-menthane skeleton. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.45, 677-679, 1997.

MORDUE (LUNTZ), A.J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: an update. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.39, n.11, p.903-924, 1993.

MORDUE (LUNTZ), A.J.; COTTEE, P. K.; EVANS, K. A. Azadirachtin: Its effect on gut motility, growth and moulting in *Locusta*. **Physiological Entomology**, Oxford, v.10, p.431-437, 1985.

MORDUE (LUNTZ), A.J.; NISBET, A.J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, n.4, p. 615-632, 2000.

MOREIRA, M.D.; PICANÇO, M.C.; SILVA, E.M.; MORENO, S.C.; MARTINS, J.C. Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas. In: VENZON, M.; PAULA JUNIOR, T.J. de; PALLINI, A. **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG, 2006. cap.5, p.89-116.

MORGAN, E.D. Azadirachtin, a scientific gold mine. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Oxford, v.17, p.4096-4105, 2009.

NAKATANI, M.; IWASHITA, T.; NASKI, H.; HASE, T. Structure of a limonoid antifeedant from *Trichilia roka*. **Phytochemistry**, New York, v.24, p.195-196, 1985.

NAKATANI, M.; HUANG, R.C.; OKAMURA, H.; IWAGAWA, T.; TADERA, K. Degraded limonoids from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, New York, v.49, p.1773-1776, 1998.

NAUEN, R. Perspectives Insecticide mode of action: return of the ryanodine receptor. **Pest Management Science**, Sussex, v.62, p.690-692, 2006.

NGOH, S.P., HOO, L., PANG, F.Y., HUANG, Y., KINI, M.R., HO, S.H. Insecticidal and repellent properties of nine volatile constituents of essential oils against the American cockroach, *Periplaneta americana* (L.). **Pesticide Science**, Oxford, v.54, p.261-268, 1998.

NASIRUDDIN, M.; MORDUE (LUNTZ), A.J. The effects of azadirachtin on the midgut histology of the locusts *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. **Tissue and Cell**, Philadelphia, v.25, p.875-884, 1993.

OHTA, T. Slightly deleterious mutant substitutions in evolution. **Nature**, London, v.246, p.96-98, 1973.

OKAMURA, H.; YAMAUCHI, K.; MIYAWAKI, K.; IWAGAWA, T.; NAKATANI, M. Synthesis and biological activities of degraded limonoids, (\pm)-fraxinellonone and its related compounds. **Tetrahedron Letters**, Elmsford, v.38, p.263–266, 1997.

ONO, E. INOUE, J.; HASHIDUME, T.; SHIMIZU, M.; SATO, R. Anti-obesity and anti-hyperglycemic effects of the dietary citrus limonoid nomilin in mice fed a high-fat diet. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v.410, n.3, p.677-681, 2011.

ORTEGO F.; LÓPEZ-OLGUÍN. J.F.; RUIZ, M.; CASTAÑERA, P. Effects of toxic and deterrent terpenoids on digestive protease and detoxication enzyme activities of Colorado potato beetle larvae. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.63, p.76-84, 1999.

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: KLAASSEN, C.D. **Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poisons**. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 133-224.

PASQUALOTTO, V.G.; NEBO, L.; MATOS, A.P.; VIERIA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade inseticida dos frutos e sementes de *Trichilia* spp. (Meliaceae). In: .REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 31., 2008, Águas de Lindóias, SP. **Anais...** Águas de Lindóia: SBQ, 2008. p.1-2

PETERSEN, R.A.; ZANGERL, A.R.; BERENBAUM, M.R.; SCHULER, M.A. Expression of CYP6B1 and CYP6B3 cytochrome P450 monooxygenases and furanocoumarin metabolism in different tissues of *Papilio polyxenes* (Lepidoptera: Papilionidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.31, p.679-690, 2001.

PETERSON, J.K.; HARRISON, H.F.; JACKSON, D.M. Biological activities and contents of scopolin and scopoletin in sweetpotato clones. **HortScience**, Alexandria, v.38, n.6, p.1129-1133, 2003.

PICKETT, J.A.; WADHAMS, L.J.; WOODCOCK, C.M. Developing sustainable pest control from chemical ecology. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Philadelphia, v.64, p.149-156, 1997.

PRATES, H.T.; SANTOS, J.P. Óleos essenciais no controle de pragas de grãos armazenados. In: Lorini, I.; Miike, L.H.; Scussel, V.M. **Armazenagem de Grãos**. Campinas: IBG, 2000. p. 443–461.

PRIESTLEY, C.M.; WILLIAMSON, E.M.; WAFFORD, K.A.; SATTELLE, D.B. Thymol, a constituent of thyme essential oil is a positive allosteric modulator of human GABA receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. **British Journal of Pharmacology**, London, v.140, p.1363-1372, 2003.

PURITCH, G.S.; ALMOND, D.S.; PARKER, D.L. Triglyceride enhanced pyrethrin-based arthropodocidal composition US 5700473A. Patent N°5.700.473, Dec.23, 1997.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013. Disponível em: <http://www.R-project.org>.

RAMASUBRAMANIAN, T.; REGUPATHY, A. Magnitude and mechanism of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* Hub. population of Tamil Nadu, India. **Asian Journal of Plant Sciences**, New York, v.3, p.94-100, 2004.

RATTAN, R.S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Protection**, Guildford, v.29, n.9, p.913-920, 2010.

RAUBENHEIMER, D.; SIMPSON, S.J. Analysis of covariance: an alternative to nutritional indices. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.62, p.221 -231, 1992.

REMBOLD, H.; SUBRAHMANYAM, B.; MÜLLER, T. Corpus cardiacum - a target for Aza. **Experientia**, Basel, v.45, p.361-363, 1989.

RESTELLO, R.M.; MENEGATT, C.; MOSSI, A.J. Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v.53, n.2, p.304-307, 2009.

RETNAKARAN, A.; GRANETT, J.; ENNIS, T. Insect growth regulators. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, Oxford, v.12, p. 529-601, 1985.

RICE, P.J.; COATS, J.R. Insecticidal properties of monoterpenoid derivatives to the house fly (Diptera: Muscidae) and red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). **Pesticide Science**, Oxford, v.41, p.195-202, 1994.

RICHARDS, A.G.; CUTKOMP, L.K. Effects of poisons on nerve ultrastructure. **Journal of New York Entomology Society**, New York, v.53, p.319-355, 1945.

RICHARDSON, M.J. Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. In: RICHARDSON, M.J. **Methods in Plant Biochemistry**. New York: Academic Press, 1991. p. 259-305.

RIVA, D.; SIMIONATTO, E.L.; WISNIEWSKI, A.; SALERNO, A.R.;
SCHALLENBERGERS, T.H. Estudo da adaptação da espécie *Piper hispidinervum* C. DC. (pimenta longa) à região do Vale do Itajaí - SC, através da composição química do óleo essencial obtido por hidrodestilação por micro-ondas e convencional. **Acta Amazonica**, Manaus, v.41, n.2, p.297-302, 2011.

ROCHA, W.C. **Busca de substâncias bioativas em plantas amazônicas: *Adiscanthus fusciflorus* (Rutaceae), *Trichilia pallida* e *T. rubra* (Meliaceae)**. 2004. 221p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

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

RODRÍGUEZ, C.H.; VENDRAMIM, J.D. Uso de índices nutricionales para medir el efecto insectistático de extractos de meliáceas sobre *Spodoptera frugiperda*. **Manejo Integrado de Plagas**, Turrialba, v.48, p.11-18, 1998.

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

ROGERS, E.F.; KONIUSKY, F.R.; SHAVEL JR, J.; FOLKERS, K. Plant Insecticides. I. Ryanodine, a new alkaloid from *Ryania speciosa* Vahl. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v.70, n.9, p.3086-3088, 1948.

ROSE, R.L.; SPARKS, T.C.; SMITH, C.M. The influence of resistant soybean (PI 227687) foliage and coumestrol on the metabolism of xenobiotics by the soybean looper, *Pseudoplusia includens* (Walker). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.34, p.17-26, 1989.

RYAN, C.A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.28, p.425-449, 1990.

SAITO, M.L. **As plantas praguicidas:** Alternativa para o controle de pragas da agricultura. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 2004. p.1-4.

SAITO, M.L.; LUCHINI, F. **Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente.** Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. 46p. (EMBRAPA-CNPMA. Série Documentos, 12).

SALEHZADEH, A.; AKHKHA, A.; CUSHLEY, W.; ADAMS, R.L.P.; KUSEL, J.R.; STRANG, R.H.C. The antimetabolic effect of the neem terpenoid Aza on cultured insect cells. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.33, n.9, p. 681-689, 2003.

SALINAS, A.E.; WONG, M.G. Glutathione S-transferases: a review. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v.6, p. 279-309, 1999.

SAS Statistical Analysis System. **SAS User's Guide:** Statistics. SAS Institute, Cary, NC, USA, 2009.

SATTELLE, D.B.; CORDOVA, D.; CHEEK, T.R. Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. **Invertebrate Neuroscience**, Berlin, v.8, p.107-119, 2008.

SCHICK, M.P.; SCHICK, R. Understanding and implementing safe and effective flea control. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v.22, p.421-434, 1986.

SCHMUTTERER, H. Influence of azadirachtin, of an azadirachtin- free fraction of an alcoholic neem seed kernel extract and of formulated extracts on pupation, adult emergence and adults of the braconid, *Apanteles glomeratus* L. (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.113, p.79-87, 1992.

SCOTT, I.M.; JENSEN, H.R.; PHILOGÈNE, B.J.R.; ARNASON, J.T. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. **Phytochemistry Review**, New York, v.7, p.65-75, 2008.

SCOTT, J.G.; LIU, N; WEN, Z.M. Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v.121, p.147-155, 1998.

SCRIBER, J.M.; SLANSKY JR, F. The nutritional ecology of immature insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.26, p.183-211, 1981.

SEVERINO, R.P.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.F.; GAMBOA, I.C.; SANTOS, R.M.G.; CORREA, A.G.; BATISTA-PEREIRA, L.G.; CAMARGO-DIETRICH, C.R.R.; PEREIRA, D.A.; COSTA-LEONARDO, A.M.; BUENO, O.C. Biological activity of limonoids from Meliaceae against a subterranean termite (*Heterotermes tenuis*). **Sociobiology**, Chicago, v.50, n.3, p. 947-957, 2007.

SIEGFRIED, B.D.; SCOTT, J.G. Properties and inhibition of acetylcholinesterase in resistant and susceptible German cockroaches (*Blattella germanica* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.38, n.2, p.122–129, 1990.

SILVA, M.F.G.F.; AGOSTINHO, S.M.M.; PAULA, J.R.; OIANO NETO, J.; CASTRO-GAMBOA, I.; RODRIGUES FILHO, E.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C. Chemistry of *Toona ciliata* and *Cedrela odorata* graft (Meliaceae): chemosystematic and ecological significance. **Pure and Applied Chemistry**, South Africa, v.71, n.6, p.1083-1087, 1999.

SILVA-AGUAYO, G. **Botanical insecticides**. In: RADCLIFFE, E.B.; HUTCHISON, W.D.; CANCELADO, R.E. **Radcliffe's IPM World Textbook**. University of Minnesota, Saint Paul, 2002. Disponível em: <<http://ipmworld.umn.edu/chapters/SilviaAguayo.htm>>. Acesso em: 28 mar.2011.

SIMS, S.R.; GREENPLATE, J.T.; STONE, T.B.; CAPRIO, M.A.; GOULD, F.L. Monitoring strategies for early detection of Lepidoptera resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. In: BROWN, T.M. **Molecular genetics and evolution of pesticide resistance**. Washington: American Chemical Society, 1996. cap.23, p.229-242.

SINGH, S. Chemical constituents of essential oil from *Anethum sowa* Kurz. seed. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, Rajasthan, v.4, n.9, p.4156-4160, 2012.

SINGH, M.; KHOKHAR, S.; MALIK, S.; SINGH, R. Evaluation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) extracts against American bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.45, 3262-3268, 1997.

SIQUEIRA, H.A.A.; NICKERSON, K.W.; MOELLENBECK, D.; SIEGFRIED, B.D. Activity of gut proteinases from Cry1Ab-selected colonies of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Pest Management Science**, Sussex, v.60, p.1189–1196, 2004.

SNYDER, M.J.; GLENDINNING, J.I. Causal connection between detoxification enzyme activity and consumption of a toxic plant compound. **Journal of Comparative Physiology A**, New York, v.179, p.255-261, 1996.

SNYDER, M.J.; HSU, E.; FEYEREISEN, R. Induction of cytochrome P-450 activities by nicotine in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.19, n.12, p.2903-2916, 1993.

SNYDER, M.J.; WALDING, J.K.; FEYEREISEN, R. Metabolic fate of the allelochemical nicotine in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.24, p.837-846, 1993.

SOUZA, J.C.; SOUZA, M.A. **Lagarta-do-cartucho e besourinho-das-plântulas**: principais pragas do milho em plantio direto no sul de Minas. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. 32p. (EPAMIG, Boletim Técnico, 68).

STAAL, G.B. Insect growth regulators with juvenile hormone activity. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.20, p.417-460, 1975.

SUMAN, D.S.; PARASHAR, B.D.; PRAKASH, S. Efficacy of various insect growth regulators on organophosphate resistant immatures of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from diferente geographical areas of India. **Journal of Entomology**, London, v.7, p.33-43, 2010.

SENTHIL NATHAN, S.; KALAIVANI, K.; CHUNG, P.G. The effects of azadirachtin and nucleopolyhedrovirus on midgut enzymatic profile of *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.83, p. 46-57, 2005.

SENTHIL NATHAN, S.; KALAIVANI, K.; MURUGAN, K.; CHUNG, P.G. The toxicity and physiological effect of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) the rice leaf folder. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.81, p.113-122, 2005.

SENTHIL NATHAN, S.; CHOI, M.Y.; PAIK, C.H.; SEO, H.Y.; KALAIVANI, K.; KIM, J.D. Effect of azadirachtin on acetylcholinesterase (AChE) activity and histology of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stal). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.70, p.244-250, 2008.

TANZUBIL, P.B.; McCAFFERRY, A.R. Effects of azadirachtin and aqueous neem seed extracts on survival, growth and development of the african armyworm, *Spodoptera exempta*. **Crop Protection**, Guildford, v.9, p.383-386, 1990.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes-properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, Oxford, v.109, p.1-62, 1994.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Biochemistry of Digestion. In: GILBERT, L.I.; IATROU, K.; GILL, S.S. **Comprehensive Molecular Insect Science**, Oxford, v. 4, p.171-224, 2005.

TESTA, B.; JENNER, P. Inhibitors of cytochrome P-450s and their mechanism of action. **Drug Metabolism Reviews**, New York, v.12, p.1-117, 1981.

TIMMINS, W.A.; REYNOLDS, S.F. Azadirachtin inhibits secretion of trypsin in midgut of *Manduca sexta* caterpillars: reduced growth due to impaired protein digestion. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.63, p.47- 54, 1992.

TOMAR, S.S.; SAXENA, V.S.; MAHWESHWARI, M.L.; SARUP, P.; MUKERJEE, S.K. New carbaryl synergist derived from dillapiole. **Indian Journal of Entomology**, New Delhi, v.40, p.113-116, 1978.

TOMQUELSKI, G.V.; MARTINS, G.L.M. Efficiency of insecticides on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) on crop corn in region of Chapadoes. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.6, p.26-39, 2007.

TORRECILLAS, S.M.; VENDRAMIM, J.D. Extrato aquoso de ramos de *Trichilia pallida* e o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* em genótipos de milho. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.58, n.1, p.27-31, 2001.

TRIPATHI, A.K.; BHAKUNI, R.S.; UPADHYAY, S.; GAUR, R. Insect feeding deterrent and growth inhibitory activities of scopoletin isolated from *Artemisia annua* against *Spilarctia obliqua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insect Science**, Elmsford, v.18, p.189-194, 2011.

TRUMM, P.; DORN, A. Effects of azadirachtin on the regulation of midgut peristalsis by the stomatogastric nervous system in *Locusta migratoria*. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v.28, p.7-26, 2000.

TYLER, V.E.; BRADY, L.R.; ROBBERS, J.E. **Farmacognosia**. Buenos Aires: Editorial El Ateneo, 1979. p.431-434.

VEITCH, G.E.; BECKMANN, E.; BURKE, B.J.; BOYER, A.; MASLEN, S.L.; LEY, S.L. Synthesis of azadirachtin: A long but successful journey. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v.46, n.40, p.7629-7632, 2007.

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

VIEGAS JR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, São Paulo, v.26, n.3, p.390-400, 2003.

VILLANI, M.; GOULD, F. Screening of crude plant extracts as feeding deterrent of the wireworm, *Melanotus communis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.37, p.69-75, 1985.

WADDELL, T.G.; OSBORNE, C.B.; COLLISON, R.; LEVINE, M.J.; CROSS, M.C. Erigerol, a new labdane diterpene from *Erigeron philadelphicus*. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v.48, p.4450-4453, 1983.

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

WALKER, A.J.; FORD, L.; MAJERUS, M.E.N.; GEOGHEGAN, I.E.; BIRCH, N.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. Characterization of the midgut digestive proteinase activity of the two-spot ladybird (*Adalia bipunctata* L.) and its sensitivity to proteinase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.28, p.173-180, 1998.

WAQUIL, J.M.; MENDES, S.M. **Evolução do milho Bt no Brasil**: potenciais problemas e superação. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2013. (Boletim Grão em Grão, 46).

WAQUIL, J.M.; VIANA, P.A.; LORDELLO, A.I.; CRUZ, I.; OLIVEIRA, A.C. Controle da lagarta-do-cartucho em milho com inseticidas químicos e biológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, n.2, p.163-166. 1982.

WEI, F.Y.; YUAN, C.L. Isolation and identification of pesticidal activity components in *Dictamnus dasycarpus* Turcz. **Acta Agriculturae Boreali Occidentalis Sinica**, Beijing, v.15, p.93-95, 2006.

WILKINSON, C.F.; MURRAY, M.; MARCUS, C.B. Interaction of methylenedioxyphenyl compounds with cytochrome P-450 and microsomal oxidation. **Reviews in Biochemical Toxicology**, New York, v.6, p.27-63, 1984.

WINK, M. Interference of alkaloids with neuroreceptors and ion channels. In: RAHMAN, A.U. **Bioactive natural products**. Elsevier, v.11, 2000. p. 3-129.

YANG, Z.; ZHANG, Y.; DING, W.; LUO, J.; QIN, P. Effect of temperature on toxicities of scopoletin and bisdemethoxycurcumin against *Tetranychus cinnabarinus* (Acari:Tetranychidae). **Acta Entomologica Sinica**, Peking, v.55, n. 4, p.420-425, 2012.

YU, S.J. Induction of detoxifying enzymes by allelochemicals and host plants in the fall armyworm. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.19, p.330-336, 1983.

YU, S.J. Interactions of allelochemicals with detoxification enzymes of insect-susceptible and resistant armyworm. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.22, p.60-68, 1984.

YU, S.; Insect Glutathione S-Transferases. **Zoological Studies**, Taipei, v.35, n.1, p.9-19, 1996.

YU, S.J.; ABO-ELGHAR, G.E. Allelochemicals as inhibitors of glutathione-S-transferases in the fall armyworm. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.68, p.173-183, 2000.

ZARIDAH, M.Z., NOR AZAH, M.A., ABU SAID, A., MOHD. FARIDZ, Z.P. Larvicidal properties of citronellal and *Cymbopogon nardus* essential oils from two different localities. **Tropical Biomedicine**, Malaysia, v.20, p.169-174, 2003.

ZHANG, X.; CHIU, S.F. Effects of toosendanin on several enzyme systems of the cabbageworm *Pieris rapae* L. **Acta Entomologica Sinica**, Peking, v.35, p.171-177, 1992.

ZYGADLO, J.A.; GROSSO, N.R.; ALBURRA, R.E.; GUZMAN, C.A. Essential oil variation in *Tagetes minuta* populations. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v.18, p.405-407, 1990.