

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE TRÊS ESPÉCIES DE**  
*Solanum* **SOBRE** *Cryptotermes brevis* **E** *Spodoptera frugiperda*

**Vânia Rech Cainelli**

**Caxias do Sul, 2010**

**Vânia Rech Cainelli**

**BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE TRÊS ESPÉCIES DE  
*Solanum* SOBRE *Cryptotermes brevis* E *Spodoptera frugiperda***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Neiva Monteiro de Barros**

**Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Veronica Cesio**

**Caxias do Sul, 2010**

**Vânia Rech Cainelli**

**BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE TRÊS ESPÉCIES DE  
*Solanum* SOBRE *Cryptotermes brevis* E *Spodoptera frugiperda***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Neiva Monteiro de Barros

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Veronica Cesio

**Dissertação defendida em 10 de dezembro de 2010.**

**Orientadora:**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Neiva Monteiro de Barros

---

**Co-Orientadora:**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Veronica Cesio

**Membros da banca:**

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

---

Prof. Dr. Alexandre Specht

---

Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

---

**“Deus me conceda falar com propriedade e pensar de forma correspondente aos dons que me foram dados, porque ele é o guia da sabedoria e o orientador dos sábios”.**

*Bíblia sagrada*

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus fonte de sabedoria e persistência, ser primordial e a quem devo todas as minhas conquistas.

A minha família em especial meu marido Alfredo Severo Cainelli, pela paciência e amor necessários para agüentar meus diferentes níveis de dificuldades, por ser o porto seguro e fonte de todo o meu amor mais sincero.

A minha linda filha, nascida durante o mestrado, Valentina Rech Cainelli, que enquanto dormia ou brincava, muitas horas me inspirou a continuar e não desistir jamais.

A minha querida mãe pelo incentivo, apoio e sábias palavras na hora do desânimo, a ela devo minha vida. Ao meu saudoso pai Adelino Rech (*in memorian*), pois sei que meu sonho também era o seu.

Aos meus queridos amigos Gaura e Jerônimo, por tantas vezes cuidarem de minha filha, por todo carinho e amor.

A orientadora Dra. Neiva Monteiro de Barros, pela confiança, conselhos e eterna paciência.

A co-orientadora Dra. Maria Veronica Césio por ter me ajudado a resolver os mais diversos problemas durante o mestrado, por sua amizade que com certeza foi além do nível profissional.

Ao Prof. Dr. Alexandre Specht pela a ajuda e colaboração em todas as etapas do trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray Laguna pela disponibilidade, amizade e críticas altamente construtivas.

Ao Professor Eugen Stumpp pela amizade e apoio na Iniciação Científica.

Ao Professor e coordenador do curso de Pós Graduação em Biotecnologia Aldo José Pinheiro Dillon, pela compreensão, carinho e amizade.

A secretária da pós-graduação Lucimara Serafini Rech pela ajuda e colaboração nos assuntos burocráticos, por ser uma pessoa facilitadora e especial.

A todas as pessoas que me ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho. Aos bolsistas Stefani Garcia Giani e Eduardo Valduga, pelas incansáveis horas de laboratório, sem a ajuda de vocês seria impossível a realização deste trabalho, muito obrigado.

Agradeço o pessoal do Laboratório de Farmacognosia da UdeLaR, em especial Alejandro Ruiz Dias, por toda colaboração na parte química por nos receberem tão prestativos no laboratório e pela transmissão do conhecimento. Aos queridos amigos Ximena e Nacho pelas agradáveis horas de convivência.

A minha querida amiga Flaviane Eva Magrini, por agüentar minhas reclamações e me apoiar nas horas difíceis. Por ser uma pessoa especial, amiga e companheira.

Aos amigos e colegas Marines, Valdirene, Celso, Lúcia, Janaína, Ana Carolina, Monique, Taísa, Cris, Claire, Giovana, Marielsa, Rosangêla, Deise Rech e a todos amigos do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

A UCS, CAPES e UdeLAR pelo apoio financeiro.

# Índice

LISTA DE ABREVIATURAS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE TABELAS .....	xv
RESUMO .....	xvi
ABSTRACT .....	xvii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
2.1 Aspectos gerais, distribuição e taxonomia dos vegetais estudados .....	8
2.1.1 Relação entre a composição química e a atividade anti-inseto em representantes do gênero <i>Solanum</i> .....	9
2.2 Espécies de <i>Solanum</i> selecionadas para o estudo .....	15
2.2.1 <i>Solanum bonariense</i> .....	15
2.2.2. <i>Solanum bistellatum</i> .....	16
2.2.3. <i>Solanum sisymbriifolium</i> .....	17
2.3 Bioatividade de extratos do gênero <i>Solanum</i> .....	19
2.4. Insetos teste.....	20
2.4.1. Cupim-de-madeira-seca ( <i>Cryptotermes brevis</i> ) .....	20
2.4.1.2 Controle de cupins-praga .....	22
2.4.2. Lagarta-do-cartucho ( <i>Spodoptera frugiperda</i> ).....	24

2.4.2.1 Controle da lagarta do cartucho ( <i>S. frugiperda</i> )	26
.....	
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	28
3.1 Procedência e preparo das amostras vegetais	28
3.2 Obtenção dos Extratos	28
3.3 Avaliação da bioatividade de extratos de <i>Solanum</i> sobre <i>C. brevis</i>	30
3.3.1 Coleta e obtenção dos cupins para os ensaios	31
3.3.2 Ensaio de repelência dos extratos a <i>C. brevis</i>	31
3.3.1.2 Determinação da deterrência alimentar – Índice Antialimetar (IA%)	32
3.4 Avaliação da bioatividade de extratos de <i>S. sisymbriifolium</i> e <i>S. bonariense</i> sobre <i>Spodoptera frugiperda</i>	34
3.4.1 Criação de <i>Spodoptera frugiperda</i>	34
3.4.2 Atividade biológica de extratos brutos de <i>S. sisymbriifolium</i> e <i>S. bonariense</i> sobre <i>Spodoptera frugiperda</i>	33
3.5 Procedimentos químicos gerais	35
3.5.1 Estudo fitoquímico e análise química	36
3.5.2 Cromatografia de Coluna Aberta	36
3.5.2.1 Isolamento do composto majoritário do extrato diclorometano /acetona de <i>S. bistellatum</i>	36
3.5.2.2 Isolamento dos compostos majoritários I e II (ésteres de açúcares) de <i>S.</i>	

<i>sisymbriifolium</i> .....	37
3.5.2.3 Identificação dos ácidos graxos presentes nos ésteres de açúcares isolados .....	38
3.5.3 Atividade biológica dos compostos majoritários I e II (ésteres de açúcares) de <i>S.</i> <i>sisymbriifolium</i> sobre <i>S. frugiperda</i> .....	39
3.6 Análise estatística .....	40
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>CAPÍTULO I</b> .....	41
Atividade antialimentar e efeito repelente de extratos de <i>S. bonariense</i> , <i>S. istellatum</i> e <i>S.</i> <i>sisymbriifolium</i> sobre <i>Cryptotermes brevis</i> e relação com sua composição fitoquímica .....	41
4.1 Repelência de extratos brutos das três espécies de <i>Solanum</i> sobre <i>C. brevis</i> .....	40
4.2 Efeito antialimentar de extratos brutos de <i>S. bonariense</i> , <i>S. bistellatum</i> e <i>S.</i> <i>sisymbriifolium</i> sobre <i>C. brevis</i> .....	44
4.3 Análise fitoquímica dos extratos de <i>Solanum</i> .....	47
4.3.1 Identificação dos compostos presentes nos extratos de <i>S. sisymbriifolium</i> e <i>S. bistellatum</i> .....	49
4.3.1.1 <i>S. sisymbriifolium</i> .....	49
4.3.1.2 <i>S. bistellatum</i> .....	50
4.3.1.3 Determinação dos açúcares dos ésteres de açúcares .....	56
4.3.1.4 Considerações finais .....	56
<b>5. CAPÍTULO II</b> .....	57

Avaliação da bioatividade de extratos de <i>S. sisymbriifolium</i> e <i>S. bonariense</i> sobre <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	58
5.1 Atividade biológica dos extratos diclorometânico e diclorometano/acetona de <i>S. sisymbriifolium</i> .....	58
5.1.1 Avaliação do extrato diclorometânico de <i>S. sisymbriifolium</i> sobre <i>S. frugiperda</i> ....	58
5.1.2 Atividade biológica do extrato diclorometano/acetona de <i>S. sisymbriifolium</i> sobre <i>S. frugiperda</i> .....	61
5.2 Atividade biológica dos extratos diclorometânico e diclorometano/acetona de <i>S. bonariense</i> .....	64
5.2.1 Extrato diclorometânico de <i>S. bonariense</i> sobre <i>S. frugiperda</i> .....	64
5.2.2 Extrato diclorometano/acetona de <i>S. bonariense</i> sobre <i>S. frugiperda</i> .....	67
5.3 Atividade biológica dos compostos majoritários I e II (ésteres de açúcares) isolados de <i>S. sisymbriifoliym</i> .....	71
<b>6. DISCUSSÃO GERAL</b> .....	82
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	85
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS

CCD = Cromatografia de Camada Delgada

EDSb = Extrato Diclorometânico *Solanum bistellatum*

EDASb = Extrato Diclorometano/Acetona *Solanum bistellatum*

EDSbo = Extrato Diclorometânico/Acetona *Solanum bonariense*

EDASbo = Extrato Diclorometano/Acetona *Solanum bonariense*

EDSs = Extrato Diclorometânico *Solanum sisymbriifolium*

EDASs = Extrato Diclorometano/Acetona *Solanum sisymbriifolium*

GC-MS = Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa

IA = Índice antialimentar

RMN = Ressonância Magnética Nuclear

SPSS = Statistical Package for the Science

Ti = Tempo inicial

Tf = Tempo final

Tr = Tempo de retenção

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura química de um éster de açúcar .....	11
<b>Figura 2. a)</b> Tricomas glandulares tipo A e tipo B <b>b)</b> Tricomas glandulares .....	12
<b>Figura 3.</b> Estrutura química de um éster de açúcar de <i>S. sisymbriifolium</i> .....	13
<b>Figura 4.</b> Espécie <i>Solanum bonariense</i> coletada no Uruguai.....	16
<b>Figura 5.</b> Espécie <i>Solanum bistellatum</i> coletada no Jardim Botânico de Caxias do Sul – RS .....	17
<b>Figura 6.</b> Espécie <i>Solanum sisymbriifolium</i> coletada no Uruguai.....	19
<b>Figura 7.</b> Distribuição de localidades endêmicas de <i>C. brevis</i> .....	21
<b>Figura 8.</b> Colônia de <i>C. brevis</i> .....	22
<b>Figura 9.</b> <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	24
<b>Figura 10.</b> Distribuição de <i>S. frugiperda</i> .....	25
<b>Figura 11.</b> Esquema de obtenção dos extratos .....	30
<b>Figura 12:</b> Placa de Petri contendo papel filtro tratado com 1mg/mL de extrato diclorometânico (direta) e papel filtro não tratado (esquerda) para estimar a repelência alimentar de <i>C. brevis</i> .....	32
<b>Figura 13.</b> Placa de Petri contendo papel filtro (Controle) para avaliar o índice antialimentar de <i>C. brevis</i> .....	33
<b>Figura 14.</b> Ensaio de sobrevivência com <i>S. frugiperda</i> .....	34
<b>Figura 15.</b> Cromatografia de Coluna Aberta para isolamento de ésteres de açúcares majoritários .....	38
<b>Figura 16.</b> Extratos diclorometânico e extrato diclorometano/acetona. a) Revelador específico	

para ésteres de açúcares; b) Revelador Universal (CuSO <sub>4</sub> ). <i>S. bonariense</i> .....	47
<b>Figura 17.</b> Cromatografia de Camada Delgada (CCD). a) Revelador específico para ésteres de açúcares; b) Revelador Universal (CuSO <sub>4</sub> ). <i>S. sisymbriifolium</i> e <i>S. bistellatum</i> . .....	47
<b>Figura 18.</b> Espectro <sup>1</sup> HMRN do composto isolado de <i>S. sisymbriifolium</i> .....	50
<b>Figura 19.</b> Espectro <sup>1</sup> HMRN de <i>S. bistellatum</i> com os principais sinais .....	51
<b>Figura 20.</b> Espectro <sup>13</sup> CRMN de <i>S. bistellatum</i> com os principais sinais .....	52
<b>Figura 21.</b> Espectro RMN HSQC de <i>S. bistellatum</i> .....	54
<b>Figura 22.</b> GC de ácidos graxos metilados presentes na amostra (1) ácido 3 hidroxipalmítico, (2) ácido 3-hidroxipalmítico metilado .....	55
<b>Figura 23.</b> CCD para determinação de açúcares comparada com os padrões .....	56
<b>Figura 24.</b> Percentual de lagartas de <i>S. frugiperda</i> que passaram por 4, 5, 6 ou 7 instares em dieta artificial acrescida de três concentrações de extrato diclorometânico de <i>S. sisymbriifolium</i> .....	59
<b>Figura 25.</b> Sobrevivência larval, pupal e total corrigida (Abbott, 1925) de <i>S. frugiperda</i> , alimentadas com extrato diclorometânico de <i>S. sisymbriifolium</i> .....	60
<b>Figura 26.</b> Percentual de lagartas de <i>S. frugiperda</i> que passaram por 4, 5, 6, 7 ou 8 instares em dieta artificial acrescida de extrato diclorometano/acetona de <i>S. sisymbriifolium</i> .....	63
<b>Figura 27.</b> Sobrevivência larval, pupal e total de <i>S. frugiperda</i> , alimentadas com extrato diclorometano/acetona de <i>S. sisymbriifolium</i> .....	63
<b>Figura 28.</b> Percentual de lagartas de <i>S. frugiperda</i> que passaram por 4, 5 e 6 instares em dieta artificial acrescida de extrato diclorometânico de <i>S. bonariense</i> .....	66

<b>Figura 29.</b> Sobrevivência larval, pupal e total de <i>S. frugiperda</i> , alimentadas com dieta acrescida de extrato diclorometânico de <i>S. bonariense</i> .....	67
<b>Figura 30.</b> Percentual de lagartas de <i>S. frugiperda</i> que passaram por 4, 5 , 6 e 7 ínstaes em dieta artificial acrescida de extrato diclorometano/acetona de <i>S. bonariense</i> .....	68
<b>Figura 31.</b> Sobrevivência larval, pupal e total de <i>S. frugiperda</i> , alimentadas com extrato diclorometano/acetona de <i>S. bonariense</i> .....	69
<b>Figura 32.</b> Adulto normal e adulto defeituoso de <i>S. frugiperda</i> , alimentado com dieta artificial (Controle) e dieta artificial acrescida de extrato diclorometano/acetona de <i>S. bonariense</i> (0,25 mg/mL) .....	70
<b>Figura 33.</b> Cromatografia de Camada Delgada para identificação dos compostos majoritários (ésteres de açúcar) a) I ; b) II .....	72
<b>Figura 34.</b> Estrutura química de um éster isolado de <i>S. sisymbriifolium</i> .....	73
<b>Figura 35.</b> Percentual de lagartas de <i>S. frugiperda</i> que passaram por 4, 5 e 6 ínstaes em dieta artificial acrescida do composto majoritário I de <i>S. sisymbriifolium</i> .....	73
<b>Figura 36.</b> Sobrevivência larval, pupal e total de <i>S. frugiperda</i> , alimentadas com dieta artificial acrescida do composto majoritário I isolado do extrato de <i>S. sisymbriifolium</i> .....	74
<b>Figura 37.</b> Percentual de lagartas de <i>S. frugiperda</i> que passaram por 4, 5 e 6 ínstaes em dieta artificial acrescida do composto majoritário II de <i>S. sisymbriifolium</i> .....	77
<b>Figura 38.</b> Sobrevivência larval, pupal e total de <i>S. frugiperda</i> , alimentadas com dieta artificial acrescida do composto majoritário II isolado do extrato de <i>S. sisymbriifolium</i> .....	78
<b>Figura 39.</b> Anormalidades encontradas em <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta artificial adicionada do composto majoritário I (2,5 mg/mL) no processo de metamorfose .....	80
<b>Figura 40.</b> Anormalidades na fase larval de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta artificial	

adicionada do composto majoritário II (0,25 mg/mL e 1 mg/mL) .....80

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Percentual médio de repelência e respectivos erros padrão dos extratos de <i>S. bonariense</i> , <i>S. bistellatum</i> e <i>S. sisymbriifolium</i> sobre <i>C. brevis</i> .....	42
<b>Tabela 2.</b> Índice anti-alimentar apresentado por <i>C. brevis</i> em papel filtro tratado com diferentes extratos de <i>Solanum</i> spp. ....	46
<b>Tabela 3.</b> Correlação dos sinais de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ RMN .....	53
<b>Tabela 4.</b> Avaliação da biologia de <i>Spodoptera frugiperda</i> alimentadas com adição do extrato diclometânico .....	61
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros biológicos de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta artificial adicionada com três concentrações de extrato diclometano/acetona de <i>S. sisymbriifolium</i> .....	65
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros biológicos de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta artificial adicionada com três concentrações de extrato diclometânico de <i>S. bonariense</i> .....	68
<b>Tabela 7.</b> Parâmetros biológicos de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta artificial adicionada com três concentrações de extrato diclometano/acetona de <i>S. bonariense</i> .....	72
<b>Tabela 8.</b> Parâmetros biológicos de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta artificial adicionada com três concentrações do composto majoritário I de <i>S. sisymbriifolium</i> .....	76
<b>Tabela 9.</b> Parâmetros biológicos de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta artificial adicionada com três concentrações do composto majoritário I I de <i>S. sisymbriifolium</i> .....	80

## RESUMO

O gênero *Solanum* é um dos mais diversos na América do Sul e seus representantes apresentam compostos químicos com bioatividade contra insetos-praga. Entre as principais pragas que provocam danos econômicos tanto a bens culturais e imóveis como na agricultura encontram-se *Cryptotermes brevis* (cupim-de-madeira-seca) e *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho). No presente estudo avaliou-se os efeitos antialimentar e repelente dos extratos diclorometânico, extrato diclorometano/acetona (fração enriquecida em ésteres de açúcares) e extrato aquo-alcoólico obtidos de *Solanum bonariense*, *Solanum bistellatum* e *Solanum sisymbriifolium* sobre *C. brevis*. Avaliou-se também o efeito dos extratos diclorometânico e diclorometano/acetona de *S. bonariense* e *S. sisymbriifolium* e dois compostos majoritários I e II (ésteres de açúcares) isolados do extrato diclorometano/acetona de *S. sisymbriifolium* sobre o desenvolvimento de *S. frugiperda*. Os extratos obtidos das três espécies vegetais demonstraram ação antialimentar e repelente ao cupim *C. brevis*, especialmente os extratos diclorometânico e diclorometano/acetona de *S. sisymbriifolium* e de *S. bistellatum*. Os resultados obtidos com os extratos destas duas espécies indicam a existência de compostos bioativos com potencial para o controle de *C. brevis*. Nos ensaios com *S. frugiperda* observou-se que a adição dos extratos de *S. sisymbriifolium* afetaram o número de ínstar larvais, sendo que o extrato diclorometânico teve menor efeito sobre a fase larval e acentuado efeito sobre as pupas. O extrato diclorometano/acetona de *S. sisymbriifolium* afetou mais a sobrevivência larval do que a pupal, e induziu uma diminuição na sobrevivência com uma resposta dose dependente. O extrato diclorometânico de *S. bonariense* não afetou o número de ínstar larvais e afetou minimamente a sobrevivência larval, pupal e total de *S. frugiperda*, e o extrato diclorometano/acetona afetou o número de ínstar larvais, sendo a sobrevivência larval,

pupal e total pouco afetadas. O extrato mais efetivo foi diclorometano/acetona de *S. sisymbriifolium* que representa uma fração enriquecida de ésteres de açúcares, do qual isolou-se os compostos majoritários I e II, que demonstraram ser altamente tóxicos na fase larval de *S. frugiperda* com 0,46% de sobrevivência total na concentração 2,5 mg/mL para o composto I, e 11,11% de sobrevivência total na concentração 1 mg/mL para o composto II. Estes compostos isolados também afetaram a metamorfose da lagarta para o estágio de pupa. A elucidação estrutural dos compostos isolados das espécies *S. sisymbriifolium* e *S. bistellatum* foi realizada por RMN e Cromatografia Gasosa podendo determinar em ambas espécies a presença de ésteres de açúcares: dissacarídeos esterificados com ácidos graxos de cadeia larga, principalmente ácido palmítico e hidroxipalmítico. A descoberta de substâncias bioativas representa uma alternativa ao uso de inseticidas naturais para controle de pragas, que apresentem maior segurança e sustentabilidade ao meio ambiente.

## ABSTRACT

Two of the major pests that damage property and cultural goods as well as threaten crop productivity and yields are *Cryptotermes brevis* (dry-wood-termite) and *Spodoptera frugiperda* (fall-armyworm-cartridge). Looking for new and natural sources to control them, we investigated the antiinsect activity of three american *Solanum* species on these two pests. The genus *Solanum* is one of the most diverse in South America and many of its representative's biosynthesed different chemical compounds with proven bioactivity against insect pests. In the present study, the antifeedant and repellent effects on *C. brevis* of dichloromethane, dichloromethane/acetone (enriched fraction sugar esters) and aqueous/alcoholic extract obtained from *Solanum bonariense*, *Solanum bistellatum* and *Solanum sisymbriifolium* were evaluated. The extracts from the three plant species showed antifeedant and repellent effect against *C. brevis*, especially dichloromethane and dichloromethane / acetone extracts from *S. sisymbriifolium* and *S. bistellatum*. The results obtained from these extracts of the three evaluated species indicate the presence of bioactive compounds with potential bioactivity against *C. brevis*. We also evaluated the effect of dichloromethane and dichloromethane/acetone extracts from *S. bonariense* and *S. sisymbriifolium* and the two major compounds I and II (sugar esters) isolated from the dichloromethane / acetone extract of *S. sisymbriifolium* on the development of *S. frugiperda*. In the tests performed with *S. frugiperda* it was observed that the addition of *S. sisymbriifolium* extracts affected the number of larval instars, and the dichloromethane extract had less effect on the larval stage and a pronounced effect on the pupae. The *S. sisymbriifolium* dichloromethane/acetone extract affected more than the larval pupae and induced a decrease in survival with a dose dependent response. The dichloromethane *S. bonariense* extract did

not affect the number of larval instars but minimally influenced the *S. frugiperda* larval and pupal behaviour, however the dichloromethane / acetone extract affects the number of larval instars, and the larval, pupal and total development were less affected. The most effective extract evaluated against *S. frugiperda* was the *S. sisymbriifolium* dichloromethane/acetone extract representing an enriched fraction of sugar esters. Two major components were isolated: I and II, they were also evaluated on *S. frugiperda* and proved to be highly toxic to fall-armyworm-cartridge larvae from with 0.46% overall survival at concentration 2.5 mg / mL for compound I, and 11.11% overall survival at concentration 1 mg / mL for compound II. These isolated compounds also affected the metamorphosis of the caterpillar to the pupa stage. Structural elucidation of the isolated compounds from the species *S. sisymbriifolium* and *S. bistellatum* was performed using NMR and Gas Chromatography. In both species the presence of esters of sugars was determined; a disaccharide esterified with long chain fatty acid, mainly palmitic and hidroxi palmitic acid. The discovery of bioactive substances represents an alternative to the use of natural insecticides in pests' control that gave higher safety and environmental sustainability.

# 1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas com propriedades inseticidas é prática muito antiga, sendo que o homem, desde a pré-história, vem utilizando extratos vegetais de modo empírico ou intuitivo com base em descobertas ao acaso.

As substâncias químicas naturais encontradas em plantas possuem papel significativo no futuro do controle de pragas. Muitas pesquisas têm sido focalizadas em plantas que apresentam metabólitos secundários que afetam processos biológicos dos insetos, incluindo comportamento alimentar, oviposição e reprodução.

O gênero *Solanum* possui 61 espécies nativas descritas somente no Rio Grande do Sul (Mentz *et al.* 2007). Os representantes deste gênero produzem uma grande diversidade de metabólitos secundários de defesa como: terpenos, fenóis e ésteres de açúcares, com ação anti-inseto, anti-bacteriana, antifúngica e alelopática.

A utilização de compostos vegetais com ação sobre insetos apresenta vantagens no controle de pragas, pois, em geral, as substâncias naturais são menos persistentes no meio ambiente e podem ser utilizadas sem alterar o equilíbrio do ecossistema, respeitando os princípios de sustentabilidade e não geram resistência como os produtos de síntese química.

Entre as principais pragas que afetam o ecossistema, provocando danos agrícolas e a bens imóveis encontram-se o cupim-de-madeira-seca (*Cryptotermes brevis*), praga cosmopolita, com hábitos recônditos e crípticos invadem o ambiente urbano (atacando móveis, forros, portas e madeiras em geral). E a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), praga de várias culturas (principalmente o milho, e secundariamente algodão, soja e trigo).

Considerando-se a grande diversidade de plantas do gênero *Solanum* e a quantidade de substâncias químicas a elas associadas com bioatividade contra insetos, o objetivo do presente

estudo foi avaliar três tipos de extratos de *Solanum bonariense*, *Solanum bistellatum* e *Solanum sisymbriifolium*, sobre cupins-de-madeira-seca (*C. brevis*) considerando-se repelência, deterrência e/ou toxicidade e sobre a lagarta-do-cartucho (*S. frugiperda*) avaliando-se os parâmetros biológicos. Realizou-se estudo fitoquímico dos extratos com atividade biológica, com base no modelo de estudo bioguiado, empregando métodos cromatográficos para isolar os metabólitos secundários com possível bioatividade.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os insetos e plantas não vivem simplesmente juntos, mas interagem entre si, sofrendo as consequências dessas interações e adaptando-se, pois um depende do outro. Insetos e plantas co-existem, sendo que da mesma forma que os insetos desenvolvem estratégias para se alimentarem das plantas, estas desenvolvem maneiras de diminuir ou até mesmo impedir o ataque dos herbívoros (Panizzi & Parra, 2009). Esses mecanismos de defesa das plantas se manifestam através de barreiras químicas ou físicas.

A primeira barreira encontrada pelos herbívoros é uma barreira física, localizada na parte exterior da planta (Shepherd & Wagner, 2007). Esta barreira é chamada de cera epicuticular e é uma camada hidrofóbica. A cera epicuticular é biosintetizada nas camadas externas das células epiteliais e é composta por lipídios altamente hidrofóbicos, como por exemplo alcanos de número ímpar de átomos de carbono, ésteres de cera e ácidos graxos de alto peso molecular que se depositam sobre a cutícula impermeabilizando as folhas jovens e o talo impedindo a perda de água interna (Paroul *et al.* 2009).

A cera epicuticular é removida pela extração da superfície da folha com um solvente apolar por um tempo muito reduzido, normalmente de 30 segundos. Desta forma, os lipídios internos não são extraídos, entretanto, extraem-se todos os metabólitos depositados na superfície da folha (Garcia, *et al.* 1995; Cesio *et al.* 2006). Portanto, os compostos secretados por estruturas como tricomas glandulares são extraídos como parte das ceras e frequentemente são classificados genericamente como integrantes da cera epicuticular (Wollenweber *et al.* 2003). Entretanto é possível diferenciar a origem destes compostos analisando o conteúdo dos tricomas glandulares (Dutra *et al.* 2008).

Porém, as ceras epicuticulares não oferecem somente proteção contra agentes físicos, mas também contra patógenos (Garcia *et al.* 1997) e são responsáveis pelas interações químico-ecológicas entre a planta e a biota relacionada com seu ambiente mais próximo (Hashidoko, 2005).

Entretanto, a extração dos compostos oriundos dos tricomas é um processo lento e demorado. Para isolar grandes quantidades de compostos oriundos de tricomas para avaliação biológica, opta-se por isolar a cera epicuticular e, sequencialmente, tentar isolar os compostos dos extratos brutos (Severson *et al.* 1994). A metodologia usual é feita pelo fracionamento do extrato empregando solvente polar como a acetona, onde a maioria dos compostos não polares das ceras (hidrocarbonetos, ésteres céreos, entre outros) são insolúveis e os mais polares (ésteres de açúcares, por exemplo) permanecem em solução (Severson *et al.* 1994).

A defesa química das plantas contra insetos fundamentalmente utiliza os mecanismos de não-preferência (antixenose) e antibiose. A não-preferência ocorre principalmente devido aos estímulos de aleloquímicos que causam efeitos como o de repelência, que orienta o inseto na direção contrária da planta; o arrestante, que leva o inseto a cessar o movimento e o supressante, que impede que o inseto continue a se alimentar ou ovipositar. A antibiose ocorre quando o inseto se alimenta da planta e esta exerce um efeito adverso sobre sua biologia, podendo causar sua morte na fase imatura, alteração do tempo de vida, redução do tamanho, peso e fecundidade (Gallo *et al.* 2002).

Os produtos mais utilizados para o controle de pragas são os inseticidas químicos. Entretanto devido ao alto custo e ao seu efeito poluidor no meio ambiente, produtos alternativos tem sido utilizados, tais como, extratos vegetais. As plantas biossintetizam uma grande quantidade de metabólitos secundários que podem ser utilizados para diversos fins. Conforme Robbers *et al.* (1997), o organismo vivo pode ser considerado um laboratório

bio sintético não só no que se refere aos compostos químicos (carboidratos, proteínas, gorduras) utilizados como alimentos pelos seres humanos e pelos animais, mas também no que se refere a uma infinidade de outros compostos, os metabólitos secundários (glicosídeos, alcalóides, terpenóides) que exercem efeitos fisiológicos.

O interesse neste campo de pesquisa tem aumentado de forma significativa, visto que os produtos extraídos de plantas não se acumulam na flora, fauna e no solo. A busca destes produtos na natureza, como por exemplo compostos provenientes de plantas, que possuam propriedades praguicidas, é um campo de pesquisa promissor (Saito & Lucchini, 1998).

O emprego de substâncias extraídas de plantas silvestres, na qualidade de inseticidas, tem inúmeras vantagens quando comparado ao emprego de sintéticos: os inseticidas naturais são obtidos de recursos renováveis e são rapidamente degradáveis; o desenvolvimento da resistência dos insetos a essas substâncias compostas da associação de vários princípios ativos é um processo lento (Roel, 2001).

O uso de plantas com propriedades inseticidas é uma prática muito antiga, sendo que até a descoberta dos inseticidas organossintéticos, na primeira metade do século passado, as substâncias extraídas de vegetais eram amplamente utilizadas no controle de insetos (Gallo *et al.* 2002).

Compostos vegetais com ação inseticida aparecem como importante alternativa a ser utilizada no manejo integrado de insetos-praga, podendo ser aplicados como pós, óleos ou extratos brutos, como por exemplo espécies de Meliaceae, tais como *Azadirachta indica*, comumente conhecida por “neem” (Rodrigues *et al.* 2008). Extratos de *Melia azedarach* e *Azadirachta indica* apresentaram atividade anti-alimentar e repelente à traça das crucíferas *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) (Charleston *et al.* 2005).

A bioatividade de inseticidas botânicos de espécies vegetais oriundas das famílias

Meliaceae, Solanaceae, Myrtaceae, Rutceae e Fabaceae foram avaliados sobre lagartas e posturas de *Ascia monuste orseis* (Latr. 1819) (Lepidoptera: Pieridae), verificando-se que em laboratório o pó de fumo da solanacea (*Nicotiana tabacum* L.), foi o extrato que apresentou melhor atividade ovicida (Biermann, 2009).

Extratos de plantas de 57 espécies de 21 diferentes famílias botânicas do Sudeste da Espanha foram obtidos com solventes de polaridade crescente (hexano, acetona e água-metanol) avaliando-se sua atividade sobre *Tribolium castaneum* (Herbst.) (Coleoptera: Tenebrionidae). Em geral 70% dos extratos testados apresentaram alguma atividade e 21% (incluindo espécies endêmicas) foram mais ativos (Pascual-Villalobos & Robledo, 1999).

Um dos fatores importantes que influenciam na extração de compostos químicos bioativos é o solvente utilizado no processo. Baskar *et al.* (2009), avaliando diferentes extratos de *Atalantia monophylla* (Hexânico, clorofórmico e acetato de etila) sobre *Helicoverpa armigera*, verificaram 67,93% de atividade pupicida com o extrato clorofórmico na maior concentração (5%) e nenhum efeito na menor concentração (0,5%). Com o extrato hexânico observou-se 25,26% e 100% de mortalidade pupal nas concentrações de 0,5 e 5%, respectivamente.

Em um trabalho realizado com espécies nativas do Uruguai, extratos de diferentes partes vegetativas de plantas das famílias Lamiaceae, Bignoneacea, Phytolacaceae, Sapindaceae e Solanaceae foram avaliados contra diferentes tipos de insetos: *Epilachna paenulata* Germar (Coleoptera:Coccinellidae), *Rhopalosiphum padi* L. (Hemiptera: Aphididae), *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera:Aphididae), *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera:Noctuidae) e *Apis mellífera* L. (Hymenoptera:Apidae). Alguns extratos ocasionaram redução na alimentação das espécies mastigadoras, e outros extratos causaram redução na fixação dos insetos nas plantas e atividade antialimentar (Castillo *et al.* 2009).

Resíduos da indústria cítrica (cera de *Citrus latifolia* Tanaka e *Citrus sinensis* (L. Pers.)) foram fracionados e sua toxicidade foi avaliada sobre *Cryptotermes brevis* Walker (Isoptera:Kalotermitidae). As frações obtidas da cera de *C. latifolia* induziram mortalidade de 63 e 91,5% e as frações de *C. sinensis* causaram de 60 a 88% de mortalidade de cupins ocasionado também redução de simbioses, demonstrando ser economicamente viável a utilização destes resíduos para o controle do cupim (Barros *et al.* 2008; Sbeghen-Loss *et al.* 2009).

Com relação à atividade de compostos ou extratos obtidos de plantas no controle de *Spodoptera frugiperda* como exemplo pode-se citar o extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae), verificou-se que o mesmo afetou a sobrevivência e o desenvolvimento do inseto, sendo que nenhuma lagarta alimentada com dieta acrescida do extrato (nas concentrações de 0,05, 0,4 e 3%) completou a fase larval (Roel, 2001). A bioatividade de extratos e compostos isolados de *Vitex polyganaa* Cham. e *Siphoneugena densiflora* Berg (Myrtaceae), foi avaliada sobre *S. frugiperda* observando-se que os extratos metanólico e hidroalcolico de *S. densiflora* causaram 100% de mortalidade larval (Gallo *et al.* 2006).

Efeito de extratos vegetais de *Polygonum hydopiperoides*, *Solanum nigrum* e *Calliandra pittieri* foram avaliados sobre *S. frugiperda*, e os melhores resultados foram obtidos com extratos de *P. hydopiperoides*, verificando-se 100% de mortalidade das lagartas em 12 dias e significativo efeito antialimentar com consumo das folhas inferior a 4%, sendo este efeito similar ao do produto comercial Clorpirifós (Lizarazo *et al.* 2008).

## 2.1 Aspectos gerais, distribuição e taxonomia dos vegetais estudados

Solanaceae é uma família cosmopolita constituindo-se de 90 gêneros e mais de 2.300 espécies, das quais 75% pertencem ao gênero *Solanum*. Como família botânica apresenta enorme importância econômica tanto pelas espécies comestíveis extensamente cultivadas (*S. tuberosum* L., *S. melanogena* L., *Lycopersicon esculentum* Mill., *Capsicum annum* L.,) como pelas espécies de uso farmacêutico (*Atropa belladonna* L., *Datura stramonium* L., *Hyoscyamus niger* L., *Scopolia spp.*) e comercial (*Nicotiana tabacum* L.) (Vázquez, 1997).

O gênero *Solanum* encontra-se distribuído em todas as regiões tropicais e subtropicais das Américas, África e Austrália, com um menor número de espécies euroasiáticas (Mentz & Oliveira, 2004). Este gênero considerado maior e mais complexo da família Solanaceae, foi investigado por Mentz & Oliveira (2004) num estudo abrangendo a região sul do Brasil. Para o Rio Grande do Sul foram registradas 61 espécies nativas de *Solanum* (Mentz *et al.* 2007).

A maioria das espécies de *Solanum* possui tricomas nos caules, folhas e inflorescências. O tricoma glandular apresenta a célula apical ou células apicais arredondadas, de conteúdo citoplasmático denso, modificadas para secreção ou acumulação. Este tipo de tricoma é formado por três partes: a porção imersa na epiderme, a porção proximal, que forma o pedicelo, e porção distal, clavada ou globosa, que é a secretora (Mentz *et al.* 2000).

Estas estruturas, do ponto de vista da relação da planta com o meio ambiente, servem como defesa física e química, pois os tricomas glandulares possuem em seus exsudatos substâncias que atuam na defesa das plantas contra o ataque de herbívoros e os tricomas não glandulares são os responsáveis pela defesa física (Smith, 1989).

Além disso, há relatos na literatura de atividade anti-inseto de extratos de *S. bonariense* contra *Tribolium castaneum* (Pascual-Villalobos & Robledo, 1999), e atividade fungicida de

ésteres de açúcares de *S. sisymbriifolium* sobre *Aspergillus flavus* (Cesio *et al.* 2006), atividade fungicida de extratos metanólicos da mesma espécie *S. sisymbriifolium* sobre três espécies de *Aspergillus* e *Candida albicans* (Vaghela *et al.* 2009). Extratos metanólicos desta espécie também foram tóxicos ao microcrustáceo *Artemia salina* (Silva *et al.* 2007).

### **2.1.1 Relação entre a composição química e a atividade anti-inseto em representantes do gênero *Solanum***

As plantas são protegidas contra dessecação, predação por insetos e doenças por ceras epicuticulares encontradas em sua superfície. Quimicamente, essas ceras são constituídas por ésteres ligados a ácidos graxos de cadeia longa e alcoóis alifáticos (Smith, 1989).

Em um estudo para avaliar as principais diferenças na composição dos componentes presentes nas ceras epicuticulares de variedades comerciais de *S. tuberosum* foram encontrados n-alcenos de cadeia muito longa, 2-metil alcanos e 3-metil alcanos, álcoois primários, ácidos graxos e ésteres cereos. A composição qualitativa da cera é bastante similar, mas há diferenças quantitativas entre as variedades (Szafrank & Synak, 2006).

Posteriormente a este estudo, os compostos de *S. tuberosum* foram avaliados para verificar a influência sobre a alimentação do besouro do colorado *Leptinotarsa decemlineata*. Foram avaliadas diferentes variedades comerciais, e os compostos extraídos da superfície de *S. tuberosum* foram hidrocarbonetos, sesquiterpenos, alcoóis e outros componentes não identificados. A separação por HPLC rendeu 15 frações contendo muitos hidrocarbonetos, ésteres, cetonas, aldeídos, ácidos graxos, esteróis e outros componentes não identificados, sendo que uma fração não identificada demonstrou efeito fagodeterrente ao besouro (Szafrank *et al.* 2008).

Alcanos tem sido identificados entre os compostos presentes nas ceras epicuticulares de 21 espécies de *Solanum* encontradas na Argentina, podendo ser utilizados como marcadores quimiotaxonômicos (Maxud & Zydgallo, 1991). Estes constituintes foram estudados em duas espécies (*Solanum viarum* e *Lycopersicon esculentum*), avaliando-se seus efeitos na oviposição e atração de *Helicoverpa amigera*. Com duas frações de *S. viarum* e *L. esculentum*, observou-se preferência alimentar e maior oviposição, sendo que a maioria dos constituintes químicos identificados são n-alcenos ou relacionados com alcoóis primários e aldeídos. Uma das frações de compostos voláteis de *L. esculentum*, contendo predominantemente álcool 3-nitrobenzil e pequenas quantidades de 3-nitrobenzaldeído, pequenas quantidades de docosano e trimetildecano, além de um composto desconhecido reduziu a oviposição e causou efeito deterrente alimentar (Srinivasan *et al.* 2006).

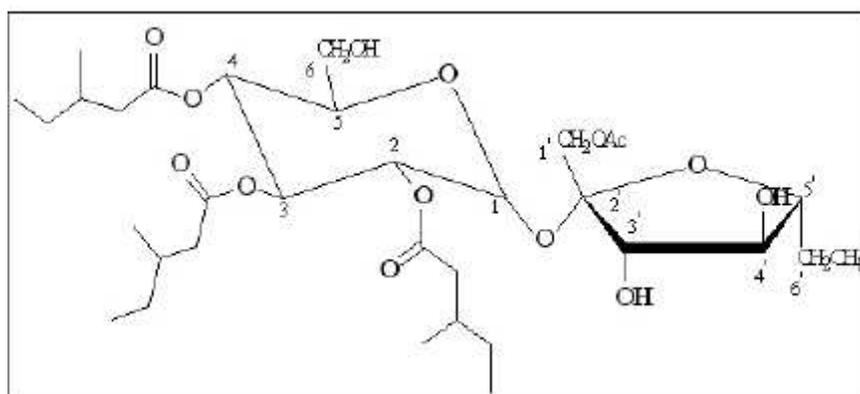
Os exsudatos dos tricomas glandulares de espécies de *Solanum* apresentam atividade contra diferentes insetos, tais como, repelência e deterrência alimentar em afídios como *Myzus persicae*, besouro do colorado *Leptinotarsa decemlineata* (Avé *et al.* 1987; Neal *et al.* 1990; Yencho *et al.* 1994). Os compostos exsudatos dos tricomas glandulares do gênero *Nicotiana* aumentam a mortalidade da mosca-branca *Trialeurodes vaporariorum* (Buta *et al.* 1993) *Bemisia tabaci* (Neal *et al.* 1994) e reduz a taxa de crescimento de *Manduca sexta* (Van Dam & Hare, 1998).

Outros tipos de metabólitos secundários biossintetizados nos tricomas glandulares de diversas espécies de Solanaceae são os acil-açúcares, ou ésteres de açúcares simples com um ou mais ácidos graxos. A análise preliminar dos extratos de clorofórmio das folhas de *Datura mentel* indicou que os ésteres de glicose constituem uma parte importante dos compostos não voláteis e a quantidade dos ésteres de açúcares variam conforme a densidade dos tricomas tipo B. Estes exsudatos que foram posteriormente isolados indicam a presença de ésteres de

glicose 2,3-di-*O* e 1,2,3-tri-*O*-acilados (Russel & Calhoun,1988).

A grande quantidade de acil-açúcares exsudatos de tricomas glandulares na família Solanaceae é relacionada a diversas reações no comportamento de insetos. Frações de ésteres de açúcares de *Nicotiana gossei* induziram 100% de mortalidade da mosca branca *Trialeurodes vaporariorum* no início do segundo ínstar, mostrando resultados de controle similares aos obtidos com inseticidas químicos e Neem (Neal *et al.* 1994). As diferentes frações de ésteres de açúcares exsudatos dos tricomas glandulares de *Salpichroa origanifolia*, demonstraram propriedades antifúngicas contra *Aspergillus niger* (Dutra *et al.* 2008). A estrutura química de um éster de açúcar pode ser visualizada na Figura 1.

Em experimentos com adição e remoção de ésteres de *Datura wrightii* verificou-se que o consumo de alimento pelo coleoptero *Epitix hirtipennis* foi reduzido por adição de acil-açúcares. Em *Trichobaris compacta* o consumo de alimento foi reduzido por acil-açúcares somente nos experimentos com remoção dos ésteres. A localização dos acil-açúcares na ponta de tricomas longos, ao invés dos que estão sobre a superfície foliar pode ser um componente importante da atividade biológica dos mesmos contra *T. compacta* na natureza (Hare, 2005).

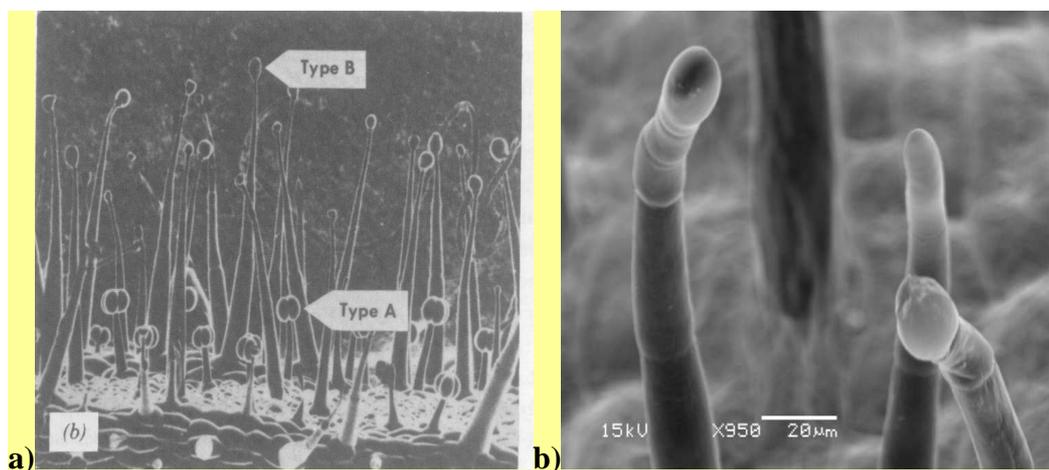


**Figura 1.** Estrutura química de um éster de açúcar (Fonte: Césio, M. V., 2004)

Estudos comportamentais mostram que a resistência do pulgão a *Lycopersicon pennellii*

(Corr.) está correlacionada com a concentração de ésteres de açúcares secretados por tricomas glandulares do tipo IV (B). A triagem para verificar o acúmulo de açúcar facilita enormemente a seleção em programas de melhoramento que utilizam ésteres de açúcares epicuticulares como um mecanismo de resistência a insetos (Goffreda *et al.* 1990). Os 2,3,4-tri-*O*-acilglicose de *L. pennellii* são compostos de C<sub>4</sub> e C<sub>12</sub> ácidos graxos, inclusive 2-metil butanóico, 3-metil butanóico, 8-metil nonaóico, e ácidos n-decanóico e n-dodecanóico (Burke *et al.* 1987).

Os tricomas glandulares encontrados no gênero *Solanum* são de diversos tipos, e seus exsudatos conferem às plantas resistência ao ataque de herbívoros e podem ser tóxicos aos insetos. Esta resistência esta associada à presença de dois tipos principais de tricomas glandulares: tricomas tipo A, curtos com uma glândula tetralobulada em seu ápice, e os tipo B, que são alongados com uma glândula ovóide que libera um exsudato viscoso (ésteres de açúcares) (Tingey, 1985). Estes dois tipos de tricomas A e B podem ser visulizados na Figura 2 a) e os tricomas glandulares na Figura 2 b).

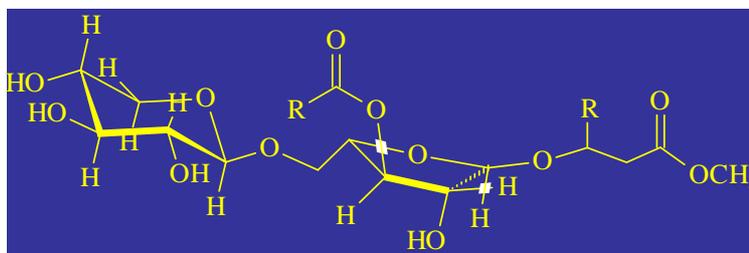


**Figura 2. a)**Tricomas glandulares tipo A e tipo B (Fonte: Smith, 1989); **b)** Tricomas glandulares (Fonte: Cesio, M. V. 2004).

Entre os tricomas relacionados por Mentz *et al.* (2000) para as folhas de *S. sisymbriifolium* estão os tricomas simples, tricomas estrelados e tricomas glandulares. Em um estudo mais aprofundado Boligon (2007) encontrou quatro tipos de tricomas para *S. sisymbriifolium*: 1) tector unicelular; 2) tector estrelado com quatro ou mais raios laterais; 3) glandular longo-pedicelado pluricelular com cabeça clavada unicelular e 4) glandular curto-pedicelado com cabeça globosa pluricelular.

Dentre as espécies com resistência ao pulgão *Myzus persicae*, a batata silvestre *Solanum berthaultii* tem se destacado por seus altos níveis de resistência devido à presença de tricomas glandulares (tipos A e B) (Gamarra *et al.* 1998). Em um trabalho realizado com a espécie selvagem *Solanum berthaultii* e a espécie cultivada *Solanum tuberosum*, os sesquiterpenos foram os maiores constituintes dos tricomas tipo A exsudatos dos tricomas glandulares e o menores constituintes dos tricomas tipo B. A mistura dos sesquiterpenos das duas espécies de plantas demonstrou ser repelente ao afídeo verde do pêssigo *Myzus persicae* (Sulzer) (Avé *et al.* 1987).

Os ésteres de açúcares de *S. sisymbriifolium* são estruturas compostas de arabinose e arabinoxilanes glicosiladas com  $\beta$ -ácido hidroxipalmitico, estereificados com ácidos graxos como láurico, mirístico e palmítico (Cesio *et al.* 2006). Na Figura 3 podemos visualizar a estrutura química deste tipo éster de açúcar acima descrito.



**Figura 3.** Estrutura química de um éster de açúcar de *S. sisymbriifolium* (Fonte: Cesio, M. V. 2006)

Ésteres de sacarose obtidos de *N. gossei* foram eficazes no controle da mosca branca *Trialeuroides vaporariorum*, sendo estes compostos avaliados em frações individuais e misturadas. Não houve diferença na eficácia dos quatro ésteres individualmente, embora a porcentagem de mortalidade causada pela mistura tenha sido um pouco menor do que a causada pelos compostos individualmente (Butta *et al.* 1993).

Os extratos hidroalcoólicos das folhas de *S. macranthun* (Dunal) foram avaliados para verificar atividade inseticida sobre ninfas de *Rhodnius pallescens*, *Rhodnius prolixus* e *Rhodnius colombiensis*, causadores da doença de Chagas. A atividade inseticida máxima foi observada após 24 horas utilizando-se concentrações inferiores a 0,3 mg/mL. Em um estudo fitoquímico preliminar, observou-se a presença abundante de alcalóides, lactonas terpenicas, cumarinas e flavonóides, moléculas possivelmente responsáveis pela atividade inseticida do material vegetal (Carvajal *et al.* 2010).

Como exemplo podemos citar os bioensaios realizados com o vetor da dengue *Aedes aegypti* utilizando diferentes concentrações de extratos aquosos polares (clorofórmio:metanol) e extratos obtidos com solventes não polares (éter de petróleo, benzeno), acetona e álcool absoluto foram utilizados na extração dos frutos maduros de *S. Villosum*. O extrato clorofórmio:metanol causou acentuado efeito larvicida sendo considerado um agente promissor de controle (Chowdhury *et al.* 2008).

As propriedades repelentes de um glicosídeo denominado luciamin extraído das partes aéreas de *Solanum laxum* obtido com extração etanólica mostrou atividade deterrente contra o afídio *Schizaphis graminum* (Soulé *et al.* 2000).

Outros compostos são encontrados no gênero *Solanum* e obtidos através de técnicas de extração específicas. Além dos alcalóides, os flavonóides constituem um dos grupos de substâncias mais frequentes, flavonóis glicosilados descritos como bioprodutos de espécies

deste gênero são geralmente derivados do kanferol e quercetina (Silva *et al.* 2003). São citados para este gênero também a presença de compostos como pirrolidina e alcalóides pirrólicos (*S. sturtianum*), glicoalcalóides (solanina, chaconina, solasodine), glicosídeos esteróides (Pomilio *et al.* 2007).

## 2.2 Espécies de *Solanum* selecionadas para o estudo

Após classificação das plantas coletadas, as espécies *Solanum bistellatum*, *Solanum bonariense* e *Solanum sisymbriifolium* foram selecionadas devido aos caracteres morfológicos das três espécies, sendo de importante valor taxonômico a ocorrência de pelos glandulares e não glandulares encontrados nas partes abaxial e adaxial das folhas.

### 2.2.1 *Solanum bonariense*

Linnaeus – Spec.Plant. 1:185 – 1753 – *Solanum saponaceum* var. *uruguense* Grisebach. Arbusto de 1,5-2 m de altura, ramificada, com ramificações pardas cobertas de tricomas estrelados, velhas glabras, com espinhos curtos ou sem eles. Folhas pecioladas, com pecíolos de 15 – 30mm, e lâmina amplamente elíptica ou oval, incisivo no ápice e deltóide ou arredondada na base, sinuada ou lobada na margem, ramos floridos inteiros, com alguns tricomas estrelados dispersos ou completamente glabro, as vezes com espinhos sobre as nervuras da face inferior. **Ocorrência:** Em bosques úmidos do sul do Brasil, Uruguai e Nordeste da Argentina, até o rio de la Plata. Em Entre Rios se encontra preferencialmente nos bosques da ribeira do Uruguai e no Delta. Floresce na primavera (Figura 4) (Burkart,1979).



**Figura 4.** Espécie *Solanum bonariense* coletada no Uruguai.

### **2.2.2. *Solanum bistellatum***

Arbusto de até 1,8 m de altura, ereto, pouco ramificado, caule e ramos com tricomas glandulares e simples de 1-4 células, inconspícuos ou visíveis, esparsos; acúleos aciculares ou alargados na base, não achatados lateralmente, patentes ou retrorsos, com diferentes tamanhos, de até 0,7 cm de comprimento, verdes ou vinosos, escuros quando secos, cobertos com tricomas simples até a metade de seu comprimento. Face abaxial frequentemente vinosa, com tricomas estrelados de dois tipos, alguns deles maiores que os laterais, multiangulados ou em um mesmo plano, raio central mais longo que os laterais, com 1-2 células, nesse caso a inferior mais longa que a apical, e outro menor porrecto-estrelado, com 3-5 raios laterais e raio central igual ou pouco maior; nervura principal coberta por tricomas simples e glandulares e com até 8 acúleos esparsos; nervuras secundárias com 2-3 acúleos.

Inflorescência extra-axilar, cimoso-escorpioidal, de 10-28 flores, pedúnculo de 1-5 cm, coberto de tricomas e acúleos iguais aos dos ramos. Cálice de sépalas desiguais, triangular-lanceoladas, de até 0,8 cm de comprimento e 0,2-0,3 cm de largura, cobertas de tricomas

hialinos simples, de 2-3 células e com 3 ou mais acúleos sobre cada lacínia, além de muitos acúleos no tubo e pedicelo. Corola creme-esverdeada a branco-amarelada, às vezes com 6 pétalas, profundamente partida, pétalas de 1,2 cm de comprimento e 0,4 cm de largura densamente pilosas na face abaxial ao longo da nervura, com tricomas simples de 2-4 células, ápice das lacínias cuculadas, com ou sem um tufo de tricomas no interior do capuz.

**Ocorrência:** No Brasil, na Região Sudeste (São Paulo) e na Região Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), em clareiras e orla da Floresta Ombrófila Mista e Altomontanha, além de ocorrer na Floresta Ombrófila Densa e na Região de Savanas, em capoeiras, beira de estradas e como reuderal, em altitudes de 250 a 1500 m de altitude (Figura 5) (Mentz & Oliveira, 2004).



**Figura 5.** Espécie *Solanum bistellatum* coletada no Jardim Botânico de Caxias do Sul – RS.

### **2.2.3. *Solanum sisymbriifolium***

Subarbusto ou arbusto ramificado, com ramos estendidos lateralmente, raras vezes ereto, chegando a 2 m de altura; ramos cobertos, tricomas simples e glandulares e tricomas

estrelados esparsos, alguns com raio central mais grosso e longo que os laterais e com acúleos amarelos, alaranjados ou vinosos, de até 2,1 cm de comprimento. Folhas solitárias, às vezes as superiores parecendo geminadas, desiguais no tamanho. Pecíolo com até 6 cm de comprimento, coberto com tricomas iguais aos dos ramos. Face adaxial com tricomas simples e porrecto-estrelados, sésseis, de 4-6 raios laterais, raio central com 2-3 células, mais longo que os laterais, alguns mais robustos com raio central muito mais longo; raro com tricomas glandulares; nervura principal com tricomas estrelados multiangulados, raio central mais grosso que os laterais; acúleos iguais aos dos ramos, com base coberta de tricomas simples e glandulares até a metade de seu comprimento, raro mais. Face abaxial coberta de tricomas porrecto-estrelados, sésseis, de 4-6 raios laterais, raio central muito mais longo que os laterais; tricomas mais homogêneos no tamanho do que na face adaxial; tricomas simples e glandulares mais esparsos; nervura principal com tricomas iguais aos das zonas intercostais; acúleos iguais aos da face adaxial, inflorescência cimosa, extra-axilar, a jovem visivelmente escorpioidal, com aspecto racemiforme quando as flores abertas, com 4-15 flores; pedúnculo e pedicelo finos, cobertos com tricomas simples e glandulares e com raros acúleos, aciculares, de até 0,5 cm de comprimento. Cálice com lacínias profundamente partidas, ovalado-lanceoladas, de 0,5-0,7 cm de comprimento, cobertas abaxialmente de tricomas simples e glandulares e numerosos acúleos aciculares. **Ocorrência:** Tem ampla distribuição, ocorrendo no Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai, podendo ser encontrada em outros países como introduzida, ocorrendo em todas as formações vegetais do sul do Brasil, ao nível do mar até 1300 m de altitude, ocorrendo nos campos, clareiras das matas, em matas abertas com *Araucaria angustifolia*, em matas secundárias, capoeiras, margens de estradas, dunas, restingas, campos sujos, como ruderal, e em lavouras de soja e resteva de arrozais (Figura 6) (Mentz & Oliveira, 2004).



**Figura 6.** Espécie *Solanum sisymbriifolium* coletada no Uruguai.

### **2.3 Bioatividade de extratos do gênero *Solanum***

Apesar de ainda não existirem publicações utilizando compostos extraídos das plantas do gênero *Solanum* sobre *C. brevis* e *S. frugiperda*, a bioatividade de seus extratos tem sido relatada para alguns insetos.

Os extratos geralmente são específicos, com baixa toxicidade a organismos não-alvo e biodegradáveis. Como exemplos são citados extratos dos frutos de *S. villosum* com acentuada atividade larvicida contra mosquitos cucúlideos como o vetor da dengue *Aedes aegypti* (L.) (Diptera:Culicidae) (Chowdhury *et al.*, 2008); extratos das folhas de *S. trilobatum* com atividade repelente ao vetor da malária *Anopheles stephensi* Liston (Rajkumar & Jebanesan, 2005); extratos de folhas de *S. nigrum* L. com propriedades larvicidas contra três espécies de mosquitos transmissores de doenças (Singh *et al.* 2001); extratos de *S. surratense* reduzindo o número de ovos do besouro *Callosobruchus chinensis* L.(Coleoptera: Bruchidae), uma das maiores pragas de grãos armazenados (Srivatava & Gupta, 2007); extrato aquoso de *S.*

*fastigiatum* var. *acicularium* com atividade inseticida contra o pulgão da couve *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera:Aphididae) (Lovatto *et al.* 2004).

Extratos obtidos com CHCl<sub>3</sub> da superfície foliar de *S. tuberosum* foram avaliados sobre o besouro do Colorado *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae); efeitos tóxicos de folhas e flores de *S. bonariense* sobre *Tribolium castaneum* (Herbst.) (Coleoptera: Tenebrionidae); e bioatividade de ésteres de açúcares sobre afídios (Neal *et al.* 1990; Yencho *et al.* 1994). Os extratos metanólicos de *Solanum* também já foram testados em outros organismos, como os fungos demonstrando significativa atividade antifúngica (Vaghela *et al.* 2009) e contra o microcrustáceo *Artemia salina* (Anostraca: Artemiidae), mostrando atividade tóxica (Silva *et al.* 2007).

## **2.4. Insetos teste**

A avaliação do efeito dos extratos dos representantes do gênero *Solanum* foi realizada sobre dois insetos de importância econômica para todo o Continente Americano: *Cryptotermes brevis* (cupim-de-madeira-seca) (Isoptera:Kalotermitidae) e *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho) (Lepidoptera:Noctuidae).

### **2.4.1. Cupim-de-madeira-seca (*Cryptotermes brevis*)**

*Cryptotermes brevis* vive exclusivamente dentro da madeira na qual se alimenta, estimando-se que os gastos com tratamento, reparos e substituições de peças atacadas nas áreas urbanas mundiais, alcancem valores da ordem de 5 a 10 bilhões de dólares anuais. Apenas na cidade de São Paulo, as perdas podem variar de 10 a 20 milhões de dólares por ano

(Fontes & Milano, 2002). *C. brevis* está distribuído por praticamente toda América latina (Scheffrahn *et al.* 2009) (Figura 7).



**Figura 7.** Distribuição de localidades endêmicas de *C. brevis*.

Fonte: Scheffrahn *et al.* (2009)

Este cupim se espalhou de maneira alarmante por diversas partes do globo. De acordo com Scheffrahn *et al.* (2009), em 2004, foi coletado *C. brevis* em madeira velha e morta em campo de videiras cultivadas perto do deserto em terras agriculturáveis na comunidade de Copiapó, Chile (Ripa e Luppichini, 2004). Esta descoberta levou a supor que o habitat endêmico de *C. brevis* é no Pacífico, deserto costeiro da América do Sul (Chile e Peru).

De acordo com Constantino (2002), pelo menos seis espécies de cupins foram introduzidas de outras regiões e se estabeleceram como pragas urbanas entre elas *C. brevis* (Figura 8), sendo algumas espécies as principais pragas estruturais.



**Figura 8.** Colônia de *C. brevis* (Fonte: Stumpp, E. 2007)

Os produtos oriundos da madeira são extensivamente usados em construções e expostos ao tempo quando utilizados ao ar livre, de maneira que a madeira pode ser degradada por diversos organismos, incluindo fungos, insetos e térmitas. O tratamento para preservar essas estruturas contra a biodeterioração tem sido feito com biocidas (Shultz, *et al* 2007).

#### **2.4.1.2 Controle de cupins-praga**

O método convencional de combate aos cupins tem como princípio a utilização de produtos químicos. Estes inseticidas hoje, principalmente organo-fosforados, apresentam toxicidade para o homem e outros seres-vivos e risco de contaminação ambiental. Nesse sentido, a busca de produtos alternativos para a preservação da madeira baseia-se em pesquisas relacionadas com feromônios, análogos do hormônio juvenil, inibidores da síntese de quitina e extrativos vegetais (Martius, 1998). Neste último caso, os estudos não visam utilizá-los diretamente, mas conhecer sua composição e forma de ação para que substâncias com base nos componentes ativos sejam sintetizadas (Cabrera *et al.* 2001).

Com o aumento das infestações por cupins, é necessária a descoberta de tratamentos efetivos de controle, mais seguros ao meio ambiente e com os mínimos efeitos tóxicos a

mamíferos (Meepagala *et al.* 2006)

Testes realizados com compostos naturais derivados de plantas (vulgarone B – das partes aéreas de *Artemisia douglasiana*; apiol, sementes de *Ligustic hulteni*; cnicim, das folhas frescas de *Centaurea maculosa* foram utilizados para verificar a atividade contra o cupim subterrâneo *Coptotermes formosanus*. Sendo que os mesmos causaram mortalidade significativamente maior do que o controle em bioensaios em laboratório. Estes compostos estão presentes em níveis elevados em suas respectivas fontes vegetais, e também possuem outras atividades biológicas, tais como fitotoxicidade e propriedades antifúngicas (Meepagala *et al.* 2006).

Gutiérrez *et al.* (1999), testaram produtos naturais extraídos de plantas do deserto, avaliando dois terpenos (partheniol e argentone) e um triterpeno (incalinilin) contra o cupim subterrâneo *Reticulitermes flavipes*, para verificar as propriedades de deterrência alimentar e toxicidade. Estes compostos apresentaram diferentes níveis de atividade antialimentar e efeitos tóxicos, sendo argentone o composto antialimentar mais efetivo. Entre os quassinóides de *C. emoryi*, glaucarubolone glucosídeo demonstrou moderada atividade antialimentar e efeitos tóxicos.

A atividade do óleo de vetiver sobre o cupim *Coptotermes formosanus* e seus simbiontes intestinais mostrou uma redução na atividade alimentar dos insetos e na abundância dos protozoários presentes no intestino, evidenciando certo grau de toxicidade deste óleo aos cupins estudados (Maistrello *et al.* 2002).

A repelência e toxicidade da cera industrial de *Citrus latifolia* foi testada contra *C. brevis* verificando seu potencial no controle desta espécie (Barros *et al.* 2008). Frações obtidas a partir desta cera mostraram ação antialimentar sobre *C. brevis*, a qual pode estar associada a presença de cumarinas e furanocumarinas (Sbeghen-Loss *et al.* 2009).

#### 2.4.2. Lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*)

Uma das pragas de grande importância agrícola é a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Figura 9), que pertence à ordem Lepidoptera e família Noctuidae. Esta espécie possui destaque por se alimentar de mais de 80 espécies de plantas, incluindo algodoeiro, milho e soja (Pogue, 2002) (Figura 10). Na fase de lagarta são prejudiciais à agricultura, pois são fitófagas (Gallo *et al.* 2002), constituindo-se numa praga de grande importância, não somente pelos danos provocados, mas também pela dificuldade de seu controle (Roel & Vendramin, 2006).



**Figura 9.** *S. frugiperda*

Os adultos põem cerca de dois mil ovos na parte superior das folhas, e após três dias as lagartas eclodem e passam a se alimentar das folhas mais novas, sendo a duração larval de 12 a 30 dias. Sua coloração é escura e, com o passar do tempo, apresentam faixa dorsal com pontos pretos (pináculos) na base das cerdas. A cabeça é preta, com uma linha clara em forma de Y, nitidamente perceptível. A mariposa mede aproximadamente 35 mm de envergadura, com as asas anteriores pardo-escuras e posteriores branco-acizentadas (Gallo *et al.* 2002).

Em condições de campo o ciclo completo de desenvolvimento de *S. frugiperda* tem duração de cerca de 30 dias, geralmente apresentando seis ínstaes, com fase larval de 14 dias,

as pupas medem de 14 a 18 mm, sendo a duração deste estágio cerca de oito a nove dias, em temperatura de aproximadamente 25°C (Capinera, 2005).



**Figura 10.** Distribuição de *S. frugiperda*.

Fonte: Pogue (2002)

O ataque pode ocorrer desde a fase de plântula até as fases de pendoamento e espigamento do milho. As lagartas pequenas raspam o limbo das folhas mais novas, danificando, a seguir, as folhas centrais da região do cartucho, o qual pode ser totalmente destruído. Em ataques tardios, as lagartas podem ser encontradas na espiga destruindo palha e grãos (Ávila *et al.* 1997).

#### 2.4.2.1 Controle da lagarta do cartucho (*S. frugiperda*)

O controle desta praga é geralmente realizado com produtos químicos sintéticos que além de nem sempre serem eficientes acarretam diversos problemas, tais como resíduos em alimentos, destruição de inimigos naturais e intoxicação dos aplicadores. Nos últimos anos, diversas alternativas menos agressivas ao ambiente vêm sendo pesquisadas, destacando-se entre elas, o emprego de extratos botânicos (Maroneze, *et al.* 2007).

O efeito de diferentes concentrações do extrato acetato de etila de folhas e ramos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) foram avaliados sobre a lagarta-do-cartucho, verificando que o extrato causou mortalidade larval de 100% (em concentração igual, ou superior a 0,05%) e que as lagartas alimentadas desde a eclosão foram mais afetadas do que as alimentadas a partir dos dez dias de idade (Roel *et al.* 2000).

Folhas de milho tratadas com extrato aquoso de folhas de nim causaram 100% de mortalidade de *S. frugiperda*, afetando o desenvolvimento das lagartas sobreviventes (Viana & Prates, 2003).

A bioatividade de compostos isolados de *Vitex polygama* (Verbenaceae) e *Siphoneugena densiflora* (Myrtaceae) foi testada em *Spodoptera frugiperda*, verificando-se que os extratos metanólico e hidroalcolico de *S. densiflora*, causaram 100% de mortalidade larval. Entre os compostos isolados, os flavonóides apresentaram os melhores resultados como inseticida, e os taninos uma maior inibição do crescimento larval (Gallo *et al.* 2006).

Outros extratos vegetais: extratos aquosos de folhas e ramos de arruda (*Ruta graveolens* L.), folhas e ramos de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.), folhas do alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) e o fruto verde de mamona (*Ricinus communis* L.) foram utilizados em estudos da biologia da lagarta-do-cartucho (*S. frugiperda*). Os resultados

obtidos com o uso de extrato aquoso de frutos verdes de *R. communis* diferiram significativamente da testemunha nos parâmetros duração, viabilidade larval, pupal e peso. O extrato aquoso de *R. graveolens* reduziu o peso da pupa. O extrato de *M. charantia* exerceu forte efeito sobre a fase adulta do inseto, inibindo totalmente a postura e aumentando a longevidade. A viabilidade de pupa não foi afetada pelos extratos (Santiago *et al.* 2008).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Procedência e preparo das amostras vegetais**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle de Pragas da Universidade de Caxias do Sul - UCS e no Laboratório de Química da Universidad de la Republica de Montevideo – UdelaR, Uruguai.

As espécies coletadas no Uruguai foram: *Solanum bonariense* (voucher MVFQ 4329), coletada em outubro de 2008, no campus da Faculdade de Agronomia Montevideo e *Solanum sisymbriifolium* (voucher MVFQ 3520), coletada em novembro de 2008, na Estacion Mario A. Cassinoni da Faculdade de Agronomia, R3 Km 363, Paysandú, ambas depositadas no Herbário Arechavaleta da Facultad de Química – UdelaR – Uruguai.

A espécie coletada no Brasil (serra gaúcha): *Solanum bistellatum*, outubro de 2008, depositada com o voucher MVFQ 4327, no Herbário da Facultad de Química – UdelaR – Uruguai.

A extração de compostos de interesse para atividade biológica foi realizada com material vegetal fresco das partes aéreas (folhas, caule e flores), utilizando-se solventes específicos (1kg de planta para cada 2L de solvente). Os extratos diclorometânico e diclorometano/acetona foram diluídos em acetona e o extrato aquo-alcoólico diluído em água para solubilização e posterior utilização nos bioensaios.

#### **3.2 Obtenção dos Extratos**

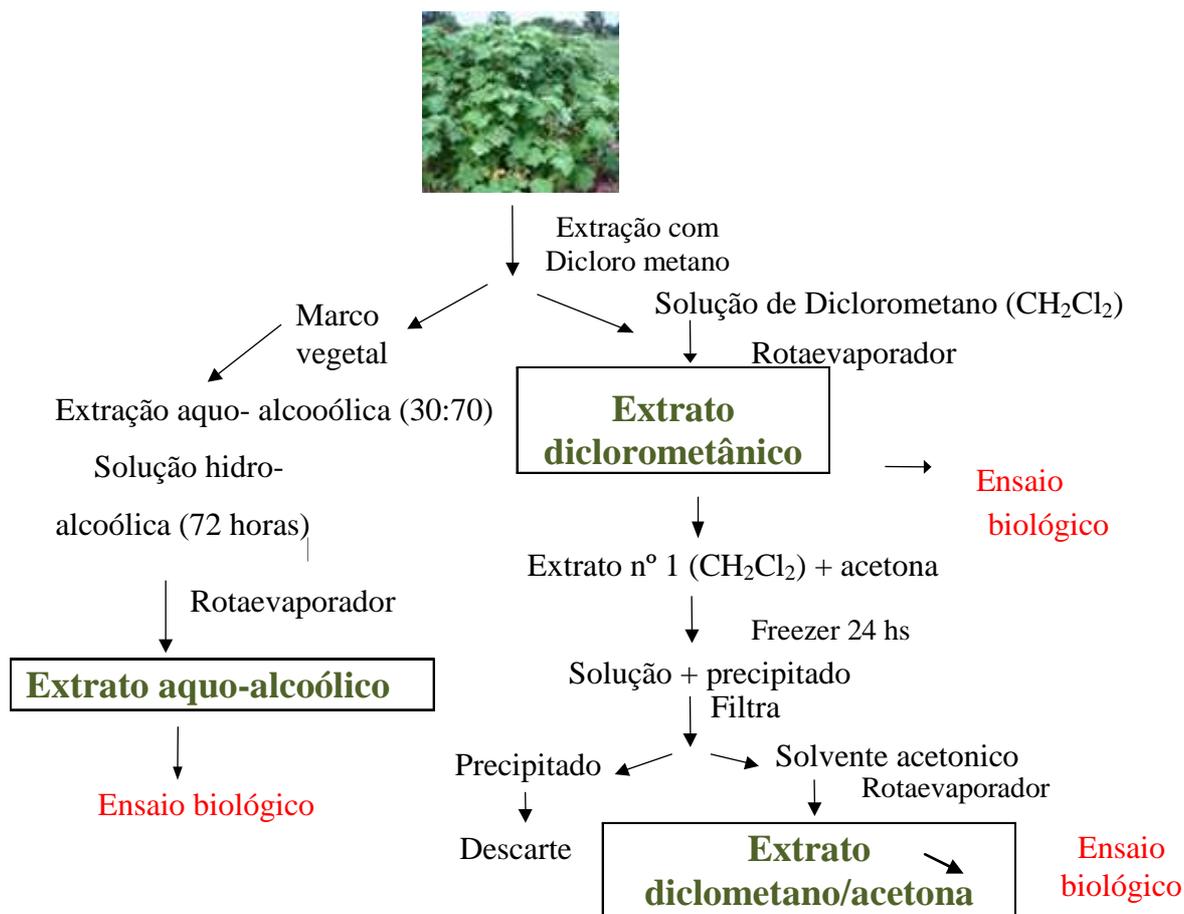
Foram realizados 3 (três) tipos de extrações para cada espécie vegetal selecionada, de

acordo com o esquema apresentado na Figura 11, visando obter diferentes grupos de metabólitos secundários presentes nas partes aéreas das plantas.

**a) Compostos presentes nas ceras epicuticulares e exsudatos dos tricomas glandulares** - Com o material vegetal fresco foi realizada uma extração utilizando-se diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), este material foi submergido durante 30 segundos no solvente, sendo o solvente foi evaporado à pressão reduzida e denominada extrato diclorometânico.

**b) Fração enriquecida de ésteres de açúcares** - A extração foi realizada adicionando-se o solvente acetona ao extrato diclorometânico evaporado a pressão reduzida, mantendo-se a  $20^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Desta solução resultou um precipitado que foi descartado, o restante do extrato foi evaporado para eliminação da acetona obtendo-se desta forma o extrato sequencial diclorometano/acetona.

**c) Compostos não presentes nas ceras epicuticulares** - O marco vegetal resultante da extração anterior foi utilizado como material para este extrato, realizando-se uma extração com álcool – água (70:30), evaporada em evaporador rotatório de pressão reduzida. Este extrato foi denominado extrato aquo-alcoólico.



**Figura 11.** Esquema de obtenção dos extratos

### 3.3 Avaliação da bioatividade de extratos de *Solanum* sobre *C. brevis*

A avaliação da bioatividade dos extratos sobre *C. brevis* foi realizada em papel filtro de acordo com metodologia descrita por Sharma & Raina (1998), com algumas modificações, considerando-se os seguintes parâmetros: repelência e deterrência alimentar – Índice Antialimetar (IA%). Em todos os testes aplicou-se 1mL das soluções dos extratos sobre discos de papel filtro. Para evaporação do solvente os discos foram deixados em capela de fluxo laminar durante 48 horas.

Em cada placa foram colocados 30 operários da espécie *C. brevis*, e cada tratamento foi repetido 5 (cinco) vezes. Para os grupos controle utilizou-se discos de papel filtro tratados com o solvente.

Os ensaios foram conduzidos à temperatura de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $70 \pm 5\%$ , no escuro, sendo as observações realizadas durante o período de 30 dias.

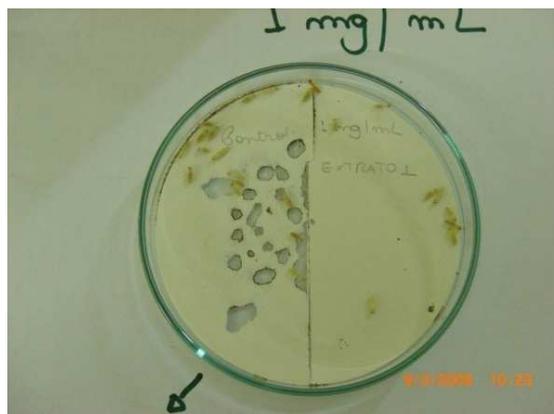
### **3.3.1 Coleta e obtenção dos cupins para os ensaios**

Madeira contendo cupins foi coletada em residências do Estado, armazenada dentro de bacias plásticas, e estocada em condições controladas ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 5\%$ ). Os cupins (operários) foram removidos da madeira à medida que os bioensaios foram realizados.

### **3.3.2 Ensaio de repelência dos extratos a *C. brevis***

Os bioensaios foram realizados utilizando-se as concentrações 0,25; 1,00 e 2,50 mg/mL, sendo os extratos diclorometânico e diclometano/acetona diluídos em acetona e o aquo-alcoólico diluído em água.

Nos testes de repelência observou-se a preferência da área (tratada ou não tratada) pelos cupins (Figura 12), de modo que discos de papel filtro com 9,0 cm de diâmetro foram cortados em duas metades, sendo que metade foi utilizada como controle sem nenhum tratamento e a outra metade do disco foi tratada com as concentrações dos extratos.



**Figura 12:** Placa de Petri contendo papel filtro tratado com 1mg/mL de extrato diclorometânico (direta) e papel filtro não tratado (esquerda) para estimar a repelência alimentar de *C. brevis*

O valor da percentagem de repelência (PR) foi calculado através da fórmula:

$$PR = (Nc - Nt) / (Nc + Nt) \times 100$$

Sendo Nc = Cupins no controle e Nt = Cupins na área tratada

### 3.3.1.2 Determinação da deterrência alimentar – Índice Antialimetar (IA%)

Os bioensaios foram realizados utilizando-se as concentrações 2,5; 12,5 e 25,0 mg/mL, sendo os extratos diclorometânico e diclometano/acetona diluídos em acetona e o aquo-alcoólico diluído em água. As respectivas concentrações correspondem a uma retenção no papel filtro de: 2,5mg/mL (39,48  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), 12,5 mg/mL (196,48  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) e 25,0 mg/mL (392,96  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

Discos de papel filtro com 9,0 cm de diâmetro (63,6  $\text{cm}^2$ ) foram secos (60°C) por 4 horas, determinando-se o peso seco inicial em balança analítica. Após o término dos ensaios

foi repetido este procedimento para avaliação do consumo (peso inicial – peso final após a exposição aos cupins) (Figura 13).



**Figura 13.** Placa de Petri contendo papel filtro (Controle) para avaliar o índice antialimentar de *C. brevis*

O consumo de substrato foi determinado pela perda de massa do CP [(massa inicial = após impregnação com o produto) – (massa final = após exposição aos cupins)] x 100.

A percentagem de inibição da alimentação (IA), para cada concentração, foi determinada pela equação  $(IA\%) = [(Consumo\ do\ controle - Consumo\ do\ disco\ tratado) / (Consumo\ do\ controle + Consumo\ do\ disco\ tratado)] \times 100$ , de acordo com Simmonds, *et al.* (1990).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

### **3.4 Avaliação da bioatividade de extratos de *S. sisymbriifolium* e *S. bonariense* sobre *Spodoptera frugiperda***

#### **3.4.1 Criação de *Spodoptera frugiperda***

Lagartas de *Spodoptera frugiperda* foram mantidas na sala de criação de insetos do Laboratório de Controle de Pragas do Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), em sala climatizada sob  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , UR  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 14 horas.

A criação dos insetos foi realizada segundo metodologia descrita por Parra (2001), utilizando-se dieta artificial (Greene *et al.* 1976) modificada para lagartas. Os extratos foram diluídos em Tween-80 (5%), e misturados com a dieta até homogeneização.

### 3.4.2 Atividade biológica de extratos brutos de *S. sisymbriifolium* e *S. bonariense* sobre *Spodoptera frugiperda*

Os ensaios foram realizados com blocos de dieta de  $1\text{cm}^3$  adicionada dos extratos diclorometânico e diclorometano/acetona nas concentrações de 0,25; 1,00 e 2,50 mg/mL e um grupo controle, em recipientes plásticos de 50 ml que foram tampados e adicionados de algodão umedecido (Figura 14). Foram utilizadas 70 lagartas de 1º ínstar (recém eclodidas) para os testes com os extratos brutos. Foram realizadas observações diárias dos estágios de desenvolvimento até a emergência dos adultos.



**Figura 14.** Ensaio de sobrevivência com *S. frugiperda*

Na fase de larva avaliaram-se os parâmetros: duração, número de ínstars e

sobrevivência. Na fase de pupa foi realizada a identificação dos sexos seguindo esquemas de Butt & Cantu (1962). Após dois dias, as mesmas foram pesadas em balança semi-analítica com precisão de centésimo de miligrama, e medidas com paquímetro em seu maior comprimento, avaliando-se, também, sobrevivência, peso, tamanho da pupa, período de duração e medida da asa esquerda.

### 3.5 Procedimentos químicos gerais

Para a realização das análises foram utilizados reagentes analíticos (Sigma Aldrich).

As placas de Cromatografia em camada Delgada (CCD) utilizadas foram Polygram Sil/UV<sub>254</sub> 0,25 mm Layer (Macherey-Nagel), e a fase móvel utilizada foi CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:1).

Todas as soluções foram evaporadas à pressão reduzida com temperatura igual ou menor que 60°C.

Preparação dos reveladores:

1) Revelador universal: 5% de CuSO<sub>4</sub> (Sulfato de Cobre) em solução aquosa de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 10%. A placa cromatográfica foi pulverizada com o revelador, seguida por aquecimento em estufa a 20-140°C (4°C/min) observando-se as diferentes colorações (Catálogo Merck, 1974).

2) Revelador para açúcares: 4g de difenilamina, 4 mL anilina e 20 mL de ácido fosfórico a 85% foram dissolvidos em 200 mL de acetona. A placa de cromatografia foi pulverizada com o revelador, seguida de aquecimento por 10 min a 85°C, observando-se o aparecimento de cores características: 1-4 aldohexose azul. (Catálogo Merck, 1974).

Para as análises das frações de interesse de *S. bistellatum* e *S. sisymbriifolium* utilizou-se um espectrômetro de RMN Bruker Avance 400 MHz, realizando experimentos de Próton e

Carbono, mono e bidimensional. As amostras foram dissolvidas em  $\text{CDCl}_3$ .

A cromatografia gasosa foi realizada em cromatógrafo Hp 6890–Mass Selective Detector 5973, Modo Split, T injector: 290°C, T interfase: 280°C, T Fonte: 230°C, T quadrupolo: 140°C. Fluxo constante. Coluna Capilar HP-5, gás: Helio. Programa de temperatura: Ti: 60°C, 5min, 5°C/min até Tf: 270°C, 5min.

O pico majoritário com um  $t_r=32,55$  foi identificado pela Biblioteca NIST05a.L como metil éster de ácido 3-hidroxiexadecanóico.

### **3.5.1 Estudo fitoquímico e análise química**

O estudo fitoquímico foi realizado com base no fracionamento bioguiado, seguindo a fração com atividade biológica. Realizou-se um estudo fitoquímico dos extratos com cromatografia de camada delgada (CCD) de *S. bonariense*, *S. sisymbriifolium* e *S. bistellatum*. Foi utilizado para o estudo um revelador específico para ésteres de açúcares e um revelador universal para identificar outros compostos presentes na amostra.

Previamente utilizou-se outros reveladores específicos como, por exemplo, para Alcalóides (Reativo de Dragendorff), para demonstrar que esses compostos não estavam presentes nestes extratos.

### **3.5.2 Cromatografia de Coluna Aberta**

#### **3.5.2.1 Isolamento do composto majoritário do extrato diclorometano /acetona de *S. bistellatum***

Utilizou-se 60 mg do extrato diclorometano/acetona que foram introduzidos em uma coluna com 10 g de Sílica Gel (Baker 60-200 Mesh), suspendida em clorofórmio. Posteriormente o solvente foi removido com pressão reduzida, e o gradiente de eluição foi CHCl<sub>3</sub>, posteriormente CHCl<sub>3</sub>:MeOH (95:5), CHCl<sub>3</sub>:MeOH (90:10).

Foram coletadas frações de 2 mL cada uma e a sua composição foi checada por CCD utilizando uma mistura de CHCl<sub>3</sub>:MeOH (85:15) como fase móvel e revelador de açúcares.

### **3.5.2.2 Isolamento dos compostos majoritários I e II (ésteres de açúcares) de *S. sisymbriifolium***

A cromatografia de Coluna Aberta (Figura 15) foi feita com o extrato diclorometano/acetona de *S. sisymbriifolium* para isolar os ésteres de açúcares majoritários deste extrato, sendo estes compostos revelados com revelador específico, correspondendo a duas manchas encontradas em maior quantidade. Utilizou-se 50 g de Sílica Gel (Baker 60-200 Mesh), sendo esta colocada na coluna com clorofórmio introduzindo-se aproximadamente 1 g do extrato diclorometano/acetona de *S. sisymbriifolium*. Foram amostrados 250 tubos com alíquotas de 10 mL usando um gradiente de solvente para eluição com: CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9,5:0,5), até isolar os compostos de interesse: Compostos I e II.



**Figura 15.** Cromatografia de Coluna Aberta para isolamento de ésteres de açúcares majoritários.

Os Gradientes de solventes utilizados para eluição foram:  $\text{CHCl}_3/\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (96:4)/ $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (90:10)/ $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (85:15).

O controle da Cromatografia de coluna aberta foi realizado por cromatografia de camada delgada utilizado como fase móvel:  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (85:15).

### **3.5.2.3 Identificação dos ácidos graxos presentes nos ésteres de açúcares isolados**

Utilizando-se 5 mg do composto problema dissolvidos em 0,5 mL de KOH 0,1N em MeOH anidro. Após 15 minutos, foi adicionado 1mL de HCl 0,1N em metanol anidro. Foi agitado durante 15 min e adiciona-se 0,5 mL de água. Posteriormente se extrai com éter de petróleo 3 porções de 1mL cada uma, que foi seca com  $\text{MgSO}_4$  e evaporado a com pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em 1 mL de hexano e injetado no GC-MS.

### **3.5.3 Atividade biológica dos compostos majoritários I e II (ésteres de açúcares) de *S. sisymbriifolium* sobre *S. frugiperda***

O isolamento dos compostos majoritários foi realizado seguindo os programas de seleção para produtos naturais biologicamente ativos pelo fracionamento bioguiado, sendo que para todas as frações testadas e para aquelas que continuaram a exibir atividade biológica, foi dada continuidade ao fracionamento químico até que os compostos bioativos fossem purificados. Na busca por compostos dos extratos que apresentaram maior atividade biológica (alta mortalidade larval), foram isolados dois compostos majoritários de ésteres de açúcares denominados compostos I e II.

Os ensaios foram realizados em recipientes plásticos de 50 ml contendo dieta artificial (blocos de 1cm<sup>3</sup>) acrescida dos compostos majoritários I (0,25, 1,00 e 2,5 mg/mL) e II (0,25 e 1,00 mg/mL) e um grupo controle, utilizando-se 30 lagartas de 1º ínstar (recém eclodidas). Foram realizadas observações diárias dos estágios de desenvolvimento até a emergência dos adultos.

Na fase de larva avaliou-se os parâmetros: duração, número de ínstar e sobrevivência. Na fase de pupa foi realizada a identificação dos sexos seguindo esquemas de Butt & Cantu (1962). Após dois dias, as mesmas foram pesadas em uma balança semi-analítica com precisão de centésimo de miligrama, e medidas com paquímetro em seu maior comprimento, avaliando-se, também, sobrevivência, peso, tamanho da pupa, período de duração, medida da asa esquerda e a malformação dos adultos.

### **3.6 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas através de testes paramétricos sendo os dados submetidos à análise de variância e médias comparadas pelo teste de Tukey (ANOVA) ( $P \leq 0,05$ ), com o auxílio do programa computacional SPSS versão 10.0.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da bioatividade dos extratos das três espécies de *Solanum* serão apresentados em dois capítulos: Capítulo I sobre *C. brevis* e Capítulo II sobre *S. frugiperda*.

### CAPÍTULO I

#### 4.1 Repelência de extratos brutos de três espécies de *Solanum* sobre *C. brevis*

Algumas pesquisas têm sido realizadas com produtos naturais derivados de plantas apresentando potencial contra cupins praga. Dentre os efeitos observados está a repelência, cuja ação provoca movimentos direcionados dos insetos para longe das superfícies tratadas (Sharma & Raina, 1998; Zhu *et al.* 2003).

No presente estudo, observou-se ação repelente aos cupins com os extratos diclorometânico (ceras epicuticulares) e diclorometano/acetona (fração enriquecida em ésteres de açúcares). Os extratos aquo-alcoólicos obtidos das espécies selecionadas de *Solanum* foram menos repelentes em relação aos demais extratos, com exceção de *S. bistellatum* na maior concentração avaliada (Tabela 1).

O extrato diclorometânico de *S. bonariense* apresentou atividade de repelência acima de 70% nas três concentrações avaliadas (0,25, 1,00 e 2,50 mg/mL), e também na concentração 2,50 mg/mL do extrato diclorometano/acetona (Tabela 1). Em relação ao extrato aquo-alcoólico observou-se ausência do efeito de dosagem e a atividade de repelência em torno de 55% nas três concentrações avaliadas.

Tabela 1. Percentual médio de repelência e respectivos erros padrão dos extratos de *S. bonariense*, *S. bistellatum* e *S. sisymbriifolium* sobre *C. brevis*.

Planta	Concentração	Extrato		
		Diclorometânico	Diclorometano- acetona*	Aquo- alcólico
		Repelência(%) (Média ± S.E)	Repelência(%) (Média ± S.E)	Repelência(%) (Média ± S.E)
<i>S. bonariense</i>	0,25 mg/mL	70,55 <b>b</b> ± 11,13	22,90 <b>b</b> ± 3,24	55,94 <b>a</b> ± 7,04
	1,00 mg/mL	86,55 <b>a</b> ± 7,65	29,43 <b>b</b> ± 3,54	54,06 <b>a</b> ± 5,96
	2,50 mg/mL	82,52 <b>a</b> ± 6,51	73,58 <b>a</b> ± 2,71	55,34 <b>a</b> ± 6,23
<i>S. bistellatum</i>	0,25 mg/mL	50,70 <b>b</b> ± 12,10	28,73 <b>c</b> ± 13,07	43,81 <b>c</b> ± 15,06
	1,00 mg/mL	42,70 <b>b</b> ± 13,69	41,90 <b>b</b> ± 17,20	56,09 <b>b</b> ± 7,28
	2,50 mg/mL	93,20 <b>a</b> ± 4,12	92,14 <b>a</b> ± 5,49	86,32 <b>a</b> ± 7,28
<i>S. sisymbriifolium</i>	0,25 mg/mL	79,91 <b>b</b> ± 3,09	84,53 <b>b</b> ± 2,68	32,74 <b>b</b> ± 6,60
	1,00 mg/mL	92,21 <b>a</b> ± 2,08	90,06 <b>a</b> ± 2,01	37,31 <b>ab</b> ± 6,68
	2,50 mg/mL	82,67 <b>b</b> ± 3,18	91,91 <b>a</b> ± 1,98	50,73 <b>a</b> ± 7,02

\*Fração enriquecida de ésteres de açúcares  
Média de 5 repetições; 30 pseudergates por repetição.  
Valores seguidos da mesma letra, em cada coluna, para cada planta, não diferem entre si (Tukey test, P < 0.05)

Os extratos diclorometânico e diclorometano/acetona de *S. bistellatum* na concentração de 2,50 mg/mL demonstraram repelência superior a 92%, e o extrato aquo-alcoólico desta espécie apresentou atividade de repelência de 86,32% (Tabela 1). A repelência observada pode estar associada aos compostos presentes na superfície foliar, já que esta espécie possui tricomas glandulares tipo B que secretam compostos com bioatividade reportada contra

insetos (Neal *et al.* 1990). Em um trabalho realizado com outra espécie de *Solanum* (*S. tuberosum*), as ceras epicuticulares extraídas com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> revelaram a presença de alcanos, ácidos graxos, alcoóis e esteróis (Szafranek & Synak, 2006).

A atividade do extrato aquo-alcoólico provavelmente se deve à presença de metabólitos secundários que se encontram no interior do vegetal. Em um trabalho realizado com extrato aquo-alcoólico de folhas de *S. macranthum* sobre ninfas de IV e V estádios de *Rhodnius* observou-se que o efeito inseticida pode ser atribuído possivelmente à presença de alcalóides que foram detectados em um estudo fitoquímico preliminar, compostos presentes nas partes internas das folhas, não descartando-se a possibilidade de efeito sinérgico de cumarinas e flavonóides (Carvajal *et al.* 2010).

Os extratos diclorometânico e diclorometano/acetona de *S. sisymbriifolium* mostraram repelência aos cupins de 79,91 a 92,21%. O extrato aquo-alcoólico apresentou atividade de repelência de 50,73% na maior concentração (2,50 mg/mL), sendo menos efetivo que os demais extratos avaliados (Tabela 1). Ação repelente de extratos aquosos de *S. sisymbriifolium* foi verificada sobre *Brevicoryne brassicae*, conhecido como pulgão da couve, verificando-se repelência significativa nas concentrações testadas, sendo que o tratamento com o extrato de flores a 5% foi o mais eficiente (Lovatto *et al.* 2004).

A atividade repelente dos extratos diclorometânico e diclorometano/acetona das três espécies de *Solanum* avaliadas pode estar associada, principalmente, à presença dos compostos encontrados nas ceras epicuticulares e dos metabólitos exsudatos por tricomas glandulares tipo B ou tipo IV, os ésteres de açúcares. Este tipo de associação foi observada contra o pulgão *Myzus persicae*, onde a mistura de sesquiterpenos encontrados em exsudatos de *S. berthaultii* oriundos dos tricomas tipo A e os compostos secretados pelos tricomas tipo B foram reponsáveis pela repelência encontrada (Avé *et al.* 1987).

Pode-se observar na Tabela 1 que o extrato diclorometânico de *S. bonariense* diminui a atividade repelente aos cupins após a purificação com acetona, ao contrário do observado para as duas outras espécies vegetais avaliadas. Esta diferença pode estar relacionada a baixa proporção de ésteres de açúcares no extrato diclorometano/acetona de *S. bonariense*, que em comparação a *S. sisymbriifolium* e *S. bistellatum*, é a espécie que possui menor quantidade de tricomas glandulares (Burkart,1979).

A investigação da superfície foliar da espécie *Salpichroa organifolia* (Solanaceae) permitiu o reconhecimento de tricomas tipo IV e as investigações químicas confirmaram a presença de acil-açúcares. Estes acil-açúcares encontrados em espécies de *S. organifolia*, quando testados para verificar sua atividade antifúngica, apresentam um alto nível de bioatividade similar aos agroquímicos (Dutra *et al.* 2008).

#### **4.2 Efeito antialimentar de extratos brutos de *S. bonariense*, *S. bistellatum* e *S. sisymbriifolium* sobre *C. brevis***

Substâncias com efeitos antialimentares não necessariamente são repelentes, mas podem cancelar algum sinal num órgão específico no inseto, evitando o início da alimentação. A maioria dos compostos com ação antialimentar não matam o inseto diretamente (Cremllyn, 1990).

Os extratos obtidos a partir de *S. bonariense* indicaram haver leve (< 30%) inibição da alimentação dos térmitas nos tratamentos com extratos diclorometânico e diclorometano/acetona. Com o extrato aquo-alcoólico verificou-se baixa atividade antialimentar aos insetos (Tabela 2).

Com a utilização dos extratos diclorometânico e diclorometano/acetona de *S.*

*bistellatum* constatou-se atividade anti-alimentar moderada em todas as concentrações testadas. Entretanto, com o extrato aquo-alcoólico houve atividade fagoestimulante nas concentrações de 12,5 e 25 mg/mL (Tabela 2).

O extrato diclorometânico de *S. sisymbriifolium* na concentração 25 mg/mL ocasionou 100% de inibição alimentar. Com o extrato diclorometano/acetona na mesma concentração o percentual de inibição foi 78,20%. Entretanto, em experimentos com o extrato aquo-alcoólico não foi observada atividade anti-alimentar.

No presente estudo constatou-se que a atividade do extrato diclorometânico foi maior que a do extrato diclorometano/acetona (fração enriquecida em ésteres de açúcares). A atividade conjunta dos distintos componentes de um extrato pode ser maior que a ação dos compostos em separado (Houghton *et al.* 2007).

Extratos brutos ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) da superfície das folhas de *S. tuberosum* e suas frações mostraram bioatividade sobre o besouro *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera:Chrysomelidae), sendo identificados os compostos presentes nas ceras cuticulares, hidrocarbonos sesquiterpenos, álcoois, bem como outros compostos não identificados (Szafranek *et al.* 2008).

Tabela 2. Índice anti-alimentar apresentado por *C. brevis* em papel filtro tratado com diferentes extratos de *Solanum*.

Espécie vegetal	Concentração do extrato	Extrato		
		Diclorometânico	Diclorometano -acetona*	Aquo-alcoólico
		Índice Antialimentar (%)	Índice Antialimentar (%)	Índice Antialimentar (%)
<i>S. bonariense</i>	2,50 mg/mL**	11,11% <b>Aa</b>	6,33% <b>Aa</b>	-3,5% <b>Ba</b>
	12,5 mg/mL***	22,10% <b>Aa</b>	14,08% <b>Aa</b>	-1,0% <b>Ba</b>
	25,0 mg/mL****	28,05% <b>Aa</b>	28,11% <b>Aa</b>	7,55% <b>Ba</b>
<i>S. bistellatum</i>	2,50 mg/mL**	31,67% <b>Aa</b>	32,46% <b>Ab</b>	9,92% <b>Ba</b>
	12,5 mg/mL***	39,81% <b>Aa</b>	52,80% <b>Aa</b>	-6,9% <b>Ba</b>
	25,0 mg/mL****	43,29% <b>Aa</b>	57,46% <b>Aa</b>	-1,4% <b>Ba</b>
<i>S. sisymbriifolium</i>	2,50 mg/mL**	10,79% <b>Ab</b>	16,23% <b>Ab</b>	-7,0% <b>Bb</b>
	12,5 mg/mL***	86,91% <b>Aa</b>	63,85% <b>Aa</b>	9,96% <b>Ba</b>
	25,0 mg/mL****	100% <b>Aa</b>	78,20% <b>Aa</b>	8,66% <b>Ba</b>

\*Fração enriquecida de ésteres de açúcares

\*\* 2,5 mg/mL = 39,48 µg/cm<sup>2</sup>

\*\*\*12,5 mg/mL = 196,48 µg/cm<sup>2</sup>

\*\*\*\*25 mg/mL = 392,96 µg/cm<sup>2</sup>

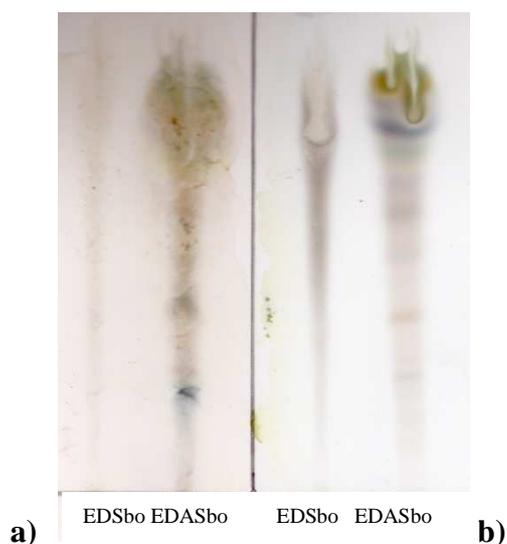
Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na mesma coluna para cada planta não diferem entre si.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas três colunas para todas as plantas e extratos não diferem entre si.

Os extratos diclorometânico e diclorometano/acetona obtidos de *S. sisymbriifolium* e *S. bistellatum* (Tabela 1 e 2), foram os que apresentaram melhor atividade biológica, provavelmente devido a presença dos ésteres de açúcares presentes em ambos os extratos.

### 4.3 Análise fitoquímica dos extratos de *Solanum*

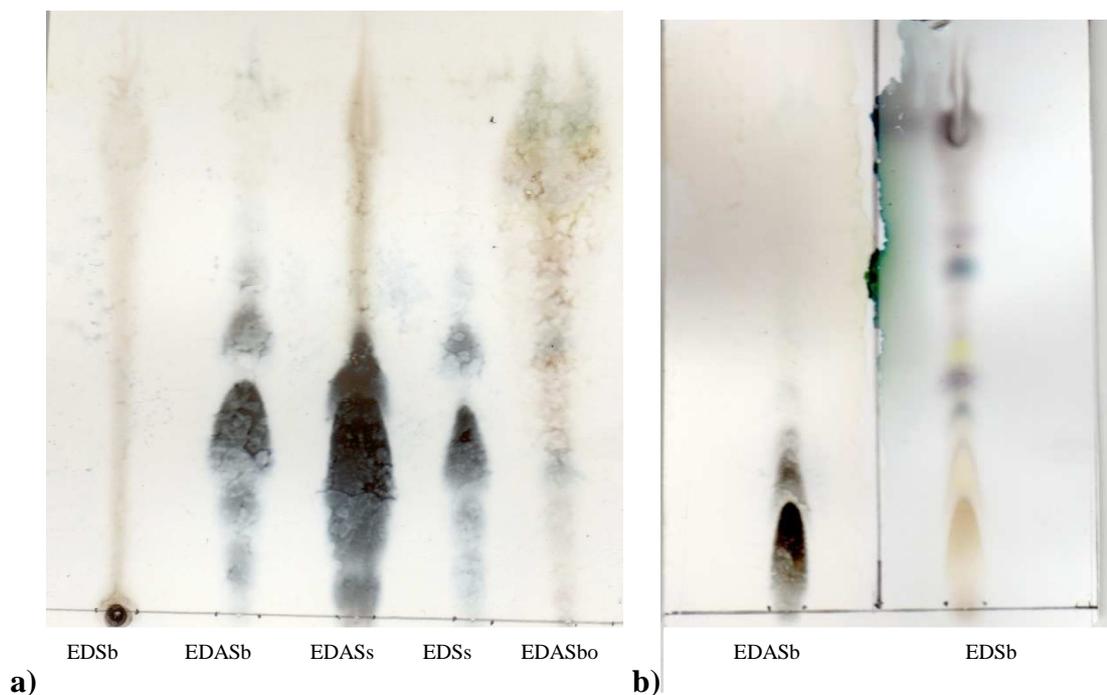
As folhas das plantas são protegidas contra dessecação, predação por insetos e doenças por uma camada de ceras na superfície sobre a cutícula (Smith, 1989). O diclorometano extrai compostos apolares e polares que formam parte das ceras epicuticulares, entre os quais os ésteres de açúcares e outros metabólitos naturais produzidos pela planta para sua defesa. Observou-se que *S. bonariense* (Figura 16), possui uma baixa proporção de ésteres de açúcares, coincidindo com a característica botânica de que esta espécie possui uma baixa proporção de tricomas em suas folhas. Na CCD não foi possível visualizar nenhum acil-açúcar quando a placa foi revelada com um revelador específico para açúcares (Figura 15).



**Figura 16.** Extratos diclorometânico e extrato diclorometano/acetona. a) Revelador específico para ésteres de açúcares; b) Revelador Universal ( $\text{CuSO}_4$ ). *S. bonariense*. Fase móvel  $\text{CHCl}_3$ :MeOH 9:1

Os resultados obtidos por CCD mostram a presença de compostos positivos para

revelador de açúcares, particularmente acilaçúcares, em *S. sisymbriifolium* e *S. bistellatum* (Figura 17). As manchas mais escuras representam os ésteres de açúcares, presentes nas diferentes espécies de *Solanum*.



**Figura 17.** Cromatografia de Camada Delgada (CCD). a) Revelador específico para ésteres de açúcares; b) Revelador Universal ( $\text{CuSO}_4$ ). *S. sisymbriifolium* e *S. bistellatum*. Fase móvel  $\text{CHCl}_3$ :MeOH 9:1

O extrato diclorometano/acetona de *S. bistellatum* contém ésteres de açúcares cujos Rfs são similares aos de *S. sisymbriifolium*, sendo que as características das manchas indicaram um padrão estrutural similar. O perfil do extrato diclorometano/acetona de *S. sisymbriifolium* apresenta uma composição mais complexa, sendo similar ao reportado por outros autores (Cesio, 2004; Dutra *et al.* 2006). Estes autores descrevem a presença de três tipos de ésteres de açúcares com Rf bem diferenciados. No presente estudo detectou-se compostos similares

com  $R_f=0,3$  e  $0,25$  descritos pelos autores como majoritários. Entretanto o composto com  $R_f=0,8$  reportados pelos outros autores, não foram detectados no presente estudo.

O extrato diclorometano/acetona permite enriquecer o extrato em ésteres de açúcar, compostos liberados pelos tricomas glandulares encontrados em plantas do gênero *Solanum*. O extrato aquo-alcoólico extrai os compostos que estão na parte interna da planta. Os compostos que são extraídos com esta mescla aquo-alcoólica são compostos de maior polaridade, como fenólicos, ácidos, como por exemplo ácido cafeico, ácido clorogênico e flavonóides, entre outros (Vázquez, 1997).

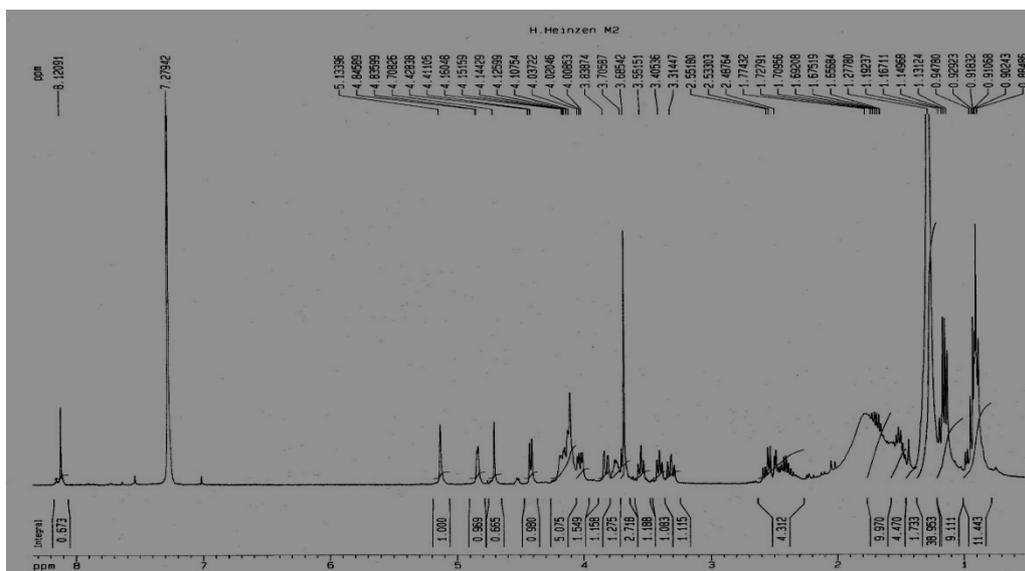
#### **4.3.1 Identificação dos compostos presentes nos extratos de *S. sisymbriifolium* e *S. bistellatum***

De acordo com os resultados biológicos, foi realizado o estudo fitoquímico das frações enriquecidas de ésteres de açúcares em *S. sisymbriifolium* e *S. bistellatum* para verificar se a presença destes compostos esta relacionada com a atividade biológica observada. Devido a baixa atividade antialimentar apresentada por *S. bonariense* sobre *C. brevis*, assim como o baixo conteúdo de ésteres de açúcares presentes nos extratos desta espécie não foi dada continuidade a elucidación estrutural dos compostos presentes nesta planta.

##### **4.3.1.1 *S. sisymbriifolium***

Os compostos majoritários de *S. sisymbriifolium*,  $R_f=0,3$  e  $0,25$ , foram isolados por cromatografía preparativa, buscando identificar os responsáveis pela bioatividade. Foram obtidos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . As análises espectroscópicas com  $^1\text{H}$ RMN (Figura 18)

realizadas com as frações purificadas de *S. sisymbriifolium*, indicam a presença de ésteres de açúcares como reportado por Cesio *et al.* 2006.

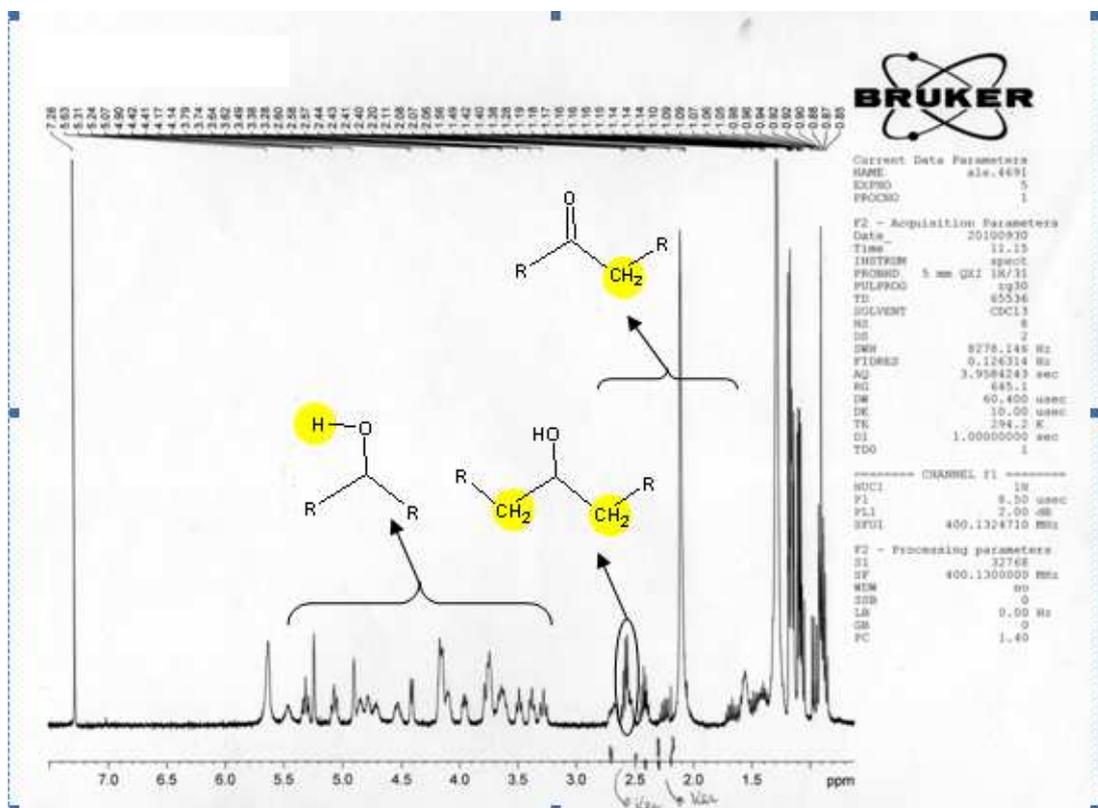


**Figura 18.** Espectro  $^1\text{HRMN}$  do composto isolado de *S. sisymbriifolium*.

#### 4.3.1.2 *S. bistellatum*

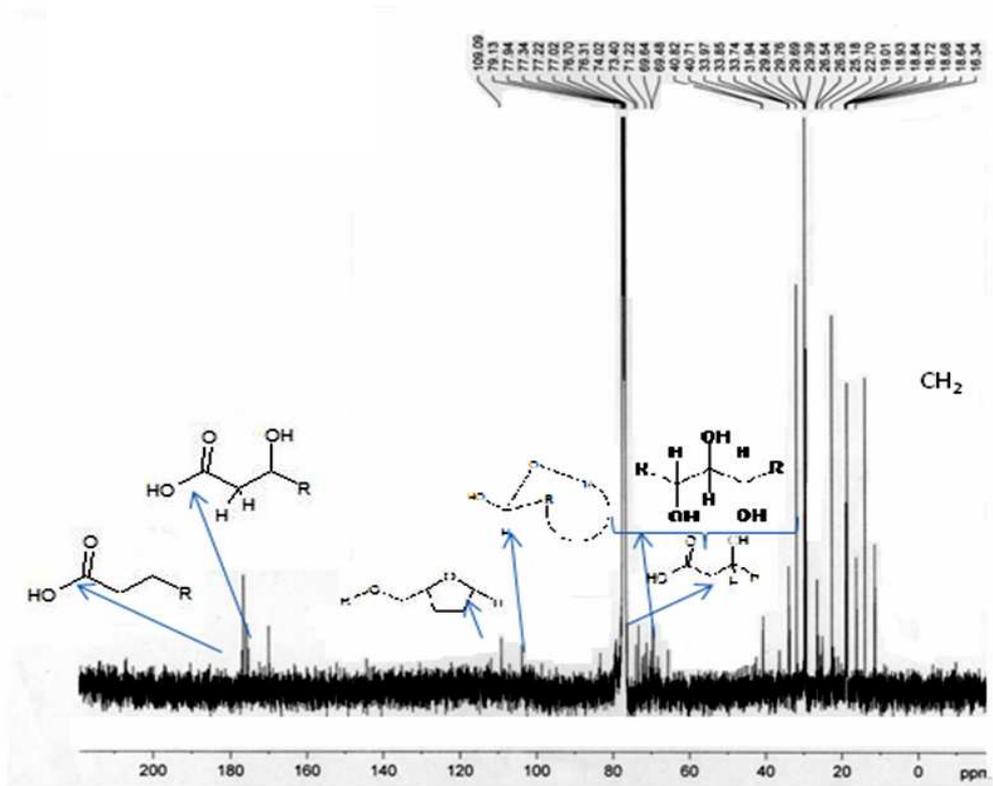
A fração majoritária do extrato diclorometano/acetona de *S. bistellatum* foi isolada por cromatografia em coluna aberta e sua composição química estudada seguindo o mesmo esquema dos demais extratos do estudo. Como se observa na cromatografia de camada delgada (Figura 16), a polaridade da fração majoritária de *S. bistellatum* é similar a de *S. sisymbriifolium*. Desta forma, pode ser considerado que se tratam de estruturas com polaridades similares. Por análise de RMN sobre a fração intacta de próton e carbono bem como os experimentos bidimensionais pôde-se obter a informação para a possível formação da estrutura isolada, como a de um dissacarídeo (Tabela 3).

O grupo de sinais a  $\delta < 4.0$  ppm correspondente aos metilenos e metilas de cadeias dos ácidos graxos dos acil-açúcares. Similar descrição pode ser realizada com o espectro de próton: entre  $\delta = 5.5$  e  $3.0$  ppm foram observados os prótons unidos a carbonos hidroxilados. Entre  $\delta = 3.0$  e  $2.0$  ppm se observaram os prótons alfa e carboxilas e um multiplete centrado a  $\delta = 2.5$  ppm que corresponde aos prótons metilênicos alfa e a carbonila de um beta hidroxiácido (Figura 19).



**Figura 19.** Espectro <sup>1</sup>H RMN de *S. bistellatum* com os principais sinais.

No espectro de carbono podem ser identificados sinais correspondentes a carbonos anoméricos a  $\delta=104$  e  $109$  ppm, um grupo de sinais entre  $\delta =82- 60$  ppm correspondentes a carbonos substituídos por hidroxilas (Figura 20).



**Figura 20.** Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN de *S. bistellatum* com os principais sinais.

Estas informações se conjugam com o experimento bidimensional HSQC (Figura 21), onde é possível correlacionar os sinais dos prótons com os carbonos ligados diretamente a eles. Desta maneira é possível construir a tabela de correlação próton-carbono (Tabela 3).

Tabela 3: Correlação dos sinais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR

$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)
109	5,24
104	4,41
83,3	4,42
79,6	4,16
79,3	4,90
77,4	4,11
77,3	7,29
76,7	3,49
74,0	3,77
73,4	3,38
69,6	3,64
69,5	3,61
65,6	3,96-3,28

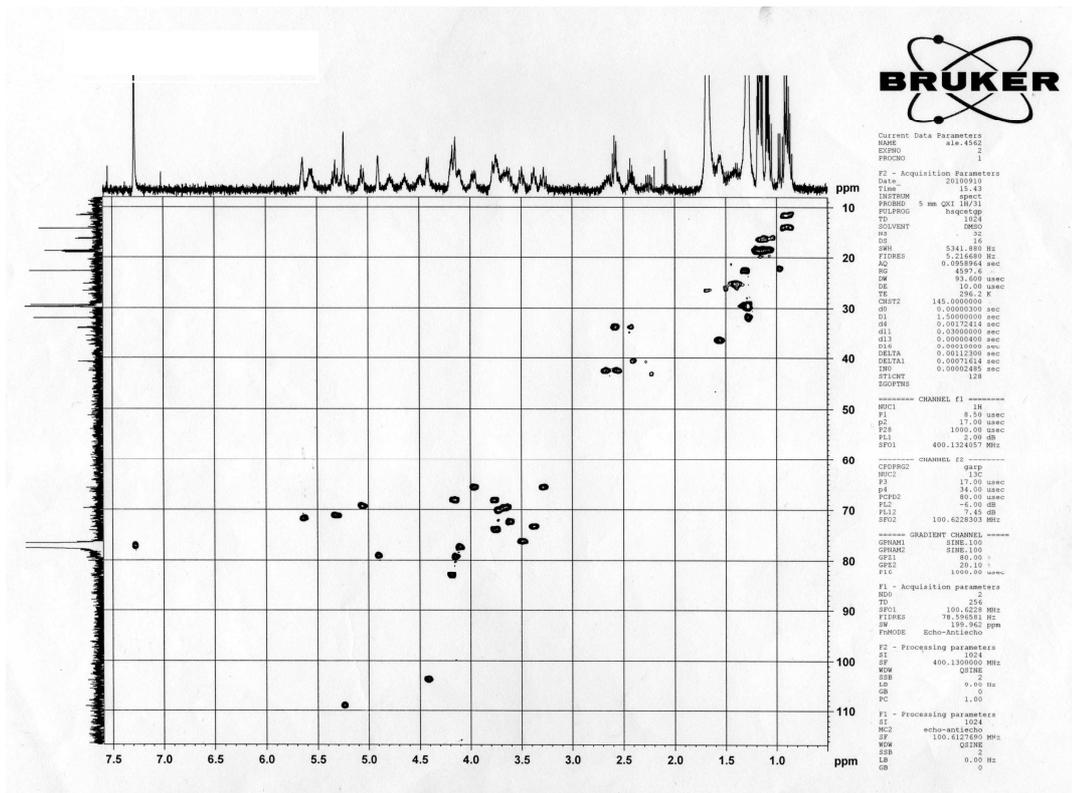
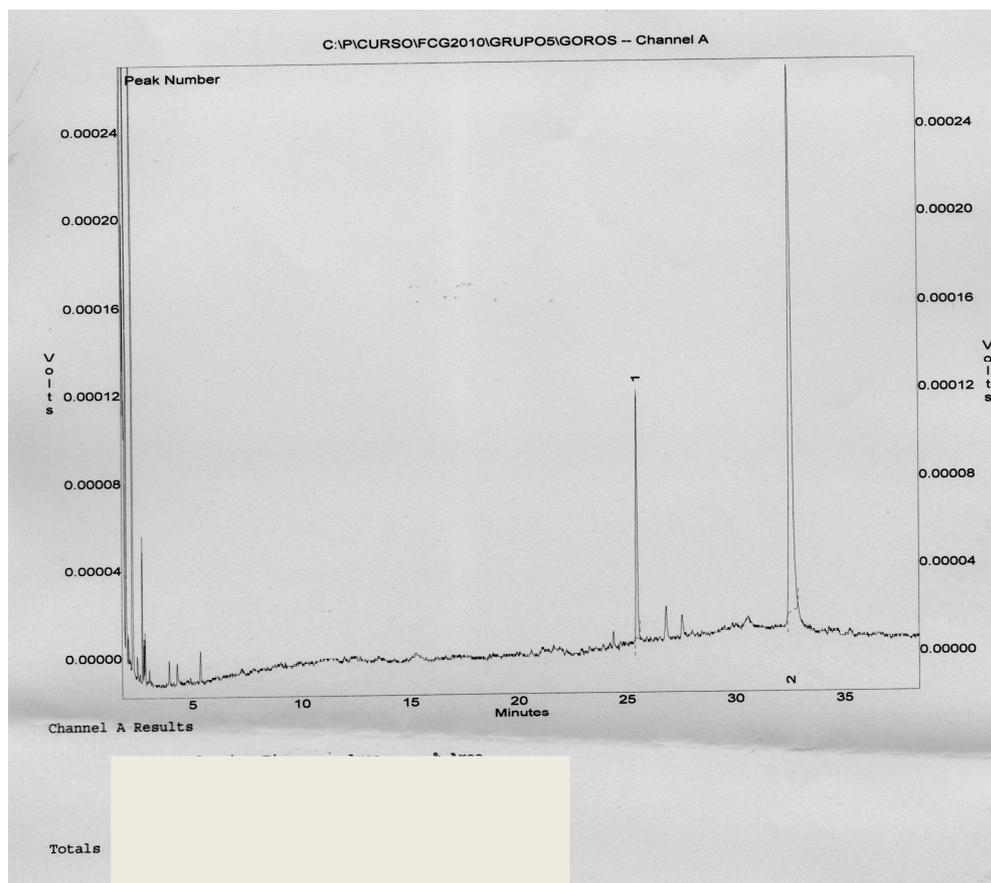


Figura 21. Espectro RNM HSQC de *S. bistellatum*.

Os ácidos graxos presentes na molécula foram investigados por GC/MS (Figura 22), após a hidrólise e metilação. Foi encontrado o ácido-3-hidroxi palmítico como ácido graxo majoritário. Este é o mesmo ácido que está glicosilando os açúcares acilados de *S. sisymbriifolium* já reportados.

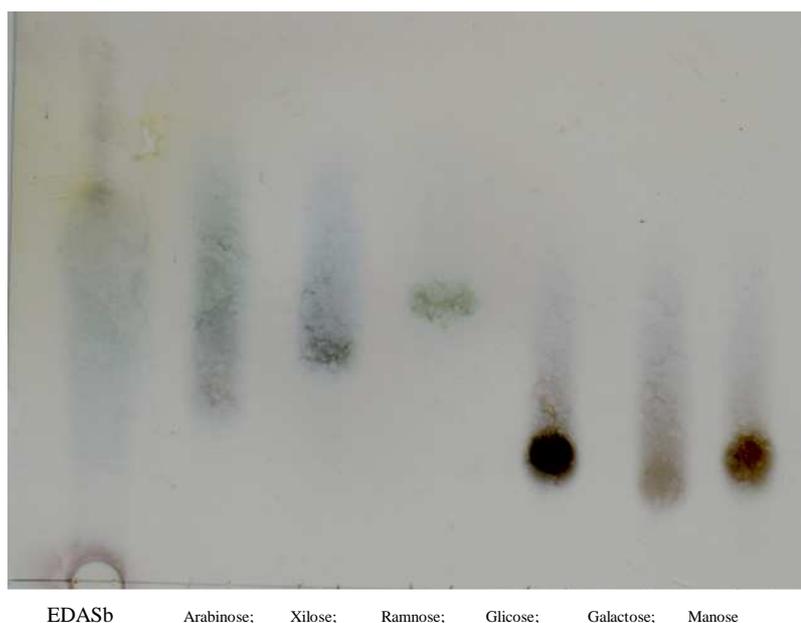


**Figura 22.** GC de ácidos graxos metilados presentes na amostra (1) ácido 3 hidroxi palmítico, (2) ácido 3-hidroxi palmítico metilado .

O pico com tempo de retenção (Tr) de 32,55 minutos, corresponde ao ácido 3-hidroxi palmítico metilado, identificado e comparado com um cromatograma de padrão de metil éster de ácido 3-hidroxi palmítico (Figura 22). A estrutura foi confirmada utilizando-se cromatografia gasosa acoplada a massas e comparada com um espectro de referência da biblioteca NIST05a.L.

#### 4.3.1.3 Determinação dos açúcares dos ésteres de açúcares

Por meio de hidrólise ácida e transesterificação do composto isolado, estudou-se os açúcares por CCD, comparando-os com os padrões (Figura 23), comprovando-se que os açúcares presentes na amostra não são nenhum dos seguintes monossacarídeos: arabinose, xilose, glicose, galactose, ramnose e manose. A determinação total destas estruturas deverá ser objeto de um estudo posterior ao presente trabalho. De acordo com a informação estrutural identificada até o momento, tem-se a presença de um glicosídeo dissacarídeo com ao menos um de seus açúcares em forma furanósica pelo sinal a  $\delta=109.9\text{ppm}$ .



**Figura 23.** CCD para determinação de açúcares comparada com os padrões.

#### 4.3.1.4 Considerações finais

Este trabalho mostra resultados obtidos durante uma série de bioensaios e tem grande

importância relatando a atividade dos representantes do gênero *Solanum* ainda tão pouco conhecidos e sua atividade como deterrente alimentar e repelente ao cupim de madeira seca *C. brevis*. Testes piloto foram realizados para obtenção de dados relativos a mortalidade dos cupins utilizando-se tratamentos com os extratos estudados, porém os resultados foram pouco significativos, não sendo apresentados neste trabalho.

A problemática de desenvolver inseticidas para cupins, é que esta praga depois de instalada na peça de madeira é de difícil remoção e tratamento curativo, pois este inseto tem hábitos crípticos. A alternativa é utilizar produtos preventivos e repelentes, sendo os deterrentes alimentares um exemplo destes tratamentos, os quais evitam o estabelecimento do inseto. Desta forma, os tratamentos empregando produtos com ação antialimentar para o controle de cupins podem ser uma alternativa para a proteção da madeira (Gutiérrez, *et al.* 1999; Sbeghen-Loss *et al.* 2009).

O potencial biológico dos ésteres de açúcares presentes nos extratos de *S. sisymbriifolium* e *S. bistellatum* sobre *C. brevis* verificados no presente estudo, mostram a possibilidade de desenvolvimento de um produto natural protetor da madeira, de baixa toxicidade devido a estrutura química que apresentam sendo facilmente acessíveis, devido a abundância das plantas avaliadas.

## 5. CAPÍTULO II

### **Avaliação da bioatividade de extratos de *S. sisymbriifolium* e *S. bonariense* sobre *Spodoptera frugiperda***

Os insetos na fase larval tendem a escolher alimentos apropriados para consumi-los em proporções balanceadas, de tal forma, a utilizá-los adequadamente para obter um ótimo crescimento e desenvolvimento, gerando adultos que sejam reprodutivamente competitivos.

Em condições de campo o ciclo completo de desenvolvimento de *S. frugiperda* tem duração de cerca de 30 dias, geralmente apresentando seis ínstars, com fase larval de 14 dias, as pupas medem de 14 a 18 mm, sendo a duração deste estágio cerca de oito a nove dias, em temperatura de aproximadamente 25°C (Capinera, 2005).

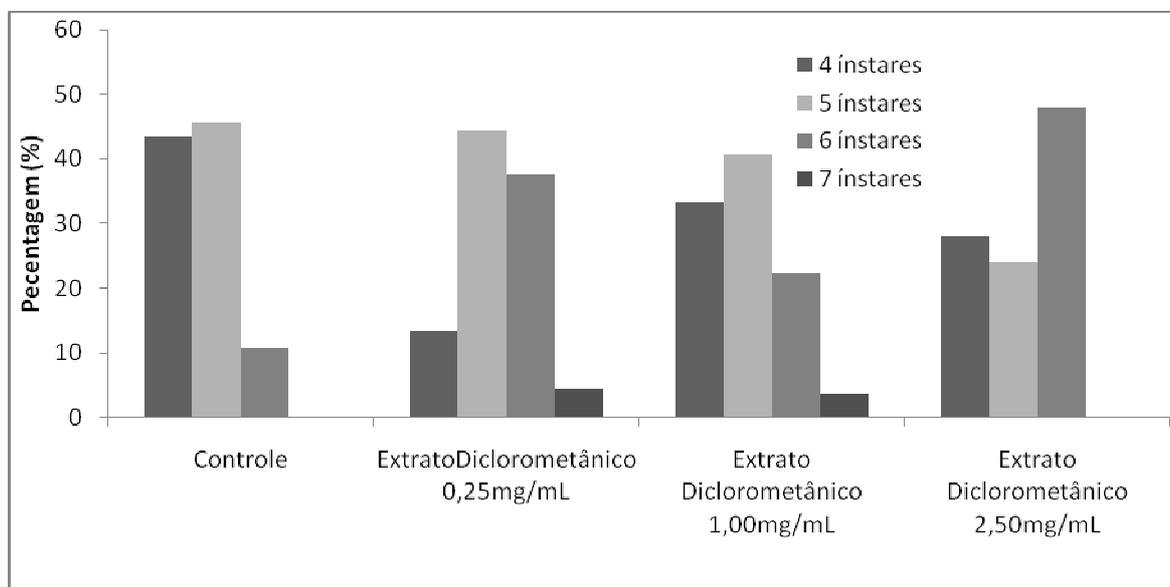
Considerando que o desenvolvimento e a reprodução dos insetos estão diretamente associados aos alimentos utilizados avaliou-se a ação dos diferentes extratos adicionados à dieta artificial sobre o desenvolvimento da lagarta-do-cartucho *S. frugiperda*.

#### **5.1 Atividade biológica dos extratos diclorometânico e diclorometano/acetona de *S. sisymbriifolium***

##### **5.1.1 Avaliação do extrato diclorometânico de *S. sisymbriifolium* sobre *S. frugiperda***

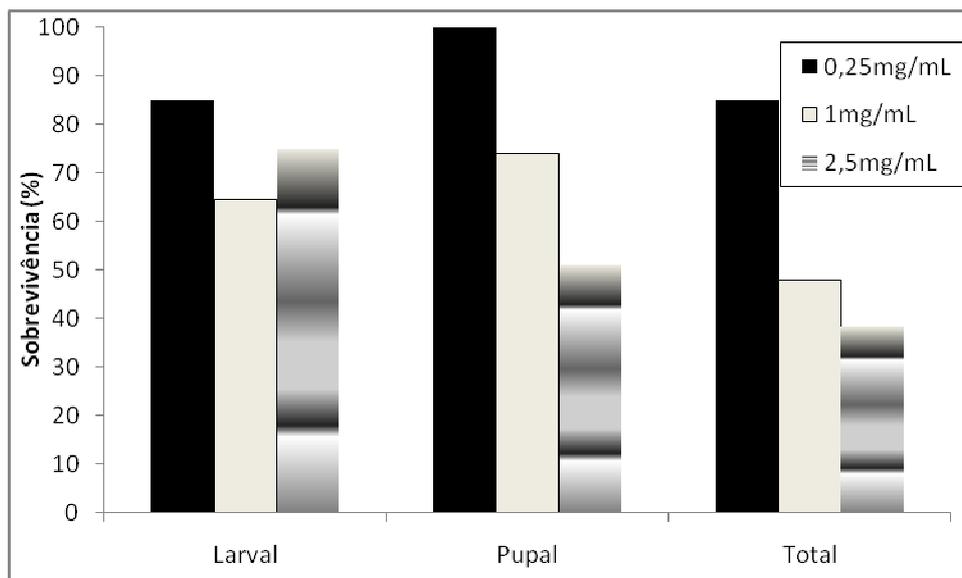
A adição de extrato diclorometânico de *S. sisymbriifolium* nas concentrações 0,25, 1,00 e 2,50 mg/mL afetou o desenvolvimento de *S. frugiperda*, o que pode ser verificado pelos percentuais de larvas que passaram por 4, 5, 6 ou 7 ínstars (Figura 24). No controle, a

maioria das larvas passou por 4 ou 5 ínstaes. Nos tratamentos houve um decréscimo no percentual de larvas que passaram por 4 ínstaes e um acréscimo no número de exemplares que passaram por 6, além de um ínstar adicional nas concentrações de 0,25 e 1,00 mg/mL.



**Figura 24.** Percentual de lagartas de *S. frugiperda* que passaram por 4, 5, 6 ou 7 ínstaes em dieta artificial acrescida de três concentrações de extrato diclorometânico de *S. sisymbriifolium*.

Se preconiza uma sobrevivência dos insetos em torno de 70% quando criados em dieta artificial (Singh, 1977), sendo que no presente trabalho todos os valores de sobrevivência encontrados no controle foram superiores a esta taxa, desta forma evidencia-se claramente o efeito do extrato diclororometânico sobre a sobrevivência de *S. frugiperda* (Figura 25).



**Figura 25.** Sobrevivência larval, pupal e total corrigida (Abbott, 1925) de *S. frugiperda*, alimentadas com extrato diclorometânico de *S. sisymbriifolium*.

As lagartas alimentadas com dieta artificial acrescida de extrato diclorometânico apresentaram percentuais de sobrevivência larval relativamente altos em todas as concentrações: 84,85% (0,25 mg/mL) 64,62% (1,00 mg/mL) e 74,89% (2,50 mg/mL).

A sobrevivência pupal variou entre 100% (0,25 mg/mL), 74,07% (1,00 mg/mL) e 51,07% (2,50 mg/mL), verificando-se, desta forma, que o extrato diclorometânico teve menor efeito sobre a fase larval e efeito mais acentuado sobre as pupas, na maior concentração testada (2,50 mg/mL).

Considerando-se os dados da sobrevivência larval e pupal obteve-se a total de 84,85% (0,25 mg/mL), 47,86% (1,00 mg/mL) e 38,25% (2,50 mg/mL), observando-se um acentuado efeito de mortalidade associado ao aumento da dose, demonstrando o potencial de atividade biológica deste extrato.

A sobrevivência larval de *S. frugiperda* quando exposta ao extrato diclorometânico de *S. sisymbriifolium* foi superior a 40%. Em estudos com *S. nigrum* observou-se que em presença

do extrato diclorometano, a porcentagem de sobrevivência de *S. frugiperda* foi também superior a 40% nas concentrações de 1,00 mg/mL, 2,50 e 5,00 mg/mL (Lizarazo *et al.* 2008).

Os compostos do extrato diclorometânico que não fazem parte da fração de ésteres de açúcares presentes neste extrato não foram estudados quimicamente, avaliando-se somente a atividade dos ésteres de açúcares secretados por tricomas.

Tabela 4: Avaliação dos parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* com larvas alimentadas com adição do extrato diclorometânico na dieta artificial.

Parâmetros biológicos	Controle	Concentrações de extrato adicionadas na dieta		
		0,25 mg/mL	1,00 mg/mL	2,5mg/mL
N	46	45	27	25
Duração larval (dias)	20,39 ± 1,87 <sup>a</sup>	19,66 ± 1,75 <sup>a</sup>	23,74 ± 2,47 <sup>b</sup>	23,50 ± 2,47 <sup>b</sup>
Duração pupal (dias)	13,40 ± 1,58 <sup>a</sup>	13,14 ± 1,54 <sup>a</sup>	13,25 ± 1,68 <sup>a</sup>	13,66 ± 0,52 <sup>a</sup>
Peso pupal (mg)	0,2278 ± 0,024 <sup>a</sup>	0,2244 ± 0,028 <sup>a</sup>	0,2339 ± 0,028 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,03 <sup>b</sup>
Comprimento pupal (mm)	16,557 ± 0,917 <sup>a</sup>	16,352 ± 0,763 <sup>a</sup>	16,634 ± 1,167 <sup>a</sup>	17,07 ± 0,63 <sup>b</sup>
Comprimento asa (mm)	15,951 ± 0,830 <sup>a</sup>	15,959 ± 0,95 <sup>a</sup>	15,865 ± 1,042 <sup>a</sup>	16,39 ± 0,65 <sup>a</sup>

\*Médias seguidas pela mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P ≤ 0,5).

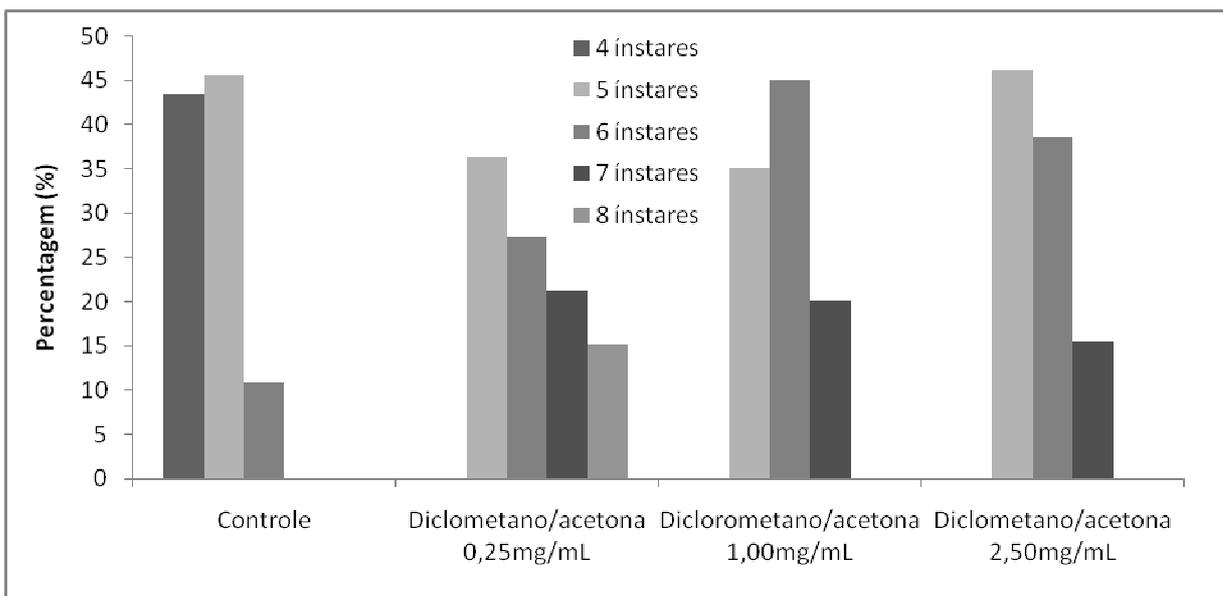
A duração do período larval prolongou-se significativamente de 20,39 dias para 23,74 e 23,50 nos tratamentos com as concentrações de 1,00 mg/mL e 2,50 mg/mL, com adição do extrato diclorometânico, respectivamente (Tabela 4). Entretanto, o mesmo efeito não foi observado sobre a duração pupal. As pupas provenientes de larvas alimentadas com dieta acrescida de 2,5mg/mL de extrato apresentaram peso e comprimento significativamente maior que nas demais concentrações testadas, as larvas tiveram um aumento do período larval de 3,74 dias o que também se confirma pelo aumento do comprimento pupal.

O alongamento da fase larval e maior mortalidade de *S. frugiperda* também foram observados com extratos brutos de *Terminalia argentea* Mart & Zucc (Combretaceae) (Rodrigues *et al.* 2008). Estes resultados podem estar associados ao maior número de ínstaes efetuados pelas lagartas nos tratamento, uma vez que em condições desfavoráveis o inseto tende a aumentar o número de ínstaes (Parra *et al.* 2001).

Com aumento do número de ínstaes ocorre alongamento do período larval, diminuindo o número de gerações dos insetos durante a safra, acarretando diminuição de danos nas culturas afetadas e conseqüentemente a redução do uso de produtos para o controle desta praga.

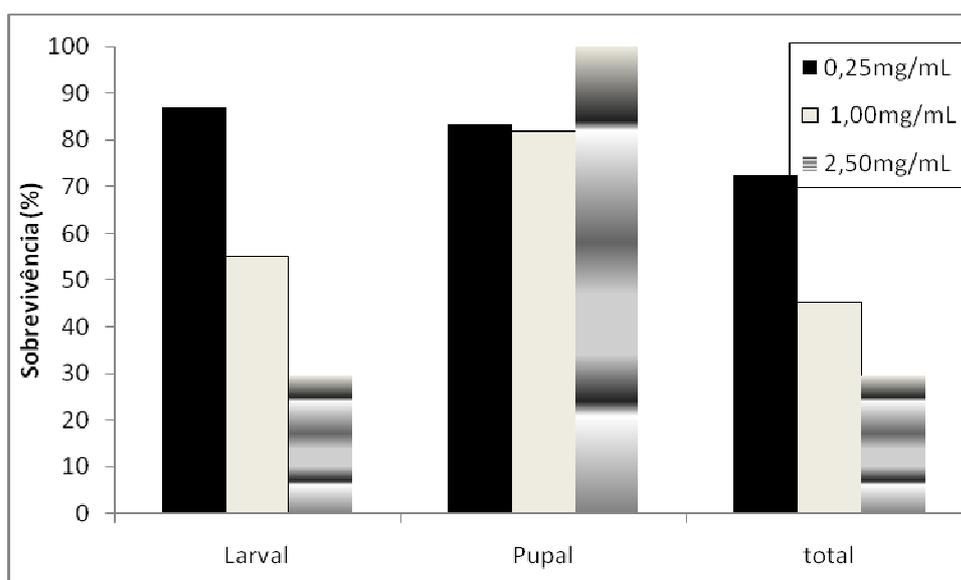
#### **5.1.2 Atividade biológica do extrato diclorometano/acetona de *S. sisymbriifolium* sobre *S. frugiperda***

O desenvolvimento de *S. frugiperda* alimentada com dieta acrescida de extrato diclorometano/acetona de *S. sisymbriifolium* nas concentrações 0,25, 1,00 e 2,50 mg/mL foi afetado, como pode ser observado pelos percentuais de larvas que passaram por diferentes ínstaes (Figura 26). As lagartas nos tratamentos passaram por cinco ou até oito ínstaes, enquanto que a maioria do controle passou por quatro ou cinco, e poucos por seis.



**Figura 26.** Percentual de lagartas de *S. frugiperda* que passaram por 4, 5, 6, 7 ou 8 ínstaes em dieta artificial acrescida de extrato diclorometano/acetona de *S. sisymbriifolium*.

O extrato diclorometano/acetona afetou mais a sobrevivência larval do que a pupal (Figura 27). Os percentuais de sobrevivência larval foram de 86,69 (0,25 mg/mL), 55,08 (1,00 mg/mL) e 29,43% (2,50 mg/mL) e de sobrevivência pupal de 83,33 (0,25 mg/mL), 81,82 (1,00 mg/mL) e 100% (2,5 mg/mL).



**Figura 27.** Sobrevivência larval, pupal e total de *S. frugiperda*, alimentadas com

extrato diclorometano/acetona de *S. sisymbriifolium*.

Em relação à sobrevivência total (larval + pupal) observaram-se percentuais de 72,41% (0,25 mg/mL), 45,07% (1,00 mg/mL) e 29,43% (2,50 mg/mL). A adição de extrato diclorometano/acetona, o qual esta composto principalmente de ésteres de açúcares, induziu uma diminuição na sobrevivência total em função da concentração, sendo a mais efetiva na concentração de 2,50 mg/mL.

Essa diminuição na sobrevivência dos insetos pode ser relacionada aos compostos presentes em tricomas glandulares tipo (IV), que são isolados como constituintes das ceras e posteriormente purificados neste extrato diclorometano/acetona, avaliado no presente estudo. Estes compostos já tem sido reportados na literatura apresentando bioatividade contra insetos e fungos (Neal *et al.* 1994; Buta *et al.* 1993; Yencho *et al.* 1994; Dutra *et al.* 2008).

Em relação aos efeitos causados por ésteres, encontra-se na literatura dados referentes a ação de frações de ésteres de sacarose de *Nicotina gossei*, sobre diferentes insetos mostrando atividade contra a mosca branca *Trialeurodes vaporariorum*, comparável a dos inseticidas comerciais e do Neen (Neal *et al.* 1994).

Tabela 5: Parâmetros biológicos de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial adicionada com três concentrações de extrato diclometano/acetona de *S. sisymbriifolium*.

Parâmetros biológicos	Controle	Concentrações de extrato adicionadas na dieta		
		0,25 mg/mL	1,00 mg/mL	2,5mg/mL
N	48	33	20	13
Duração larval (dias)	20,20 ± 3,03 <sup>a</sup>	20,39 ± 4,01 <sup>a</sup>	20,85 ± 2,27 <sup>a</sup>	21,15 ± 2,11 <sup>a</sup>
Duração pupal (dias)	13,12 ± 1,20 <sup>a</sup>	13,85 ± 1,64 <sup>a</sup>	13,75 ± 1,23 <sup>a</sup>	12,81 ± 1,88 <sup>a</sup>
Peso pupal (mg)	0,2244 ± 0,038 <sup>a</sup>	0,2318 ± 0,034 <sup>a</sup>	0,2408 ± 0,032 <sup>a</sup>	0,2482 ± 0,026 <sup>a</sup>
Comprimento pupal (mm)	16,349 ± 1,111 <sup>a</sup>	16,189 ± 0,820 <sup>a</sup>	16,797 ± 0,827 <sup>a</sup>	16,575 ± 0,962 <sup>a</sup>
Comprimento asa (mm)	16,150 ± 0,845 <sup>a</sup>	15,857 ± ,617 <sup>a</sup>	16,045 ± 0,909 <sup>a</sup>	16,095 ± 0,946 <sup>a</sup>

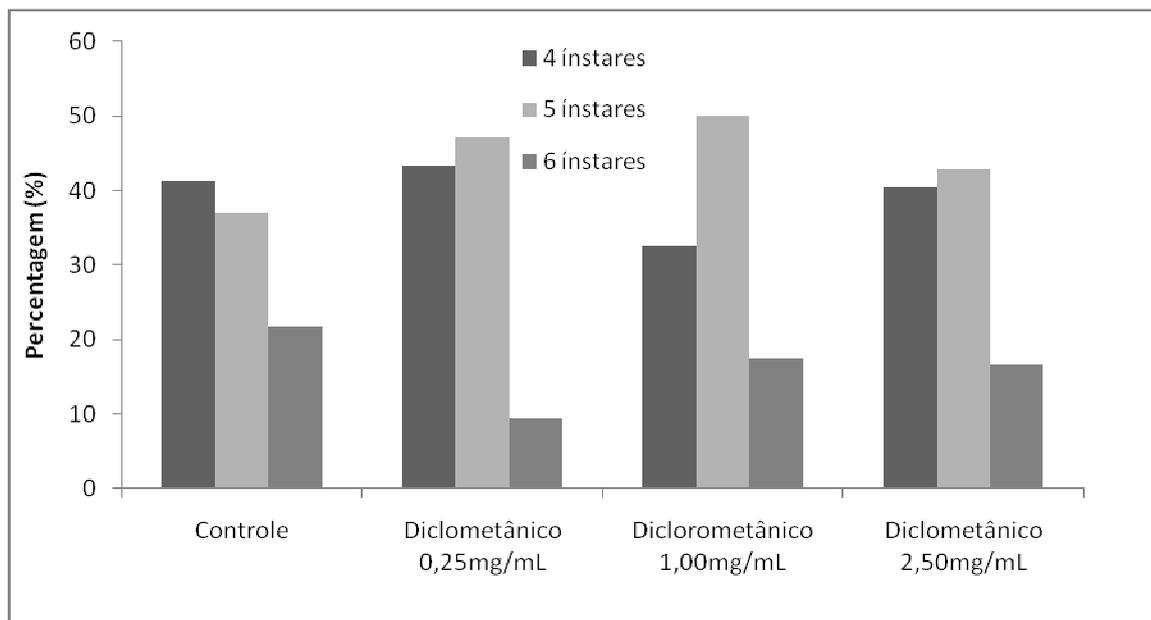
\*Médias seguidas pela mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,5$ ).

Os parâmetros biológicos como duração larval e pupal, peso e comprimento pupal e tamanho da asa dos adultos não variaram significativamente entre os tratamentos (Tabela 5).

## 5.2 Atividade biológica dos extratos diclorometânico e diclorometano/acetona de *S. bonariense*

### 5.2.1 Extrato diclorometânico de *S. bonariense* sobre *S. frugiperda*

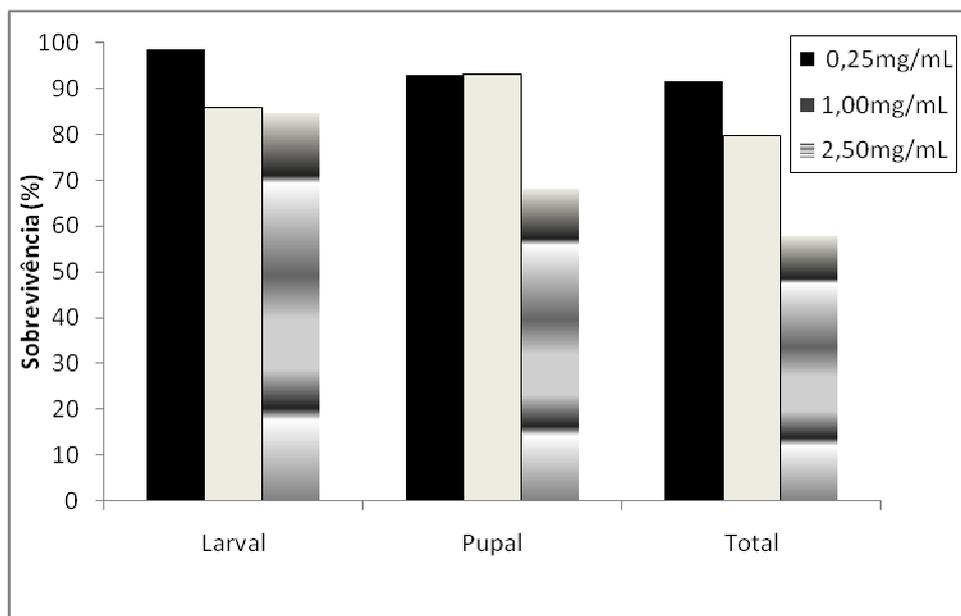
A adição de extrato diclorometânico de *S. bonariense* nas concentrações 0,25, 1,00 e 2,50 mg/mL não afetou o desenvolvimento de *S. frugiperda*, como demonstrado pelos percentuais de larvas que passaram por diferentes ínstares larvais (Figura 28). Observa-se que nos tratamentos a grande maioria das lagartas realizou 6 ínstares e em menor quantidade o 5º ínstar.



**Figura 28.** Percentual de lagartas de *S. frugiperda* que passaram por 4, 5 e 6 ínstaes em dieta artificial acrescida de extrato diclorometânico de *S. bonariense* .

O extrato diclorometânico afetou minimamente a sobrevivência larval e pupal de *S. frugiperda* (Figura 29). Os percentuais de sobrevivência larval foram de 98,50 (0,25 mg/mL), 85,71 (1,00 mg/mL) e 84,70% (2,50 mg/mL) e de sobrevivência pupal de 92,82 (0,25 mg/mL), 93,00 (1,00 mg/mL) e 68,17% (2,50 mg/mL).

Em relação à sobrevivência total (larval + pupal) observaram-se percentuais de 91,43% (0,25 mg/mL), 79,11% (1,00 mg/mL) e 57,74% (2,50 mg/mL). A concentração 0,25 mg/mL praticamente não afetou a sobrevivência total do inseto porém, as concentrações 1,00 e 2,5 mg/mL ocasionaram efeito moderado na sobrevivência pupal e total.



**Figura 29.** Sobrevivência larval, pupal e total de *S. frugiperda*, alimentadas com dieta acrescida de extrato diclorometânico de *S. bonariense*.

Em ensaios utilizando extratos acetônicos de plantas do mesmo gênero (*S.villosum*) observou-se sobrevivência larval em torno de 93,33 e 96,67% do vetor da dengue *S. aegypti* (Chowdhury *et al.* 2008).

Exudatos dos tricomas glandulares tipo IV de *D. wrightii* contém misturas de ésteres de açúcares que reduzem significativamente a taxa de desenvolvimento de larvas de *Manduca sexta*. Análises com GC-MS mostraram que o ácido hexanóico foi o mais abundante (57%), seguido de heptanóico (19%), nonanóico (13%), e octanóico (9%). O ácido pentanóico foi o composto em menor quantidade (2%), e a análise de GC-MS mostra que este extrato contém 13 picos de ésteres de açúcares (van Dam & Hare, 1998). Acilaçúcares de *D. wrightii* não causaram mortalidade sigificativa em nenhuma das três espécies avaliadas de coleópteros: *E. hirtipennis*, *T. compacta* e *L. daturaphila* (Hare, 2005).

Tabela 6: Parâmetros biológicos de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial adicionada com três concentrações de extrato diclometânico de *S. bonariense*.

Parâmetros biológicos	Controle	Concentrações de extrato adicionadas na dieta		
		0,25 mg/mL	1,00 mg/mL	2,5mg/mL
N	46	53	40	42
Duração larval (dias)	20,76 ± 2,1 <sup>a</sup>	21,08 ± 1,72 <sup>a</sup>	23,35 ± 3,22 <sup>b</sup>	24,07 ± 3,02 <sup>b</sup>
Duração pupal (dias)	9,35 ± 4,53 <sup>a</sup>	10,58 ± 2,97 <sup>a</sup>	10,1 ± 4,07 <sup>a</sup>	7,33 ± 5,69 <sup>b</sup>
Peso pupal (mg)	0,2102 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,2189 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,2195 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,2055 ± 0,04 <sup>a</sup>
Comprimento pupal (mm)	16,17 ± 0,86 <sup>a</sup>	16,10 ± 1,08 <sup>a</sup>	16,462 ± 0,88 <sup>a</sup>	16,124 ± 1,18 <sup>a</sup>
Comprimento asa (mm)	15,319 ± 0,97 <sup>a</sup>	15,71 ± 0,648 <sup>a</sup>	15,742 ± 1,128 <sup>a</sup>	15,668 ± 1,045 <sup>a</sup>

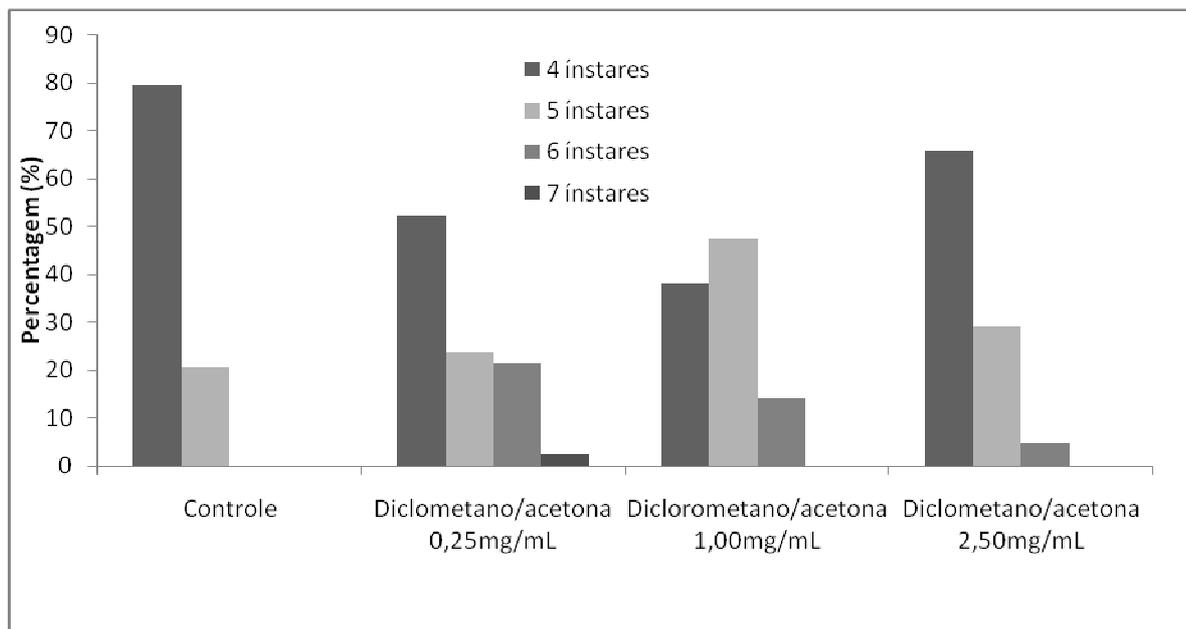
\*Médias seguidas pela mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,5$ ).

Com a adição do extrato diclorometânico à dieta artificial, a duração do período larval prolongou-se significativamente de 20,76 dias para 23,35 e 24,07 nas concentrações 1,00 mg/mL e 2,50 mg/mL. Em relação à duração pupal observou-se uma diminuição no período de desenvolvimento na concentração 2,50 mg/mL. Os parâmetros avaliados como peso e comprimento pupal e tamanho da asa dos adultos não variaram significativamente entre os tratamentos (Tabela 6).

### 5.2.2 Extrato diclorometano/acetona de *S. bonariense* sobre *S. frugiperda*

A adição de extrato diclorometano/acetona de *S. bonariens* nas concentrações 0,25, 1,00 e 2,50 mg/mL afetou o desenvolvimento de *S. frugiperda*, como pode ser observado pelos percentuais de larvas que passaram por 4, 5, 6 ou 7 ínstaes (Figura 30). No controle as larvas passaram por 4 ou 5 ínstaes. Nos tratamentos houve um acréscimo no número de exemplares que passaram por 6 e 7, além de um ínstar adicional na concentração de 0,25

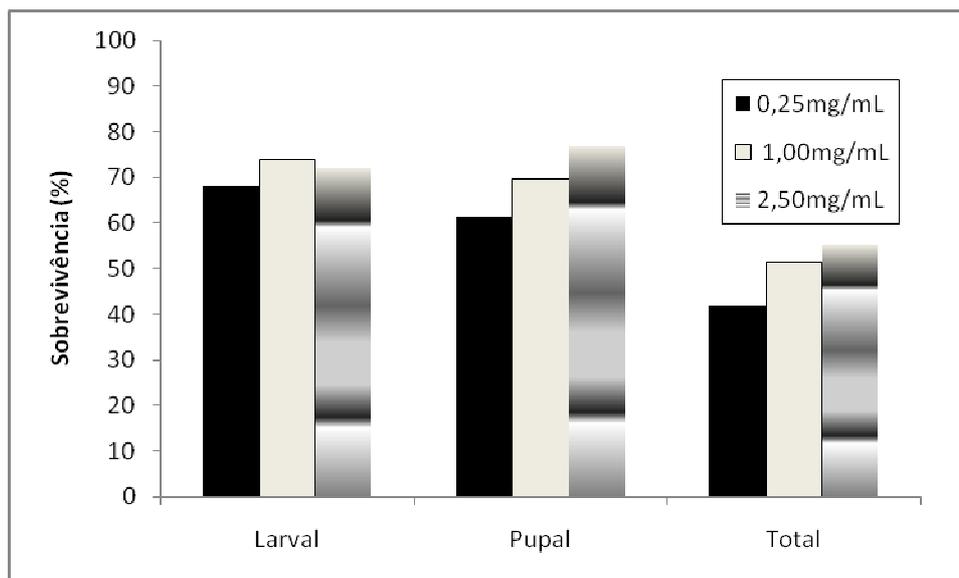
mg/mL.



**Figura 30.** Percentual de lagartas de *S. frugiperda* que passaram por 4, 5 , 6 e 7 ínstaes em dieta artificial acrescida de extrato diclorometano/acetona de *S. bonariense*

Os percentuais de sobrevivência larval foram de 68,11(0,25 mg/mL), 73,91 (1,00 mg/mL) e 72,05% (2,50 mg/mL) e de sobrevivência pupal de 61,53 (0,25 mg/mL), 69,76 (1,00 mg/mL) e 76,74% (2,50 mg/mL) (Figura 31). Em relação a sobrevivência total (larval + pupal) observaram-se percentuais de 41,91% (0,25 mg/mL), 51,56% (1,00 mg/mL) e 55,29% (2,50 mg/mL).

A sobrevivência larval de *S. frugiperda* varia pouco nas diferentes concentrações avaliadas, entretanto, quando se observa a sobrevivência pupal e total (larvas + pupas), verifica-se aumento conforme a concentração. Se os compostos são tóxicos, o resultado esperado seria uma relação inversa entre a concentração testada e a sobrevivência da lagarta, mas não é o observado para este extrato.



**Figura 31.** Sobrevivência larval, pupal e total de *S. frugiperda*, alimentadas com extrato diclorometano/acetona de *S. bonariense*.

Estudos descritos na literatura relatam a bioatividade de *S. bonariense* sobre *Trilobium cataneum* (Coleoptera:Tenebrionidae), sendo que o extrato acetônico avaliado sobre as larvas causou uma mortalidade de 78,7% com aplicação tópica (Pascual-Villalobos & Robledo, 1999). No presente estudo verificou-se menor efeito sobre a mortalidade, sendo a sobrevivência total de *S. frugiperda* menos afetada com o extrato diclorometano/acetona de *S. bonariense*. A alta sobrevivência se deve provavelmente a baixa presença de tricomas glandulares tipo B que possivelmente estão presentes em baixa quantidade ou são inexistentes nesta espécie.



**Figura 32.** Adulto normal e adulto defeituoso de *S. frugiperda*, alimentado com dieta artificial (Controle) e dieta artificial acrescida de extrato diclorometano/acetona de *S. bonariense* (0,25 mg/mL).

A presença de adultos defeituosos foi observada na menor concentração avaliada 0,25 mg/mL (Figura 32), verificou-se que a menor concentração teve mais efeito na sobrevivência total. Esse tipo de resultado foi observado por Argadonã, *et al.* (1983) em *Schizaphis graminum* alimentados com dieta artificial acrescida de diferentes concentrações de DIMBOA (2,4 dihidroxi-7metoxi -1,4 benzoxazin-3-ona), sugerindo que o composto foi ingerido inadvertidamente pelos afídios causando efeitos tóxicos, e nas concentrações maiores o composto era percebido e rejeitado.

Tabela 7: Parâmetros biológicos de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial adicionada com três concentrações de extrato diclometano/acetona de *S. bonariense*.

Parâmetros biológicos	Controle	Concentrações de extrato adicionadas na dieta		
		0,25 mg/mL	1,00 mg/mL	2,5mg/mL
N	39	42	42	41
Duração larval (dias)	19,41 ±3,65 <sup>a</sup>	20,23 ± 2,18 <sup>a</sup>	19,45 ±1,88 <sup>a</sup>	19,79 ±1,81 <sup>a</sup>
Duração pupal (dias)	12,65 ± 1,87 <sup>a</sup>	13,06 ± 2,04 <sup>a</sup>	12,67±1,78 <sup>a</sup>	12,68 ±1,86 <sup>a</sup>
Peso pupal (mg)	0,2467 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,2296 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,2519 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,2390 ± 0,02 <sup>ab</sup>
Comprimento pupal (mm)	16,88 ± 1,00 <sup>a</sup>	16,62 ± 1,03 <sup>a</sup>	16,96 ± 0,91 <sup>a</sup>	16,79 ± 0,89 <sup>a</sup>
Comprimento asa (mm)	15,945 ±1,036 <sup>a</sup>	15,446 ± 0,970 <sup>a</sup>	16,03 ± 1,011 <sup>a</sup>	15,59 ±0,801 <sup>a</sup>

\*Médias seguidas pela mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,5$ ).

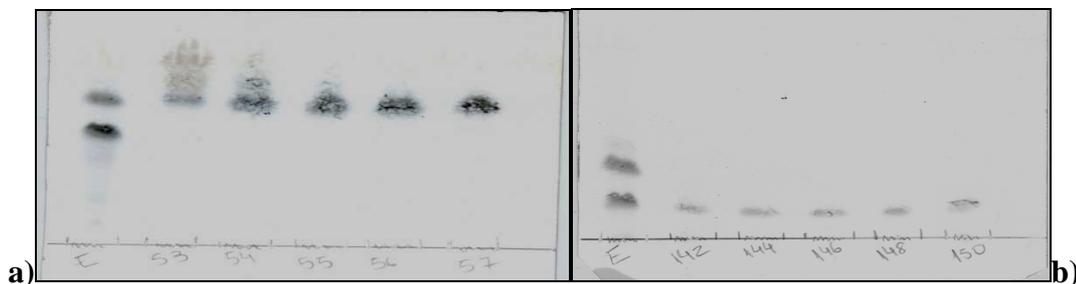
Dentre os parâmetros avaliados com o extrato diclorometano/acetona (Tabela 7), o peso pupal na concentração 1,00 mg/mL foi maior que nas demais concentrações testadas diferindo estatisticamente da menor concentração (0,25 mg/mL).

### 5.3 Atividade biológica dos compostos majoritários I e II (ésteres de açúcares) isolados de *S. sisymbriifolium*

O desenvolvimento de novas técnicas nas últimas décadas facilitou o isolamento e caracterização de diversos constituintes bioativos e a avaliação de sua eficiência biológica. Desta forma, selecionou-se o extrato diclorometano/acetona da espécie *S. sisymbriifolium* pelos resultados observados onde na maior concentração avaliada 2,5 mg/mL a sobrevivência total foi de 29,43%, demonstrando o potencial bioativo deste extrato sobre a fase larval de *S. frugiperda*.

Os dois compostos majoritários de ésteres de açúcares isolados da espécie *S.*

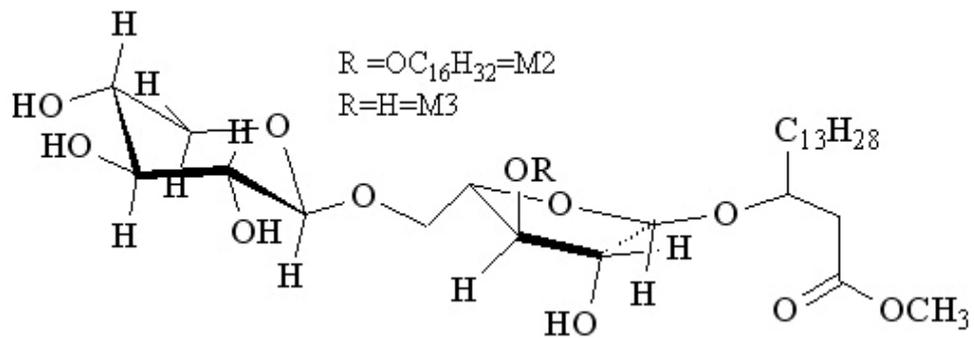
*sisymbriifolium* por coluna de sílica gel, foram identificados e revelados CCD e podem ser visualizados na Figura 33.



**Figura 33.** Cromatografia de Camada Delgada para identificação dos compostos majoritários (ésteres de açúcar) a) I; b) II.

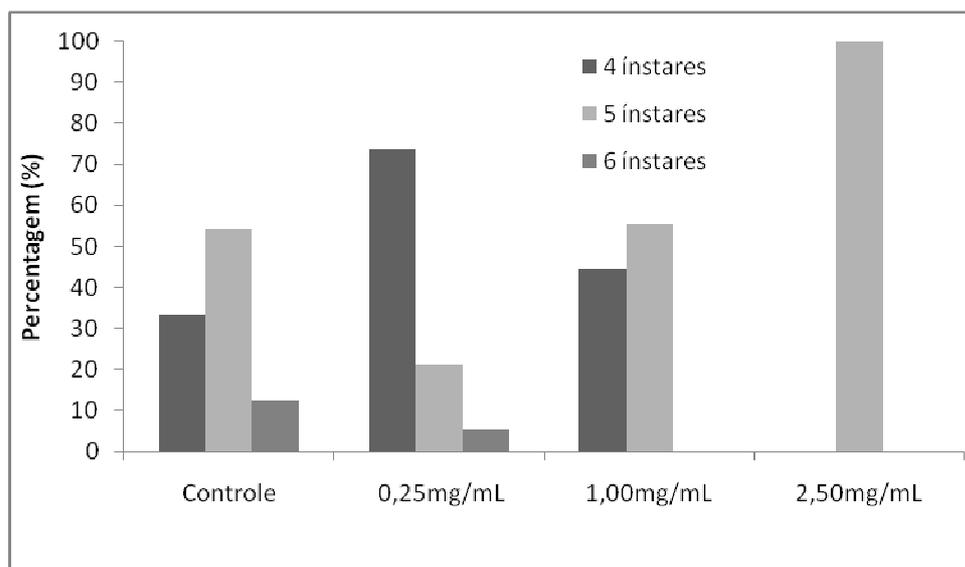
As estruturas dos compostos foram estudadas por RMN e Cromatografia, como foi descrita no item 4.3.1.1. Os compostos majoritários I e II diferiram em sua porcentagem de acilação, sendo o mais polar o menos esterificado dos dois.

Em trabalhos prévios realizados por Cesio *et al.* (2006) foram descritos os ácidos graxos e as posições de união dos açúcares assim como as acilações e glicosidação por RMN, indicando desta forma que provavelmente são as mesmas estruturas encontradas no presente estudo, ou seja, ésteres de dissacarídeos de xilose e arabinose esterificados por ácidos graxos. Estes ácidos graxos foram estudados, após serem metilados por GC identificando-se majoritariamente ácido palmítico, com a particularidade de apresentar também o ácido 3-hidroxi palmítico formando um glicosídeo em C 1 de arabinose que compõe o dissacarídeo (Figura 34).



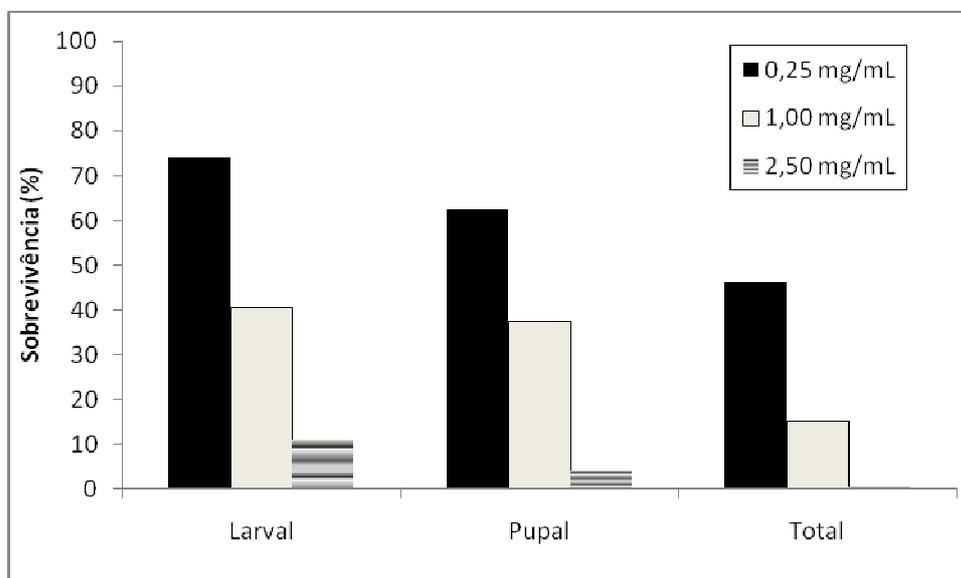
**Figura 34.** Estrutura química de um éster isolado de *S. sisymbriifolium*

Nos estudos sobre a atividade biológica dos compostos por meio de bioensaios realizados com dieta artificial acrescida dos compostos, observou-se que o composto I de *S. sisymbriifolium* nas concentrações de 0,25, 1,00 e 2,50 mg/mL afetou o desenvolvimento de *S. frugiperda*, demonstrando através dos percentuais de larvas que passaram por 4, 5 e 6 ínstaes larvais (Figura 35). Em todos os tratamentos os percentuais de lagartas que passaram por 4,5 e 6 ínstaes diferiram entre si e com o controle, indicando que o composto testado afeta o desenvolvimento desta espécie.



**Figura 35.** Percentual de lagartas de *S. frugiperda* que passaram por 4, 5 e 6 ínstaes em dieta artificial acrescida do composto majoritário I de *S. sisymbriifolium*

Os percentuais de sobrevivência larval foram de 74,07 (0,25 mg/mL), 40,74 (1,00 mg/mL) e 11,11% (2,5 mg/mL) e de sobrevivência pupal de 62,5 (0,25 mg/mL), 37,5 (1,00 mg/mL) e 4,16% (2,5 mg/mL) (Figura 36).



**Figura 36.** Sobrevivência larval, pupal e total de *S. frugiperda*, alimentadas com dieta artificial acrescida do composto majoritário I isolado do extrato de *S. sisymbriifolium*.

A baixa taxa de sobrevivência pode estar relacionada a alimentação de *S. frugiperda* que além de ser polífaga necessita de grandes quantidades de alimento para o seu desenvolvimento até chegar no estágio adulto. Não há evidência da toxicidade aguda dos ésteres de açúcares aos insetos, sendo que, a ingestão pode ser requisito para a toxicidade destes compostos (Neal *et al.* 1990). A baixa sobrevivência está relacionada com o composto isolado adicionado a dieta artificial, pois observou-se que quando utilizou-se o extrato bruto os percentuais de sobrevivência foram 72,41% (0,25mg/mL), 45,07% (1,00 mg/mL) e 29,43% (2,50 mg/mL).

No presente trabalho verificou-se que os exudatos dos tricomas glandulares (ésteres de açúcares) isolados de *S. sisymbriifolium* foram tóxicos sobre *S. frugiperda*, diferindo dos

resultados encontrados com exudatos dos tricomas glandulares tipo B de *S. berthaultii* avaliados sobre o pulgão verde do pêssego *Myzus persicae*, os quais apresentaram apenas efeito deterrente alimentar (Neal *et al.* 1990).

Em relação a sobrevivência total (larval + pupal) observaram-se percentuais de 46,29% (0,25 mg/mL), 15,27% (1,00 mg/mL) e 0,46% (2,5 mg/mL). Estes ésteres de açúcares demonstraram toxicidade nas três concentrações avaliadas, especialmente na maior concentração.

A toxicidade de ésteres de açúcar também foi observada com a utilização de frações isoladas de *N. gossei* sobre a mosca branca *Bemisia tabaci*. Com o extrato bruto com (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) observou-se 100% de mortalidade de *T. vaporariorum* no início do primeiro ínstar, e 99% de mortalidade de *M. persicae* no último ínstar (Neal *et al.* 1994).

Em relação à ação de ésteres de açúcares há relato de que a mistura de quatro ésteres de sacarose de *N. gossei* ocasionou 73% de mortalidade das ninfas de *T. vaporariorum* e compostos individuais causaram mortalidade de 94 a 96% destes insetos. As estruturas das frações foram identificadas como A (2,3-di-*O*-acil-6'-acetilsacarose onde os grupos acila são 5-metilhexanoil e 5-metilheptanoil), B (2,3-di-*O* (5-metilheptanoil)-6'-*O*-acetilsacarose) C (2,3-di-*O*-acil-1',6'-*O*-diacetil onde os grupos acila são 5-metilhexanoil e 5-metilheptanoil) e D (2,3-di-*O*-(5-metilheptanoil)-1',6'-*O*-diacetilsacarose (Buta *et al.* 2003).

Tabela 8: Parâmetros biológicos de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial adicionada com três concentrações do composto majoritário I de *S. sisymbriifolium*.

Parâmetros biológicos	Controle	Concentrações de extrato adicionadas na dieta		
		0,25 mg/mL	1mg/mL	2,5mg/mL
N	24	19	7	3
Duração larval (dias)	18,50 ± 1,53 <sup>a</sup>	20,36 ± 1,25 <sup>ab</sup>	19,71 ± 1,60 <sup>ab</sup>	21,00 ± 0 <sup>b</sup>
Duração pupal (dias)	10,45 ± 3,37 <sup>a</sup>	9,21 ± 5,07 <sup>a</sup>	7,85 ± 5,36 <sup>b</sup>	7,33 ± 6,35 <sup>b</sup>
Peso pupal (mg)	0,2747 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,2612 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,2451 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,2787 ± 0,09 <sup>a</sup>
Comprimento pupal (mm)	17,43 ± 0,86 <sup>a</sup>	17,15 ± 0,82 <sup>a</sup>	16,55 ± 0,99 <sup>a</sup>	18,14 ± 0,34 <sup>a</sup>
Comprimento asa (mm)	15,96 ± 3,48 <sup>a</sup>	16,51 ± 0,72 <sup>a</sup>	16,49 ± 1,06 <sup>a</sup>	16,34 ± 0 <sup>a</sup>

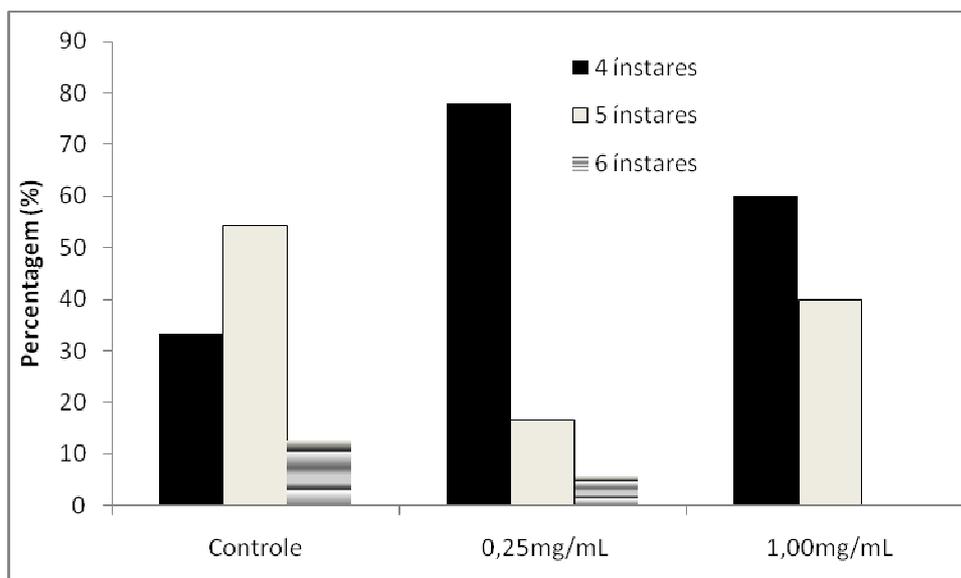
\*Médias seguidas pela mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,5$ ).

Observou-se que houve um alongamento do período da fase larval para 21 dias na maior concentração testada (2,50 mg/mL) em comparação com o controle (18,50 dias) bem como diminuição da duração pupal de 10,45 dias para 7,85 e 7,33 dias nas concentrações 1,00 e 2,50 mg/mL, respectivamente, verificando-se diferença significativa na diminuição do peso pupal na concentração de 1 mg/mL (Tabela 8).

A baixa sobrevivência na fase larval revela o potencial de controle deste composto majoritário I isolado de *S. sisymbriifolium*, sendo que em condições de campo, o alongamento juntamente com a baixa viabilidade da fase larval é importante uma vez que permitirá o aumento do tempo de exposição da praga aos inimigos naturais, bem como o tempo médio de cada geração, reduzindo desta forma o crescimento populacional e consequentemente o das populações subsequentes (Maroneze *et al.* 2007).

Em relação ao composto majoritário II (0,25 e 1,00 mg/mL), observou-se que os percentuais de lagartas que passaram por 4,5 e 6 ínstars diferiram entre si em cada concentração em relação ao controle, indicando a interferência do composto testado no

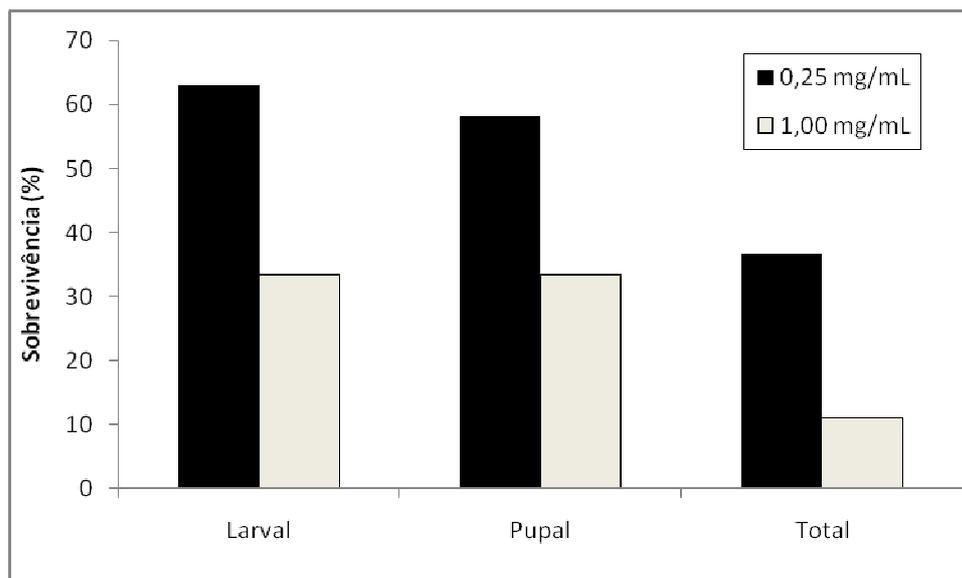
desenvolvimento desta espécie. Na concentração 0,25 mg/mL as lagartas apresentaram, em maior quantidade, o 4º instar, e com a concentração 1,00 mg/mL observou-se somente o 4º e 5º instar, estando o 6º ausente (Figura 37).



**Figura 37.** Percentual de lagartas de *S. frugiperda* que passaram por 4, 5 e 6 instares em dieta artificial acrescida do composto majoritário II de *S. sisymbriifolium*

Os percentuais de sobrevivência larval foram de 62,96 (0,25 mg/mL) e 33,33 (1,00 mg/mL) e de sobrevivência pupal de 58,33 (0,25 mg/mL) e 33,33 (1,00 mg/mL) (Figura 38). Em relação à sobrevivência total (larval + pupal) observaram-se percentuais de 36,72% (0,25 mg/mL) e 11,11% (1,00 mg/mL).

No presente trabalho verificou-se maior atividade dos compostos isolados em comparação com o extrato bruto. O fracionamento para isolamento dos compostos pode resultar em alíquotas que possuam maior atividade do que o extrato bruto (Houghton *et al.* 2007).



**Figura 38.** Sobrevivência larval, pupal e total de *S. frugiperda*, alimentadas com dieta artificial acrescida do composto majoritário II isolado do extrato de *S. sisymbriifolium*.

Os resultados indicam que a baixa sobrevivência total está associada ao composto utilizado puro na alimentação de *S. frugiperda*. Desta forma, a identificação dos compostos após comprovação de sua efetividade no controle de *S. frugiperda* é importante, pois possibilitará a síntese do composto para viabilizar sua utilização como agente de controle de pragas em programas de manejo integrado.

Tabela 9: Parâmetros biológicos de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial adicionada com três concentrações do composto majoritário I I de *S.sisymbriifolium*.

Parâmetros biológicos	Controle	Concentrações de extrato adicionadas na dieta	
		0,25mg/mL	1mg/mL
N	24	18	5
Duração larval (dias)	18,50±1,53 <sup>a</sup>	19,50 ±1,15 <sup>a</sup>	19,60±1,51 <sup>a</sup>
Duração pupal (dias)	10,45 ± 3,37 <sup>a</sup>	10,72 ±4,34 <sup>a</sup>	10,40±5,94 <sup>a</sup>
Peso pupal (mg)	0,2747 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,2509 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,2779 ± 0,08 <sup>a</sup>
Comprimento pupal (mm)	17,43 ± 0,86 <sup>a</sup>	16,89 ± 0,64 <sup>a</sup>	17,66 ± 2,63 <sup>a</sup>
Comprimento asa (mm)	15,96 ±3,48 <sup>a</sup>	14,29 ± 5,22 <sup>a</sup>	16,23 ± 0,83 <sup>a</sup>

\*Médias seguidas pela mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,5$ ).

O menor peso pupal foi observado na concentração 0,25 mg/mL (Tabela 9), sendo que os demais parâmetros avaliados não diferiram estatisticamente.

Com a adição dos compostos majoritários I e II isolados de *S. sisymbriifolium* à dieta artificial verificou-se efeito na metamorfose dos insetos, sendo que a maioria das lagartas expostas às maiores concentrações não conseguiu realizar a transformação para o estágio de pupa. Com o composto I, as taxas de mortalidade dos insetos no processo de metamorfose foram de 26,66% (1,00 mg/mL) e 53,33% (2,50 mg/mL) (Figura 39).

Em relação ao composto II, as taxas de mortalidade dos insetos no processo de metamorfose foram de 16,66% (0,25 mg/mL) e 50% (1,00 mg/mL) (Figura 40).



**Figura 39.** Anormalidades encontradas em *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial adicionada do composto majoritário I (2,50 mg/mL) no processo de metamorfose.



**Figura 40.** Anormalidades na fase larval de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial adicionada do composto majoritário II (0,25 mg/mL e 1,00 mg/mL).

Os efeitos causados pelos compostos majoritários I e II (ésteres de açúcar) isolados do extrato diclorometano/acetona de *S. sisymbriifolium* foram deletérios ao desenvolvimento de *S. frugiperda*. Anormalidades resultando em interrupção do processo de metamorfose, principalmente em lepidópteros durante o estágio imaturo já foi verificado com o uso do produto químico denominado lefenuron que é uma benzenoilfenuréia potente, que age como regulador do crescimento em insetos (Cohen, 2001). A azadiractina obtida da *Azadirachta indica* conhecida como neem, afetou a muda induzindo uma ampla variedade de anomalias

em *S. littoralis*. Muitas lagartas morrem durante a ecdise sem conseguir liberar totalmente a exúvia e fazer a metamorfose, pois este aleloquímico promove alterações no sistema neurosecretor perturbando o regulamento do ecdiesteróide (Martinez & van Emden, 2001).

A atividade biológica dos compostos majoritários isolados (ésteres de açúcares) sobre a sobrevivência e desenvolvimento de *S. frugiperda* mostrou que os mesmos foram mais tóxicos que os extratos brutos avaliados, ocasionando anomalias nos insetos. Pode-se, portanto, afirmar que esta atividade se deve aos ésteres de açúcares, devido ao aumento da bioatividade destes compostos puros.

Estes compostos apresentam potencialidade bioinseticida para o controle desta praga com grande importância agrícola, entretanto, trabalhos mais aprofundados são necessários para identificar o modo de ação destes compostos majoritários I e II (ésteres de açúcares) em *S. frugiperda*.

## 6. DISCUSSÃO GERAL

Durante o período de desenvolvimento deste estudo, observaram-se os efeitos de três espécies de *Solanum* sobre insetos pertencentes a duas ordens de insetos: *C. brevis* (cupim-de-madeira-seca) e *S. frugiperda*. O conhecimento da biologia desses insetos e sua susceptibilidade aos compostos são fundamentais para o seu controle. Este trabalho tem relevância, pois não existem registros das espécies de *Solanum* utilizadas no controle destas duas pragas. Alguns aspectos ainda não estudados foram incluídos neste estudo, como os efeitos dos compostos isolados (ésteres de açúcares) sobre a duração dos ínstar larvais e as anomalias físicas às lagartas.

Os extratos tiveram pouco efeito sobre a mortalidade dos cupins, porém, os extratos diclorometânico e diclorometano/acetona das três espécies selecionadas apresentaram potencial repelente e os extratos de *S. bistellatum* e *S. sisymbriifolium* demonstraram atividade deterrente alimentar ao cupim *C. brevis*. Os resultados sugerem que o efeito deterrente pode estar relacionado à presença de ésteres de açúcar, da mesma forma que o já observado com o pulgão *M. persicae*, onde foi verificado efeito deterrente alimentar com extratos de *S. berthaultii*, os quais continham ésteres de açúcares em sua composição (Neal *et al.* 1990)

Os térmitas exploram alimentos com baixo valor nutricional se comparado aqueles consumidos por outros animais (Lima & Costa-Leonardo, 2007), além disso, a maior parte dos indivíduos da colônia são muito longevos, podendo sobreviver por longos períodos sem se alimentar. Nos testes realizados observou-se que operários de *C. brevis*, sem alimentação, permanecem ativos por aproximadamente 100 dias, com um máximo de 182 dias. Assim, os extratos causam deterrência alimentar o que determinou a não ingestão dos compostos tóxicos, e conseqüentemente a sobrevivência além o período de 30 dias de observação.

A compreensão da ação dos compostos que atuam como repelentes e deterrentes alimentares, pode potencializar a obtenção de produtos eficazes e com potencial econômico para o controle do cupim-de-madeira-seca.

Os compostos majoritários isolados do extrato diclorometano/acetona de *S. sisymbriifolium* e *S. bistellatum*, correspondem a um mesmo tipo de estrutura básica, trata-se de dissacarídeos de pentoses que estão glicosidados em seu carbono anomérico por ácido 3-hidroxi palmítico e esterificados em diferentes proporções por ácidos graxos de cadeia longa, fundamentalmente ácido palmítico. Os compostos isolados de *S. sisymbriifolium* indicam ser os mesmos descritos por Cesio *et al.* (2006). Para *S. bistellatum* os compostos resultantes do estudo realizado com RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  assim como o estudo dos ácidos graxos que compõem a molécula por GC-MS, sugerem padrões estruturais básicos do composto.

Para determinação final da estrutura dos compostos responsáveis pela bioatividade dos extratos da espécie *S. bistellatum* deverão ser realizadas mais análises de RMN bidimensionais bem como HMBC, espectroscopia de massas, infravermelho, para conhecer as uniões entre os monossacarídeos e as eventuais substituições por ácidos graxos e outros experimentos bidimensionais  $^1\text{HRMN}/^{13}\text{CRMN}$ . Estudos de GC utilizando a técnica de alditoles são necessários para determinar que monossacarídeos compõem a molécula e assim chegar a elucidación completa da estrutura.

Em relação a *S. frugiperda*, que se alimenta durante todo período de desenvolvimento larval (cerca de 30 dias) (Capinera, 2005), considera-se que as mesmas ingeriram os compostos tóxicos, os quais não foram ingeridos pelos cupins. Isto explica a maior mortalidade das lagartas.

As três espécies de *Solanum* demonstram ser repelentes ao cupim *C. brevis*, destacando-se os extratos diclorometânico e diclorometano/acetona. Em relação ao índice-

antialimentar destacaram-se os extratos diclorometânico e diclorometano/acetona das espécies *S. bistellatum* e *S. sisymbriifolium*. A atividade biológica dos extratos avaliados sobre *S. frugiperda* se deve em grande parte a presença dos compostos isolados e posteriormente testados individualmente. As plantas desenvolveram estas substâncias secundárias como um meio de defesa contra insetos, inicialmente como uma resposta às pressões exercidas pelos herbívoros, posteriormente essas substâncias foram utilizadas pelos insetos em benefício próprio para a sua própria defesa contra outros predadores. Segundo Meepagala *et al.* (2006), os metabólitos secundários são produzidos pelas plantas como parte do seu mecanismo de defesa natural. Eles executam um significativo papel de defesa das plantas contra insetos, fungos, bactéria e outras plantas.

A maior toxicidade do extrato diclorometano/acetona de *S. sisymbriifolium* à lagarta *S. frugiperda* está relacionada à presença de ésteres de açúcares, como demonstrado nos ensaios com os compostos isolados. Porém, a espécie *S. bonariense* não foi ativa, visto que, o extrato diclorometano/acetona não continha ésteres de açúcares como as outras duas espécies estudadas.

Os produtos naturais continuam sendo um campo de pesquisa promissor no controle de pragas. A síntese dos compostos secundários representa mais uma ferramenta de controle com características mais específicas aos organismos alvos e menos poluentes ao meio ambiente, e pode contribuir significativamente para o desenvolvimento da biotecnologia na busca de novas substâncias e moléculas bioativas.

## 7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que:

- Os extratos diclorometânico, diclorometano-acetona e aquo-alcoólico de *S.bistellatum* demonstraram repelência aos cupins na concentração 2,50 mg/mL.

- Os extratos diclorometânico e diclorometano/acetona das espécie *S. bonariense* e *S. sisymbriifolium* demonstraram ser repelentes ao cupim-de-madeira-seca *C. brevis*.

- Evidenciou-se efeito supressor do extrato diclorometânico de *Solanum sisymbriifolium* na concentração de 25,0 mg/ml a *C. brevis*.

- Os extratos diclorometano-acetona de *S.sisymbriifolium* e *S. bistellatum* nas concentrações de 12,5 e 25,0 mg/mL, demonstraram-se fagodeterrente ao cupim *C. brevis*.

- Os extratos diclorometânico e diclorometano/acetona de *S.sisymbriifolium* afetaram o número de instares larvais de *S. frugiperda*.

- O extrato diclorometânico de *S.sisymbriifolium* teve menor efeito sobre a fase larval e acentuado efeito sobre as pupas, na maior concentração testada de 2,50 mg/mL.

- O extrato diclorometano/acetona de *S.sisymbriifolium* afetou mais a sobrevivência larval do que a pupal. O extrato induziu uma diminuição na sobrevivência em função da concentração, sendo a mais efetiva na concentração de 2,50 mg/mL.

- O extrato diclorometânico de *S. bonariense* não afetou o número de instares larvais de e afetou minimamente a sobrevivência larval, pupal e total de *S. frugiperda*.

- O extrato diclorometano/acetona de *S. bonariense* afetou o número de instares larvais, as sobrevivência larval, pupal e total foram pouco afetadas e observa-se um aumento da sobrevivência conforme aumenta a concentração.

- Os compostos majoritários (ésteres de açúcares) I e II foram mais tóxicos a lagarta *S.*

*frugiperda* que os extratos brutos, impedindo a metamorfose, causando anomalias, e diminuindo a sobrevivência total.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, College Park.(18):265-266.
- Argadoña, V. H.; Corcuera, L. J.; Niemeyer, H. H.; Campbell, B. C. (1983). Toxicity and feeding deterrency of hidroxamic acids from graminae in synthetic diets against the greenbug, *Schizaphis graminum*. **Ent. exp. & appl.** (34): 134-138.
- Avé, D. A.; Gregory, P.; Tingey, W. M. (1987). Aphid repellent sesquiterpenes in glandular trichomes of *Solanum berthaultii* and *S. tuberosum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. (44):131-138.
- Ávila, C. J.; Degrande , P. E.; Gomez, A. S. (1997). Insetos pragas: reconhecimento, comportamento, danos e controle. In \_\_\_\_\_. **Milho: Informações técnicas**. Dourados: EMBRAPA-CPAO. P. 157-170, (Circular Técnica).
- Barros, N. M.; Heinzen, H.; Cesio, M. V.; Acosta, S.; Mato, M.; Sbeghen-Loss, A. C.; Rech, V. & Frizzo, C. (2008). The use of residues from the citrus industry to control dry-wood termites *Cryptotermes brevis* (Isoptera-Kalotermitidae). **Sociobiology**. (51):283-293.
- Baskar, K.; Kingsley, S.; Vendan, S. E.; Paulraj, M. G.; Duraipandiyan, V.; Ignacimuthu, S. (2009). Antifeedant, larvicidal and pupicidal activities of *Atalantia monophylla* (L) Correa against *Helicoverpa armigera* Huber (Lepidoptera: Noctuidae). **Chemosphere**. (75): 355-359.
- Biermann, A. C. S. (2009). Bioatividade de inseticidas botânicos sobre *Ascia monuste orseis*

- (Lepidoptera: Pieridae). **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, Brasil.
- Boligon, D. S. (2007). Variação nos tricomas de *Solanum sisymbriifolium* (Solanaceae) e herbivoria por larvas de *Gratiana spadicea* (Coleoptera, Chrysomelidae). **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- Botton, M.; Carbonari, J.J.; Garcia, M. S.; Martins, J. F. S. (1998). Preferência alimentar e biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae) em arroz e capim-arroz. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. (27): 207-212.
- Burkart, A. (1979). **Flora Ilustrada de Entre Rios (Argentina)**. Parte V: Dicotiledoneas Metaclamideas Generalidades (gamopétalas). Coleccion Cientifica del I.N.T.A,VI, V, Buenos Aires.384-387.
- Burke, B. A.; Goldsby, G.; Mudd, J. B. (1987). Polar epicuticular lipids of *Lycopersicon pennellii*. **Phytochemistry**. (26):2567-2571.
- Busato, G. R.; Grützmacher, A. D.; Garcia, M. S.; Giolo, F. P.; Nörnberg, S. D. (2004). Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera:Noctuidae) em duas temperaturas. **Ciênc. Agotec. Lavras**. (28):1278-1283.
- Butt, B. A.; Cantu, E. (1962). Sex determination of lepidopterous pupae. **Agricultural Research Service**. ARS - 33-75. Washington: USDA. 7p.
- Butta, J. G.; Lusby, W. R.; Neal, J. W.; Rolland, Jr.; Waters, M.; Pittarelli, W. (1993). Sucrose

esters from *Nicotiana gossei* active against the greenhouse whitefly *Trialeuroides vaporariorum*. **Phytochemistry**. (32):859-864.

Cabrera, R. R.; Lelis, A. T.; Berti Filho, E. (2001). Ação de extratos das madeiras de ipê (*Tabebuia sp.*, BIGNONIACEAE) e de Itaúba (*Mezilaurus sp.*, LAURACEAE) sobre o cupim-de-madeira-seca *Cryptotermes brevis* (ISOPTERA, KALOTERMITIDAE). **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo.(68):103-106.

Capinera, J. L. (2005). *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). University of Florida. Disponível on line: [http://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/fall\\_armyworm.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/fall_armyworm.htm). Acessado em outubro de 2010.

Carvajal, J. E. H.; Orjuela, Y. F.; Vallejo, A. G. (2010). Evaluación de La actividad inseticida de *Solanum macranthum* (Dunal) sobre ninfas de los estádios IV y V de *Rhodnius pallescens*, *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius colombiensis*. **Revista Cubana de Farmácia**. (45):71-78.

Castillo, L.; González-Coloma, A.; Gonzáles, A.; Díaz, M.; Santos, E.; Alonso-Paz, E.; Bassagoda, M.; Rossini, C. (2009). Screening of Uruguayan plants for deterrent activity against insects. **Industrial Crops and Products**. (29): 235-240.

Cesio, V.; Dutra, C.; Moyna, P.; Heinzen, H. (2006). Morphological and chemical diversity in the tipe IV glandular trichomes of Solanaceae (*S. sisymbriifolium* and *N. glauca*) as germplasm recources for agricultural and food uses. **Eletronic Journal of Biotechnology**. ISSN: 0717-3458. (9):281-285.

Charleston, D. S.; Kfir. R.; Vet, L.E. M.; Dike, M. (2005). Behavioural responses of diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to extracts derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica*. **Bulletin of Entomological Research**. (95):457-

465.

Cohen, E. (2001). Chitin synthesis and inhibition: a revisited. **Pest manag. Sci.** (57):946-950.

Chowdhury, N.; Ghosh, A.; Chandra, G. (2008). Mosquito larvicidal activities of *Solanum villosum* berry extract against the dengue vector *Stegomyia aegypti*. **BMC Complementary and Alternative Medicine.** (8):1-10.

Constantino, R. (2002). The pest termites of South America: taxonomy, distribution and status. **J. Appl. Ent.** (126): 355-365.

Cremling, R. J. (1990). Some novel methods of insect control. In: **Agrochemicals: preparation and mode of action.** Ed. Wiley. 396p.

Dutra, C.; Cesio, M. V.; Moyna, P.; Heinzen, H. (2008). Acyl Sucrose from *Salpiglossa organifolia*. **Natural Product Communication.** (3):539-542.

On line: [http://dell.nossosite.com.br/bcnp2007/media/pub/abst\\_book.pdf](http://dell.nossosite.com.br/bcnp2007/media/pub/abst_book.pdf)

Fontes, L. R. & Milano, S. (2002). **Cupim e Cidade – Implicações ecológicas e Controle.** São Paulo. 142 p.

Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, O.; Carvalho, R.P.L.; Batista, G.C.; Berti Filho, E.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R. A.; Alves, S.B.; Vendramin, J.D.; Marchini, L.C.; Lopes, J.R.S. & Omoto, C. (2002). **Entomologia Agrícola.** Piracicaba: FEALQ, 920p.

Gallo, M. B. C.; Rocha, W. C.; Cunha, U. S.; Diogo, F. A.; Silva, F. C.; Vieira, P. C.; Vendramin, J. D.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F.; Batista-Pereira, L. G. (2006). Bioactivity of extracts and isolated compounds from *Vitex polygama* (Verbenaceae) and

*Siphoneugena densiflora* (Myrtaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Manag. Sci.** (62):1072-1081.

Gamarra, D. C.; Bueno, V. H. P., Moraes, J. C.; Auad, A. M. (1998). Influência de tricomas glandulares de *Solanum berthaultii* na predação de *Scymnus (Pullus) argentinicus* (Weise) (Coleoptera: Coccinellidae) em *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae). **An. Soc. Entomol. Brasil.** (27):59-65.

Garcia, S.; Heinzen, H.; Hubbuch, H.; Martinez, M.; De Vries, C.; Moyne, J. X.(1995). Éteres metílicos P triterpene das ceras epicuticulares de Palmae. **Fitoquímica.** (39):1381-1382.

Garcia, S.; Garcia, C.; Heinzen, H.; Moyne, P.; (1997). Base química da resistência de semente de cevada para fungos patogênicos. **Fitoquímica.** (44) 3:415-418.

Greene, G. L.; Leppla, N. C.; Dickerson, W.A. (1976). Velvetbean caterpillar; a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology.** Lanham.(69):487-488.

Gutiérrez, C.; Gonzalez-Coloma, A.; Hoffmann, J. J. (1999). Antifeedant properties of natural products from *Parthenium argentatum*, *P. argentatum* X *P. tomentosum* (Asteraceae) and *Castela emory* (Simaroubeaceae) against *Reticulitermes flavipes*. **Industrial Crops and Productss.** (10): 35-40.

Goffreda, J. C.; Steffens, J. C.; Mutschler, M. A. (1990). Association of epicuticular sugars with aphid resistance in hybrids wild tomato. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** (115):161-165.

Hare, J. D. (2005). Biological activity of acil glucose esters from *Datura wrightii* glandular trichomes against three natice insects herbivores. **Journal of Chemical Ecology.** (31): 1475-1491.

- Hashidoko, Y. (2005). Studies of interrelationships between epiphytic bacteria and host plants ecochemical by secondary metabolites. **Biosci . Biotechnol. Biochem.** (69): 1427-41.
- Houghton, P. J. & Ramam, A. (1998). Analysis of crude extracts, fractions and isolated compounds. In: **Laboratory Handbook for the fractionation of natural extracts.** 1<sup>a</sup> ed. 199p.
- Lima, J. T.; Costa-Leonardo, A. M. (2007). Recursos alimentares explorados pelos cupins (Insecta: Isoptera). **Biota Neotropica.** (7): 243-250.
- Lizarazo, K.; Mendonza, C.; Carrero, R. (2008). Efecto de extractos vegetales de *Polygonum hydropiperoides*, *Solanum nigrum* y *Calliandra pittieri* sobre el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*). **Agronomía Colombiana.** (23):427-434.
- Lovatto, P. B.; Goetze, M.; Thomé, G. C. (2004). Efeito de extratos de plantas da família Solanaceae sobre o controle de *Brevicoryne brassicae* em couve (*Brassica oleraceae* var. *Acephala*). **Ciência Rural.** (34): 971-978.
- Maistrello, L.; Henderson, G. & Laine, R. (2002). Comparative effects of vetiver oil, nootkatone and disodium octoborate tetrahydrate on *Coptotermes formosanus* and its symbiotic fauna. **Pest. Manag. Sci.** (59):58-68.
- Maroneze, D. M.; Mendes, E. C.; Nalim, D. M. (2007) Anais do XVI EIAC.
- Martinez, S. S.; van Emden, H. F. (2001). Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera:Noctuidae) caused by azadirachtin. **Crop Protection.** (30):113-125.

- Martius, C. (1998). Perspectivas do controle biológico de cupins (Insecta, Isoptera). **Revista Brasileira de Entomologia**. (41): 179-194.
- Maxud, M. K.; Zydgallo, J. A. (1991). Variación de alcanos foliares em algumas espécies argentinas de *Solanum* (SOLANACEAE). **Anales de Biología**. (17):137-140.
- Mentz, L. A.; Oliveira, P. L.; Silva, M. V. (2000). Tipologia dos tricomas das espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae) na Região Sul do Brasil. **IHERINGIA**. Sér. Bot. Nº 54, p. 75-106.
- Mentz, L. A.; Oliveira, P. L. (2004). *Solanum* (SOLANACEAE) na região sul do Brasil. Botânica, Nº 54. São Leopoldo, RS.
- Mentz, L. A.; Vendruscolo, G. S.; Soares, E. L. C.; Vignoli-Silva, M. (2007). Solanaceae nativas no Rio Grande do Sul, Brasil – Listagem II: *Solanum* L. **Revista Brasileira de Biociências**. (5):1059-1061.
- Meepagala, K. M.; Osbrink, W.; Sturtz, G.; Lax, A. (2006). Plant-derived natural products exhibiting activity against Formosan subterranean termites (*Coptotermes formosanus*). **Pest Management Science**. (62):565-570.
- Merck. Darmstadt. (1974). **Dyeing reagents for Thin Layer and Paper Chromatography**.

- Neal, J. J.; Tingey, W. M.; Steffens, J. C. (1990). Sucrose esters of carboxylic acids in glandular trichomes of *Solanum berthaultii* deter settling and probing by green peach aphid. **Journal of Chemical Ecology.** (16): 487-497.
- Neal, J. W.; Buta, J. G.; Pittarelli, G. W.; Lusby, W. R.; Bentz, J. A. (1994). Novel sucrose esters from *Nicotiana glauca*: Effective biorationals against selected horticultural insect pests. **Horticultural Entomology.** (87):1600-1607.
- Panizzi, A. R.; Parra, J. R. P. (2009). **Bioecologia e nutrição de insetos.** Base para o manejo integrado de pragas. In \_\_\_\_\_. Interações inseto-planta. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, DF.
- Parra, J. R. P.; Haddad, M. D. L. (1989). Determinação do número de ínstar de insetos. **FEALQ:** Piracicaba.49p.
- Parra, J. R.P. (2001). Técnicas de Criação de Insetos para Programas de Controle Biológico. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. **FEALQ:** Piracicaba.
- Paroul, N.; Cansian, R. L.; Rossato, M.; Pauletti, G.; Serafini, L. A.; Rota, L.; Moyna, P.; Heinzen, H. (2009). Use of palmar wax hydrocarbon fractions as chemotaxonomical markers in *Butia* and *Syagrus*. **Brazilian Journal of Biology.** (69):353-361.
- Pascual-Villalobos, M. J.; Robledo, A. (1999). Anti-insect activity of plant extracts from the wild flora in southeastern Spain. **Biochemical Systematics and ecology.** (27):1-10.
- Pogue, G. M. (2002). A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae).

- Memoirs of the. American Entomological Society.** (43):1-202, 2002.
- Pomilio, A. B.; Falzoni, E. M.; Vitale, A. A. (2007). Toxic chemical compounds of the Solanaceae family. **Natural Product Communications.** (0):1-24.
- Rajkumar, S.; Jebanesan, A.; (2005). Scientific Note. Oviposition deterrent and skin repellent activities of *Solanum trilobatum* leaf extract against the malarial vector *Anopheles stephensi*. **Journal of Insect Science.** 5:15. 3p.
- Ripa, R.; Luppichini, P. (2004). Termitas y otros insectos xilófagos em Chile:espécies, biologia y manejo. **Invest. Agropecuarias.** Quillota, Chile, p. 147.
- Robbers, J. E., Speedie, M. K., Tyler, V. E. (1997). **Farmacognosia Biotecnologia.** Editorial Premier. 372 p.
- Roel, A. R.; Vendramim, J. D.; Friguetto, R. T. S.; Friguetto, N. (2000). Efeito do estrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da lagarta-do-cartucho. **Bragantia.** Campinas, (59):53-58.
- Roel, A. R.; (2001). Utilização de plantas com propriedades inseticidas:uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local.** (1):43-50.

Roel, A. R.; Vendramin, J. D. (2006). Efeito residual do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) para lagartas de diferentes idades de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera:Noctuidae). **Ciência Rural**. (56):581-589.

Rodrigues, S. R.; Coutinho, G. V.; Garcez, F. R.; Zanella, D. P. F. (2008). Atividade inseticida (Lepidoptera:Noctuidae). **Agrarian**. (1):133-144.

Russel, R. K.; Calhoun, L. A. (1988). 2,3-DI-O and 1,2,3-TRI-O-ACYLATED glucose esters from the glandular trichomes of *Datura mentel*. **Phytochemistry**. (27): 3761-3763.

Saito, M. L.; Lucchini, F. (1998). Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente. Jaguariúna: **Embrapa – CNPMA**. Série documentos, 12, 46 p. 1998.

Santos, H. P. dos; Pires, J. L. (2004). Porque cultivar milho. Passo Fundo: Embrapa Trigo, **(Embrapa Trigo. Comunicado Técnico Online, 141)**. Disponível em: [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p\\_co141.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co141.htm)

Santiago, G. P.; Pádua, L. E. M.; Silva, P. R. R.; Carvalho, E. M. S.; Maia, C. B. (2008). Efeitos dos extratos de plantas na biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) mantida em dieta artificial. Ciênc. Agrotec., Lavras. n.3.p.792-796.

- Sbeghen-Loss, A. C.; Barbosa, E. G. C.; Mato, M.; Cesio, M. V.; Frizzo, C.; Heinzen, H.; Barros, N. M. (2009). Lime Wax influences feeding behavior of *Cryptotermes brevis* and the viability of its *Foina sp.* Symbionts. **Sociobiology**. (54): 647-659.
- Scheffrahn, R. H.; Krecek, J.; Ripa, R.; Luppichini, P. (2009). Endemic origin and vast anthropogenic dispersal of the West Indian drywood termite. **Biol Invasions**. (11):787-789.
- Schultz, T. P.; Nicholas, D. D.; Preston, A. F. (2007). Perspective: A brief review of the past, present and future of wood preservation. **Pest Management Science**. (63):784-788.
- Severson, R. F.; Chortyk, O. T.; Stephenson, M. G.; Akey, D. H.; Neal, J. W.; Pittarelli, G. W.; Jackson, D. M. and Sisson, V. A. (1994). Characterization of natural pesticide from *Nicotiana glauca*. In \_\_\_\_\_: Hedin, P. A. ed. **Bioregulators for Crop Protection and Pest Control**. Washington, D. C. 109-121.
- Sharma, R. N. & Raina, R. M. (1998). Evaluating chemicals for eco-friendly pest management I: terpenoids and fatty acids for bulduings termites. **Journal of Scientific & Industrial Research**. (57):306-309.
- Shepherd, R.W.; Wagner, G.J. (2007). Phylloplane proteins: emerging defenses at the aerial frontline. **Trends Plant Sci**. (12):51-56.
- Silva, T. M. S.; Carvalho, M. G.; Braz-Filho, R.; Agra, M. F. (2003). Ocorrência de flavonas,

- flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). **Química Nova**. (26):517-522.
- Silva, T. M. S.; Nascimento, R. J. B.; Batista, M. M.; Agra, M. F. Camara, C. A. (2007). Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. (17): 35-38.
- Simmonds, M. S. J.; Blaney, W. M.; Delle Monache, F.; Marini-Bettolo, G. B. (1990). Insect antifeedant activity associated with compounds isolated from species of *Lonchocarpus* and *Tephrosia*. **Journal of Chemical Ecology**. (16): 365-380.
- Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R (1999). **Farmacognosia – Da Planta ao medicamento**. Ed. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC. 1ª Edição. 821 p.
- Smith, C. M. (1989). **Plant resistance to insects**. A Fundamental Approach. John Wiley & Sons.
- Singh, P. **Artificial diets for insects, mites, and spiders**. London: Plenum, 1977. 594p.
- Singh, S.P.; Raghavendra, K.; Singh, R. K.; Subbarao, S. K. (2001). Studies on larvicidal properties of leaf extract of *Solanum nigrum* Linn. (family Solanaceae). **Current Science**. (81): 1529-1530.

- Soulé, S.; Güntner, C.; Vázquez, A.; Argandoña, V.; Moyna, P.; Ferreira, F. (2000). An aphid repellent glycoside from *Solanum laxum*. **Phytochemistry**. (55):217-222.
- Srinivasan, R.; Uthamasamy, S.; Talekar, N. S. (2006). Characterization of oviposition attractants of *Helicoverpa armigera* in two solanaceous plants, *Solanum viarum* and *Lycopersicon esculentum*. **Current Science**. (90):846-850.
- Srivastava, M.; Gupta, L. (2007). Effect of formulations of *Solanum surratense* (Family:Solanaceae) an Indian desert plant on oviposition by pulse beetle *Callosobruchus chinensis* Linn. **African Journal of Agricultural Research**. (2):552-554.
- Szafranek, B. M.; Synak, E. E. (2006). Cuticular waxes from potato (*Solanum tuberosum*) leaves. **Phytochemistry**. (67):80-90.
- Szafranek, B.; Synak, E.; Waligóra, D.; Szafranek, J.; Nawrot, J. (2008). Leaf surface compounds of potato (*Solanum tuberosum*) and their influence on Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) feeding. **Chemoecology**. (18):205-216.
- Tingey, W. M. (1985). Plant defensive mechanisms against leafhoppers . In: L. R. Nault & L. G. Rodriguez (eds.). **The leafhoppers and planthoppers**. John Wiley and Sons, New York: 217-234
- Wollenweber, E.; Dörr, M.; Rivera, D.; Roitman, J.N. (2003). Externally accumulated flavonoids in three Mediterranean species Onono. **Z Naturforscher**.(58):771-775.

- Vaghela, J.; Rana, M.; Savalia, V.; Sheth, N. R. (2009). Evaluation of antifungal activity of methanolic extract of leaves and stems of *Solanum sisymbriifolium* LAM. **Pharmacologyonline.** (3):1-5
- Van Dam, N. M.; Hare, D. (1998). Biological activity of *Datura wrightii* glandular trichome exudates against *Manduca sexta* Larvae. **Journal of Chemical Ecology.** (24): 1529-1549.
- Vázquez, A. (1997). **Química y Biología de Solanaceas.** Estructura y actividad biológica de los glicósidos del género *Solanum*. Universidad Mayor de la República. Facultad de Química. Montevideo.
- Viana, P. A. & Prates, H. T. (2003). Desenvolvimento e mortalidade larval de *Spodoptera frugiperda* em folhas de milho tratadas com extrato aquoso de *Azadirachta indica*. **Bragantia.** Campinas. (62):69-74.
- Yencho, G. C.; Renwick, J. A. A.; Steffens, J. C.; Tingey, W. M. (1994). Leaf surface extracts of *Solanum berthaultii* Hawkes deter Colorado potato beetle feeding. **Journal of Chemical Ecology.** (20):991-1007.
- Zhu, B. C. R.; Henderson, G. Sauer, A. M.; Yu, Y.; Crowe, W.; Laine, R. (2003). Structure-activity of valencenoid derivatives and their repellence to Formosan subterranean termite. **Journal of Chemical Ecology.** (29):2695-2701.

