

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

Atividade Biológica de Extratos de *Cabrlea canjerana* Sobre *Anastrepha fraterculus* e *Spodoptera frugiperda*

**FLAVIANE EVA MAGRINI**

CAXIAS DO SUL, DEZEMBRO DE 2011.

**FLAVIANE EVA MAGRINI**

Atividade Biológica de Extratos de *Cabralea canjerana* Sobre *Anastrepha fraterculus* e *Spodoptera frugiperda*

“Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia”.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Specht  
Co-orientadora: Profa. Dra. Valdirene Camatti Sartori  
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Verônica Cesio

CAXIAS DO SUL, DEZEMBRO DE 2011.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
UCS - BICE - Processamento Técnico

M212a Magrini, Flaviane Eva, 1983-  
Atividade biológica de *Cabrlea canjerana* sobre *Anastrepha fraterculus* e *Spodoptera frugiperda* / Flaviane Eva Magrini. - 2011.  
119 f. : il. ; 30 cm.

Apresenta bibliografia.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2011.  
“Orientação: Prof. Dr. Alexandre Specht ; Co-orientação: Profª. Drª. Valdirene Camatti Sartori, Profª. Drª. Maria Verônica Cesio.”

1. Biotecnologia. 2. Mosca-das-frutas. 3. Meliaceae . I. Título.

CDU 2.ed.: 57.082.2

Índice para o catálogo sistemático:

1. Biotecnologia	57.082.2
2. Mosca-das-frutas	595.773.4
3. Meliaceae	582.746.41

Catalogação na fonte elaborada pelo bibliotecário  
Marcelo Votto Teixeira – CRB 10/1974

*Atividade Biológica de Extratos de Cabralea canjerana Sobre*

*Anastrepha fraterculus e Spodoptera frugiperda*

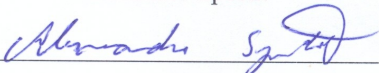
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Specht  
Co-orientadora: Profa. Dra. Valdirene Camatti Sartori  
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Verônica Cesio

**Dissertação defendida em 15 de dezembro de 2011.**

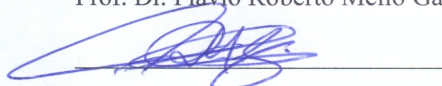
**Orientador:**

Prof. Dr. Alexandre Specht

  
\_\_\_\_\_

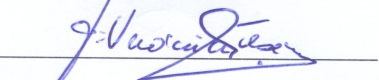
**Membros da banca:**

Prof. Dr. Flávio Roberto Mello Garcia

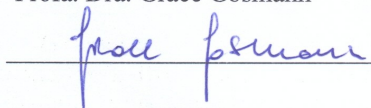
  
\_\_\_\_\_

**Co-Orientadoras:**

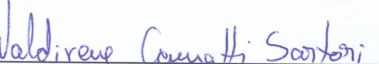
Profa. Dra. Maria Veronica Cesio

  
\_\_\_\_\_

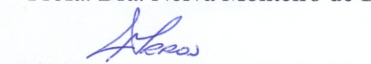
Profa. Dra. Grace Gosmann

  
\_\_\_\_\_

Profa. Dra. Valdirene Camatti Sartori

  
\_\_\_\_\_

Profa. Dra. Neiva Monteiro de Barros

  
\_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Eduardo Vanelli, pelo incentivo, paciência, ajuda e companhia nos finais de semana e feriados. A toda minha família pela compreensão nas ausências, especialmente, nos almoços de domingo.

Aos estagiários e amigos, Juliano Gaio, Cristiane Priscila Girelli e Maurício Rigo Panazzolo, pela ajuda e parceria nos bioensaios, sem a qual, não seria possível a realização deste trabalho.

A todos do Laboratório de Farmagnosia da Universidad de la Republica, pela amizade e ajuda durante os três meses de estágio. Em especial, ao Federico Rey pelo mate, e ao colega Ignacio Mígues, que esteve mais próximo nas atividades em fitoquímica.

Ao professor Dr. Horácio Heinzen pelos ensinamentos. À professora co-orientadora Dra. Verônica Césio, pela amizade, ajuda e momentos agradáveis compartilhados.

Ao orientador Dr. Alexandre Specht, pela paciência e pelos grandes ensinamentos durante todo o mestrado. À co-orientadora Dra. Valdirene Camatti Sartori, pela amizade e contribuição neste trabalho.

Aos professores da banca de acompanhamento Dra. Neiva Monteiro de Barros e Dr. Sidnei Moura e Silva, pelas sugestões que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Às minhas amigas e colegas Débora de Oliveira, Vania Rech, Juliana Martins, Marcia Toigo Angonese, Janaina Iltchenco, Fabiane Mezzomo, Maiara Tedesco e Jenifer Zago pela boa companhia e amizade.

Aos colegas de laboratório e de pós-graduação Edegar Fronza e Debora Goulart Montezzano, pela companhia incondicional, especialmente nas horas mais difíceis.

A todos estagiários do laboratório de Controle Biológico que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho. À funcionária Dra. Lucia Vargas pelas sugestões nos bioensaios, à

Marielsa Seco e Rosangela Festugato pela amizade e conforto do bom humor, à dona Sebastiana pelo bom chimarrão.

Ao pesquisador Dr. Marcos Botton e à Bióloga Vânia Sganzerla da Embrapa Uva e Vinho que cederam as pupas de *Anastrepha fraterculus* e me acolheram em um estágio para dominar a criação massal das moscas-das-frutas.

À Universidade de Caxias do Sul pelo apoio e infra-estrutura, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, ao professor Dr. Aldo José Pinheiro Dillon e à secretária Lucimara Serafini pelas orientações e amizade.

À Universidad de la Republica e à Facultad de Química pelo acolhimento.

À Capes pela concessão da bolsa, e ao programa de Cooperação Internacional pela oportunidade de realizar o mestrado sanduíche em parceria com a Capes/UdelaR.

À Fapergs e CNPq pelo apoio financeiro a este trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivo Específico.....	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1 Mosca-das-frutas <i>Anastrepha fraterculus</i> .....	15
3.1.1 Taxonomia e biologia.....	15
3.1.2 Distribuição geográfica, plantas hospedeiras e importância econômica de <i>A. fraterculus</i> .....	18
3.1.3 Tipos de controle.....	19
3.2 Lagarta do cartucho <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	21
3.2.1 Taxonomia e biologia.....	21
3.2.2 Distribuição geográfica, plantas hospedeiras e importância econômica de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	22
3.2.3 Tipos de controle.....	24
3.3 Plantas inseticidas.....	26
3.3.1 Terpenos.....	28
3.3.2 Compostos fenólicos.....	31
3.3.3 Compostos nitrogenados.....	33
3.4 Família Meliaceae.....	35
3.5 <i>Cabralea canjerana</i> .....	37
4. REFERÊNCIAS.....	40
5. RESULTADOS.....	54
5.1 Capítulo 1	

Extratos de canjerana (Meliaceae) para controle da mosca-das-frutas-sul-americana (Diptera: Tephritidae).....	54
---	----

## **5.2 Capítulo 2**

Antifeedant activity and effects of fruits and seeds extracts of <i>Cabrlea canjerana canjerana</i> (Vell.) Mart. (Meliaceae) on the immature stages of the fall armyworm <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).....	86
<b>6. DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>115</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>117</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>118</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida de <i>Anastrepha fraterculus</i> .....	<b>16</b>
<b>Figura 2:</b> Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....	<b>29</b>
<b>Figura 3:</b> Estrutura química da Azadiractina.....	<b>30</b>
<b>Figura 4:</b> Estrutura química da Rotenona.....	<b>32</b>
<b>Figura 5:</b> Estrutura química da Nicotina.....	<b>34</b>
<b>Figura 6:</b> Frutos de <i>Cabralea canjerana</i> .....	<b>37</b>
<b>Figura 7:</b> Triterpeno Dammarano Cabraleadiol.....	<b>38</b>

## RESUMO

Estudos têm indicado que representantes de Meliaceae, incluindo o neem, apresentam metabólitos secundários com importante atividade biológica sobre insetos. *Cabralea canjerana* é uma Meliaceae arbórea endêmica da América e de ampla distribuição, utilizada na medicina indígena, devido as suas propriedades terapêuticas. Dentre os principais insetos-praga associados à produção agrícola da América do Sul, destacam-se a mosca-das-frutas-sul-americana - *Anastrepha fraterculus* e a lagarta-do-cartucho-do-milho - *Spodoptera frugiperda*. Este estudo objetivou avaliar os efeitos de extratos de frutos e sementes de *C. canjerana* obtidos em acetato de etila e etanol sobre a ingestão e a oviposição de adultos de *A. fraterculus* e sobre ovos, larvas e pupas de *S. frugiperda*. O extrato de fruto (acetato de etila), adicionado a dieta artificial (5mg/mL), em 48h, foi significativamente mais efetivo, induzindo 69,42% de mortalidade das moscas. Todos os extratos provocaram deterrência de oviposição, reduzindo significativamente o número de moscas por fruto de mamão papaia. Entre os demais efeitos biológicos sobre *A. fraterculus* verificou-se que o extrato de fruto (acetato de etila), induziu a mortalidade larval, ocorrência de pupas larviformes e de adultos anormais. Todos os extratos induziram atividade antialimentar e larvicida à *S. frugiperda* nas concentrações de 500 e 1000 ppm. O extrato de semente (acetato de etila), a 1000 ppm, foi o mais ativo, induzindo mortalidade larval e embrionária (100% e 69%, respectivamente). Do seu fracionamento em coluna de cromatografia foram obtidas cinco frações. A partir destas frações, a terceira, composta principalmente por triterpenos induziu mortalidade larval três vezes maior do que o extrato bruto. Todos os extratos e frações alteraram significativamente a duração do ciclo, do peso larval e induziram a ocorrência de diversas anormalidades larvais e pupais em *S. frugiperda*. A maior atividade dos extratos de semente e de fruto de *C. canjerana*, obtidos com acetato de etila indica a presença de limonóides e triterpenos com atividade biológica que, potencialmente podem vir a ser utilizados no manejo de *A. fraterculus* e *S. frugiperda*.

## ABSTRACT

Many reports in the literature indicated that representatives of Meliaceae, including neem, have secondary metabolites with important biological activities on insects. *Cabralea canjerana* is a widely distributed America native tree from Meliaceae, which it is and used in indigenous medicine, due to its therapeutic properties. Among the major insect pests associated with agricultural production in South America, stand out the South American fruit fly - *Anastrepha fraterculus* and the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. This study evaluated the effects of *C. canjerana* ethyl acetate and ethanol extracts of mature fruits and their seeds on the intake and oviposition the adults of *A. fraterculus* and on eggs, larvae and pupae of *S. frugiperda*. The ethyl acetate fruit extract added to an artificial diet (5mg/mL), within 48 hours, was significantly more effective than the other evaluated extracts, inducing 69.42% mortality of the flies. All extracts caused oviposition deterrence, significantly reducing the number of flies in papaya fruit. Among other biological effects on *A. fraterculus* was found that the ethyl acetate fruit extract, induced larval mortality, occurrence of larviform pupae and abnormal adults. All extracts induced antifeedant and larvicidal activity of *S. frugiperda* at concentrations of 500 and 1000 ppm. The ethyl acetate seed extract at 1000 ppm was the most active one, inducing both larval and embryonic mortality (100% and 69%, respectively). From its fractionation on Column Chromatography five fractions were obtained. From these obtained fractions, the third one, composed principally of triterpenes induced larval mortality three times higher than the crude extract. All extracts and fractions significantly altered the life cycle, the larval weight and induced the occurrence of various abnormalities on *S. frugiperda* larvae and pupae. The greater activity of seed extracts and fruit of *C. canjerana* obtained with ethyl acetate indicates the presence of limonoids and triterpenes with biological activity that can potentially come to be used in the management of *A. fraterculus*. and *S. frugiperda*.

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas inseticidas é uma técnica antiga que ressurgiu devido à necessidade de incorporação de novas práticas para o manejo de pragas nos cultivos agrícolas. Os produtos de origem vegetal são uma fonte promissora de compostos com ação inseticida, que vêm sendo estudados como uma alternativa ao uso de inseticidas sintéticos, por apresentarem metabólitos secundários biosintetizados como resposta das plantas à agressão.

Entre os principais metabólitos secundários encontram-se as saponinas, os taninos, os terpenos, os fenóis, os alcalóides, entre outros, que podem afetar o comportamento de insetos, tanto na repelência quanto no seu metabolismo, tendo a vantagem de serem um produto de menor impacto ambiental, que não geram resistência como os de síntese.

Ao contrário de muitos inseticidas sintéticos, os bioinseticidas são rapidamente biodegradados, razão pela qual são menos danosos ao ambiente. Além disso, compostos vegetais costumam apresentar características mais específicas e seletivas, curto efeito residual e baixa toxicidade a mamíferos.

A família das meliáceas tem sido bastante investigada, por apresentar vários compostos como fonte de compostos bioinseticidas com diferentes modos de ação sobre várias espécies de insetos.

Dentre as plantas utilizadas como inseticida, destaca-se o nim, *Azadirachta indica* (A Juss, 1797) a qual é considerada uma das espécies mais importantes devido à sua atividade biológica, eficiência em baixas concentrações e baixa toxicidade. O principal composto extraído dos frutos desta planta é a azadiractina, um limonóide que atua interferindo no funcionamento de glândulas endócrinas que controlam a metamorfose em insetos e também apresenta propriedade fago-inibidora.

Dentre as principais pragas associadas à produção agrícola do Rio Grande do Sul, destacam-se a mosca-das-frutas sul-americana *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) e a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797).

A mosca-das-frutas *Anastrepha fraterculus* é responsável por elevados prejuízos por inutilizar frutos, principalmente de rosáceas como pêssigo e ameixa, sendo a região da Serra Gaúcha responsável por mais de 70% da produção nacional, com cultivares para conserva e para consumo *in natura*, com uma produção de 80.000 ton.ano<sup>-1</sup>.

A lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda*, constitui numa praga de grande importância no cultivo do milho, e de outras culturas anuais como arroz, olerícolas e soja, não somente pelos danos provocados, mas também pela dificuldade de seu controle, sendo o Rio Grande do Sul um dos principais produtores de milho do país, sendo que 95% da produção do cereal estão concentradas na região centro-sul.

O controle destes insetos é feito quase que exclusivamente com inseticidas químicos, de alta periculosidade ambiental, os quais provocam impactos negativos ao homem e ao ambiente, resíduos nos alimentos, intoxicação de agricultores e consumidores, resistência dos insetos a estes produtos, contaminações do solo e dos lençóis freáticos, etc.

Com base no que foi mencionado, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos biológicos de extratos de acetato de etila e etanol de frutos e sementes de *Cabralea canjerana* (Vell) Mart. (Meliaceae) sobre *A. fraterculus* e *S. frugiperda*, visando sua inclusão em programa de Manejo Integrado de Pragas, contribuindo, desta forma, para a redução do uso de agroquímicos.

Os resultados estão apresentados em dois capítulos. No primeiro, avaliou-se a atividade biológica de extratos acetato de etila e etanol de frutos e sementes de *C. canjerana* sobre a ingestão, oviposição e o desenvolvimento de *A. fraterculus*. No segundo capítulo, estudou-se as atividades ovicida, larvicida, pupicida e a variação de peso e duração do ciclo larval de extratos acetato de etila e etanólico de frutos e sementes de *C. canjerana* sobre *S. frugiperda*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade biológica de extratos de *Cabralea canjerana* sobre *Anastrepha fraterculus* e *Spodoptera frugiperda*

### 2.2 Objetivos específicos

Extrair e caracterizar os componentes de frutos e sementes de *C. canjerana* obtidos com acetato de etila e etanol.

Avaliar a repelência e a deterrência dos extratos sobre *A. fraterculus* e *S. frugiperda*.

Avaliar os efeitos dos extratos sobre *A. fraterculus*, com relação a ingestão de dieta artificial contendo diferentes concentrações e sobre a oviposição considerando frutos de mamão papaia aspergidos com os extratos.

Avaliar os efeitos da aspersão dos extratos sobre frutos no desenvolvimento de *A. fraterculus*.

Avaliar o efeito dos extratos sobre a biologia do desenvolvimento de *S. frugiperda*, incluindo atividade tóxica sobre ovos, larvas e pupas.

Avaliar efeitos da ingestão dos extratos sobre o desenvolvimento de *S. frugiperda*.

Separar e identificar os compostos majoritários presentes no extrato com maior atividade biológica.

Comparar a atividade biológica, larvicida e pupicida de todos os extratos brutos e as frações obtidas do extrato de semente em acetato de etila sobre *S. frugiperda*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

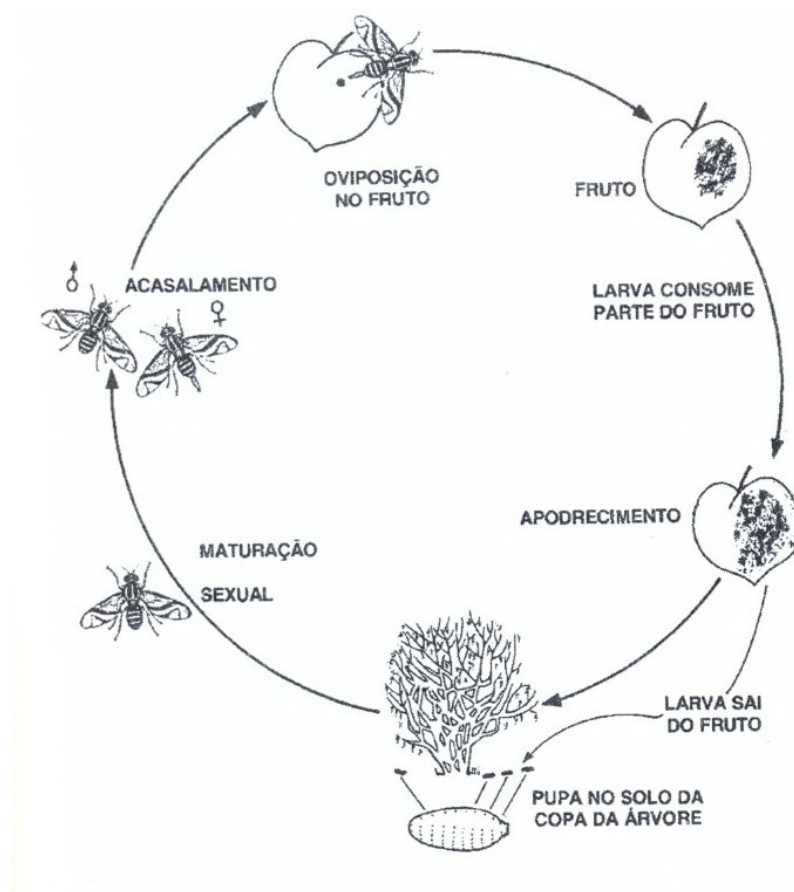
#### 3.1 Mosca-das-frutas *Anastrepha fraterculus*

##### 3.1.1 Taxonomia e biologia

A mosca-das-frutas pertence à ordem Diptera (que apresentam apenas um par de asas), à subordem Brachycera (com antenas curtas), série Schizophora (com fissura ptilinal), seção Acalyptratae (sem caliptra), família Tephritidae (com nervura subcostal dobrada em ângulo) (Zucchi, 2000a).

O gênero *Anastrepha* (Schiner, 1868) por sua vez, é representado no Brasil por 94 espécies, das quais sete são particularmente importantes do ponto de vista econômico: *A. grandis* (Macquart), *A. fraterculus* (Wied.), *A. obliqua* (Macquart), *A. pseudoparallela* (Loew), *A. sororcula* (Zucchi), *A. striata* (Schiner) e *A. zenildae* (Zucchi) (Zucchi, 2000a).

As moscas-das-frutas, como todos os insetos holometabólicos completam seu desenvolvimento passando pelos estágios de ovo, larva, pupa e adulto (Fig.1).



**Figura 1:** Ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus* (Salles, 2000).

*Fase de ovo* – O ovo da mosca-das-frutas em geral é de coloração branca-creme, alongado e ligeiramente curvo, seu maior diâmetro fica na região central ou então próxima ao pólo anterior, que contém a micrópila, o diâmetro decresce em direção aos pólos, terminando em extremidades afiladas. Durante a oviposição, o pólo posterior emerge primeiro e fica voltado para o interior do fruto, conseqüentemente, o pólo anterior fica mais próximo à superfície do fruto. Desse modo, a orientação dorso-ventral do ovo também fica definida, pois o lado convexo corresponde à região onde se formará a parte ventral do embrião e a face côncava corresponde à região dorsal. Os ovos das moscas-das-frutas não apresentam opérculo ou linhas de fissura, as larvas eclodem por uma fenda longitudinal, em geral próxima a uma das extremidades do ovo (Selivon & Perondini, 2000).

*Fase de larva* - A larva completamente desenvolvida mede de 8 a 10mm de comprimento, é de aspecto vermiforme, e a coloração branca-creme com as peças bucais escuras. A cabeça das larvas da mosca-das-frutas não é bem definida (Ribeiro, 1999). Em *A. fraterculus*, distinguem-se 11



segmentos corporais (oito caudais) de igual tamanho, além da cabeça que é retrátil. Na região ventral, com exceção da cabeça, cada um desses segmentos apresenta denticulos provavelmente associados à adesão e a locomoção larval dentro do fruto. O estágio larval é composto por três momentos definidos. O final do terceiro ínstar é caracterizado pela ausência de alimentação e saída da larva do fruto, período chamado de pré-pupa (Selivon & Perondini, 2000).

*Fase de pupa* – As pupas geralmente apresentam forma ovóide, coloração branca-creme até escura, assemelhando-se com a mosca adulta dentro de seu pupário, formado pela última exúvia larval, de coloração avermelhada até castanho-escuro (Salles, 2000). Inicia-se com a apólise larval pupal e finaliza com a transformação da pupa criptocefálica (pupa em processo de histólise dos tecidos larvais e diferenciação dos tecidos corporais) em uma pupa fanerocefálica que é determinada pela evaginação da cabeça e dos discos imaginais dos apêndices torácicos, levando à formação do adulto. A pupa de *A. fraterculus* mede cerca de 5-6mm de comprimento por 2-2,5mm de largura, e o período pupal é de 16,4 dias, em média (Taufer, 1995).

*Fase adulta* - A longevidade dos adultos de *A. fraterculus* em temperatura de 25°C, com 70-80% de umidade relativa, 16 horas de fotofase e alimentados com dieta artificial, é igual para fêmeas e machos, ou seja, 161 dias (Salles, 2000). O período de pré-oviposição, em que a fêmea desenvolve e viabiliza os órgãos e sistema reprodutivo, varia de 7 a 30 dias. *A. fraterculus* oviposita mesmo sem ter acasalado, obviamente esses ovos são inférteis. O período de oviposição varia de 65 a 80 dias, porém a viabilidade dos ovos decresce ao longo do período de oviposição. Aos dez dias de oviposição, as fêmeas ovipositam cerca de 20 ovos por dia, com 70% de viabilidade, aos 40 dias, cerca de 10 ovos, com 20% de viabilidade e, aos 80 dias, somente 5 ovos, com 5% de viabilidade. Os adultos possuem ampla variação fenotípica, principalmente entre os diferentes gêneros (Salles, 2000).

O ciclo de vida das mosca-das-frutas está condicionado, basicamente, a dois componentes do meio em que vivem, ao clima e ao hospedeiro. O desenvolvimento de *A. fraterculus* é favorecido em temperaturas que variam entre 15 e 27°C (Salles, 2000).

### **3.1.2 Distribuição geográfica, plantas hospedeiras e importância econômica de *A. fraterculus***

Segundo Malavasi *et al.* (2000), *A. fraterculus* é uma praga primária de maior importância na Argentina, Uruguai, e nos Estados do sul e sudeste do Brasil, sendo que nestes locais, se concentram as maiores perdas e medidas de controle.

A mosca-das-frutas ocorre desde a região temperada até a tropical, com exceção das áreas polares e desérticas, onde a vida vegetal é praticamente ausente (Zucchi, 2000b). Algumas espécies apresentam maior capacidade de invadir novos ambientes, como *Ceratitis capitata* (Wiedman, 1824), e outras têm distribuição restrita e baixa capacidade de se adaptar a novos ambientes, como a maioria das espécies das regiões temperadas, do gênero *Ragoletis* (Loew, 1862) (Malavasi *et al.* 2000). Os tefritídeos possuem elevado potencial biótico, facilidade de se dispersarem no ambiente e habilidade de adaptação em diferentes hospedeiros (Salles, 1995), sendo que *A. fraterculus* possui 67 espécies de diversas famílias botânicas. Dentre os hospedeiros mais conhecidos, estão as mirtáceas (araçá, goiaba, guabiroba, jabuticaba, pitanga, etc.), rosáceas (ameixa, morango, pêssego, pêra, nêspera, maçã, etc.), rutáceas (lima, laranja, etc.), dentre outras culturas (Zucchi, 2000b).

No Rio Grande do Sul, a produção de frutíferas é uma atividade importante em quatro sub-regiões do Estado, sendo a macieira cultivada nos Campos de Cima da Serra, com produção anual de 250.000 toneladas. A parte sul do Estado e a região da Serra são responsáveis pela produção de pêssego, especialmente para a indústria de conservas (Kovaleski *et al.* 2000). Destacando-se ainda como o principal polo produtor de uvas para processamento do Brasil (Mello, 2007).

As moscas-das-frutas são os principais insetos-praga que causam danos à fruticultura brasileira, em especial no Rio Grande do Sul à cultura do pessegueiro (Nava & Botton, 2010), e

ultimamente vem se destacando provocando prejuízos na cultura da videira em toda região Sul do país (Nondillo *et al.* 2007).

A importância econômica da mosca-das-frutas deve-se aos danos diretos causados à produção, sendo considerada uma praga-chave para diversas culturas. Os danos podem ser externos e ou internos, o dano externo é causado pela fêmea no momento em que insere o ovipositor em frutos que estão em fase de crescimento, a deformação decorre da lesão dos tecidos no local de introdução do ovipositor. O dano interno é produzido pela larva durante as atividades de alimentação e locomoção, sendo que quanto maior a galeria produzida pela larva, maior a deformação externa. Quando o ataque é intenso, geralmente leva a perda total, com o desenvolvimento completo das larvas, principalmente durante a fase de maturação dos frutos (Kovaleski *et al.* 2000).

### **3.1.3 Tipos de controle**

O controle da mosca-das-frutas no sistema convencional é realizado com base na aplicação de iscas tóxicas e pulverizações de inseticidas organofosforados e piretróides em cobertura, que controlam os estágios imaturos no interior dos frutos e impedem a formação de galerias (Kovaleski & Ribeiro, 2002; Nava & Botton, 2010; Agrofit 2011). Os inseticidas fosforados, entretanto, caracterizam-se por apresentarem elevada toxicidade, baixa seletividade aos inimigos naturais e longo período de carência (Salles, 1998), além dos riscos de contaminação de produtores e consumidores e o impacto ambiental provocado pelo uso destes produtos.

No sistema orgânico de produção, o manejo é realizado com a utilização de armadilhas contendo atrativos alimentares, como proteína hidrolizada, açúcar mascavo, melado de cana, vinagre e sucos de frutas e ainda com aplicações de produtos naturais, tais como, caldas, óleos e extratos vegetais e também diferentes práticas culturais que auxiliem na redução deste inseto-praga (Rupp, 2005).

A procura por produtos orgânicos sem resíduos de agroquímicos é cada vez maior na população mundial, por isso um dos grandes desafios para a agricultura moderna, é a busca por produtos naturais que sejam de baixo impacto ambiental e que tenham controle sobre diversos tipos de insetos-praga (Viegas Jr. 2003).

O efeito de extratos vegetais de cinamomo (*Melia azedarach* Lin.1753) e nim (*Azadiractha indica*), sobre a *A. fraterculus* foi estudado por Salles & Rech (1999). Os autores observaram que os extratos administrados às moscas através de ingestão oral, apresentaram ação inseticida pela redução da postura e do desenvolvimento larval e pupal. Botton *et al.* (2003) avaliaram o efeito do nim (*A. indica*) e do piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.) em laboratório para o controle de *A. fraterculus*. O nim não apresentou efeito sobre adultos e as larvas, enquanto que o piretro foi eficaz no controle do adulto, mas não das larvas. Taufer (1995), utilizando extrato aquoso de *Solanun malacoxylon*, observou um aumento significativo do tempo de desenvolvimento larval de *A. fraterculus*, diminuindo a viabilidade pupal em até 46%.

No controle de *Musca domestica* L. 1758 (Diptera: Muscidae) com extrato aquoso de *M. azedarach*, Freitas (2008) observou 50 e 59,33% de mortalidade larval com a utilização dos extratos nas concentrações de 5 e 10%, e na fase de pupa, o mesmo tratamento a 5 e 10% provocaram mortalidade de 18,48 e 36,46%, respectivamente.

Senthil Nathan *et al.* (2005a), avaliando o efeito de extratos metanólicos de folhas e sementes de *M. azedarach* sobre adultos de *Anopheles stephensi* Lis. (Diptera: Culicidae) em laboratório, constataram anti-oviposição e repelência, sendo que os extratos da semente mostraram uma bioatividade elevada em todas as doses testadas, suprimindo a atividade dos adultos mesmo em doses baixas, enquanto que os extratos da folha provaram serem ativos, somente nas doses mais elevadas.

Já, o composto isolado azadiractina na concentração de 0,1 à 10 µg/mg provocou um bloqueio no desenvolvimento de larvas de 3º instar de *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912

(Diptera: Phlebotominae), enquanto que na maior concentração (10 µg/mg) as larvas alcançaram somente o 2º instar e uma mortalidade de 70% até o 14º dia (Andrade-Coelho *et al.* 2006).

Para o controle da mosca-das-frutas *Rhagoletis indifferens* (Diptera: Tephritidae), VanRanden & Roitberg (1998) não observaram efeito deterrente na oviposição com frutos de cerejas tratados com inseticida à base de nim nas concentrações de 0,1 a 10%. Porém as fêmeas das moscas expostas continuamente a dieta contendo o bioinseticida tiveram 50% de inibição do desenvolvimento dos ovos e também apresentaram ovários descoloridos e redução consideravelmente em tamanho. A sobrevivência do inseto diminuiu significativamente com o aumento da concentração do bioinseticida adicionado a dieta.

## **3.2 Lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda***

### **3.2.1 Taxonomia e biologia**

A espécie *Spodoptera frugiperda* foi classificada por Smith em 1797, como pertencente ao Reino Animal, Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Lepidoptera, Família Noctuidae, Subfamília Xyleninae, Gênero *Spodoptera* (*Laphygma*) e Espécie *Spodoptera frugiperda* (Sarmiento *et al.* 2002).

Apresenta metamorfose completa, do tipo holometabólico, compreendendo as fases de ovo, larva, pupa e adulto. Os adultos normalmente acasalam-se até três dias após a emergência e caracterizam-se por apresentarem hábitos noturnos. As fêmeas podem ovipositar de 1000 a 2000 ovos, principalmente nos primeiros quatro dias após a cópula. Os ovos são dispostos em camadas e recobertos por escamas abdominais (Valicente & Cruz, 1991). As fêmeas podem ovipositar tanto na porção inferior quanto na superior das folhas, logo após a oviposição os ovos têm coloração verde claro e vão escurecendo até tornarem-se cinza, próximo à eclosão (Valicente & Cruz, 1991).

As larvas passam por seis ou sete instares até chegar ao completo desenvolvimento. A larva de último instar mede cerca de 50 mm de comprimento, apresentando coloração que varia de pardo-escuro, verde até quase preta. Longitudinalmente, apresenta três finíssimas linhas de coloração branco-amareladas na parte dorsal do corpo. Na parte lateral, abaixo da linha branco-amarelada, existe uma linha escura mais larga, e mais abaixo dessa, uma listra amarelada irregular marcada com vermelho. A cabeça possui coloração escura com suturas que se cruzam formando um “y” invertido, bem característico na espécie. Com o fim do período larval, as lagartas penetram no solo, onde se transformam em pupas (crisálidas) de coloração avermelhada, medindo em torno de 15 mm de comprimento. Após a emergência surge a mariposa adulta medindo cerca de 35 mm de envergadura, com as asas anteriores de coloração parda-escuro e as posteriores de coloração branca acinzentada (Gallo *et al.* 2002; Nakano *et al.* 1981).

### **3.2.2 Distribuição geográfica, plantas hospedeiras e importância econômica de *S. frugiperda***

A lagarta-do-cartucho ocorre desde a região central dos Estados Unidos até a Argentina e em algumas ilhas a oeste da Índia (Pedigo, 1989). No Brasil sua ocorrência tem sido relatada na maioria dos estados (Lucchini, 1977).

É um inseto polífago, cujas larvas se alimentam de um grande número de plantas cultivadas, entre elas: chicória (*Cichorium intybus* L.), alfafa (*Medicago sativa* L.), algodão (*Gossypium* sp. L.), arroz (*Oryza sativa* L.), ervilha (*Pisum sativum* L.), aveia (*Avena sativa* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), milho (*Zea mays* L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), soja (*Glycine max* L.), dentre outras (Angulo *et al.* 2008).

As lagartas alimentam-se das folhas, reduzindo a área foliar e afetando a capacidade fotossintética das plantas e, conseqüentemente a produção. Estes danos são diferenciados em função da espécie de planta atacada, estágio fenológico, época de ataque e intensidade de infestação (Sarmiento *et al.* 2002).

Dentre as culturas atacadas por *S. frugiperda* no Brasil, destaca-se a cultura do milho (*Z. mays*). Os danos decorrem do ataque às folhas novas, que são raspadas pelas lagartas. A partir do 3º instar a lagarta penetra no cartucho destruindo diversos pontos da folha durante sua alimentação (Hynes, 1942). Esta praga pode reduzir a produção em até 34%, dependendo da fenologia da cultura (Valicente & Barreto, 1999). A capacidade de danos da lagarta é influenciada pelo vigor da planta e pelo clima. Na região tropical, os danos podem ser severos, com até 60% de redução de grãos (Cruz, 1992). Em situação de seca, durante a fase vegetativa do milho, o prejuízo observado em área com 100% de infestação, é de 60%, em função da redução no peso médio de espigas e do aumento no número de plantas improdutivas (Iapar, 1991).

A cultura do milho é uma das mais importantes no contexto econômico e social no mundo, ocupando a segunda posição em termos de produção mundial (Fnp 2004). O Brasil é o terceiro produtor mundial dessa cultura, estando a sua frente apenas os Estados Unidos e a China, no entanto, a produtividade nacional é baixa. A média de rendimento é de menos de um terço da norte-americana (Fnp 2004).

No Brasil, estima-se que a lagarta-do-cartucho seja responsável por mais de 25% dos prejuízos causados por pragas ao milho e pela maior parte dos 38,3 milhões de dólares gastos com pulverizações de inseticidas, resultando no prejuízo anual de aproximadamente 250 milhões de dólares (Waquil & Vilella 2003).

No Rio Grande do Sul, além de ser importante praga da cultura do milho, também se desenvolve no capim arroz, que é uma planta invasora e serve como hospedeira dessa praga (Botton *et al.* 1998). Ocorre geralmente no período entre a emergência das plantas e a irrigação por inundação da lavoura, quando cortam as plantas próximo ao solo e podem destruir extensas áreas de arrozais (Ferreira & Martins, 1984). No arroz irrigado é conhecida como lagarta-da-folha, sendo encontrada alimentando-se de plantas novas, antes da inundação definitiva dos arrozais, consumindo-as completamente.

Nas lavouras onde o arroz também é cultivado sobre taipas, o ataque pode estender-se até a fase de emissão das panículas, devido ao deslocamento das lagartas a estes locais, após a inundação da lavoura (Loeck *et al.* 1993).

O Brasil está entre os dez principais produtores mundiais de arroz, com cerca de 11 milhões de toneladas para um consumo de 11,7 milhões de toneladas base casca. A lavoura orizícola tem grande importância econômica para o país. No ano de 2000 a produção no valor de R\$ 3,34 bilhões, representou 6,7% do valor bruto da produção agrícola nacional (Embrapa, 2005).

Entre os motivos apontados para esse aumento de importância da praga, pode ser citado o desequilíbrio biológico, pela eliminação de seus inimigos naturais, e também o aumento da exploração da cultura, que é cultivada em várias regiões brasileiras, em duas safras anuais. Dessa maneira, livre dos inimigos naturais e com a disponibilidade de alimento durante o ano todo, a praga tem amplas condições de sobrevivência (Cruz & Monteiro, 2004).

### **3.2.3 Tipos de controle**

Devido ao fato dessa praga danificar diversas culturas, em qualquer época do ano, o controle da lagarta-do-cartucho é feito com uso de inseticidas sintéticos (piretróides e organofosforados), os quais atualmente são os métodos mais apropriados para o controle devido a sua ação rápida e eficaz (Agrofit, 2011).

Apesar da eficiência dos inseticidas sintéticos, esses podem apresentar diversos problemas, como contaminação ambiental, altos níveis residuais em alimentos, desequilíbrio biológico e surgimento de populações de insetos resistentes (Rodríguez & Vendramim, 1996).

Os extratos de plantas inseticidas vêm sendo estudados como uma alternativa no manejo integrado de pragas. Segundo Gallo *et al.* (2002) o uso de extratos vegetais tem por objetivo reduzir o crescimento populacional de pragas.



Rodríguez & Vendramim (1996) avaliaram a bioatividade de extratos aquosos de diversas espécies de meliáceas na concentração de 5% sobre *S. frugiperda*, observando mortalidade larval de 100% com os extratos de folhas e ramos de *Trichilia pallida* Swartz e *M. azedarach* e ramos de *C. canjerana*.

Em outro trabalho realizado por Rodríguez & Vendramim (1997), com extratos de folhas de *C. canjerana* e *Swietenia macrophylla* King (1886) incorporados a dieta artificial de *S. frugiperda*, observou-se uma grande redução do peso pupal, sugerindo uma inibição da alimentação ou uma menor eficiência de conversão do alimento ingerido.

Ao avaliarem o efeito inseticida de extratos etanólicos de diversas plantas, Rodrigues *et al.* (2008), observaram que o extrato de *Mascagnia pubiflora* (A.Juss) provocou mortalidade pupal de 13,15% de *S. frugiperda*, enquanto que os extratos de *Ocotea minarum* ((Nees & Mart.) e *Tabebuia aurea* [(Manso) Benth. & Hook. f. ex S. Moore] causaram mortalidade de 8,98 e 7,14%, respectivamente. Os maiores efeitos de mortalidade foram verificados na fase larval, em lagartas tratadas com os extratos de *Nectandra megapota mica* [(Spreng.) Mez], *Terminalia argentea* (Mart & Zucc) e *T. aurea*, as quais apresentaram redução de peso pupal, diferindo estatisticamente da testemunha.

Em teste *in vitro* sem chance de escolha com lagartas de *S. frugiperda*, observou-se que o consumo da área foliar nas seções foliares contendo os óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgares* L.), mil-folhas (*Achillea millefolium* L.) e óleo de nim (*A. indica*), foi equivalente a menos da metade do consumo das seções foliares da testemunha, demonstrando que houve repelência, (Castro *et al.* 2006).

Na atividade inseticida de frutos e sementes de *Trichilia* sp. (Meliaceae) observou-se que os extratos metanólicos dos frutos e as inflorescências de *Trichilia* sp. ocasionaram 70% de mortalidade de *S. frugiperda* com cinco a seis dias de fase larval em ambos os extratos (Pasqualotto *et al.* 2008).

### 3.3 Plantas inseticidas

O uso de plantas com propriedades inseticidas é uma prática muito antiga, até a descoberta dos inseticidas organosintéticos, na primeira metade do século passado, as substâncias extraídas de vegetais eram amplamente utilizadas no controle de insetos (Roel, 2001; Gallo *et al.* 2002).

Dentre os primeiros produtos utilizados estão a nicotina extraída do fumo *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae), a rianodina extraída de *Ryania speciosa* Vahl (Flacuorticaceae), a sabadila oriunda de *Schenocalum officinale* (Schltdl. & Cham.) (Liliaceae), a piretrina proveniente de *Crysanthemum cinerariaefolioum* (Asteraceae), e a rotenona extraída de *Derris* sp. e *Lonchocarpus* spp. (Fabaceae) e *Azadirachta indica* (Meliaceae), produtoras de azadiractina (Lagunes & Rodríguez, 1989).

O emprego de substâncias extraídas de plantas silvestres, na qualidade de bioinseticidas, tem inúmeras vantagens quando comparado ao emprego de sintéticos: os inseticidas naturais são obtidos de recursos renováveis, além se serem de fácil acesso e de baixo custo de produção (Roel, 2001).

De acordo com Vendramin & Castiglioni (2000), as pesquisas com plantas inseticidas são realizadas basicamente com dois objetivos: primeiro, a descoberta de novas moléculas que permitam a obtenção de novos inseticidas sintéticos; segundo, a obtenção de inseticidas botânicos naturais para o uso direto no controle de pragas.

O objetivo principal deve ser reduzir ou, se possível, impedir a oviposição e a alimentação do inseto e, conseqüentemente, o crescimento da população da praga. Em virtude disso, as plantas que são matérias-prima para a obtenção dos derivados botânicos, em vez de plantas inseticidas, deveriam mais apropriadamente ser denominadas plantas insetistásticas, devendo o seu emprego ser considerado como uma técnica complementar dentro de um sistema de manejo biorracional de pragas (Gallo *et al.* 2002).

Nos últimos anos inúmeras plantas com atividade contra insetos pertencentes a diversas famílias botânicas têm sido descobertas, Grainge & Ahmed (1988) catalogaram 2.400 espécies de

plantas com potencial para uso no controle de pragas, mencionando as características gerais das plantas, a ação sobre os insetos, além de uma listagem dos tipos de pragas controladas por essas plantas.

As plantas com atividade inseticida podem causar diversos efeitos sobre os insetos, tais como repelência, inibição de oviposição e da alimentação, alterações no sistema hormonal, causando distúrbios no desenvolvimento, deformações, infertilidade e mortalidade nas diversas fases (Roel, 2001).

Segundo Jacobson (1989) as plantas com atividade inseticida mais promissoras encontram-se nas famílias Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Annonaceae, Labiatae e Canellaceae.

As substâncias químicas presentes nas plantas são constituídas por dois grandes grupos, um formado pelas substâncias essenciais para as atividades metabólicas, como os lipídios, carboidratos, proteínas e ácidos nucléicos, e outro formado pelas substâncias do metabolismo secundário, as quais não são utilizadas para a manutenção da vida da planta, mas como forma de defesa (Taiz & Zeiger, 2004).

Os metabólitos secundários são substâncias que não tem função no metabolismo primário da planta, mas frequentemente tem um papel ecológico marcado como atrativo de polinizadores, como defesa contra micro-organismos, insetos e predadores e, até mesmo, contra outras plantas invasivas. Os metabólitos secundários são sintetizados em células especializadas e em estágios de desenvolvimento distintos, sendo utilizados comercialmente como produtos farmacêuticos ou inseticidas (Balandrin & Klocke, 1985).

As plantas constituem fonte de vários metabólitos secundários, tais como os alcalóides, terpenos, flavonóides e esteróides, com distintas propriedades já comprovadas. Os terpenos, os compostos fenólicos e os compostos nitrogenados formam as três principais classes de metabólitos secundários das plantas utilizados na defesa contra estresse biótico e abiótico (Taiz & Zeiger, 2004).

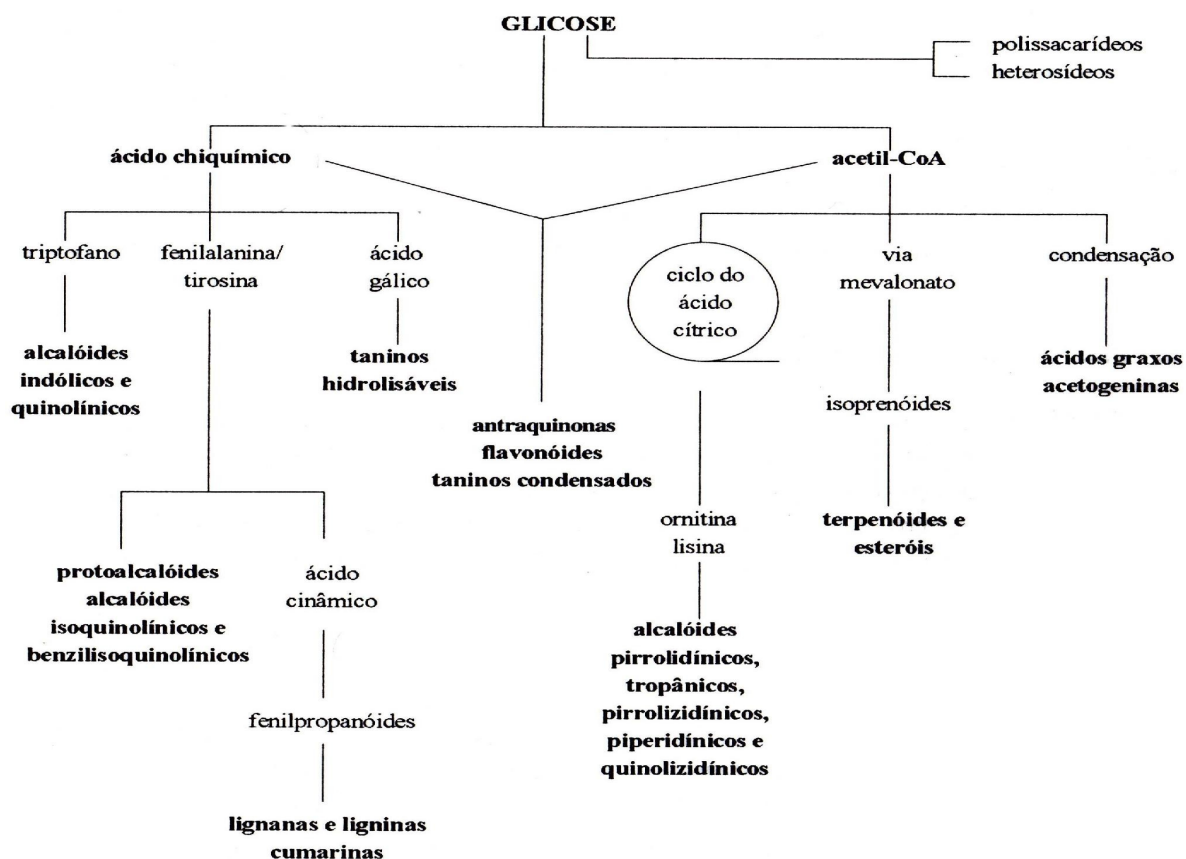
A identificação e o isolamento de compostos vegetais com propriedades inseticidas representam alternativa promissora à incorporação de novas substâncias ao manejo de pragas, configurando-se assim, numa alternativa aos produtos químicos convencionais, visto que a evolução contínua da resistência de pragas a pesticidas limita a adoção, por tempo indefinido, de estratégias baseadas em mortalidade de insetos (Tabashnik & Roush, 1990).

### 3.3.1 Terpenos

Os terpenos abrangem uma grande variedade de substâncias de origem vegetal e sua importância ecológica como defensivos de plantas está bem estabelecida. Vários monoterpenos foram isolados e avaliados quanto à toxicidade frente a diferentes insetos (Viegas Jr., 2003).

Os limonóides são tetranortriterpenóides e talvez os maiores representantes dentro dessa classe como substâncias inseticidas, no entanto monoterpenos simples, como o limoneno e o mirceno desempenham um papel de proteção contra insetos nas plantas que os produzem. Vários trabalhos (Addor, 1994) têm relatado o papel e ação de monoterpenos, bem como complexos terpenóides aldeídicos como, por exemplo, o gossipol, que transfere resistência a insetos em variedades de algodão (Simões *et al.* 2007).

Os limonóides são também conhecidos como meliacinas e são assim denominados devido ao seu sabor amargo. Tais substâncias foram isoladas de plantas pertencentes às famílias Meliaceae, Rutaceae e Cneoraceae. Sua rota biossintética em plantas (Fig.2), deriva do ciclo do ácido cítrico, via mevalonato (Connoly, 1983; Simões *et al.* 2007), e prevê como precursor um triterpeno que, ao final, dá origem aos tetranortriterpenóides pela perda de quatro átomos de carbono do precursor original.

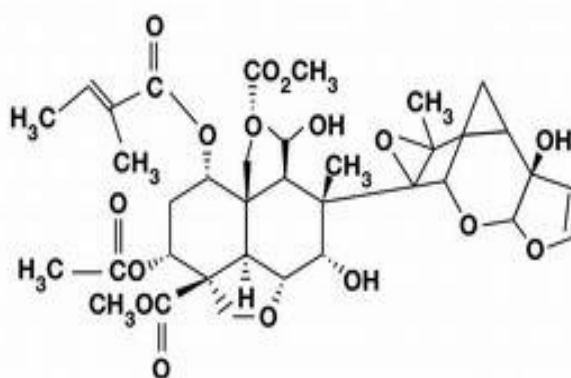


**Figura 2:** Ciclo biossintético dos metabólitos secundários (Simões *et al.* 2007)

Os limonóides representam o nível máximo na sequência de produção de terpenóides em plantas que normalmente não são atacadas por insetos (Viegas Jr., 2003). São conhecidos pelo fato de apresentarem efeito no comportamento, crescimento, atividade antialimentar e regulação do crescimento de insetos (Senthil Nathan *et al.* 2005b). Cerca de 100 triterpenóides têm sido identificados das sementes, madeira, pericarpos, folhas e frutos de *A. indica* (Meliaceae) (Viegas Jr., 2003).

Dentro da família Meliaceae, existe uma grande diversidade de limonóides isolados, entre eles azidaractinas (Huang *et al.* 1995), sendaninas e trichilinas (Takeya *et al.* 1996), sendo azadiractina o principal composto.

A azadiractina (Fig.3), isolada da *A. indica* pela primeira vez por Butterworth & Morgan (1968), é um limonóide que está intimamente associado à ação supressora de apetite ou inibidora de crescimento em insetos e têm sido extensamente estudada, com o objetivo de se conhecer a química, biossíntese, toxicologia e o potencial inseticida deste grupo de compostos naturais (Viegas Jr., 2003). Durante séculos, *A. indica* foi utilizada na Índia no combate a insetos e, atualmente, são extraídos e comercializados compostos químicos ativos sobre mais de 200 espécies de insetos, incluindo alguns moluscos (Viegas Jr., 2003).



**Figura 3:** Estrutura química da Azadiractina (Viegas Jr. 2003).

De acordo com Rembold (1989) a azadiractina interfere no funcionamento das glândulas endócrinas que controlam a metamorfose em insetos, impedindo o desenvolvimento da ecdise, apresentando ainda atividade fago-inibidora.

A partir dos excelentes resultados verificados com o nim, outras meliáceas também passaram a despertar o interesse de pesquisadores, no intuito de encontrar novas espécies e novas moléculas com atividade inseticida (Matos *et al.* 2009).

Estes mesmos autores, identificaram os limonóides cedrelona e angolensato de metila a partir do extrato metanólico de *T.catigua* A.Juss (Meliaceae), o limonóide 11  $\beta$ -acetoxiobacunona de extrato metanólico de frutos de *T. catigua*, os quais todos apresentaram atividade inseticida relevante.

Já para a meliácea *M. azedarach*, foram identificados os limonóides com anel-C *seco* salannal e melicarpinina e também os limonóides salanina, deacetilsalanina, nimbolinina B e nimbolidina B (Huang *et al.* 1996).

### 3.3.2 Compostos fenólicos

Pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (Simões *et al.* 2007). Estas substâncias recebem o nome de compostos fenólicos, polifenóis ou fenilpropanóides (García & Carril, 2009).

Os vegetais e a maioria dos micro-organismos têm a capacidade de sintetizar o anel benzênico, e a partir dele, principalmente compostos fenólicos. Dentre os compostos fenólicos pertencentes ao metabolismo secundário dos vegetais são encontradas estruturas tão variadas quanto à dos ácidos fenólicos, dos derivados da cumarina, dos pigmentos hidrossolúveis das flores, dos frutos e das folhas (Simões *et al.* 2007).

Os fenóis vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos: alguns são solúveis apenas em solventes orgânicos, outros são ácidos carboxílicos e glicosídeos solúveis em água e há, ainda, aqueles que são grandes polímeros insolúveis (Taiz & Zeiger, 2004).

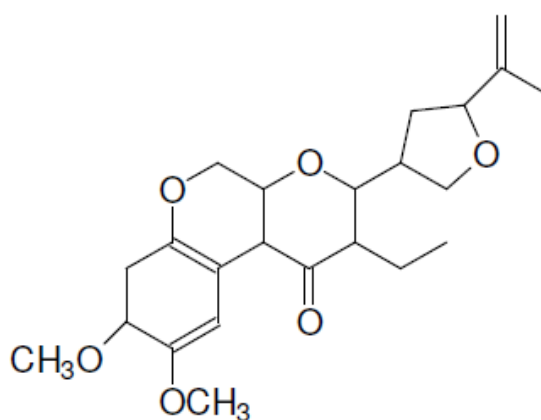
Duas rotas metabólicas básicas estão envolvidas na síntese dos compostos fenólicos: a rota do ácido chiquímico que participa na biossíntese da maioria dos fenóis vegetais, e a rota do ácido malônico, que embora seja uma fonte importante de produtos secundários fenólicos em fungos e bactérias, é menos significativa nas plantas superiores (Taiz & Zeiger, 2004).

A maioria dos compostos fenólicos deriva da fenilalanina, por meio da eliminação de uma molécula de amônia para formar o ácido cinâmico. A enzima fenilalanina amonialiase (PAL) cataliza a formação do ácido cinâmico por eliminação de uma molécula de amônia da fenilalanina.

Esta enzima está situada em um ponto de ramificação entre o metabolismo primário e secundário, de forma que a reação que ela cataliza é uma importante etapa reguladora na formação de muitos compostos fenólicos (Taiz & Zeiger, 2004; García & Carril, 2009).

A lignina é um polímero altamente ramificado de fenilpropanóides. Depois da celulose é a substância orgânica mais abundante nas plantas. É encontrada covalentemente unida a celulose e a outros polissacarídeos da parede celular (García & Carril, 2009). Além do suporte mecânico, tem importante função de proteção às plantas, pois a durabilidade química da lignina a torna relativamente indigerível aos herbívoros, diminuindo a digestibilidade da celulose e proteínas, ligando-se a elas (Taiz & Zeiger, 2004).

Entre os compostos fenólicos também encontramos os flavonóides. Seu esqueleto carbonado contém 15 carbonos ordenados em dois anéis aromáticos unidos por uma ponte de três carbonos, formando uma família de mais de 4.000 diferentes compostos já descritos, incluindo os subgrupos flavanóis, flavanonas, antocianidinas e flavonas. Os flavonóides realizam diferentes funções na natureza, incluindo pigmentação e defesa (García & Carril, 2009; Taiz & Zeiger, 2004). Algumas ligninas, como os rotenóides (rotenona) (Fig. 4) têm ação fortemente inseticida, e outros ainda podem funcionar como fitoalexinas, compostos antimicrobianos sintetizados em resposta a infecções por fungos e bactérias (Taiz & Zeiger, 2004).



**Figura 4:** Estrutura química da Rotenona (Vieira *et al.* 2004).



Os taninos, compostos formados pela polimerização de unidades de flavonóides são dissuasivos (deterrentes) de alimentação por herbívoros e atuam também como antimicrobianos (Taiz & Zeiger, 2004). O nome tanino procede da antiga prática de utilizar extratos vegetais para conversão da pele animal em couro (no curtimento, se ligam ao colágeno aumentando sua resistência ao calor, à água e a micro-organismos) (García & Carril, 2009).

As propriedades defensivas dos taninos são geralmente atribuídas a sua habilidade em se ligar às proteínas, como outros compostos fenólicos, dificultando a digestão nos insetos. A limitação da disponibilidade de proteínas também deve ser fator de inibição do crescimento e desenvolvimento de patógenos (Taiz & Zeiger, 2004).

Os compostos fenólicos formam uma das maiores classes de metabólitos secundários encontrados em vegetais, e muita atenção deve ser voltada a esses compostos, pois muitos apresentam potenciais efeitos biológicos, incluindo ações antioxidantes, antimicrobiana, repelente e anti-inflamatória (Taiz & Zeiger, 2004).

### **3.3.3 Compostos nitrogenados**

Uma grande variedade de metabólitos secundários vegetais possui nitrogênio na sua estrutura. Nesta categoria estão os bem conhecidos anti-herbívoros como os alcalóides e os glicosídeos cianogênicos, muito tóxicos ao homem e com propriedades medicinais, encontrados em mais de 20% das plantas superiores (Taiz & Zeiger, 2004).

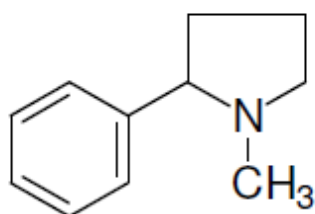
Os alcalóides são uma grande família de mais de 15.000 metabólitos secundários que possuem em comum três características: são solúveis em água, contém ao menos um átomo de nitrogênio na molécula e exibem atividade biológica. São encontrados em aproximadamente 20% das plantas vasculares, a maioria dicotiledôneas herbáceas (García & Carril, 2009).

Acredita-se que a maioria dos alcalóides tem função de defesa contra predadores, especialmente mamíferos, devido a sua toxicidade e a capacidade de deterrência (Taiz & Zeiger,

2004). Tem sido observado que muitas plantas que produzem alcalóides são evitadas por animais ou insetos em sua dieta, isso certamente devido a sua toxicidade ou ao fato de a maioria dos alcalóides possuir gosto amargo. Alguns, como o grupo dos alcalóides pirrolizidínicos, é utilizado por determinado grupo de borboletas para defesa contra predadores, outros são utilizados para síntese de feromônios (Simões *et al.* 2007).

Em humanos, os alcalóides geram respostas fisiológicas e psicológicas, e a maioria deles interagem com neurotransmissores. Em doses muito altas, quase todos os alcalóides são muito tóxicos. No entanto, doses baixas possuem um alto valor terapêutico como relaxantes musculares, tranquilizantes e analgésicos (García & Carril, 2009).

Entre os alcalóides mais conhecidos, encontramos a nicotina (Fig. 5), utilizada como estimulante, tranquilizante e bioinseticida na agricultura; a morfina, que é um analgésico e narcótico; a quinina, utilizada no tratamento para malária; a atropina, um antídoto usado contra outros venenos e também na dilatação de pupilas para exames oftalmológicos; a reserpina e protoveratrina A, como anti-hipertensivos; cafeína, um estimulante do sistema nervoso central, dentre outros (García & Carril, 2009; Simões *et al.* 2007).



**Figura 5:** Estrutura química da Nicotina (Vieira *et al.* 2004).

Os compostos nitrogenados glicosídeos são metabólitos vegetais de grande importância. Seu nome faz referência ao enlace glicosídico que se forma quando uma molécula de açúcar se condensa com outra que contém um grupo hidroxila. Existem três grupos de glicosídeos de particular interesse: saponinas, glicosídeos cianogênicos e glicosídeos cardioativos. Uma quarta

família, os glicosinolatos, se incluem neste grupo devido a sua estrutura similar aos glicosídeos (García & Carril, 2009).

As saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclico. Possuem uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcares), o que determina as propriedades surfactantes das saponinas, assemelhando-se aos detergentes (Simões *et al.* 2007).

Os glicosídeos cardioativos são assim denominados devido a sua ação sobre o músculo cardíaco. Possuem propriedades detergentes, porém sua estrutura contém uma lactona. Encontram-se naturalmente na forma de glicosídeos esteroidais. Os mais conhecidos são a digitoxina e seu análogo digoxina, extraída de *Digitalis purpurea*, utilizada como medicamento no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva (García & Carril, 2009; Simões *et al.* 2007).

Os glicosídeos cianogênicos são compostos nitrogenados, que não são tóxicos, mas rapidamente decompõem-se quando a planta é lesada, produzindo venenos voláteis como o ácido cianídrico (HCN). A cianogênese tem sido detectada em pelo menos 2.650 espécies de plantas pertencentes a mais de 130 famílias e tem sido registrada em bactérias, fungos, líquens, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas (Buhrmester *et al.* 2000).

### **3.4 Família Meliaceae**

As plantas da família Meliaceae pertencem à ordem Sapindales (Souza & Lorenzi, 2008), subdividida em quatro subfamílias, destacando-se Melioideae constituídas de sete tribos e 35 gêneros e Swietenioideae com três tribos e 13 gêneros (Pennington & Styles, 1975). No Brasil ocorrem seis gêneros e cerca de 100 espécies (Souza & Lorenzi, 2008). Os gêneros nativos do Brasil são *Cedrela*, *Cabralea*, *Swietenia*, *Carapa*, *Guarea* e *Trichilia* (Pennington & Styles, 1975), dos quais muitos produzem vários compostos com ação medicinal e inseticida (Lorenzi, 2002).

As meliáceas têm sido bastante investigadas, por apresentarem muitas espécies como fonte de compostos inseticidas, principalmente os limonóides, com diferentes modos de ação, sobre várias espécies de insetos (Rodríguez, 1995). Entre as espécies de meliáceas destacam-se *A. indica* (nim), *M. azedarach* (cinamomo) (Vendramim & Scampini, 1997), *Cedrella fissilis* (cedro) (Matos *et al.*, 2010) e também diversas espécies de *Trichilia* (Pennington & Styles, 1975) sendo, a primeira considerada uma das mais eficientes plantas inseticidas já estudada, e a mais utilizada no mundo todo (Brunherotto & Vendramim, 2001), devido à sua atividade reportada para mais de 400 espécies de insetos (Mordue (Luntz) & Nisbet, 2000).

Diversos autores demonstraram a atividade inseticida de vários gêneros de meliáceas. Carpinella *et al.* (2006) demonstraram potenciais perspectivas do uso de extratos etanólicos de frutos de *M. azedarach* no controle de insetos, observando atividade antialimentar superior a 75% para os coleópteros *Pantomorus leucoloma* (Boh.), *Diabrotica speciosa* (Germar) e *Epilachna paenulata* (Germar), e com resultados similares para os lepidópteros *Spilosoma virginica* (Fabricius), *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) e *Colias lesbias* (Fabricius) (Carpinella *et al.* 2003). O efeito de extratos aquosos desta espécie também foi evidenciado por Migliorini *et al.* (2010), reduzindo a zero a sobrevivência de *D. speciosa* em 96h.

O efeito de extratos aquosos de ramos e folhas de *T. pallida* sobre *S. frugiperda* criadas em genótipos de milho, foi de 100% de mortalidade larval na concentração de 5% (Vendramim & Torrecilas, 1998). Observou-se também que lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de milho tratadas com extratos de acetato de etila de *T. pallida* apresentaram um menor peso e uma duração da fase larval maior que aquelas do controle (Roel & Vendramin, 1999).

A atividade biológica de extratos de folhas, galhos e frutos de *C. fissilis* foram avaliados por Matos *et al.* (2010) contra *S. frugiperda*, obtendo-se 63% de mortalidade alongamento da fase larval, seguido da diminuição do peso pupal. Coitinho *et al.* (2006) verificaram 92,5% de

mortalidade e redução da emergência do gorgulho do milho *S. zeamais* (Mots) tratado com o óleo essencial de *C. fissilis*.

Dessa forma, os vegetais desta família têm merecido a atenção de diversos pesquisadores na busca de diversos compostos químicos para uma possível aplicação como biopesticidas.

### 3.5 *Cabrlea canjerana*

*Cabrlea canjerana* pertence à família Meliaceae, subfamília Melioideae, e a tribo Guareeae (Pennington *et al.* 1981), apresenta um porte arbóreo-arbustivo, estendendo-se desde a Costa Rica até o nordeste da Argentina (Barreiros & Souza, 1986). No Brasil existem três subespécies, *Cabrlea canjerana* subsp. *canjerana*, *Cabrlea canjerana* subsp. *polytricha*. e *Cabrlea canjerana* subsp. *selloi*. Essas subespécies divergem ecologicamente, em relação aos nichos que ocupam cuja distribuição está intimamente relacionada à tipologia de solos, formas de relevo, clima e proximidade de recursos hídricos (Pennington *et al.* 1981; Barreiros & Souza 1986).

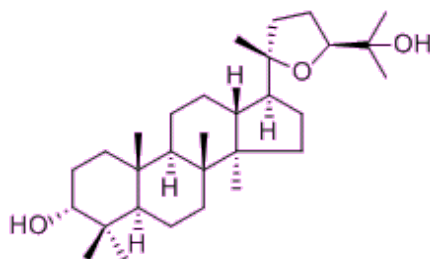
A subespécie *canjerana* apresenta porte arbóreo de 30 a 40 m de altura, ocorrendo em matas de galerias e florestas desde o norte até o sul do Brasil (Barreiros & Souza 1986). É uma espécie monóica, apresenta ovário semi-ínfero com cinco lóculos e cada lóculo tem dois óvulos superpostos. Os frutos são vermelhos (Fig. 6) com cápsula loculicida e pericarpo carnoso. Suas sementes são elipsóides e totalmente cobertas por arilo (Fuzeto *et al.* 2001).



**Figura 6:** Frutos de *Cabrlea canjerana*

A madeira de ótima qualidade de cor branca até vermelho escura é utilizada em carpintaria e marcenaria em geral. O suco dos frutos tem propriedades inseticidas, das flores extraem-se substâncias para perfumes. Da casca se extrai um corante vermelho e também é muito utilizada na medicina popular, principalmente pelos indígenas, devido as diversas propriedades terapêuticas, desde purgativo, febrífugo até abortivo (Bueno *et al.* 2005; Backes & Irgang, 2009).

Segundo dados da literatura são encontrados no gênero *Cabralea* vários triterpenos da série damarano, como por exemplo, o cabraleadiol (Fig. 7), limonóides do grupo gedunina e mexicanolídeos, como por exemplo o deacetilfissinolídeo, sendo encontrados preferencialmente nos frutos (Sarria *et al.* 2011; Soares *et al.* 2004).



**Figura 7:** Triterpeno Damarano Cabraleadiol (Sarria *et al.* 2011).

Braga *et al.* (2006), também fizeram um levantamento de alguns compostos do gênero *Cabralea* descritos na literatura, descrevendo a presença de alguns limonóides *D-seco* como, gedunina, mexicanolídeos, fissinolídeos e triterpenos damaranos como cabraleona e cabraleadiol nas sementes, cabraleona, cabraleadiol, cabralealactona e cabraleaidroxilactona nos frutos e cabraleona, ocotilona, cabraleadiol, cabralealactona e cabraleaidroxilactona na madeira. E ainda, os mesmos autores reportaram a presença de diversos damaranos triterpenos isolados com extrato hexânico de ramos de *C. canjerana*.

Em outro trabalho, Cazal *et al.* (2010) avaliaram a atividade antitumoral dos triterpenos damaranos cabraleadiol e ocotilona extraídos de extrato etanólico de frutos de *C. canjerana*, onde o cabraleadiol foi três vezes mais ativo do que ocotilona na inibição do crescimento celular de

adenocarcinoma da mama e câncer das células do pulmão, evidenciando as propriedades farmacológicas desta planta, a qual já é conhecida pelos Guaranis na medicina indígena.

A atividade inseticida de triterpenóides e limonóides isolados de frutos e sementes de *C. canjerana* foi reportado por Sarria *et al.* (2011), evidenciando prolongamento da fase larval e redução do peso pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial contendo os tratamentos. Enquanto que Smaniotto *et al.* (2010) verificaram 100% de mortalidade para o coleóptero *Acanthoscelides obtectus* (Say) com extrato bruto na concentração de 1% de *C. canjerana* e, Sefrin *et al.* (2008), demonstraram atividade fagoderrente para adultos de *Diabrotica speciosa* com extrato aquoso de folíolos de desta mesma espécie.

#### 4. REFERÊNCIAS

Addor, R.W. (1994). **Insectisides**. In: Simões et al. (2007). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC. 1102p.

Agrofit. (2011). Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Disponível (on line):**

[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). (16 de dezembro de 2011).

Andrade-Coelho, C.A.; Souza, N.A.; Feder, M.D.; Silva, C.E.; Garcia, E.S.; Azambuja, P.; Gonzales, M.S.; Rangel, E.F. (2006). Effects of Azadirachtin on the Development and Mortality of *Lutzomyia longipalpis* Larvae (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Journal of Medical Entomology**. 43:262-266.

Angulo, A.O.; Olivares, T.S.; Weigert, G.T.H. (2008). **Estados Imaturos de Lepidópteros Nóctuidos de Importancia Agrícola y Forestal em Chile y Claves Para Su Identificación (Lepidoptera:Noctuidae)**. 3 ed. Concepción, Chile:Universidad de Concepción.154p.

Backes, P.; Irgang, B. (2009). **Árvores do Sul. Guia de identificação e interesse ecológico**. Porto Alegre:Paisagem do Sul. 332p.

Balandrin, M.F.; Klocke, J.A. (1985). Natural Plant Chemicals: Sources of Industrial and Medicinal Materials. **Science**. 4707:1154-1160.



Barreiros, H. D. S.; Souza, D. S. E. (1986). Notas Geográficas e Taxonômicas sobre *Cabrlea canjerana* (Vell.) Mart. no Brasil (Meliaceae ). **Revista Brasileira de Biologia**. 46: 17-26.

Botton, M.; Scoz, P.L.; Garcia, M.S.; Colletta, V.D. (2003). Novas alternativas para o monitoramento e controle de *Anastrepha fraterculus* (Wied. 1830) em fruteiras temperadas. In: Encontro Nacional sobre Fruticultura de Clima Temperado. **Anais**. pp.163–172. Fraiburgo, SC, (2003).

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.

Braga, P.A.C.; Soares, M.S.; Silva, F.M.G.F.; Vieira, P.C.; Fernandes, J.B.; Pinheiro, A.L. (2006) Dammarane triterpenes from *Cabrlea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae): Their chemosystematic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**. 34:282-290.

Brunherotto, R.; Vendramim, J.D. (2001). Bioatividade de extratos aquosos de *Melia azedarach* L. sobre o desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em tomateiro. **Neotropical Entomology**. 30: 455-459.

Bueno, N. R.; Castilho, R. O.; Costa, R. B.; Pott, A.; Pott, V. J.; Scheidt, G. N.; Batista, M. S. (2005). Medicinal plants used by the Kaiowá and Guarani indigenous populations in the Caarapó Reserve, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Botânica Brasilica**. 19: 39-44.

Buhrmester, R.A.; Ebinger, J.E. & Seigler, D.S. (2000). Sambunigrin and cyanogenic variability in populations of *Sambucus canadensis* L. (Caprifoliaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. 28: 689-695.

Butterworth, J. H.; Morgan, E. D. (1968). Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. **Chemical Communications**. 1: 23-24.

Carpinella, M.C; Defago, M; Valladares, G; Palacios, S.M. (2003). Antifeedant and insecticide properties of a limonoid from *Melia azedarach* (Meliaceae) with potential use for pest management. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51:369–374.

Carpinella, M.C., Defago, M; Valladares, G; Palacios, S.M. (2006). Role of *Melia azedarach* L. (Meliaceae) for the control of insects and acari: present status and future prospects. **Naturally Occurring Bioactive Compounds**. 3: 81-123.

Castro, D.P.; Cardoso, M.G.; Moraes, J.C.; Santos, N.M.; Baliza, D.P. (2006). Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L e *Thymus vulgares* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s. 8:27-32.

Cazal, C.M.; Choosang, K.; Severino, V.G.P.; Soares, M.S.; Sarria, A.L.F.; Fernandes, J.B.; Silva, M.F.G.F.; Vieira, P.C.; Pakkong, P.; Almeida, G.M.; Vasconcelos, M.H.; Nascimento, M.S.J.; Pinto, M.M.M. (2010). Evaluation of effect of triterpenes and limonoids on cell growth, cell cycle and apoptosis in human tumor cell lines. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**. 10:769-776.

Coitinho, R.L.B.C.; Oliveira, J.V.; Gondim Jr, M.G. C.; Câmara, C. A.G. (2006). Atividade inseticida de óleos vegetais sobre *Sitophilus zeamais* mots. (Coleoptera: Curculionidae) em milho armazenado. **Caatinga**. 19:176-182.

Connoly, J.D. (1983). **Chemistry of the Limonoids of the Meliaceae and Cneoraceae**. In: Simões et al. (2007). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC.1102p.

Cruz, I. (1992). Determinação dos instares de *Spodoptera frugiperda* em lagartas alimentadas com diferentes dietas. **Relatório técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo 1992-1993**. Sete Lagoas, 5: 76-77.

Cruz, I.; Monteiro, M.A.R. (2004). Controle Biológico da lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda*, utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum*. EMBRAPA-CNPMS. v.98. 4p. Sete Lagoas.. **(Comunicado Técnico)**.

Embrapa Clima Temperado. (2005). Sistemas de Produção 3, Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil.

**Disponível (on line)**

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/index.htm>

(02 de outubro de 2010).

Ferreira, E.; Martins, J.F.S. (1984). **Insetos prejudiciais ao arroz no Brasil e seu controle**.

EMBRAPACNPAF: Documentos, 11, 67 p. Goiânia, 1984.

Fnp. Consultorias & Agroinformativos. Agriannual. (2004): **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo, Brasil. 496p.

Freitas, S.R.Q. (2008). Bioatividade de extratos aquosos de *Eucalyptus* sp. L'Hér. (Myrtaceae) e *Melia azedarach* L. (Meliaceae) sobre *Musca domestica* L. (Diptera, Muscidae). **Dissertação de mestrado**. Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

Fuzeto, A.P.; Barbosa, A.A.A.; Lomônaco, C. (2001). *Cabralea canjerana* subsp. *polytricha* (Adri. Juss.) Penn. (Meliaceae), uma espécie dióica. **Acta Botanica Brasilica**.15:167-175.

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

García, A.A.; Carril, E.P.U. (2009). **Metabolismo secundário de plantas**. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2:119-145.

Grainge, M.; Ahmed, S. (1988). **Handbook of plants with pest-control properties**. NewYork: JohnWiley. 470p.

Huang, R.C.; Okamura, H.; Iwagawa, T.; Tadera, K.; Nakatani, M. (1995). Azedarachin C, a limonoid antifeedant from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**. 38:593-594.

Huang, R. C.; Tadera, K.; Yagi, F.; Minami, Y.; Okamura, H.; Iwagawa, T. (1996). Limonoids from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**. 43:581-583.

- Hynes, H.B.N. (1942). Lepidopterous pests of maize in Trinidad. **Tropical Agriculture**. 19:194-202.
- Iapar- Fundação instituto agrônômico do Paraná. (1991). **A cultura do milho no Paraná**. Circular n° 68. Paraná, Brasil. 271p.
- Jacobson, M. (1989). **Botanical pesticides – past, present and future**. In: Arnasan, J.T.; Philogene, B.J.R.; Morandi, P. (ed). Insecticides of plant origin. Washington: American Chemical Society, p.1-10.
- Kovaleski, A; Sugayama, R.L.; Malavasi, A. (2000). **Controle químico em macieiras**. In: Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil. Ribeirão Preto, SP: Ed. Holos. pp. 135-141.
- Kovaleski, A.; Ribeiro, L.G. (2002). Manejo de pragas na produção integrada de maçã. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 34. Bento Gonçalves. **(Circular Técnica)**.
- Lagunes, T.A.; Rodríguez, H.C. (1989). **Búsqueda de tecnología apropiada para el combate de plagas del maíz almacenado en condiciones rústicas**. Chapingo: Conacyt. 150p.
- Loeck, A.E.; Martins, J.F.S.; Botton, M., Carbonari, J.J.; Canever, M.D.; Moreira, M.R. (1993). **Método de avaliação de inseticidas para o controle da lagartada-folha na cultura do arroz irrigado**. In: An. Reun. Cult. Arroz Irrig, 20, Pelotas. pp.222-223.
- Lorenzi, H. (2002). **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4aed. Nova Odessa, SP, Brasil: Instituto Plantarum de Estudos da Flora.

Lucchini, F. (1977). Biologia de *Spodoptera frugiperda* (Smith & Abbot, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Níveis de prejuízos e avaliação toxicológica de inseticidas para o seu combate em milho. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil.

Malavasi, A.; Zuchi, R.A.; Sugayama, R.L. **Biogeografia**. (2000). In: Malavasi, A.; Zucchi, R.A. Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil. Ribeirão Preto, SP; Ed. Holos. pp 93-98.

Matos, A.P.; Nebo, L.; Vieira, P.C.; Fernandes, J.B.; Silva, M.F.G.F; Rodrigues, R.R. (2009). Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* e *T. Catigua* (Meliaceae). **Química Nova**. 32:1553-1556.

Matos, A.P; Myamoto, D.T.; Alves, A.R.; Leite, A.C.; Vieira, P.C.; Fernandes, J.B; Silva, M.F.G.F. (2010). Atividade de *Cedrela fissilis* e *Cipadessa fruticosa* (Meliaceae) sobre a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera:Noctuidae). **Biossay**. 5:1-7.

Mello, L.M.R. (2007). Atuação do Brasil no mercado vitivinícola mundial - Panorama 2006. Bento Gonçalves: EMBRAPA/CNPUV. **Disponível (on line)** <[http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/panorama\\_2006vitivinicultura.pdf](http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/panorama_2006vitivinicultura.pdf)> (23 de janeiro de 2012).

Migliorini, P.; Lutinski, J.A.; Garcia, F.R.M. (2010). Eficiência de extratos vegetais no controle de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae), em laboratório. **Revista Biotemas**. 23:83-89.

Mordue (Luntz), J.A.; Nisbet, A.J. (2000). Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. 29: 615-632.

Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Zucchi, R.A. (1981). **Entomologia Econômica**. Piracicaba: Livroceres. 314p.

Nava, D. E.; Botton, M. (2010). **Bioecologia e controle de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* em pessegueiro**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. Documentos, 315. 29 p.

Nondillo, A.; Zanardi, O.; Afonso, A.P.; Benedetti, A.J.; Botton, M. (2007). Efeito de Inseticidas Neonicotinóides sobre a Mosca-das-Frutas Sul-Americana *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) na Cultura da Videira. **BioAssay**. 2:1-9.

Pasqualotto, V. G.; Severino, V.G.P.; Nebo, L.; Matos, A. P.; Vieira, P. C.; Fernandes, J.B.; Silva, M. F. G. F. (2008). Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Inseticida dos Frutos e Sementes de *Trichilia* ssp. (Meliaceae). In: 31 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. **Resumos**. Águas de Lindóia, SP, 2008.

Pedigo, L. P. (1989). **Entomology and pest management**. New York: MacMillan. 646 p.

Pennington, T. D.; Styles, B. D.; Taylor, D.A.H. (1981). **Meliaceae. Flora Neotropica** Monograph 28: 235-244.

Pennington, T.D.; Styles, B.D. (1975). **A generic monograph of Meliaceae**. Blumea, 22: 419-540.

Rembold, H. (1989). **Azadirachtins, their structure and mode of action**. In: Arnason, J.T.; Philogène, B.J.R.; Morand, P. (Ed.) *Insecticides of plant origin*. Washington: ACS. cap.11, p.150-163.

Ribeiro, L. G. (1999). **Principais pragas da macieira**. In: Manual de identificação de doenças e pragas da macieira. Florianópolis: EPAGRI. pp 97-149.

Rodríguez, H.C. (1995). Efeito de extratos aquosos de *Meliaceae* no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Tese de Doutorado**. ESALQ/USP. Piracicaba, SP.

Rodríguez, H.C.; Vendramim, J.D. (1996). Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Manejo Integrado de Plagas**. 42:14-22.

Rodríguez, H.C.; Vendramim, J.D. (1997). Avaliação da bioatividade de extratos aquosos de Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda*. **Revista de Agricultura (Piracicaba)**. 72: 305-318.

Rodrigues, S.R.; Coutinho, G. V.; Garcez, W.S.; Garcez, F. R.; Zanella, D.P.F. (2008). Atividade inseticida de extratos etanólicos de plantas sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Agrarian**. 1:133-144.

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.; Vendramim, J.D. (1999). Desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em genótipos de milho tratados com extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* (Swartz). **Scientia Agricola**. 56: 581-586.



Rupp, L.C.D. (2005). Percepção dos agricultores orgânicos em relação à *Anastrepha fraterculus* (wied.) (Diptera: Tephritidae) e efeito de preparados homeopáticos no controle da espécie em pomares de pessegueiro. 89p. **Dissertação de Mestrado**. Universidade do Estado de Santa Catarina. Lages, Brasil.

Salles, L.A.B. (1995). **Bioecologia e controle da mosca-das-frutas sul-americana**. Pelotas:Embrapa-CPACT. 58p.

Salles, L.A.B. (1998). Principais pragas e seu controle. In: Medeiros, C.A.B. & Raseira, M.C.B. (Ed). **A Cultura do Pessegueiro**. Brasília: Embrapa-SPI, Pelotas: Embrapa-CPACT. pp. 205-242.

Salles, L.A.B. (2000). **Biologia e ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus***. In: Malavasi, A.; Zucchi, R.A. Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil. Ribeirão Preto, SP,: Ed. Holos. pp 81-86.

Salles, L.A.B.; Rech, N. (1999). Efeito de extratos de nim (*Azadiractha indica*) e cinamomo (*Melia azedarach*) sobre *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Díptera: Tephritidae). **Revista Brasileira de Agrociência**. 5:225-227.

Sarmiento, R.A.; Aguiar, R.W.S.; Aguiar, R.A.S.S.; Vieira, S.M.J.; Oliveira, H.G.; Holtz, A.M. (2002). Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em milho no Brasil. **Bioscience Journal**. 18: 41-48.

Sarria, A.L.; Soares, M.S.; Matos, A.P.; Fernandes, J.B.; Vieira, P.C.; Silva, M.F.G.F. (2011). . Effect of triterpenoids and limonoids isolated from *Cabrlea canjerana* and *Carapa guianensis* (Meliaceae) against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Z.Naturforsch.** 66: 245-250.

Seffrin, R.C.A.S.; Costa, E.C.; Longhi, S.J.; Lopes, S.J.; Santos, V.J. (2008). Comportamento alimentar de adultos de *Diabrotica speciosa* na presença de extratos aquosos de Meliaceae. **Ciência Rural.** 38: 2115-2118.

Selivon, D.; Perondini, A.L.P. (2000). **Morfologia dos ovos de espécies de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha***. In: Malavasi, A.; Zucchi, R.A. Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil. Ribeirão Preto, SP: Holos. pp 49-54.

Senthil Nathan, S.;Savitha, G.; George, D. K.; Narmadha, A.; Suganya L.; Chung, P. G. (2005a). Efficacy of *Melia azedarach* L. extract on the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Bioresource Technology.** 97: 1316–1323.

Senthil Nathan, S.; Kalaivani, K., Murugan, K.; Chung, P.G. (2005b). The toxicity and physiological effect of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medicalis* (Guenée) the rice leaf folder. **Pesticide Biochemistry and Physiology.** 81:113-122.

Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (2007). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC. 1104 p.

Smaniotto, L.; Moura, N.F.; Denardin, R.B.N.; Garcia, F.R.M. (2010). Bioatividade de *Cabrlea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) no controle de adultos de *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera, Bruchidae) em laboratório. **Revista Biotemas**. 23:31-35.

Soares, M. S.; Silva, M. F. G. F.; Fernandes, J. B., Vieira, P.C. (2004). Triterpenos e Limonóides isolados dos frutos de *Cabrlea canjerana*. In: XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares. **Resumos**. pp. 23.

Souza, V.C.; Lorenzi, H. (2008). **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum.

Tabashnik, B.E.; Roush, R.T. (1990). **Pesticide Resistance in Arthropods**. (Eds.). New York: Chapman & Hall. 303p.

Taiz, L.; Zeiger, E. (2004). **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed. 719p.

Takeya, K.; Qiao, Z.; Hirobe, C.; Itokawa, H. (1996). Cytotoxic trichilin-type timonoids from *Melia azedarach*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 4:1355-1359.

Taufer, M. (1995). Aspectos biológicos e o efeito de esteróides e análogos no desenvolvimento pré-imaginal e imaginal de *Anatrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Monografia de graduação**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil.

Torrecillas, S.M.; Vendramim, J.D. (2001). Extrato aquoso de ramos de *Trichilia pallida* e o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* em genótipos de milho. **Scientia Agrícola**. 58:27-31.

Valicente, F. H.; Cruz, I. (1991). Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus. Sete Lagoas: Embrapa, 23 p. (**Circular Técnica**).

Valicente, F.H.; Barreto, M.R. (1999). Levantamento dos inimigos naturais da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), na região de Cascavel, PR. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. 28:333-337.

VanRanden, E.J.; Roitberg, B.D (1998). Effect of a neem (*Azadirachta indica*) – based insecticide on oviposition deterrence, survival, behavior and reproduction of adult western cherry fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Ecology and Behavior**. 91: 123-131.

Vendramim, J.D. & Castiglioni, E. (2000). Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas. In: **Bases e Técnicas do Manejo de Insetos**. Santa Maria: Pallotti. pp 113-128.

Vendramim, J.D. & P.J. Scampini. 1997. Efeito do extrato aquoso de *Melia azedarach* sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em dois genótipos de milho. **Revista de Agricultura**. 72: 159-170

Vendramim, J.D. & Torrecillas, S.M. (1998). Efecto de extractos aquosos de *Trichilia pallida* (Meliaceae) y genótipos resistentes de maíz sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). In: Simposio internacional sobre substancias vegetales y minerales en el combate de plagas. **Anais**. p.133-144. Acapulco (1998).

Viegas Jr., C. (2003). Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Quimica Nova**. 26:390-400.

Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Andrei, C. C. (2004). **Plantas inseticidas**. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. da UFRGS, 1102 p.

Waquil, J.M.; Vilella, F.M.F. (2003). Gene bom. **Revista Cultivar**. 49:22-26.

Zucchi, R.A. **Taxonomia**. (2000a). In: Malavasi, A.; Zucchi, R.A. Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil. Ribeirão Preto, SP: Holos. pp 13-24.

Zucchi, R.A. (2000b). **Espécies de *Anastrepha*, Sinonímias, Plantas Hospedeiras e Parasitóides**. In: Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil. Ribeirão Preto, SP: Holos. pp 41-48.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 CAPÍTULO 1

#### **Canjerana (Meliaceae) extracts to control of South American fruit fly (Diptera: Tephritidae)**

Flaviane Eva Magrini<sup>1</sup>, Alexandre Specht<sup>1,2</sup>, Juliano Gaio<sup>1</sup>, Cristiane Priscila Girelli<sup>1</sup>, Ignacio Miguez<sup>3</sup>, Horacio Heinzen<sup>3</sup>, Valdirene Camatti Sartori<sup>1</sup> & Veronica Cesio<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Controle de Pragas - Caxias do Sul - RS/ Brasil 95070-560.

<sup>2</sup>Embrapa Cerrados - BR 020 Km 18 Planaltina, DF/ Brasil 73310-970

<sup>3</sup>Universidad de la Republica – Facultad de Química- Laboratorio de Química de Productos Naturais – Montevideo / Uruguai (11800).

(Artigo a ser submetido à revista *Journal of Insect Science*)

## **Abstract**

Several representatives of Meliaceae contain compounds with biological activity on insects, with reduced negative effects on the environment and humans. This study evaluated the activity of fruits and seeds extracts of *Cabralea canjerana*, obtained with ethyl acetate and ethanol on *Anastrepha fraterculus*, a major pest of fruits. Substances from limonoids and triterpenes groups were detected from fruits and seeds extracts. Each extract was tested at three concentrations and added to artificial diet of adults to assess the toxic and antifeeding activity. Three concentrations were sprinkled on fruits of *Carica papaya* to assess the effects on oviposition repellency and *A. fraterculus* biological development. The extracts presented antifeeding and toxic activities on *A. fraterculus* adults, particularly those obtained with ethyl acetate. When the extracts were sprayed on fruits for oviposition deterrence they affected negatively the development of *A. fraterculus*, increasing the number of larviform pupae, decreasing the pupal viability, affecting sex ratio and increasing the number of deformed adults. The activity of extracts remained for at least 72 hours. The mode of action of extracts of *C. canjerana* on *A. fraterculus*, indicate the potential of its use in Integrated Management Programs of fruits.

**Keywords:** *Anastrepha fraterculus*, *Cabralea canjerana*, antifeedant activity, toxic, oviposition deterrence.

## Introdução

A mosca-das-frutas-sul-americana *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae), é praga-chave de diversas frutíferas na Argentina, Uruguai, Sul e Sudeste do Brasil (Malavasi et al. 2000). Suas larvas se desenvolvem em frutos de mais de 67 hospedeiros nativos e cultivados (Zucchi 2000), podendo comprometer até 100% da produção (Carvalho 2006). O controle dos adultos é realizado com iscas tóxicas e as larvas com aplicações de produtos químicos (Kovaleski et al. 2000), que podem prejudicar os aplicadores e o ambiente, permanecer como resíduos em alimentos e no solo, provocar desequilíbrio biológico e determinar a seleção de populações resistentes (Whalon et al. 2008). Alternativamente, para minimizar os prejuízos em pomares orgânicos, utilizam-se óleos voláteis, extratos vegetais e sabões (Gonçalves et al. 2005). Em relação ao controle de representantes de Tephritidae, estudos que utilizam extratos vegetais, especialmente de Meliaceae e, particularmente derivados de nim, apresentam resultados encorajadores (Steffens & Schmutterer 1982; Stark et al. 1990; Prokopy & Powers 1995; VanRaden & Roitberg 1998a,b; Salles & Rech 1999; Singh 2003; Khan et al. 2007; Ali et al. 2011; Efrom et al. 2011).

Representantes de Meliaceae geralmente apresentam limonóides em suas estruturas (Connolly 1983; Viegas Jr 2003). Estes compostos bioativos agem de diferentes formas contra insetos de diversas ordens (Mordue & Nisbet 2000). Entre as principais meliáceas destacam-se o Nim - *Azadirachta indica* (Schmutterer 1990; Bostid 1992), o cinamomo - *Melia azedarach* (Carpinella et al. 2002), o cedro *Cedrela fissilis* (Ambrozin et al. 2006), a andiroba *Carapa guianensis* (Lavie et al. 1973, Qi et al. 2004), *Dysoxylum malabaricum* (Govindachari et al. 1994, 1995), *Sandoricum koetjape* (Powell et al. 1991) e representantes de *Trichilia* (Roel et al. 2000; Matos et al. 2009; Baatile et al. 2011) e *Cabrlea canjerana canjerana* (Vell.) Mart. (Rao et al. 1975; Schmeda-Hirschmann et al. 1992; Braga et al. 2006, Sarria et al. 2011).



*C. canjerana* é uma meliácea arbórea que ocorre da Costa Rica ao nordeste da Argentina (Pennington & Styles 1975; Barreiros & Souza 1986). Diversas propriedades terapêuticas têm sido exploradas, principalmente pelos indígenas (Bueno et al. 2005). Descreve-se a presença de limonóides do grupo gedunina, mexicanolídeos (Rao et al. 1975) e dammaranos triterpenos nos ramos e sementes (Rao et al. 1975; Braga et al. 2006; Sarria et al. 2011). Com relação a efeito de substâncias provenientes de *C. canjerana* sobre insetos Schmeda-Hirschmann et al. (1992) descreveram atividade inseticida de extratos etanólicos e hexânicos de folhas e frutos, contra ninfas de *Rhodnius neglectus*, um dos vetores da doença de Chagas e, recentemente, Sarria et al. (2011) descreveram a ação dos triterpenos e limonóides ocotilone, cabraleadiol, methyl angolensate e 3- $\beta$ -deacetylfissinolide isolados de extratos etanólicos de frutos e sementes contra a lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda*.

Este estudo objetivou avaliar a atividade de extratos etanólico e de acetato de etila, obtidos de frutos e sementes de *Cabralea canjerana* sobre a ingestão e oviposição de adultos e o desenvolvimento dos imaturos de *A. fraterculus*.

## **Materiais e métodos**

### **Material vegetal**

Frutos de *Cabralea canjerana canjerana* foram coletados em dezembro de 2009 em árvores do campus da Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, Brazil (29°9'46"S e 51°8'52"W). O material foi identificado e classificado pelo taxonomista de plantas Dr. Ronaldo Adelfo Wasun, do Museu de Ciências Naturais da UCS. A exsicata (HUCS n° 35647) foi depositada no herbário deste museu.

## **Obtenção dos extratos vegetais e identificação dos compostos**

Os frutos foram manualmente separados das sementes (Cañigueral et al. 1998). O pericarpo foi cortado em pequenos pedaços (1cm<sup>3</sup>), pesado (100g) e macerado em hexano (1:3) à temperatura ambiente por 30 min em agitação magnética. Após, a solução foi filtrada e o extrato hexânico descartado. Os frutos remanescentes foram extraídos com ambos acetato de etila ou etanol (1:10) com agitação durante 48h. Todos os extratos foram filtrados com papel filtro Watman n° 1. O filtrado foi evaporado através de evaporação rotativa (rotavapor). Os extratos de sementes foram preparados da mesma forma que os extratos de frutos. Os extratos de frutos e de sementes em acetato de etila foram avaliados fitoquimicamente através de cromatografia de camada delgada (CCD) (Merk Aluminium TLC Silica gel 60 F254) empregando como fase móvel: Clorofórmio: Metanol (97:3) utilizando diferentes reveladores: Dragendorff, Sulfato de Cobre, Ácido Sulfúrico Vanilina, Revelador específico de Açúcares, Redutor de Fluorescência UV e Anisaldeído (Anonymous 1974; Wagner & Bladt 1995).

## **Insetos e metodologia de criação**

Os insetos (*A. fraterculus*) utilizados nos bioensaios foram obtidos da criação massal de insetos do Laboratório de Controle de Pragas, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, RS. Toda a criação foi mantida em temperatura de 25 ± 3°C, umidade relativa (UR) de 70 ± 10% e fotofase de 12 horas, com adultos confinados em gaiolas plásticas (30 x 30 x 40) revestidas com tecido voil e larvas criadas em mamão papaia como substrato. Os demais detalhes da metodologia seguem como descrito em Salles (1992) e Machota Jr et al. (2010).

## **Atividade antialimentar dos extratos aos adultos**

Os testes foram realizados com chance de escolha, com fêmeas e machos de *A. fraterculus*, com 15 a 20 dias de idade, privados de alimentação por 12h. Três casais foram colocados em cada gaiola, cilíndrica de plástico transparente (9 cm de diâmetro x 10cm de altura). Cada gaiola foi considerada

como uma repetição, sendo cada tratamento composto por sete repetições. Nos tratamentos empregaram-se solução aquosa de proteína hidrolizada 3% adicionada dos extratos na concentração de 5mg/mL, com adição de 1gL<sup>-1</sup> do corante vermelho Ponceau (Sigma Chemical Co.) (Cruz et al. 1997) para verificar a ingestão, e na mesma gaiola foi adicionado o tratamento controle utilizando-se apenas proteína hidrolizada sem corante. Os tratamentos foram oferecidos através de um rolete de algodão inserido em um recipiente de 4mL (Scoz et al. 2004). A atividade antialimentar foi avaliada 24h após o início do experimento e o percentual médio de repelência foi calculado através da fórmula de Obeng-Ofori (1995) que consta de:

$$[(\text{Média dos insetos do controle} - \text{média dos insetos do tratamento}) / (\text{Média dos insetos do controle} + \text{média dos insetos do tratamento})] \times 100.$$

### **Efeito tóxico dos extratos aos adultos**

O ensaio foi realizado da mesma forma que no item anterior, porém sem chance de escolha. Nos tratamentos empregaram-se os extratos nas concentrações de 1, 2,5 e 5mg/mL, com adição de 1gL<sup>-1</sup> do corante vermelho Ponceau adicionados à solução aquosa de proteína hidrolizada 3%. Para o grupo controle, em gaiolas separadas, utilizou-se apenas proteína hidrolizada e corante. O número de insetos sobreviventes foi avaliado 24, 48 e 72 h após o início do experimento. A determinação da concentração letal (CL<sub>50</sub>) e do tempo letal (TL<sub>50</sub>) foi realizada empregando a análise de Probit (Finney 1971). Quando a mortalidade dos insetos mantidos como controle foi superior a 10%, utilizou-se valores de mortalidade corrigida segundo a fórmula de Abbott (1925).

### **Efeito dos extratos sobre a oviposição**

Foram utilizados dez casais de *A. fraterculus* com 15 a 20 dias de idade em gaiolas de madeira revestidas com tecido filó (30 x 30 x 30cm), sendo cinco repetições para cada tratamento e controle. Foi colocado um fruto de mamão papaia em cada gaiola (sem chance de escolha). Todos os frutos

foram aspergidos com os extratos diluídos em água e tween nas concentrações de 1, 2,5 e 5mg/mL, e somente água e tween para o controle. Os frutos do primeiro tratamento foram oferecidos imediatamente após a secagem do extrato sobre o fruto (1h), o segundo 24h após o primeiro e assim sucessivamente até 72h. Os frutos ficaram expostos aos insetos por 24h, depois foram transferidos e armazenados individualmente em potes plásticos (1000mL), contendo vermiculita expandida e triturada, cobertos com tela plástica envolta por tecido 'voil'. Após 15 dias, os restos dos frutos foram retirados, a vermiculita foi peneirada e então se realizou a contagem das pupas por fruto.

### **Efeito dos extratos sobre o desenvolvimento**

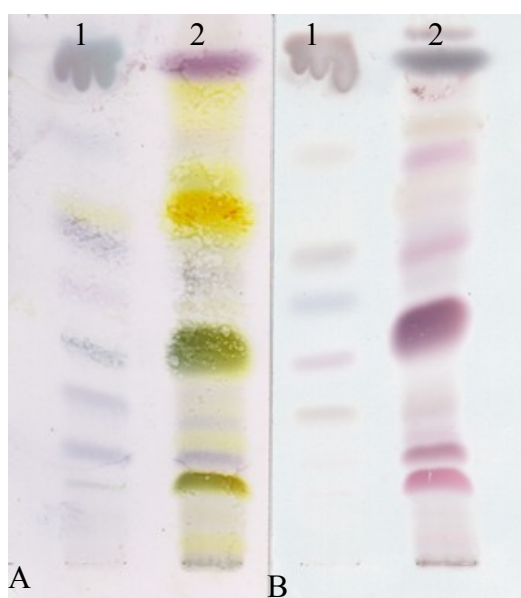
Além do número de insetos por fruto, obtido no item anterior avaliaram-se parâmetros morfológicos das pupas e adultos. As pupas foram caracterizadas quanto ao formato normal e larviforme (Hallman & Zhang 1997) e, em seguida, foram mantidas em potes, contendo vermiculita umedecida, individualizados por fruto até a emergência dos adultos. No primeiro dia após a emergência os adultos foram sacrificados em freezer (-17°C) para posteriormente identificar o sexo (Zucchi et al. 2000), e calcular a razão sexual (Silveira Neto et al. 1976). Também foi avaliado o percentual de ocorrência de deformações morfológicas.

### **Análise estatística**

Os dados experimentais foram analisados utilizando one way ANOVA, cujas médias foram comparadas pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ) utilizando-se médias transformadas em raiz quadrada ( $x + 0,5$ ). Entretanto as médias e respectivos desvios padrão apresentados nas tabelas representam os valores originais.

## Resultados

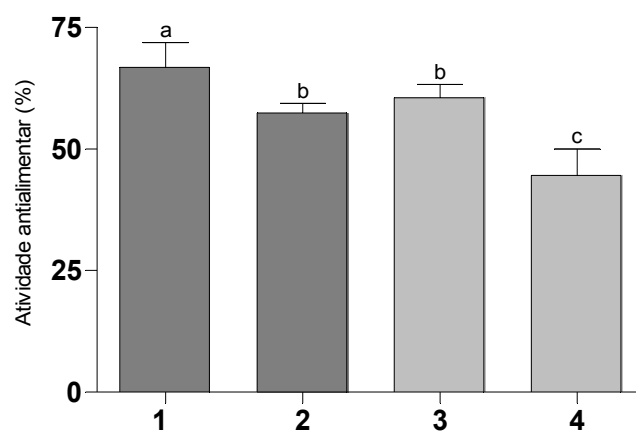
O estudo preliminar através de CCD combinado com reveladores específicos dos extratos de frutos e sementes obtidos com acetato de etila indicaram a presença de triterpenóides e compostos fenólicos em ambos, porém o perfil cromatográfico comparativo entre os extratos, revelados com Sulfato de Cobre e Ácido Sulfúrico-Vanilina são diferentes (Fig. 1), observando-se que a concentração de triterpenos é diferente entre sementes e frutos. Enquanto que os compostos majoritários de Rf 0,4 e 0,65 que revelam amarelo e verde com Ácido Sulfúrico Vanilina indicam à possível presença terpenos, incluindo terpenos oxidados, os quais não estão presentes nas sementes. A não observação de bandas com reativo de Dragendorff pressupõe que os extratos avaliados não apresentam alcalóides.



**Figura 1:** Cromatografia de camada delgada (CDD) de extratos de sementes (1) e frutos (2) de *C. canjerana* com acetato de etila revelados com Ácido Sulfúrico-Vanilina (A) e Sulfato de Cobre (B).

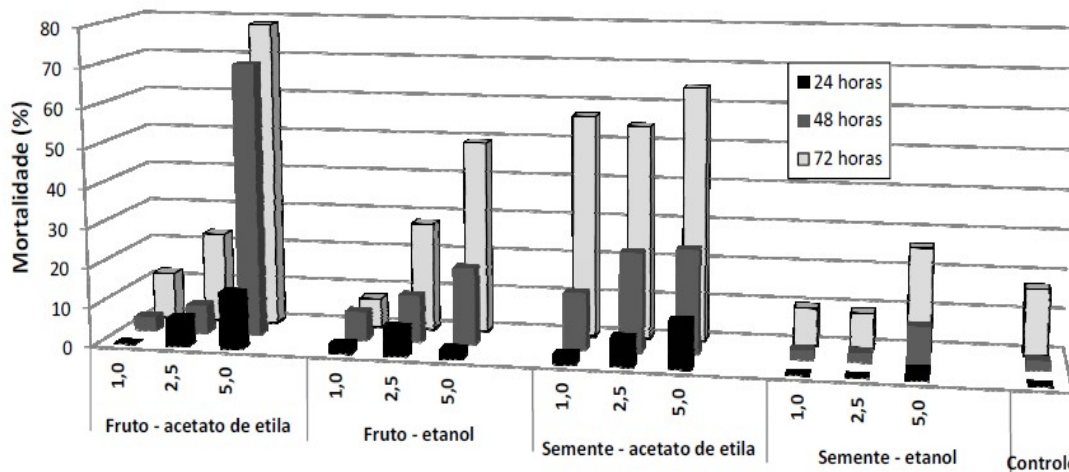
Todos os extratos conferiram repelência para adultos *A. fraterculus*, sendo a maior atividade antialimentar (Fig. 2) observada para a adição do extrato de fruto obtido com acetato de etila (66,66%), seguido pelo extrato de semente em acetato de etila (60%), e fruto etanólico (57,33%),

sem diferenças significativas entre eles. O menor percentual de repelência foi para o extrato de semente etanólico (43,99%).



**Figura 2:** Percentual médio de atividade antialimentar de adultos de *A. fraterculus* alimentados com dieta artificial contendo os extratos na concentração de 5mg/mL em teste com chance de escolha. (1) fruto acetato de etila; (2) fruto etanólico; (3) semente acetato de etila; (4) semente etanólico.

Todos os extratos de *C. canjerana* afetaram a sobrevivência dos adultos de *A. fraterculus*, (Figura 3, Tabela1) principalmente a partir de 48 e 72h. Neste experimento observou-se que, mesmo sem chance de escolha, as moscas não se alimentaram da dieta adicionada com extratos por pelo menos 24h após o início do experimento. Entretanto, apesar de não ter sido quantificado, verificou-se que as moscas do grupo controle alimentaram-se da dieta imediatamente após a liberação nas gaiolas.



**Figura 3:** Mortalidade acumulada (%) de adultos de *A. fraterculus* alimentados com dieta artificial (proteína hidrolisada a 3% Bio Anastrepha) contendo os extratos de frutos e sementes obtidos com acetato de etila e etanol, em três concentrações (mg/mL), após 24, 48 e 72 de exposição.

Observou-se efeito temporal e dose dependente dos extratos sobre a mortalidade dos adultos de *A. fraterculus* (Figura 3, Tabela 1). Os maiores efeitos, com igualdade estatística, sobre os números de insetos sobreviventes foram verificados pela ação dos extratos obtidos com acetato de etila, tanto de frutos, quanto de sementes.

**Tabela 1:** *Anastrepha fraterculus* - Número médio e erros padrão ( $\bar{X} \pm EP$ )\* de adultos alimentados com dieta artificial\*\* contendo três concentrações de extratos de frutos e sementes de *C. canjerana*, obtidos com acetato de etila e etanol, em três períodos.

Estrutura vegetal	Concentração mg/mL	Período		
		24h $\bar{X} \pm EP$	48h $\bar{X} \pm EP$	72h $\bar{X} \pm EP$
- solvente				
Fruto - acetato de etila	1,0	6,00 ± 0,0aA***	5,86 ± 0,05 aAB	5,29 ± 0,13 aB
	2,5	5,57 ± 0,06 abcA	5,71 ± 0,06 aA	4,71 ± 0,11 aB
	5,0	5,14 ± 0,12 cA	1,71 ± 0,17 dB	0,57 ± 0,11 eB
Fruto- etanol	1,0	5,86 ± 0,05 abA	5,57 ± 0,11 aA	4,43 ± 0,23 aB
	2,5	5,57 ± 0,07 abcA	5,31 ± 0,10 abA	3,14 ± 0,19 bB
	5,0	5,86 ± 0,05 abA	4,86 ± 0,20 abA	2,43 ± 0,11 bcdB
Semente - acetato de etila	1,0	5,86 ± 0,05 abA	5,00 ± 0,14 abA	1,43 ± 0,11 deB
	2,5	5,57 ± 0,11 abcA	4,43 ± 0,27 bA	1,71 ± 0,21 cdeB
	5,0	5,29 ± 0,10 bcA	3,29 ± 0,24 cB	0,86 ± 0,15 eC
Semente - etanol	1,0	6,00 ± 0,0 aA	5,86 ± 0,05 aA	5,00 ± 0,18 aB
	2,5	6,00 ± 0,0 aA	5,86 ± 0,06 aA	5,00 ± 0,16 aB
	5,0	5,86 ± 0,05 abA	5,43 ± 0,11 abA	2,86 ± 0,19 bcB
Controle		6,00 ± 0,0 aA	5,86 ± 0,05 aA	5,00 ± 0,16 aB

\*Valores médios de sete repetições com três casais (n = 42). \*\* Proteína hidrolisada (3%) Bio Anastrepha. \*\*\*Média seguida de letras minúsculas indicam diferenças entre extratos e concentrações (colunas) e maiúsculas entre períodos (linhas) pelo teste de Duncan  $P \leq 0,05$ .

Os extratos etanólicos de fruto (1mg/mL) e semente (1e 2,5mg/mL) apresentaram baixa atividade, induzindo mortalidade inferior a 10% (Fig. 3). O menor valor da Concentração Letal Mediana (CL<sub>50</sub>) foi observado com extrato de semente obtido com acetato de etila. Entretanto o menor Tempo Letal Mediano (TL<sub>50</sub>) foi verificado com a adição de extrato de fruto obtido com acetato de etila. Os maiores valores de CL<sub>50</sub> e TL<sub>50</sub> foram verificados para a adição de extrato etanólico de sementes (Tabela 2).

**Tabela 2:** Concentração Letal mediana (CL<sub>50</sub>) e Tempo Letal mediano (TL<sub>50</sub>) de extratos de frutos e sementes de *C. canjerana* obtidos com acetato de etila e etanol, incorporados à dieta artificial\* de adultos de *A. fraterculus*.

Estrutura vegetal - solvente	CL <sub>50</sub> (mg/mL)	Variação	TL <sub>50</sub> (horas)	Variação
Fruto acetato de etila	4,18 b**	3,71- 4,76	45,36 c	28,01-59,29
Fruto etanólico	4,81 b	4,27-5,58	71,72 b	66,21-79,92
Semente acetato de etila	2,73 c	0,35-2,44	62,94 b	57,51-70,21
Semente etanólico	7,46 a	6,05-10,53	95,00 a	81,85-126,54

\*Proteína hidrolisada (3%) Bio Anastrepha. \*\* Médias seguidas por letras distintas, em cada coluna, diferem entre si pelo teste de Duncan  $P \leq 0,05$ .



Todos os extratos, nas diversas concentrações, inibiram a oviposição, especialmente nas primeiras horas, observando-se efeito dose dependente. Na maior concentração, com exceção do extrato etanólico de sementes observou-se que mesmo após 72 horas houve inibição significativa da oviposição. Entretanto, este mesmo extrato, na maior concentração, foi o único a repelir completamente a oviposição, nas primeiras 24 horas (Tabela 3).

**Tabela 3:** Número médio de pupas de *A. fraterculus* por fruto (*C. papaya*) pulverizado com três concentrações de extratos de frutos e sementes de *C. canjerana*, obtidos com acetato de etila e etanol.

Estrutura vegetal - solvente	Concentração mg/mL	Períodos			
		0	24h	48h	72h
		$\bar{X} \pm EP$	$\bar{X} \pm EP$	$\bar{X} \pm EP$	$\bar{X} \pm EP$
Fruto – acetato de etila	1,0	5,00* ± 0,00cB**	2,00 ± 3,24cBC	9,20 ± 3,20cdB	30,40 ± 3,55aA
	2,5	2,80 ± 0,56cAB	14,40 ± 2,69bA	9,00 ± 0,95cdA	7,00 ± 0,81cdA
	5,0	1,00 ± 0,20cC	9,60 ± 1,66bA	5,50 ± 1,27dB	5,60 ± 2,39deB
Fruto – etanol	1,0	40,00 ± 6,07aA	23,50 ± 1,55aA	22,00 ± 1,18bA	8,00 ± 1,06cdB
	2,5	11,67 ± 0,20bA	13,50 ± 0,97aA	16,40 ± 0,97bcA	7,20 ± 1,24cdB
	5,0	14,40 ± 1,70abA	17,80 ± 4,10aA	16,00 ± 1,64bcA	7,00 ± 1,41cdB
Semente – acetato de etila	1,0	33,33 ± 1,52abA	28,75 ± 5,06aA	28,25 ± 7,24aA	32,33 ± 6,50aA
	2,5	16,00 ± 3,11abA	17,00 ± 2,11aA	16,00 ± 2,12bcA	27,20 ± 6,80aA
	5,0	10,50 ± 1,43bA	8,75 ± 2,55bA	9,40 ± 2,55cdA	14,80 ± 6,50bcA
Semente – etanol	1,0	5,40 ± 0,67cB	21,67 ± 3,21aA	19,67 ± 1,53bA	24,67 ± 5,10aA
	2,5	2,50 ± 0,42cB	20,00 ± 4,58aA	16,00 ± 3,68bcA	19,40 ± 0,23bA
	5,0	0,00 ± 0,00cC	16,50 ± 3,08bB	29,33 ± 4,72aA	17,80 ± 1,75bAB
Controle	-	39,53 ± 1,08aA	29,66 ± 0,88aA	31,58 ± 0,60aA	35,58 ± 1,38aA

\*Número médio de cinco replicatas por tratamento, com dez casais de adultos de *A. fraterculus* com 10 à 15 dias de idade.

\*\*Média seguida minúsculas indicam diferenças entre extratos e concentrações (colunas) e maiúsculas entre períodos (linhas) pelo teste de Duncan  $P \leq 0,05$ .

Além dos efeitos descritos e quantificados anteriormente observou-se aumento significativo do percentual de pupas larviformes provenientes de frutos de mamão aspergidos com extratos de frutos de *C. canjerana*, especialmente nas maiores concentrações e nas primeiras 24 horas (Tabela 4).

**Tabela 4:** Percentual de pupas larviformes, por fruto (*C. papaya*) aspergido com extratos de frutos e sementes de *C. canjerana*, obtidos com acetato de etila e etanol.

Extratos		Percentual médio de pupas larviformes			
Estrutura vegetal - solvente	Concentração (mg/mL)	Períodos			
		0	24h	48h	72h
Fruto - acetato de etila	1,0	20,00cA	10,05bB	3,52bC	3,70cC
	2,5	45,00aA	15,12bB	5,55bC	8,07bcB
	5,0	33,35bA	29,81aA	12,01aB	16,67bB
Fruto - Etanol	1,0	9,06dA	4,48cB	3,00bB	2,75cB
	2,5	9,67dA	3,79cB	4,09bB	4,41cB
	5,0	35,45bA	15,55bB	16,64aB	18,01aB
Semente - acetato de etila	1,0	0,00eA	0,00dA	0,00cA	1,04dA
	2,5	1,61eA	1,00dA	1,00cA	0,00dA
	5,0	0,00eA	0,00dA	1,00cA	0,00dA
Semente - Etanol	1,0	0,00eA	0,00dA	0,00cA	0,00dA
	2,5	0,00eA	0,00dA	0,00cA	0,00dA
	5,0	-	0,00dA	0,00cA	0,00dA
Controle	-	0,00eA	0,00dA	0,00cA	0,00dA

\*Número médio de cinco replicatas por tratamento, com dez casais de adultos de *A. fraterculus* com 10 à 15 dias de idade. \*\*Média seguida por letras minúsculas indicam diferenças entre extratos e concentrações (colunas) e maiúsculas entre períodos (linhas) pelo teste de Duncan  $P \leq 0,05$ . A significância utilizou médias transformadas por raiz quadrada ( $x + 0,5$ ).

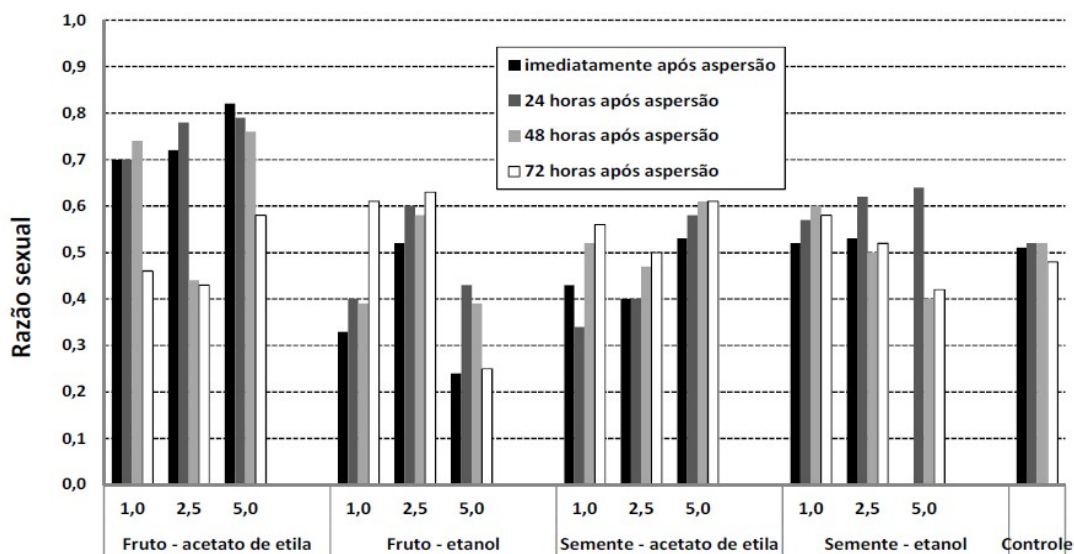
A viabilidade pupal (Tabela 5) dos insetos provenientes dos tratamentos diferenciou-se da observada no controle, com destaque para mamões aspergidos com extratos de fruto de *C. canjerana*, obtidos com acetato de etila, verificando-se sobrevivência aproximada de 50%, na maior concentração, por até 72 horas. Apesar de constatado efeito residual de, pelo menos, 72 horas, não ficou evidenciado efeito dose dependente.

**Tabela 5:** Viabilidade pupal (%) de *A. fraterculus* provenientes de frutos (*C. papaya*) aspergidos com extratos de frutos e sementes de *C. canjerana*, obtidos com acetato de etila e etanol.

Estrutura vegetal - Solvente	Concentração mg/mL	Períodos			
		0	24h	48h	72h
		$\bar{X} \pm EP$	$\bar{X} \pm EP$	$\bar{X} \pm EP$	$\bar{X} \pm EP$
Fruto – acetato de etila	1,0	100,00* ± 0,00aA**	52,14 ± 8,31bC	65,18 ± 5,20bB	66,16 ± 5,13bcB
	2,5	40,28 ± 2,89cB	62,5 ± 13,26bA	48,00 ± 10,84cB	31,78 ± 1,84dC
	5,0	50,00 ± 0,00cA	53,14 ± 8,11bA	50,00 ± 2,20bcA	42,25 ± 4,65dA
Fruto - Etanol	1,0	51,65 ± 3,89bcA	69,96 ± 5,27abA	60,95 ± 5,79bA	60,71 ± 5,05cA
	2,5	63,60 ± 3,89bB	78,33 ± 3,94abA	58,09 ± 2,36bB	60,78 ± 7,76cB
	5,0	62,16 ± 0,76bA	69,73 ± 3,04abA	72,62 ± 2,8bA	60,05 ± 0,82cA
Sementes – Acetato de etila	1,0	85,19 ± 5,24abA	60,00 ± 5,24bB	87,50 ± 3,61abA	66,81 ± 4,87bcAB
	2,5	68,89 ± 1,83bA	59,22 ± 2,02bAB	68,32 ± 3,46bA	50,67 ± 2,71cB
	5,0	92,81 ± 2,18aA	61,11 ± 2,02bB	73,46 ± 0,52bB	77,77 ± 3,79abAB
Sementes - etanol	1,0	65,03 ± 4,25bA	60,07 ± 5,76bA	67,85 ± 5,28bA	62,75 ± 3,24bcA
	2,5	98 ± 1,25aA	48,85 ± 1,25cC	69,23 ± 0,05bBC	91,67 ± 4,81aA
	5,0	-	61,35 ± 2,74bA	62,12 ± 3,35bA	80,15 ± 5,95abA
Controle	-	98,65 ± 0,83aA	95,07 ± 1,75aA	98,83 ± 0,87aA	96,31 ± 1,30aA

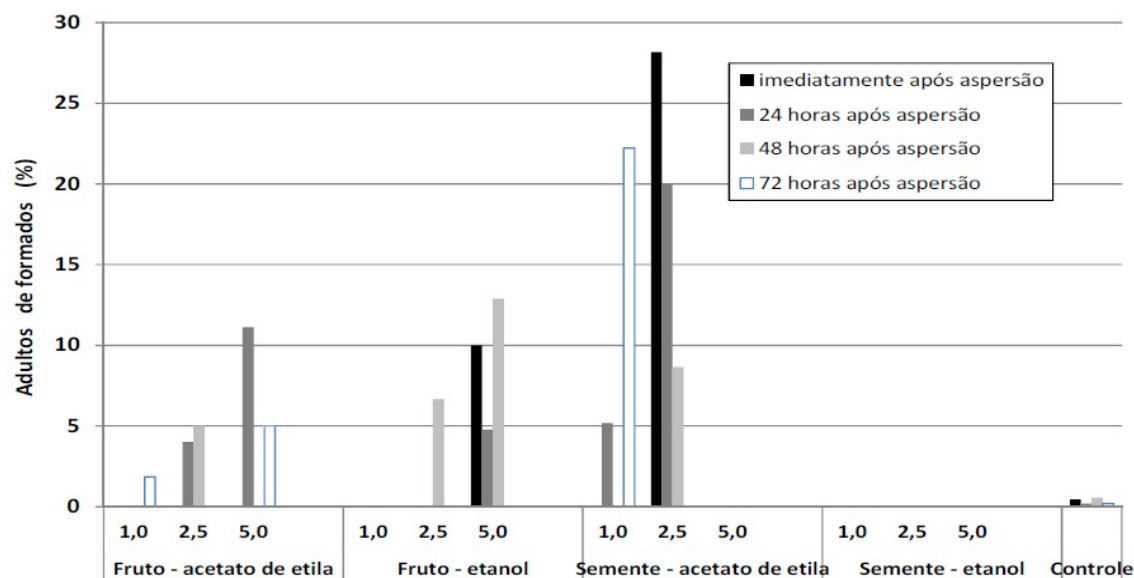
\*Número médio de cinco replicatas por tratamento, com dez casais de adultos de *A. fraterculus* com 10 à 15 dias de idade. \*\*Média seguida por letras minúsculas indicam diferenças entre extratos e concentrações (colunas) e maiúsculas entre períodos (linhas) pelo teste de Duncan  $P \leq 0,05$ .

Os extratos influenciaram diferencialmente a abundância de indivíduos de cada sexo. De maneira geral a razão sexual (Fig. 4), especialmente nas maiores concentrações, foi caracterizada pela prevalência de fêmeas nos extratos obtidos com acetato de etila e de machos no tratamento que empregou extrato etanólico de frutos. Os efeitos também foram registrados em todo o período de 72 horas.



**Figura 4** - Razão sexual [ $n^{\circ}$  fêmeas / ( $n^{\circ}$  fêmeas +  $n^{\circ}$  machos)] das moscas que emergiram de frutos de *C. papaya* pulverizados com diferentes concentrações de extratos de frutos e sementes de *C. canjerana*, com acetato de etila e etanol, em quatro períodos distintos. Valores médios de moscas emergidas de cinco frutos (repetições), disponibilizados individualmente para oviposição por 10 casais de *A. fraterculus*.

O percentual de anormalidades nos adultos (Fig. 5) foi maior (acima de 10%) nos tratamentos que empregaram extratos de fruto etanólico e semente em acetato de etila, e de 8% para fruto (acetato de etila) à 5mg/mL. Como anormalidades destacam-se a emergência incompleta, ausência de asas, asas atrofiadas, asas sem coloração característica, constrição corporal, corpo ovalado, ausência de antenas, saliência abdominal e aparelho bucal atrofiado.



**Figura 5** – Número médio de moscas com deformações, que emergiram de frutos de *C. papaya* pulverizados com diferentes concentrações de extratos de frutos e sementes de *C. canjerana*, com acetato de etila e etanol, em quatro períodos distintos. Valores médios de moscas emergidas de cinco frutos (repetições), disponibilizados individualmente para oviposição por 10 casais de *A. fraterculus*.

## Discussão

A avaliação fitoquímica demonstra uma diferença nos perfis cromatográficos entre extratos, o que pode explicar a diferença de resultados biológicos obtidos no mesmo bioensaio com extratos de frutos e sementes. A coloração violeta revelada com Sulfato de Cobre-Ácido Fosfórico (Fig. 1) indica a presença particularmente de triterpenóides e limonóides que são os principais compostos presentes em diversos representantes de Meliaceae (Regnault-Roger et al. 2004; Hu et al. 2011), incluindo espécies de *Cabralea* onde destaca-se a presença de triterpenos com estrutura damarano nos ramos e hastes (Braga et al. 2006).

A atividade antialimentar exercida pelos diversos extratos sobre adultos de *A. fraterculus* (Fig. 2) indica que, a exemplo de outras meliáceas, incluindo o nim (Jacobson 1989; Schmetterer 1995; Senthil Nathan et al. 2005, 2006; Coria et al. 2008; Alouani et al. 2009; Masood et al. 2009), *C. canjerana* também apresenta diversos compostos de ação repelente para alimentação. O fato de que a ação perdurou por, pelo menos 72 horas, indica que mais estudos sobre a identificação

estrutural e a possível utilização dos compostos ativos devem ser realizados, pois o uso de tais compostos evitaria o dano físico da perfuração dos frutos pela punctura de *A. fraterculus*.

O fato do percentual de mortalidade estar diretamente relacionado com o aumento da concentração dos extratos e o período de exposição (Figura 3, Tabela 1) e, portanto, com o aumento do volume ingerido indica que a mortalidade de *A. fraterculus* ocorreu em função de um processo cumulativo. Isto foi comprovado pela coloração vermelha no abdômen, devido a presença do corante na dieta (Cruz et al. 1997). Cabe salientar que mesmo neste ensaio, em que não houve chance de escolha, apesar de não ter sido quantificado, observou-se que as moscas deixaram de se alimentar normalmente, ingerindo maiores quantidades apenas após 24 horas. Assim, apesar dos resultados positivos, com 78% de mortalidade das moscas induzida, especialmente pelos extratos de frutos e de sementes de *C. canjerana* (Tabela 1), obtidos com acetato de etila na maior concentração, deve-se ter cautela na sua aplicação em campo, pois neste caso a mortalidade foi devida a atividade antialimentar somada à toxicidade, que são estratégias que normalmente se manifestam conjuntamente nas plantas como resistência ao ataque de insetos (Vendramim & Guzzo 2009). Isto explica a baixa mortalidade observada com todos os extratos e concentrações nas primeiras 24 horas. Com relação à sensibilidade química de *A. fraterculus*, Dickens et al. (1988) detalharam as estruturas quimiorreceptoras presentes nas antenas dos adultos de diversos tefritídeos destacando a grande capacidade discriminatória de substâncias químicas por estes insetos.

A mortalidade relativamente elevada obtida no presente estudo (Figura 3) contrasta com os resultados obtidos com óleo de nim (Botton et al. 2003, Efrom et al. 2011) onde a mortalidade de *A. fraterculus* foi muito reduzida. Tais resultados indicam que os frutos e sementes de *C. canjerana* apresentam moléculas que têm efeito ou ação sinérgica, ausentes em óleo de nim.

Além da mortalidade propriamente dita, observou-se, que após a ingestão da dieta com os extratos, as moscas apresentavam-se letárgicas permanecendo no fundo da gaiola não respondendo a estímulos externos, à semelhança das observações feitas por VanRanden & Roitberg (1998a) com

adultos de *Rhagoletis indifferens*, após ingerirem dieta contendo 0,2% de inseticida a base de nim. Estas observações indicam que apesar das moscas se alimentarem da dieta, sofrem efeito tóxico logo após a ingestão o que pode dificultar a aplicação dos extratos a nível de campo. Pois como o efeito é cumulativo, ao sofrer os efeitos tóxicos, dificilmente as moscas se alimentarão da dieta com extratos uma segunda vez.

Desconsiderando-se os efeitos de atividade antialimentar, os valores de  $CL_{50}$  (Tabela 2), especialmente o obtido com o extrato de semente, acetato de etila, indicam a possibilidade de uso em campo, pelas moscas serem atraídas pela proteína hidrolizada, minimizando custos.

A deterrência a oviposição (Tabela 3) induzida pelos extratos de frutos e sementes de *C. canjerana*, sem chance de escolha assemelha-se a outros estudos onde houve redução do número de pupas de tefritídeos em frutos tratados com extratos de nim (Ali et al. 2011; Masood et al. 2009; Chen et al. 1996). Por outro lado, Prokopy & Powers (1995) não observaram significativo efeito de deterrência de oviposição para *Rhagoletis pomonella* com extratos de nim, tanto em testes com e sem chance de escolha.

Apesar de ser conhecida a importância do odor e das características visuais para a escolha do fruto hospedeiro pelas moscas-das-frutas (Henneman & Papaj 1999; Robacker & Fraser 2002), cabe salientar que neste estudo, a redução do número de insetos por fruto, além da deterrência a oviposição, pode ter decorrido do efeito de profundidade dos tratamentos, causando a mortalidade de ovos ou das larvas (VanRanden & Roitberg 1998b). Entretanto exclui-se a aceitação ou rejeição de frutos hospedeiros, condicionada pela experiência recente de oviposição das fêmeas (Cooley et al. 1986; Papaj et al. 1987), uma vez que os insetos utilizados nos experimentos nunca tiveram contato com os frutos antes dos bioensaios.

Em termos práticos, estes resultados indicam que os extratos apresentam moléculas ou grupos de moléculas que agem sinergicamente inibindo o número de oviposições e/ou inviabilizando ovos e larvas após a oviposição, por pelo menos 72 horas também foram descritos

por VanRanden & Roitberg (1998b). Sugere-se que em estudos futuros seja avaliado o número de puncturas ou número de vezes que as moscas ovipositaram e o número de insetos sobreviventes de cada fruto. De qualquer modo o resultado preconizado é a total deterrência da oviposição onde não há nenhum tipo de dano físico ao fruto.

O percentual elevado de pupas larviformes nos tratamentos (Tabela 4), principalmente de insetos oriundos do tratamento com extrato de fruto (acetato de etila), indicam que possivelmente, os triterpenóides e limonóides presentes podem tornar a pupa suscetível, pelo não endurecimento da cutícula e estabilização das estruturas protéicas (Cruz 2000), visto que os pupários larviformes não resultam em adultos, tendo o inseto morrido nesta fase. Vinuela et al. (2000) verificaram que a ingestão de azadiractina (1mg/L) por larvas recém eclodidas de *C. capitata* impediu totalmente a emergência dos adultos. VanRandem & Roitberg (1998b) obtiveram 6,4% das pupárias de *R. indifferens* deformadas com tratamento à base de nim.

A menor viabilidade pupal (Tabela 5) verificada especialmente no tratamento com extrato de fruto obtido com acetato de etila, certamente esteve relacionada a compostos comuns entre os representantes de meliáceas, conforme relatado em diversos estudos que apontam redução de sobrevivência de tefritídeos alimentados com extratos (Steffens & Schmetterer 1982; Van-Randem & Roitberg 1998b; Vinuela et al. 2000; Mahfusa et al. 2007).

As alterações da razão sexual (Fig. 4) em função dos diferentes extratos indica que os compostos presentes atuam diferencialmente sobre indivíduos de cada sexo. Como demonstrado em diversas meliáceas, especialmente o nim, agem sobre os sistemas hormonais dos insetos (Mordue (Luntz) & Nisbet 2000; Rembold 1995) é provável que também atuem de forma diferenciada sobre machos e fêmeas. Este é o primeiro estudo que aborda o efeito diferencial de extratos sobre o sexo a partir das fases imaturas. Nakano & Romano (2002) observaram total inibição das posturas de *C. capitata* após alimentação dos adultos com azadiractina. De forma semelhante, Singh (2003) observou inibição da postura de *Bractocera dorsalis* e *B. cucurbitae* após ingerirem dietas com



extrato aquoso de nim. Mais estudos devem ser realizados detalhando o(s) efeito(s) de diferentes substâncias e ou extratos sobre o desenvolvimento de machos e fêmeas, especialmente sobre seus sistemas reprodutivos.

Além dos extratos alterarem a viabilidade pupal e o número de pupas larviformes, foram responsáveis, pelo aumento do percentual de adultos deformados (Fig. 5), especialmente o tratamento que empregou extrato de semente obtido com acetato de etila. As anormalidades encontradas nos adultos foram condizentes com as descritas em outros trabalhos que envolvem meliáceas e representantes de tefritídeos (Steffens & Schmutterer 1982; Singh 2003). Os efeitos sobre o desenvolvimento descritos neste estudo relacionam-se com alterações fisiológicas decorrentes de modificações do sistema endócrino, que controla o crescimento e a ecdise do inseto (Mordue (Luntz) & Nisbet 2000; Mordue (Luntz) et al. 2005; Silva et al. 2011) e devem ser considerados simultaneamente em programas de Manejo Integrado de Pragas.

Os resultados do presente estudo salientam a ocorrência de moléculas com propriedades deterrentes (antialimentar e oviposição) e tóxica presentes nos extratos de *C. canjerana* sobre *A. fraterculus*, com permanência de pelo menos 72 horas. Considerando aspectos práticos, o isolamento de substâncias que inibem a ocorrência de adultos nas plantas hospedeiras e proporcionam deterrência a oviposição, evita qualquer tipo de dano aos frutos. Por outro lado, a ocorrência de moléculas com efeito tóxico nos extratos também indica potencialidade de uso. Entretanto, para seu uso em iscas tóxicas, torna-se necessário o isolamento da(s) molécula(s) com tal efeito, especialmente de outras que têm propriedades deterrentes.

As diferentes formas de ação dos extratos de frutos e ou sementes de *C. canjerana* sobre *A. fraterculus*, destacando-se a atividade antialimentar e deterrência a oviposição, por pelo menos 72 horas, indicam a possibilidade da sua utilização no Manejo Integrado de Pragas em frutíferas.

## Conclusões

1. Frutos e sementes de *C. canjerana* apresentam triterpenos e limonóides que têm atividade biológica sobre *A. fraterculus*, semelhante a extratos de outras meliáceas, particularmente o nim.
2. Os extratos de *C. canjerana* apresentam atividade antialimentar e tóxica sobre adultos de *A. fraterculus*, particularmente os obtidos com acetato de etila.
3. Os extratos de *C. canjerana* apresentam deterrencia à oviposição e atividade biológica negativa sobre o desenvolvimento de *A. fraterculus*, aumentando o número de pupas mal formadas (larviformes), diminuindo a viabilidade pupal, afetando a razão sexual e aumentando o número de adultos deformados.
4. Os extratos de *C. canjerana* aspergidos sobre frutos de mamão papaia apresentaram atividade biológica sobre oviposição e desenvolvimento de *A. fraterculus*, por pelo menos 72 horas.

## Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro a este trabalho.

## Referências bibliográficas

Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267.

Ali H, Ahmad S, Hassan G, Amin A, Hussain Z, Naeem M. 2011. Bioefficacy of different plant extracts against melon fruit fly in bitter gourd. *Pakistan Journal of Weed Science Research* 17:143-149.

Alouani A, Rehim N, Soltani N. 2009. Larvicidal activity of a neem tree extract (Azadirachtin) against mosquito larvae in the Republic of Algeria. *Jordan Journal of Biological Sciences* 2:15-22.

Ambrozin ARP, Leite AC, Bueno FC, Vieira PC, Fernandes JB, Bueno OC, Silva MFGF, Pagnocca FC, Hebling MJA, Bacci Jr M. 2006. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 17: 542–547.

Anonymous. 1974. *Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography*. Darmstadt: Merck.

Baatile M, Komane EI, Olivier AMV. 2011. *Trichilia emetica* (Meliaceae) – A review of traditional uses, biological activities and phytochemistry. *Phytochemistry Letters* 4:1-9.

Barreiros HDS, Souza DSE. 1986. Notas Geográficas e Taxonômicas sobre *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. no Brasil (Meliaceae ). *Revista Brasileira de Biologia* 46: 17-26.

Bostid RFR. 1992. *Neem. A tree for solving global problems*. National Academy Press.

Botton M, Scoz PL, Garcia MS, Colleta VD. 2003. Novas alternativas para o monitoramento e controle de *Anastrepha fraterculus* (Wiedmann, 1830) (Diptera: Tephritidae) em frutíferas temperadas. In: *6º Encontro Nacional de Fruticultura de Clima Temperado*. p.163-170. EPAGRI.

Braga PAC, Soares MS, Silva FMGF, Vieira PC, Fernandes JB, Pinheiro AL. 2006. Dammarane triterpenes from *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae): Their chemosystematic significance. *Biochemical Systematics and Ecology* 34: 282-290.

Bueno NR, Castilho RO, Costa RB, Pott A, Pott VJ, Scheidt GN, Batista MS. 2005. Medicinal plants used by the Kaiowá and Guarani indigenous populations in the Caarapó Reserve, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Botânica Brasilica* 19:39-44.

Cañigüeral S, Vila R, Wichtl M. 1998. Plantas medicinales y drogas vegetales para infusión y tisana. OEMF Internacional srl.

Carpinella MC, Ferrayoli C, Valladares G, Defago M, Palacios S. 2002. Potent limonoid insect antifeedant from *Melia azedarach*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 66: 1731-1736.

Carvalho RS. 2006. Biocontrole de moscas-das-frutas: histórico, conceitos e estratégias. *Bahia Agrícola* 7:14-17.

Cazal CM, Choosang K, Severino VGP, Soares MS, Sarria AL, Fernandes JB, Silva MFGF, Vieira PC, Pakkong P, Almeida GM, Vasconcelos MH, Nascimento MSJ, Pinto MMM. 2010. Evaluation of effect of triterpenes and limonoids on cell growth, cell cycle and apoptosis in human tumor cell lines. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 10: 769-776.

Chen CC, Dong YJ, Cheng LL, Hou RF. 1996. Deterrent effect of neem seed kernel extract on oviposition of the oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Guava. *Journal of Economic Entomology* 89: 462-466.

Connolly JD. 1983. Chemistry of the Meliaceae and Cneoraceae. In: Waterman PG, Grunden MF, Editors. *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. p.175–213. Academic Press.

Cooley SS, Prokopy RJ, McDonald PT, Wong TTY. 1986. Learning in oviposition site selection by *Ceratitis capitata* flies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 40:47-51.

Coria C, Almirom W, Valladares G, Carpinella C, Ludueña F, Defago M. 2008. Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. *Aedes Aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Bioresource Technology* 99: 3066-3070.

Cruz IBM, Humeres E, Oliveira AK. 1997. Toxicity of fenthion to *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae): dose response analyses. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 26: 471-479.

Cruz IBM, Nascimento JC, Taufer M, Oliveira AK. 2000. Morfologia do aparelho reprodutor e biologia do desenvolvimento. In: Malavasi A, Zucchi RA, Editors. *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil*. p. 55-66. Ribeirão Preto.

Dickens JC, Hart WG, Lighth DM, Jang EB. 1988. Tephritid olfaction. Morphology of the antennae of four tropical species of economic importance (Diptera: Tephritidae). *Annals of Entomological Society of America* 81:325-331.

Efrom CFS, Redaelli LR, Meirelles RN, Ourique CB. 2011. Laboratory evaluation of phytosanitary products used for control of the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus*, in organic farming. *Crop Protection*, doi:10.1016/j.cropro.2011.05.007.

Finney DJ. 1971. *Probit analysis*, 3<sup>rd</sup> edition. Cambridge University Press.

Gonçalves P, Debarba J, Keske C. 2005. Incidência da mosca-das-frutas, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae), em cultivares de ameixa conduzidas sob sistema orgânico. *Revista de Ciências Agroveterinárias* 4: 101-108.

Govindachari TR, Suresh G, Krishna Kumari GN. 1994. Triterpenoids from *Dysoxylum malabaricum*. *Phytochemistry* 37: 1127-1129.

Govindachari TR, Narasimhan NS, Suresh G, Partho PD, Gopalakrishnan G, Krishna Kumari GN. 1995. Structured-related insect antifeedant and growth regulating activities of some limonoids. *Journal of Chemical Ecology* 21: 1585-1601.

Hallman GJ, Zhang QH. 1997. Inhibition of fruit fly (Diptera: Tephritidae) development by pulsed electric field. *Florida Entomologist* 80: 239-248, 1997.

Henneman ML, Papaj DR. 1999. Role of host fruit color in the behavior of the walnut fly *Rhagoletis juglandis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 93: 249–258.

Hu JF, Fan H, Wang LJ, Wu SB, Zhao Y. 2011. Limonoids from the fruits of *Melia toosendan*. *Phytochemistry Letters* 4: 292-297.

Jacobson M. 1989. Focus on Biochemical Pesticides, I. The Neem Tree. CRC Press.

Khan M, Hossain MA, Islam MS. 2007. Effects of neem leaf dust and a commercial formulation of a neem compound on the longevity, fecundity and ovarian development of the melon fly, *Bactocera*

*cucurbitae* (Coquillett) and the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10: 3656– 3661.

Kovaleski A, Sugayama RL, Malavasi A. 2000. Controle químico em macieiras. In: Malavasi A, Zucchi RA, Editors. *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil*. p. 135-141. Ribeirão Preto.

Lavie D, Levy EC, Zelnik R. 1973. Constituents of *Carapa guianensis* Aubland their biogenetic relationship. *Bioorganic Chemistry* 2: 59-64.

Machota Jr R, Bortoli LC, Tolotti A, Botton M. 2010. Técnica de criação de *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae) em laboratório utilizando hospedeiro natural. Embrapa Uva e Vinho, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 15.

Mahfuza K, Aftab MH, Saidul MI. 2007. Effect of Neem leaf dust and commercial formulation of a Neem compound on the longevity, fecundity and ovarian development of melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10: 3656-3661.

Malavasi A, Zucchi RA, Sugayama RL. 2000. Biogeografia. In: Malavasi A, Zucchi RA, Editors. *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil*. p. 93-98. Ribeirão Preto.

Masood KK, Rashid MMU, Abdullah K. 2009. Effect of Neem derivatives on infestation, settling and oviposition of melon fruit fly (*Bactrocera cucurbitae* Coq.) (Tephritidae: Diptera). *Pakistan Entomology* 31:11-15.

Matos AP, Nebo L, Vieira PC, Fernandes JB, Silva MFGF, Rodrigues RR. 2009. Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* e *T. Catigua* (Meliaceae). *Química Nova* 32: 1553-1556.

Mordue (Luntz) JA, Nisbet AJ. 2000. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 29: 615-632.

Mordue (Luntz) AJ, Morgan ED, Nisbet AJ. 2005. Azadirachtin, a natural product in insect control. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS, Editors. *Comprehensive molecular insect science*. p.117-135. Elsevier.

Nakano O, Romano FCB. 2002. Uso de reguladores de crescimento na esterilização da mosca-do-mediterrâneo. *Revista Laranja* 23: 115-125.

Obeng-Ofori D. 1995. Plant oils as grain protectants against infestations of *Cryptolestes pusillus* and *Rhyzopertha dominica* in stored grain. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 77:133-139.

Papaj DR, Prokopy RJ, McDonald PT, Wong TTY. 1987. Differences in learning between wild and laboratory *Ceratitis capitata* flies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 45: 65-72.

Pennington TD, Styles BD. 1975. *A generic monograph of Meliaceae*. Blumea.

Powell RG, Mikolajczak KN, Zilkowski BW, Mantus EK, Cherry D, Clardy J. 1991. Limonoid antifeedants from seed of *Sandoricum koetjape*. *Journal of Natural Products* 54: 241-246.



Prokopy RJ, Powers PJ. 1995. Influence of neem seed extract on oviposition and mortality of *Conotrachelus nenuphar* (Col., Curculionidae) and *Rhagoletis pomonella* (Diptera., Tephritidae) adults. *Journal of Applied Entomology* 119: 63-65.

Qi SH, Wu DG, Zhang S, Luo XD. 2004. Constituents of *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae). *Pharmazie* 59: 488-490.

Rao MM, Meshulam H, Zelnik R, Lavie D. 1975. Structure and stereochemistry of limonoids of *Cabralea eichleriana*. *Phytochemistry* 14: 1071-1075.

Regnault-Roger C, Philogène BJR, Vincent C. 2004. *Biopesticidas de origen vegetal*. Edição Mundi-Prensa.

Rembold H. 1995. Biological effects of neem and their modes of action: growth and metamorphosis. In: Schmutterer H, Editors. *The neem tree: source of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes*. Weinheim

Robacker DC, Fraser I. 2002. Do mexican fruit flies (Diptera: Tephritidae) prefer grapefruit to yellow chapote, a native host? *Florida Entomologist* 85: 481-487.

Roel AR, Vendramim JD, Frighetto, RTS, Frighetto N. 2000. Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* (Swartz) (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 29: 799-808.

Salles LAB. 1992. Metodologia de criação de *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera:Tephritidae) em dieta artificial em laboratório. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 21: 479-486.

Salles LAB, Rech NL. 1999. Efeito de extratos de nim (*Azadiractha indica*) e cinamomo (*Melia azedarach*) sobre *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera:Tephritidae). *Revista Brasileira de Agrociência* 5: 225-227.

Sarria AL, Soares MS, Matos AP, Fernandes JB, Vieira PC, Silva MFGF. 2011. Effect of triterpenoids and limonoids isolated from *Cabralea canjerana* and *Carapa guianensis* (Meliaceae) against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Z.Naturforsch* 66: 245-250.

Schmeda-Hirschmann G, Rojas de Arias AA. 1992. screening method for natural products on triatomine bugs. *Phytotherapy Research* 6: 68–73.

Schmutterer H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual Review of Entomology* 35: 271–297.

Schmutterer H. 1995. *The neem tree: source of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes*. Weinheim.

Scoz PL, Botton M, Garcia MS. 2004. Controle químico de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) em laboratório. *Ciência Rural* 34: 1689-1694.

- Senthil Nathan S, Kalaivani K, Muruga K. 2005. Effects of neem limonoids on the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica* 96: 47–55.
- Senthil Nathan S, Savith G, George DK, Narmadha A, Suganya L, Chung PG. 2006. Efficacy of *Melia azedarach* L. extract on the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Bioresource Technology* 97: 1316-1323.
- Silva MA, Alvarenga CD, Bezerra-Silva GCD, Mastrangelo T, Lopes-Mielezrski GN, Giustolin T. 2011. Toxic effects of neem seed cake on the larval-pupal (prepupal) stage of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Fruits* 66: 363-369.
- Silveira Neto S, Nakano O, Bardin D, Villa Nova NA. 1976. *Manual de ecologia dos insetos*. Agronômica Ceres.
- Singh S. 2003. Effects of aqueous extract of neem seed kernel and azadirachtin on the fecundity, fertility and post-embryonic development of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* and the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology* 127: 540–547.
- Stark JD, Vargas RI, Thalman RH. 1990. Azadirachtin effects on metamorphosis, longevity and reproduction of three tephritid fruit fly species (Diptera). *Journal of Economic Entomology* 83: 2168-2174.
- Steffens RJ, Schmutterer H. 1982. The effect of a crude methanolic neem (*Azadirachtin indica*) seed kernel extract on metamorphosis and quality of adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera, Tephritidae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 94: 98-103.

Vanranden EJ, Roitberg BD. 1998a. Effect of a neem (*Azadirachta indica*) – based insecticide on oviposition deterrence, survival, behavior and reproduction of adult western cherry fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Ecology and Behavior* 91: 123-131.

Vanranden EJ, Roitberg BD. 1998b. The effect of a neem (*Azadirachta indica*) based insecticide on survival and development of juvenile western cherry fruit fly (*Rhagoletis indifferens*) (Diptera: Tephritidae). *The Canadian Entomologist* 130: 869-876.

Vendramim JD, Guzzo EC. 2009. Resistência de plantas e a bioecologia e nutrição dos insetos. In: Panizzi AR, Parra JRP, Editors. *Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas*. p.1055-1105. Brasília.

Viegas Jr C. 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quimica Nova* 26: 390-400.

Vinuela E, Adán A, Smagghe G, González M, Medina MP, Budia F, Vogt H, Estal P. 2000. Laboratory effects of ingestion of azadirachtin by two pests (*Ceratitis capitata* and *Spodoptera exigua*) and three natural enemies (*Chrysoperla carnea*, *Opius concolor* and *Podisus maculiventris*). *Biocontrol Science and Technology* 10: 65-177.

Zucchi RA. 2000. Espécies de *Anastrepha*, sinônimas, plantas hospedeiras e parasitóides. In: Malavasi A, Zucchi R.A, Editors. *Mosca-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado*. p. 41-48. Ribeirão Preto.

Wagner H, Blatt S. 1995. *Plant Drug Analysis*. 2 rd edition. Springer.

Whalon ME, Mota-Sanchez D, Hollingworth RM. 2008. *Global Pesticide Resistance in Arthropods*. CABI.

## 5.2 CAPÍTULO 2

**Antifeedant activity and effects of fruits and seeds extracts of *Cabralea canjerana canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) on the immature stages of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).**

Flaviane Eva Magrini<sup>1</sup>, Alexandre Specht<sup>1,2</sup>, Juliano Gaio<sup>1</sup>, Cristiane Priscila Girelli<sup>1</sup>, Ignacio Miguez<sup>3</sup>, Horacio Heinzen<sup>3</sup>, Valdirene Camatti Sartori<sup>1</sup> & Veronica Cesio<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Controle de Pragas - Caxias do Sul - RS/ Brasil 95070-560.

<sup>2</sup>Embrapa Cerrados - BR 020 Km 18 Planaltina, DF/ Brasil 73310-970

<sup>3</sup>Universidad de la Republica – Facultad de Química- Laboratorio de Química de Productos Naturales – Montevideo / Uruguay (11800).

(Artigo submetido à revista *Pest Management Science*)

## **Abstract**

**BACKGROUND:** The Meliaceae, produce several secondary metabolites, especially the limonoid Azadiractin, with pesticide activity comparable to that of commercial pesticides. The effects of extracts from an endemic Meliaceae from the Americas (*Cabrlea canjerana*) on the fall armyworm (FAW) (*Spodoptera frugiperda*), the most serious economic armyworm pest are presented in this work. The biological activity of ethyl acetate and ethanolic fruit and seed extracts on eggs, larvae and pupae of the FAW was evaluated. The most active extract was the ethyl acetate seed extract. It was fractionated through silica gel column chromatography, yielding five fractions. The fractions were also tested using the bioguided fractionation concept. The main component of the most active fraction was isolated and spectroscopically studied.

**RESULTS:** All extracts showed antifeedant and larvicidal activity at concentrations of 500 and 1000 mg Kg<sup>-1</sup>. The seed extract obtained with ethyl acetate 100 mg Kg<sup>-1</sup> had 100% larvicidal and 69% ovicidal activity respectively. All extracts and fractions altered significantly the life cycle of the FAW, larval weight, and induced various larval and pupal abnormalities. The third fraction, mainly composed of triterpenes (250 mg Kg<sup>-1</sup>), killed 60% of the larvae, the main compound isolated from this fractions was identified as a dammarane triterpene.

**CONCLUSION:** The results indicate that *C. canjerana* has several biologically active substances belonging to the limonoids and triterpenes groups, especially in the seeds, which can potentially be used for alternative control of the FAW, and possibly other insects.

**Keywords:** *Cabrlea canjerana*; *Spodoptera frugiperda*; ovicidal; larvicidal; food preference.

## **1. INTRODUCTION**

Studies have shown that Meliaceae plants have a potential in insect control due to their triterpeno and limonoids content,<sup>1,2</sup>. They are bioactive compounds that act in different ways against

insects of various orders.<sup>3</sup> Among the different Meliaceae with promising insecticide activity are the Neem Tree - *Azadirachta indica* A Juss,<sup>4,5</sup> Chinaberry tree - *Melia azedarach* Linn.,<sup>6</sup> and several species of *Trichilia*.<sup>7-9</sup>

*Cabralea canjerana canjerana* (Vell.) Mart. is an arboreal Meliaceae distributed from Costa Rica to northeastern Argentina.<sup>10,11</sup> It is used by the indigenous human populations because it has various therapeutic properties.<sup>12</sup> Despite its use in popular medicine, only a few studies have described the compounds found in this species and other representatives of *Cabralea*. So far, the compounds, mostly found in the seeds, have been identified as D-secco limonoids from the gedunine group, beta D-secco limonoids,<sup>13</sup> mexicanolids and dammarane triterpenes.<sup>14</sup> The triterpenes Cabraleadiol and Ocotillone isolated from fruits showed an antitumor effect against three types of human tumor cells.<sup>15</sup> The insecticidal activity has been less investigated. Recently, it has been reported that the ethanolic and hexane extracts from leaves and fruits were active against nymphs of *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Hemiptera: Reduviidae), vector of the Chagas disease pathogen *Trypanosoma cruzi*, Chagas 1909,<sup>16</sup>. Also the crude extract, hexanic, chloroformic, ethyl acetate fractions were active against *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae),<sup>17</sup> as well as the purified triterpenes and limonoids isolated from fruits and seeds were evaluated against the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*.<sup>18</sup>

The fall armyworm - FAW [*Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797)] is a Lepidoptera distributed throughout the American continent, where it is a regular and key-pest. FAW larvae attack more than 80 species of cultivated plants, mainly corn, rice, soybeans and cotton.<sup>19</sup> In Brazil alone, the FAW is responsible for about \$ 40 million in losses per year.<sup>20</sup> The fact that a wide variety of plants can be eaten by FAW larvae throughout the year complicates the management of this pest.<sup>21</sup> FAW larvae are usually controlled with chemicals that can damage the applicators and the environment by remaining in the soil and on the plants, causing biological imbalance and determining the selection of resistant populations.<sup>22</sup> As an alternative, many insecticides of plant



origin have been marketed worldwide and have proved to be effective, efficient and less harmful to man and the environment, holding promise as new substances in pest management.<sup>23</sup>

Several authors have indicated the presence of substances with insecticidal action in Meliaceae,<sup>24-27</sup> especially in the fruits and seeds.<sup>28-29</sup> In addition, several studies have addressed aspects of the biological activity of Meliaceae extracts and Azadiractin on the FAW.<sup>8,30-40</sup> Due to the reported biological activity of Meliaceae compounds and the wide distribution of *C. canjerana*, this work focuses on the activity evaluation of ethanol ethyl acetate extracts obtained from fruits and seeds of this plant on the immature stages of the FAW aiming the preparation and characterization of a new biorational from it .

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### *2.1 Plant material*

Fruits of *Cabralea canjerana canjerana* were collected in December 2009 from trees on the campus of the University of Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, Brazil (29 ° 9'46 "S and 51 ° 8'52" W). The plant was identified by Dr. Ronaldo Adelfo Wasun, plant taxonomist from the Natural Sciences Museum of UCS. The voucher specimen (in HUUCS 35647) was deposited at the herbarium of this museum.

### *2.2. Extraction and isolation*

All the reagents were analytical grade purchased from Pharmco AAPER. Analytical TLC Silica gel Aluminium plates were from Merck, Silica Gel GF254. Silica Gel 60, 70-230 mesh, purchased from Macherey-Nagel was used for Column Chromatography. NMR spectroscopical experiments were conducted on a Bruker Avance DPX 400 MHz using with TMS as internal standard and CDCl<sub>3</sub> as solvent. Mass spectroscopic determinations were performed on a DSI-EI-MS, Shimadzu 2010 plus with direct injection probe, at 70ev.

The fruits were mechanically separated from their seeds.<sup>41</sup> The pericarp was cut into little pieces (1cm<sup>3</sup>), which were weighted (100g) and macerated in hexane (1:3) at room temperature during 30 min with magnetic agitation. The solution was filtered and the first hexane extract was discarded. The remains of the fruits were extracted with two different solvents separately: ethyl acetate and ethanol in a 1:10 ratio, with agitation for 48 hours. All the extracts were filtered through Watman number 1 filter paper. The filtrate was evaporated to dryness under reduced pressure using a rotary evaporator. The seed extracts were prepared in the same way as the fruit extracts. The extracts obtained were subjected to phytochemical evaluation through TLC analysis using different dyeing reagents.<sup>42,43</sup>

All four crude extracts were evaluated using the same biological test in order to identify which one is active. The ethyl acetate extract of the seeds (2g) were subjected to column chromatography over silica gel 60 (200g) and eluted with chloroform/methanol (98:2). A total of 124 test tubes were collected with 5mL each and similar thin layer chromatography (TLC) patterns were pooled into five fractions named: F1, F2, F3, F4 and F5. The same biological tests were conducted on the different obtained fractions.

Fraction number three (F3) was subjected to column chromatography over silica gel (10g) and eluted with chloroform /methanol gradient. The main isolated compound was further purified by preparative TLC using chloroform /methanol (98:2) as mobile phase and subjected to the spectroscopical characterization.

The MS determination (supporting information Figure S1) showed the presence of a compound  $m/z = 490.10$  (<1%),  $383.35$  (11.07%),  $143.15$  (100%),  $125.15$  (18.08%) &  $85.10$  (12.80%) calculated for  $C_{30}H_{50}O_5$   $m/z = 490.37$ ,  $C_{25}H_{35}O_3$   $m/z = 383.26$ ,  $C_8H_{15}O_2$   $m/z = 143.11$ ,  $C_8H_{13}O$   $m/z = 125.10$  &  $C_5H_9O$   $m/z = 85.07$ .

### 2.3. Insect culture

The FAWs were reared individually,<sup>44</sup> the larvae were fed an artificial diet<sup>45</sup> and maintained under controlled conditions ( $25 \pm 2$  ° C,  $70 \pm 10\%$  RH and photoperiod of 14 hours). Extracts and fractions were applied on the larvae when they reached their third instar. In all trials, data from larvae and pupae were treated as replicates.

#### *2.4. Food preference activity*

The activity of food preference of the all extracts was studied using leaf disc with free choice method.<sup>46,47</sup> Fresh maize leaf discs (13 mm diameter) were submerged in 250, 500 and 1000 mg Kg<sup>-1</sup> concentrations of crude extracts eluted in water and Tween. The leaf discs treated only with water and Tween (250, 500 and 1000 mg Kg<sup>-1</sup>) were used as control. In each Petri dish (1.5cm x 9 cm) we placed two equally spaced discs, treated and untreated, with the bottom covered with wet filter paper. One FAW larva in the third instar was introduced at the center of the each Petri dish. We recorded the progressive consumption of the leaf area by larvae after 24 h using a leaf area meter. Ten replicates were conducted for each treatment. The index of food preference (IP) was calculated using the following formula.<sup>48</sup>

$$= 2 \times (\text{leaf area consumed in treated}) / (\text{leaf area consumed in control} + \text{leaf area consumed in treated}).$$

IP > 1 = phagostimulant; IP < 1 = antifeedant activity

#### *2.5. Ovicidal activity*

The ovicidal activity of the extracts was evaluated using 10 replicates of 30 FAW eggs (24 hours old), arranged in circular pieces of 4cm<sup>2</sup> filter paper. Eggs were immersed in the extracts (250, 500 and 1000 mg Kg<sup>-1</sup>) or distilled water and Tween (control) for ten seconds. They were then transferred on the filter paper and kept in laminar flow hood for five min to eliminate excess moisture. Next, the filter papers (repetitions) with the eggs were transferred to plastic cups (50 mL)

containing a moistened cotton swab, and closed with a cardboard until the larvae hatched. The ovicidal activity was calculated as a function of the percentage of eggs that did not hatch.

### *2.6. Larvicidal activity*

A total of 10  $\mu\text{L}$  of each extract (ethanolic extracts and ethyl acetate of fruits and seeds in the concentrations of 250, 500 and 1000  $\text{mg Kg}^{-1}$ ) or fraction of the ethyl acetate extract obtained after the chromatographic column separation (F1, F2, F3, F4 and F5 at 250  $\text{mg Kg}^{-1}$ ) were applied on 13 mm-diameter corn leaf discs. Each disk was placed in a plastic cup (50 mL) containing a third instar larva and a moistened cotton swab. To maintain humidity and prevent larvae from escaping, the cup was closed with a cardboard. Thirty repetitions were performed for each experiment, including the control and each cup was considered as one replicate.<sup>49,50</sup> Every 24 hours we changed the food and noted on the duration of the larval phase and insect mortality. Additionally, we weighted the larvae 15 days from the beginning of the treatment.

### *2.7. Pupicidal activity*

Only the effect of extracts assimilated during larval feeding were evaluated, which means that our data were obtained from pupae originating from the larvicidal activity trial. After metamorphosis the pupae were kept individually in plastic cups (50 mL) containing moist vermiculite until emergence of the adults. Pupicidal activity was calculated by subtracting the number of adults emerged from the total number of pupae.<sup>51</sup> The pupae and adults were also evaluated for the presence of abnormalities, deformities and tumors.<sup>52</sup>

For the comparisons purposes, the percentage of cumulative survival was calculated using the inverse of the mean (%) ovicidal, larvicidal and pupicidal activity of each extract, fraction and concentration. The mean values of mortality (%) were calculated using the following formula:

Cumulative mortality =  $\{1 - [1 - (\text{ovicidal activity} / 100)] * 1 - (\text{larvicidal activity} / 100)] * 1 - (\text{pupicidal activity} / 100)]\} * 100$ .

As the fractions of the seed extract obtained with ethyl acetate were not used to evaluate ovicidal activity, only data from larval and pupal mortality were compared with one another.

### *2.7. Statistical analysis*

All experimental data were analyzed using one way ANOVA. Significant differences between treatments were determined using Tukey's multiple range tests ( $P \leq 0.05$ ).

### *2.8 Toxicity test*

The ethyl acetate seeds extract was submitted to an acute oral toxicity test on rats according to No. 870.2500 OECD 425 protocol. The test was carried out by Laboratorio de Experimentación Animal of Facultad de Química of Universidad de la Republica – Montevideo/ Uruguay, laboratory accredited by de CHEA (Comision Honoraria de Experimentacion Animal) of Uruguay.

## **3. RESULTS**

### *3.1. Phytochemistry*

Bioguided assays (ovicidal, larvicidal & pupicidal activity) were performed with the four different extracts obtained from seeds and fruits, and the ethyl acetate seed extract yielded the best results. A preliminary TLC phytochemical study of the ethyl acetate seed extract using different dyeing reagents indicated the presence of terpenoids, saponins, phenolic compounds, as well as aromatic compounds. A subsequent purification of the extract performed by column chromatography on silica gel, yielded five fractions that were tested with the larvicidal and pupicidal assays, the F3 had the most interesting activity. The phytochemical profile of F3 showed enrichment in triterpenoids as the main compounds present in the mixture. The major compound of F3 was isolated and purified.

The Mass Spectrum of the main isolated component of F3 (compound **1**) (supporting information Figure S1) showed a high intensity peak (100%) at m/z 143 due to tetrahydrofuran containing lateral chain, which is also typical of Meliaceae dammarane type triterpenols. Most of the dammarane triterpenes reported from Meliaceae have an hydroxyl function at C-25 as in this case (The fragmentation pathway is shown in supporting information Figure S2).

The <sup>1</sup>H NMR (Table 1), <sup>13</sup>C, COSY, HSQC and HMBC spectral data, allowed the identification of the dammarane triterpene. In the <sup>13</sup>C spectra, a signal around 200 ppm was observed, presumably due to a keto function. Four other resonances were detected between 90-60 ppm, due to hydroxyl bearing carbons. Two of them were lacking in the HSQC spectra, indicating that they were attached to quaternary carbons. Resonances around 50 ppm, according to the literature<sup>14</sup>, indicated the presence of a substituted D-ring of the triterpenoid bearing the lateral chain of dammarane from Meliaceae (Table 2).

**Table 1:** <sup>1</sup>H NMR Assignments for compound **1**.

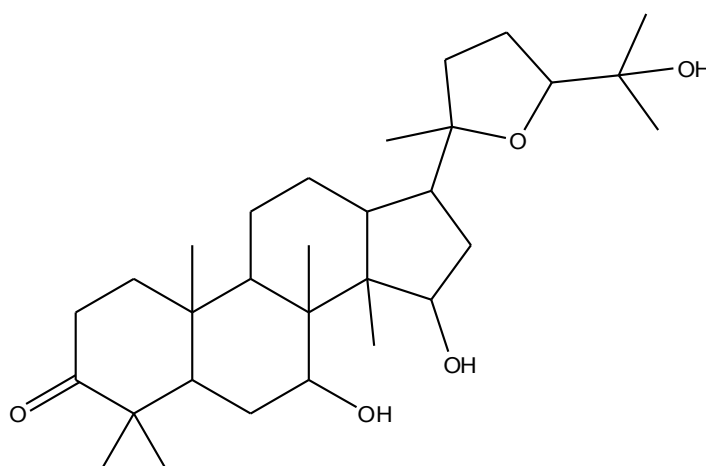
H	Signal	H	Signal
<b>1</b>	1.50 – 1.30 m	<b>18</b>	1.02 s
<b>2</b>	2.35 – 2.15	<b>19</b>	0.84 s
<b>5,6,9</b>	1.70 – 1.40 m	<b>21</b>	1.17 s
<b>7</b>	3,72 (m)	<b>22 – 23</b>	1.16 – 1.13 m
<b>11,12,13</b>	1,70.155	<b>24</b>	3.67 t
<b>15</b>	3.42 m	<b>26, 27, 30</b>	1.28 – 1.25
<b>16,17</b>	1,95-1,48	<b>28 – 29</b>	0.99 – 0.96 m

**Table 2:** Selected <sup>13</sup>C NMR chemicals shifts of compound **1**.

C	<sup>13</sup> C (δ=ppm)
<b>3</b>	197.341
<b>7</b>	130.271
<b>15</b>	76.369
<b>21</b>	77.346
<b>24</b>	86.525
<b>25</b>	68.753

The  $^1\text{H}$  allowed the detection of two resonances of protons attached to hydroxylated carbons, between  $\delta=4.0$  and  $3.0\text{ppm}$ ; a multiplet centered at  $\delta=2.3\text{ppm}$  and signals due to complex multiplets that could be tentatively assigned after the HSQC and the COSY experiments, belonging to the tetracyclic ring system.

The COSY experiment allowed to correlate the protons between C-2 to C-1 as well as the solely correlation of the C-7H proton with the geminal protons attached to C-6 and a more complex correlation was observed for the methine proton, which could be related to two geminal protons which in turn were connected to a proton that was the one attached to the C-17 as determined through the HSQC. From the combination of these spectroscopical findings the structure shown in Figure 1 for compound **1**, a 3-keto-21,24-epoxi-dammarane-7,15,25-triol is proposed.



**Figure 1:** Suggested structure compound **1**.

### 3.2 Food preference activity

All extracts from *C. canjerana canjerana* at a concentration of  $250\text{ mg Kg}^{-1}$  had a phagostimulant effect (Table 3). In higher concentrations ( $500$  and  $1000\text{ mg Kg}^{-1}$ ), however, we observed inhibition of feeding, ie, a phagodeterrent effect. Results were statistically significant ( $P \leq 0.05$ ) for seed extracts obtained with ethyl acetate: they had a small phagodeterrent effect at  $500\text{ mg Kg}^{-1}$ , and inhibited feeding in concentrations of  $1000\text{ mg Kg}^{-1}$ , demonstrating a repellent effect.

**Table 3:** Food preference activity of *C. canjerana* crude extracts in different concentrations (mg Kg<sup>-1</sup>) on larvae of FAW.

Crude extract	Concentration		
	250	500	1000
Ethyl acetate fruit	1.20 (±0.04) b	0.28 (±0.05) a	0.27 (±0.09) a
Ethanol fruit	1.31 (±0.09) ab	0.20 (±0.03) a	0.18 (±0.05) a
Ethyl acetate seeds	1.82 (±0.05) a	0.05 (±0.02) b	0.00 (±0.0) b
Ethanol seeds	1.44 (±0.05) ab	0.22 (±0.03) a	0.31 (±0.04) a

Within columns, mean ± SE followed by the same letter do not differ significantly using Tukey's test, P ≤ 0,05.

IP > 1 = phagostimulant; IP < 1 = antifeedant activity

### 3.3. Ovicidal activity

The ovicidal activity (Table 4) was dose-dependent and ranged from 0.00 to 23.34% at 250 mg Kg<sup>-1</sup>, 0.00 to 34.27% at 500 mg Kg<sup>-1</sup>, and 5.33 to 69.69% at 1000 mg Kg<sup>-1</sup>. Significantly higher values were obtained with the seed extracts, especially those obtained with ethyl acetate.

### 3.4. Larvicidal activity

The seed extracts were more active than the fruit extracts at the same concentration. At 500 mg Kg<sup>-1</sup> concentration 100% mortality was observed for both assayed seed extracts.

The larvicidal activity (Table 4) of seed and fruit extracts at 250 mg Kg<sup>-1</sup> ranged from 10.00 to 29.99%. Whereas the fractions from the ethyl acetate seed extract ranged was 13.34 to 60.00%. The F3 in the lowest concentration had twice the larvicidal activity, which was significantly higher than the best result obtained with fruit ethanolic extract and three times more potent than the crude extract from which it originated. Similarly, excluding the ovicidal activity, the cumulative survival was much lower when (F3) was used than in the treatment using the crude extract. At concentrations of 500 and 1000 mg Kg<sup>-1</sup> the values of larval mortality associated with fruit extracts differed between concentrations, but not between solvents. At these higher concentrations, the different values of larvicidal activity were all significantly lower than those obtained with the extracts originating from seeds using both solvents, responsible for killing almost all larvae.



**Table 4:** Ovicidal, larvicidal, pupicidal activity and cumulative mortality (percentual de mortalidade) of *C. canjerana* crude extracts and fractions of ethyl acetate seeds extract, in different concentrations (mg Kg<sup>-1</sup>) on immature of FAW.

Treatments		Activity			Cumulative	
		Ovicidal	Larvicidal	Pupucidal	Mortality	
Ethylacetate fruit	250	0.00 (±0.00) d	16.06 (±0.33) d	8.69 (±0.13) d	23.35	
	500	0.00 (±0.00) d	38.45 (±1.45) c	10.39 (±0.45) de	44.85	
	1000	29.63 (±0.26)c	62.22 (±2.07) b	11.88 (±0.26) cd	76.57	
Ethanol fruit	250	0.00 (±0.00) d	29.99 (±0.72) c	31.25 (±0.79) b	51.87	
	500	3.34 (±0.45) d	27.58 (±3.94) c	5.47 (±0.21) ef	33.83	
	1000	5.33 (±0.57) d	56.66 (±1.95) b	7.06 (±0.24) de	61.87	
Ethylacetate seeds	250	23.34 (±0.74) c	20.00 (±0.67) d	35.00 (±0.69) b	<sup>a</sup> 60.14 (48.00)	
	500	34.27 (±0.92) c	100.00 (±0.00) a	-----	100.00	
	1000	69.69 (±0.79) a	100.00 (±0.00) a	-----	100.00	
Ethanol seeds	250	16.67 (±0.56) d	10.00 (±0.84) de	11.11 (±0.19) de	33.34	
	500	33.33 (±0.42) c	100.00 (±0.00) a	-----	100.00	
	1000	40.00 (±0.22) b	93.33 (±1.16) a	48.25 (±1.68) a	97.93	
Fractions	1	250	-----	13.34 (±0.36) d	15.24 (±0.15) cd	<sup>a</sup> 26.55
	2	250	-----	17.24 (±0.34) d	7.73 (±0.15) de	<sup>a</sup> 23.64
	3	250	-----	60.00 (±1.34) b	16.75 (±0.41) c	<sup>a</sup> 66.70
	4	250	-----	30.00 (±0.93) c	10.51 (±0.10) de	<sup>a</sup> 37.36
	5	250	-----	33.34 (±0.85) c	10.50 (±0.16) de	<sup>a</sup> 40.34
Control		0.00 (±0.00) d	0.00 (±0.00) e	0.00 (±0.00) f	100,00	

Average values of 30 replicates.

<sup>a</sup>Considered only mortality data of larvae and pupae.

Within columns, mean ± SE followed by the same letter do not differ significantly using Tukey's test, P ≤ 0,05.

### 3.5. Pupicidal activity

As observed for the egg and larval stages, the mortality of pupae (Table 4), in treatments where there were survivors, was higher for treatments that used both seed extracts. Similar to what was observed for the first two phases, extracts and concentrations effective against eggs and larvae were also significantly more effective against FAW pupae.

### 3.6. Cumulative mortality

In general, the effect of the four plant extracts tested was dose dependent (Table 4), as can be seen in the values of mortality at each stage of development and cumulative mortality. We observed that the cumulative mortality in all extracts, in the highest concentration (1000 mg Kg<sup>-1</sup>), and in F3 (250 mg Kg<sup>-1</sup>) was greater than 60%. However, we highlight the results obtained from seeds. Administration of 500 and 1000 mg Kg<sup>-1</sup> induced a total cumulative mortality of almost 100% for both solvents.

### 3.7. Larval weight

The extracts of fruits and seeds of *C. canjerana* obtained with ethyl acetate and ethanol and the fractions of the seed extract obtained with ethyl acetate influenced significantly the weight and consequently the size of FAW larvae, as demonstrated after measurements for 20 days, during the development (Table 5), especially with respect to the reduction in size (Fig. 2A). The effect of F4 is worth mentioning because it yielded significantly larger larvae than the control. Similarly to what was observed for mortality, a much greater effect of both seed extracts was observed at concentrations of 500 and 1000 mg Kg<sup>-1</sup>. All larvae treated with ethyl acetate extracts died and only 6.77% of those treated with ethanolic extract reached the pupal phase. A residual effect killed nearly 50% of surviving pupae (Table 4). As a result of decreased larval weight, although not quantified, the pupae in the treatments with ethyl acetate and ethanol seed extracts were significantly smaller, about half the size (Fig. 2B).

**Table 5:** Larval weight (mg) of FAW, 20 days old, treated with *C. canjerana* crude extracts and fractions of ethyl acetate seeds extract, in different concentrations (mg Kg<sup>-1</sup>).

Crude extract / fractions	Concentration		
	250	500	1000
Ethyl acetate fruit	120.7 (±0.02) f	154.0 (±0.01) b	147.9 (±0.03) b
Ethanol fruit	136.6 (±0.05) e	155.6 (±0.04) ab	139.6 (±0.04) c
Ethyl acetate seeds	101.3 (±0.03) h	23.7 (±0.00) d	31.7 (±0.03) d
Ethanol seeds	98.5 (±0.02) h	30.5 (±0.01) c	32.5 (±0.01) d
F1	159.8 (±0.04) b	-----	.....
F2	153.7 (±0.03) c	.....	.....
F3	115.5 (±0.06) g	.....	.....
F4	189.4 (±0.04) a	.....	.....
F5	147.80 (±0.04) d	.....	.....
Control	160.00 (±0.08) b	157.00 (±0.03) a	163.1 (±0.03) a

Within columns, mean ± SD followed by the same letter do not differ significantly using Tukey's test,  $P \leq 0,05$ .

### 3.8. Larval stage duration

The extracts of *C. canjerana canjerana* administered in the diet of the FAW also influenced the duration of the larval stage (Table 6), which was significantly longer for virtually all treatments and concentrations, as compared with the control ( $P \leq 0.05$ ). The table 6 does not show the data on the duration of the larval stage for the treatments with seed extracts using ethyl acetate and ethanol administered at higher concentrations, because all larvae died. However, we observed that larvae in these treatments were smaller and took longer to development, lasting up to 36 days before death, still in the larval stage. The larval cycle was also longer when the larvae ingested fractions two, three and five.

**Table 6:** Larval stage duration (days) of FAW treated with *C. canjerana* crude extracts and fractions of ethyl acetate seeds extract, in different concentrations (mg Kg<sup>-1</sup>).

Crude extract / fractions	N	Concentration		
		250	500	1000
Ethyl acetate fruit	30	33.00 (±0.54) a	41.00 (±0.33) a	29.50 (±0.32) b
Ethanol fruit	30	33.20 (±0.72) a	26.00 (±0.79) b	23.75 (±0.63) c
Ethyl acetate seeds	30	34.00 (±0.68) a	.....	.....
Ethanol seeds	30	36.00 (±0.33) a	.....	36.75 (±0.66) a
F1	30	23.00 (±0.32) b	.....	.....
F2	30	29.00 (±0.92) a	.....	.....
F3	30	28.40 (±0.90) a	.....	.....
F4	30	23.00 (±0.90) b	.....	.....
F5	30	25.50 (±1.06) b	.....	.....
Control	30	23.00 (±0.50) b	24.00 (±0.50) b	23.33 (±0.80) c

Within columns, mean ± SE followed by the same letter do not differ significantly using Tukey's test, P ≤ 0,05

### 3.9. Abnormalities

Besides the effects described and quantified previously, abnormalities such as tumors, inability to perform ecdysis, and intermediate stages of development such as larva-pupa and pupa-adult were observed in the development of FAW individuals (Fig. 2).



**Figure 2.** Effects of crude extracts and fractions of *Cabralea canjerana* on FAW (*Spodoptera frugiperda*). (A) larvae size - top (control), low - ethyl acetate seeds; (B) Pupae size - top (control), low (semente etanólico). (C) Incomplete ecdysis (ethanol Seeds). (D) Larval-pupal intermediate (fraction 3). (E) Top abnormal pupa (ethyl acetate seeds) Low normal pupa (control). (F) Pupal-adult intermediate (F3). (G) Pupal-adult intermediate (F2). (H) Normal adult. (I) Pupal-adult intermediate (F1). (J) Deformed adult (ethyl acetate fruit).

### 3.10 Toxicity test

The seed extract ethyl acetate at a dose of 2000 mg Kg<sup>-1</sup> showed no toxicity to the rats, where during the 14 days of observation did not cause the mortality of animals, therefore the estimated LD<sub>50</sub> for this product is estimated between 500 and 5000 mg Kg<sup>-1</sup>, so it is assigned to Category III of toxicity according to OECD 425. The toxicity test of the ethyl acetate seed extract was performed using the limit test with a dose level of 2000 mg Kg<sup>-1</sup> and using the Acute Oral Toxicity (OECD Test Guideline 425) Statistical Program 1.0. The sample did not induced the death of any of the animals used hence, it was not necessary to perform the principal toxicity test and the estimated DL<sub>50</sub> for this product is greater than 2000 mg Kg<sup>-1</sup> (Assumed sigma (mg/kg): 0.5), for what is assigned to category III of toxicity according to OECD 425.

## 4. DISCUSSION

### 4.1. Phytochemistry

The presence of triterpenoids as the main compounds in ethyl acetate seed extracts and in F3, corroborates the findings in literature,<sup>53</sup> who described limonoids and dammarane triterpenes as the major compounds found in Meliaceae plants extracts. These type of compounds had also been identified in *C. canjerana*.<sup>14</sup> According to several authors,<sup>54,55</sup> the triterpenes, and more specifically the limonoids, are the main active components of Neem. Many triterpenoids in plants of the family Meliaceae described in the literature have many different insecticidal effects.<sup>3,56</sup>

The phytochemical study indicated that the extract from *C. canjerana* presented bioactive compounds like triterpenoids with structural similarities with dammaranes that were reported to *C. canjerana* in literature.<sup>14, 57</sup> Nevertheless, after examining the 1-D and 2-D NMR spectra, the chemical shifts assignments (Table 1) were performed. We concluded that this compound it is not a seco dammarane. The signals due to an exocyclic isopropenyl chain, that should be present on a Seco-A ring triterpenoid spectrum, were lacking in the <sup>1</sup>H spectrum. (a doublet around  $\delta = 4.8$  ppm, assigned to germinal vinyl protons and a singlet of three protons at  $\delta = 1.7$  ppm of the methyl group attached to a double bond) is not present in the <sup>1</sup>H spectrum. The compound that was characterized after the spectroscopical analysis, is probably a biosynthetic precursor of the Seco A-dammarane triterpenes described<sup>14</sup>, via Baeyer Vileger type oxidation to the lactone followed by an anti-markovnikov elimination of the C-4 hydroxyl to yield the characteristic vinyl group of Seco A-dammaranes.

#### 4.2. Food preference activity

The results concerning food preference activity in this study, showing that the lowest doses (250ppm) are phagostimulant (Table 3), and that larger doses deter FAW larvae, had not yet been described in the literature. The various studies that evaluate toxic effects of plant extracts on the feeding activity of noctuid larvae highlight their activity as deterrents,<sup>51,58-64</sup> and rare plant species whose extracts act as phagostimulants.<sup>60,63</sup> Even in the case of the FAW,<sup>30</sup> observed that hexanic and ethanolic extracts of seeds of 22 species of Meliaceae were mostly deterrent, with associated

larvicidal and pupicidal activity. The fact that the lowest concentration (250 mg Kg<sup>-1</sup>) has a phagostimulating effect on the FAW, reducing overall survival from 76.65 to 39.86% (Table 4), indicates that, at this concentration, FAW larvae inadvertently consume toxic substances in the extract. This effect is desirable when the goal is to introduce a disguised substance with insecticidal action. On the other hand, like most studies involving noctuids,<sup>51,58-64</sup> higher concentrations are more harmful to the larvae. Phagodeterrents in real applications may play an important role repelling the FAW larvae (an aspect still largely unexplored). The FAW, as various other armyworms, is a generalist species whose larvae are very mobile. They feed at night, and go down near the ground during the day, returning the next night to feed on any plant available.<sup>65</sup> Our results indicate that, for an effective control of FAW using crude extracts, low doses should be evaluated, whereas high doses, however more active, probably lead the larvae to "escape " to other crops .

#### 4.3. Ovicidal activity

The ovicidal activity (Table 4) observed in 1000 mg Kg<sup>-1</sup> treatment employing seed extracts of *C. canjerana* obtained with ethyl acetate was similar to that described for treatments that used three Neem-based insecticides (72-78%) against *Spodoptera exigua* (Hübner, [1808]).<sup>66</sup> The results of this study confirm the potential use of plant extracts with active compounds, including those from *C. canjerana*, to kill lepidopteran eggs.<sup>60,67,68</sup> Moreover, considering that our study, however promising, only assessed mortality in 24-hour age eggs, our results may be underestimated, since the greatest ovicidal activity of plant extracts has been reported on 48 -72 hour old eggs.<sup>60,68</sup> The greatest ovicidal activity of ethyl acetate seed extract (1000 mg Kg<sup>-1</sup>) should be associated with the presence of many triterpenoids which easily crossed the outermost layer of the eggs, reaching the embryo.<sup>69</sup> In practical terms, beyond the ovicidal effect, like the Neem-based insecticides for the very FAW,<sup>4</sup> and other noctuids,<sup>4,66,67,70</sup> *C. canjerana* extracts are expected to respell females,

detering oviposition, an effect typically are associated with larval feeding deterrence,<sup>30</sup> as described in this study.

#### 4.4. Larvicidal activity

The various aspects related to the biological activity of extracts of fruits and seeds of *C. canjerana* on FAW larvae, including larvicidal activity, delayed development, reduced weight and deformation are similar to results reported in several studies using extracts of different structures of representatives of Meliaceae, including the Neem on the FAW,<sup>7,8,30,33,35-39</sup> *S. exigua*,<sup>66</sup> *S. littoralis* (Boisduval, 1833),<sup>71,72</sup> *H. armigera*,<sup>73</sup> and *Peridroma saucia* (Hübner, 1808),<sup>74</sup> and other noctuid pests.<sup>75</sup> Similarly to the results obtained with azadirachtin, treatments with the extracts of fruits and seeds of *C. canjerana* impact on the physiology of the target insect, interfering with growth and moulting. Dose response effects can be seen as reduced growth (Table 5, Fig. 2A-B), increased mortalities (Table 4), abnormal moults (Fig 2 C-J) and delayed moults. These effects are due to a disruption of the endocrine system which controls growth and molting. The molting effects are due to a disruption in the synthesis and release of ecdysteroids (moulting hormone) and other classes of hormones.<sup>3</sup>

#### 4.5. Pupicidal activity

The activity of plant extracts from several plant groups on the metamorphosis of noctuids, including the pupal stage, has been previously reported.<sup>60,51,76</sup> For instance, the impact of seeds of Neem,<sup>4, 71-73</sup> and Meliaceae on FAW metamorphosis had already been.<sup>7,33</sup> The pupicidal activity described in this study (Table 4) is certainly related to the effects of substances present in the extracts and fractions on the physiology of development of the larva.<sup>3</sup> The highest pupicidal activity checked after the ingestion of ethyl acetate extract seed and the F3 to 250 mg Kg<sup>-1</sup> suggests the



presence of higher concentrations of substances toxic to the FAW in these extracts, consistent with,<sup>76</sup> who obtained the highest mortality of pupae with ethyl acetate extracts.

#### 4.6. Larval weight

The reduction in larval weight caused by the addition of extracts of *C. canjerana* in the larval diet is of practical interest. Larvae fed ethyl acetate and ethanol seed extracts (500 and 1000 mg Kg<sup>-1</sup>) and the F3 (250 mg Kg<sup>-1</sup>) showed dramatic reduction in weight with respect to the control. Those individuals who survived gave rise to pupae (Fig. 2B) and smaller adults. Lepidopteran reserves are accumulated during larval development, which means that conditions adverse to larval development determine asynchrony with the normal population, hindering copulation,<sup>32</sup> interfering with adult fitness, including reduced fecundity and low-performing offspring.<sup>77</sup>

#### 4.7. Larval stage duration

The prolongation of the larval cycle, evident in almost all treatments and concentrations, together with difficulties changing instars, and the occurrence of additional instars (probably to compensate for malnutrition and reduced growth), comparable with the effects obtained with azadirachtin is attributed to an inhibition in the production of,<sup>7,8,33,39,67,72,78,79</sup> food intake, conversion efficiency,<sup>71</sup> and for alterations of the peritrophic matrix in the midgut showed such as degradation,<sup>40</sup> thickening and fragmentation and a subsequent loss of defense capacity against the action of extracts substances on the epithelium.<sup>34</sup>

The larval mortality induced by F3 at a concentration of 250 mg Kg<sup>-1</sup>, three times higher than for the crude extract of ethyl acetate seed in the same concentration, suggests that this fraction has greater bioactivity. This fraction determined the lightest larval weight, indicating the interaction between various factors associated with biological activity of these compounds, as described above. Unfortunately, due to the small amount of material obtained in the fractions we were not able to test

the biological activity of these fractions at higher concentrations. The triterpenes and limonoids from Meliaceae can affect the neuroendocrine system and block the release of hormones, preventing the completion of the ecdysis,<sup>3</sup> causing death of the insect. Lepidopterans are more sensitive to these compounds.

#### 4.8. *Abnormalities*

The various types of abnormalities observed in larvae (Fig. 2C), pupae (Fig.2B-D-E) and adults (Fig.2G-I-J) of the FAW are also described in other studies involving representatives of Meliaceae and Spodoptera, particularly the influence of azadirachtin.<sup>7,33,39,66,71-73,80</sup> These abnormalities are related to physiological changes resulting from modifications of the endocrine system, which controls growth and ecdysis.<sup>3, 78</sup>

The *C. canjerana* seeds extracts, especially those obtained with ethyl acetate, showed potent antifeedant and negative effects on all developmental stages of the FAW. This effects, including high mortality indices, were similar those observed in Neem derivates. Our results indicate that this extract could be used for the development of new pesticide formulations for the control of armyworms. *C. canjerana* biosynthesizes preferentially dammarane triterpenes than limonoids. In the present work, a phytochemical marker of the most active extract was characterized. Due to the promising biological results, these extracts can be potentially used for the alternative control of *S. frugiperda* and other pest insects, taking advantage of the little acute oral toxicity they have demstrated when they were evaluated by the OECD 425 assay.

#### **Acknowledgements**

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support to carry out this work. Facultad de Química Montevideo to give the opportunity to work at Farmacognosia Laboratory during 3 months.

## References

- 1 Connolly JD, Chemistry of the Meliaceae and Cneoraceae, in *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*, ed. by Waterman PG., Grunden MF. Academic Press, London, pp. 175–213 (1983).
- 2 Viegas CJr, Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quimica Nova* **26**: 390-400 (2003).
- 3 Mordue (Luntz) JA, Nisbet AJ, Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *An Soc Entomol Brasil*. **29**: 615-632 (2000).
- 4 Schmutterer H, Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu Rev Entomol* **35**: 271–297 (1990).
- 5 Bostid RFR, *Neem. A tree for solving global problems*. National Academy Press, Washington, D.C. 139p (1992).
- 6 Carpinella MC, Ferrayoli C, Valladares G, Defago M, Palacios S Potent limonoid insect antifeedant from *Melia azedarach*. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**:1731-1736 (2002).
- 7 Roel AR, Vendramim JD, Frighetto RTS, Frighetto N, Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* (Swartz) (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *An Soc Entomol Brasil* **29**: 799-808 (2000).
- 8 Matos AP, Nebo L, Vieira PC, Fernandes JB, Silva MFGF, Rodrigues RR, Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* e *T. catigua* (Meliaceae). *Química Nova* **32**:1553-1556 (2009).
- 9 Baatile M, Komane EI, Olivier AMV, *Trichilia emetica* (Meliaceae) – A review of traditional uses, biological activities and phytochemistry. *Phytochemistry Letters* **4**:1–9 (2011).
- 10 Pennington TD and Styles BD, *A generic monograph of Meliaceae*, Vol 22, Blumea, pp. 419-540 (1975).
- 11 Barreiros HDS and Souza DSE, Notas Geográficas e Taxonômicas sobre *Cabrlea canjerana* (Vell.) Mart. no Brasil (Meliaceae ). *Rev Brasil Biol* **46**:17-26 (1986).
- 12 Bueno NR, Castilho RO, Costa RB, Pott A, Pott VJ, Scheidt GN, Batista MS, Medicinal plants used by the Kaiowá and Guarani indigenous populations in the Caarapó Reserve, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Bot Bras* **19**:39-44 (2005).

- 13 Rao MM, Meshulam H, Zelnik R, Lavie D, Structure and stereochemistry of limonoids of *Cabralea eichleriana*. *Phytochemistry* **14**:1071-1075 (1975).
- 14 Braga PAC, Soares MS, Silva FMGF, Vieira PC, Fernandes JB, Pinheiro AL, Dammarane triterpenes from *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae): Their chemosystematic significance. *Biochem Syst Ecol* **34**:282-290 (2006).
- 15 Cazal CM, Choosang K, Severino VGP, Soares MS, Sarria ALF, *et al*, Evaluation of effect of triterpenes and limonoids on cell growth, cell cycle and apoptosis in human tumor cell lines. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **10**:769-776 (2010).
- 16 Schmeda-Hirschmann G and Arias AR, A screening method for natural products on triatomine bugs. *Phytotherapy Research* **6**:68-73 (1992).
- 17 Smaniotto L, Moura NF, Denardin RBN, Garcia FRM, Bioatividade de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) no controle de adultos de *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera, Bruchidae) em laboratório. *Revista Biotemas* **23**:31-35 (2010).
- 18 Sarria ALF, Soares MS, Matos AP, Fernandes JB, Vieira PC, Silva MFGF, Effect of triterpenoids and limonoids isolated from *Cabralea canjerana* and *Carapa guianensis* (Meliaceae) against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Z Naturforsch* **66**:245-250 (2011).
- 19 Capinera JL, *Encyclopedia of entomology*, 2ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 4346p (2008).
- 20 Cruz I, Figueiredo MLC, Oliveira AC, Vasconcelos CA, Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. *International Journal of Pest Management* **45**: 293-296 (1999).
- 21 Barros EM, Torres JB, Bueno AF, Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. *Neotrop Entomol* **39**:996-1001 (2010).
- 22 Whalon ME, Mota-Sanchez D, Hollingworth RM, *Global Pesticide Resistance in Arthropods*. CABI, London, 208p (2008).
- 23 Al-Rubae AY, The potential uses of *Melia azedarach* L. as pesticidal and medicinal plant, review. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* **3**:185-194 (2009).

- 24 Jacobson M, Focus on Biochemical Pesticides, Vol 1, in *The Neem Tree*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 178p (1989).
- 25 Wheeler DA, Isman MB, Sanchez-Vindas PE, Arnazon JT,. Screening of Costa Rican *Trichilia* species for biological activity against the larvae of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biochem Syst Ecol* **29**:347–358 (2001).
- 26 Senthil Nathan S, Kalaivani K, Murugan K, Chung PG, Efficacy of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae) the rice leaffolder. *Crop Prot* **24**:760–763 (2005).
- 27 Kipassa NT, Iwagawa T, Okamura H, Doe M, Morimoto Y, Nakatani M, Limonoids from the stem bark of *Cedrela odorata*. *Phytochemistry* **69**:1782–1787 (2008).
- 28 Jimenez A, Villarreal C, Toscano RA, Cook M, Arnason J, Byek R, Mata R, Limonoids from *Swietenia humilis* and *Guarea grandiflora* (Meliaceae). *Phytochemistry* **49**:1981-1988 (1998).
- 29 Wandscheera CB, Duqueb JE, Silva MAN, Fukuyamac Y, Wohlkea JL, Adelman J, Fontana JD, Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Toxicon* **44**:829–835 (2004).
- 30 Mikolajczak KL and Reed DK, Extractives of seeds of the Meliaceae: Effects on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), *Acalimma vittatum* (F.), and *Artemia salina* Leach. *J Chem Ecol* **13**:99-111 (1987).
- 31 Mikolajczak KL, Zilkowski BW, Bartelt RJ, Effects of meliaceous seed extracts on growth and survival of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *J Chem Ecol* **15**:121-128 (1989).
- 32 Rodriguez HC and Vendramim JD, Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Man Integ Plagas* **42**:14-22 (1996).
- 33 Roel AR, Vendramim JD, Frighetto RTS, Frighetto N, Efeito do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da lagarta-do-cartucho. *Bragantia*. **59**:53-58 (2000).
- 34 Roel AR, Dourado DM, Matias R, Porto KRA, Bednaski AV, Costa RB, The effect of sub-lethal doses of *Azadirachta indica* (Meliaceae) oil in the midgut of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). *Rev Bras Entomol* **54**:505-510 (2010).

- 35 Torrecillas SM and Vendramim JD, Extrato aquoso de ramos de *Trichilia pallida* e o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* em genótipos de milho. *Scientia Agrícola* **58**:27-31 (2001).
- 36 Bogorni PC and Vendramim JD, Bioatividade de Extratos Aquosos de *Trichilia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em Milho. *Neotrop Entomol* **32**:665-669 (2003).
- 37 Prates HT, Viana PA, Waquil JM, Activity of neem tree (*Azadirachta indica*) leaves aqueous extract on *Spodoptera frugiperda*. *Pesq Agrop Bras* **38**: 437-439 (2003).
- 38 Viana PA and Prates HT, Larval development and mortality of *Spodoptera frugiperda* fed on corn leaves treated with aqueous extract from *Azadirachta indica* leaves. *Bragantia* **62**: 69-74 (2003).
- 39 Roel AR and Vendramim JD, Efeito residual do extrato de acetato de etila de *Trichilia pallida* (Swartz) (Meliaceae) para lagartas de diferentes idades de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciência Rural* **36**:1049-1054 (2006).
- 40 Correia AA, Wanderley-Teixeira W, Teixeira AAC, Oliveira JV, Torres, JB, Morphology of the alimentary canal of *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) larvae (Lepidoptera: Noctuidae) fed on neem-treated leaves. *Neotrop Entomol* **38**:83-91 (2009).
- 41 Cañigueral S, Vila R, Wichtl M, *Plantas medicinales y drogas vegetales para infusión y tisana*, ed. espanõla. OEMF Internacional srl, Milán, Itália, 606p (1998).
- 42 Anonymous, *Dyeing reagents for thin layer and paper chromathography*. 18, Merck, Darmstadt. (1974).
- 43 Wagner H and Bladt S, *Plant Drug Analysis*, 2° ed. Springer. Berlin. 384p (1995).
- 44 Specht A, Formentini AC and Corseuil E, Bionomy of *Anicla mahalpa* Schaus, 1898 (Lepidoptera: Noctuidae: Noctuinae), in the laboratory. *Braz J Biol* **68**:415-418 (2008).
- 45 Kasten Junior P, Precetti AAC, Parra JRP, Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. *Revista Agricultura* **53**: 68-78 (1978).
- 46 Ling B, Wang G, Ya J, Zhang M, Liang G, Antifeedant activity and active ingredients against *Plutella xylostella* from *Momordica charantia* leaves. *Agricultural Sciences in China* **7**:1466-1473 (2008).

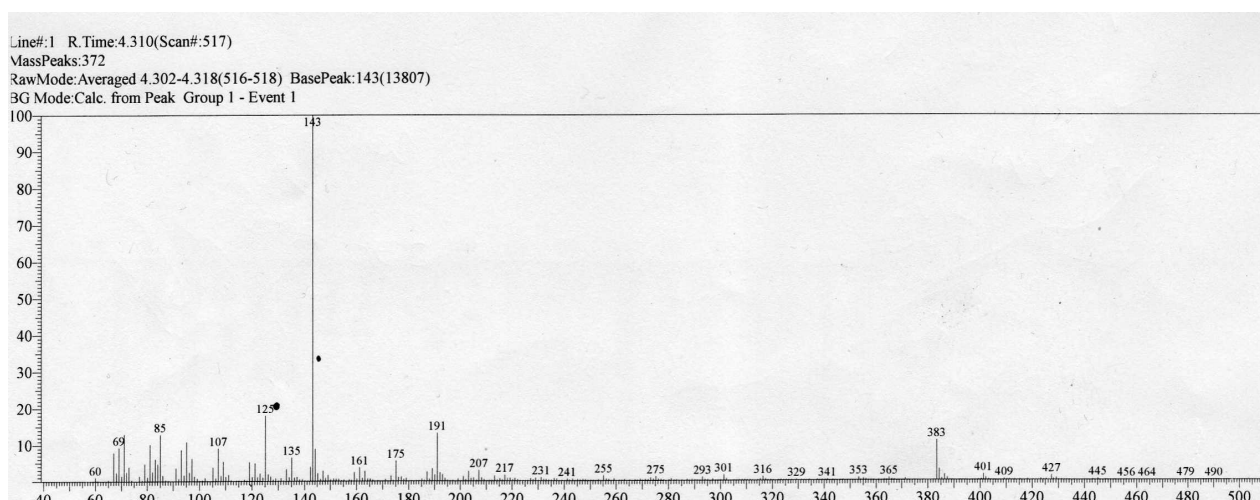
- 47 Napal GND, Carpinella MC, Palacios SM, Antifeedant activity of ethanolic extract from *Flourensia oolepis* and isolation of pinocebrin as its active principle compound. *Bioresource Technol* **100**:3669–3673 (2009).
- 48 Kogan M, Goeden RD, The host-plant range of *Lema trilineata daturaphila* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Ann Entomol Soc Am* **63**:1175-1180 (1970).
- 49 Bertholdo-Vargas LR, Martins J, Bordin D, Salvador M, Schafer A, Barros N, *et al*, Type 1 ribosome-inactivating proteins entomotoxic, oxidative and genotoxic action on *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *J Insect Physiol* **55**:51-58 (2009).
- 50 Senthil Nathan S, Kalavani K, Murugan K, Chung PG, The toxicity and physiological effect of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medicalis* (Guenée) the rice leaf folder. *Pest Biochem Physiol* **81**:113-122 (2005).
- 51 Baskar K, Kingsley S, Vendan SE, Paulraj MG, Duraipandiyar V, Ignacimuthu S, Antifeedant, larvicidal and pupicidal activities of *Atalantia monophylla* (L) Correa against *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). *Chemosphere*. **75**:355-359 (2009).
- 52 Parra JRP, A evolução das dietas artificiais e suas interações em ciência e tecnologia, in *Bioecologia e nutrição de insetos – Base para o manejo integrado de pragas*, ed. by Panizzi AR. and Parra JRP. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, Brasil, pp. 91-174 (2009).
- 53 Regnault-Roger C, Philogène BJR, Vincent C, *Biopesticidas de origen vegetal*, ed. Mundi-Prensa, Madrid, Barcelona and Mexico, 337p (2004).
- 54 Isman MB, Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu Rev Entomol* **51**:45-66 (2006).
- 55 Mitchell MJ, Smith SL, Johnson S, Morgan ED, Effects of the neem tree compounds azadirachtin, salannin, nimbin and 6- desacetylnimbin on Ecdyosone 20-monooxygenase activity. *Arch Insect Biochem Physiol* **35**:199–209 (1997).
- 56 Bohnenstengel FI, Wray V, Witte L, Srivastava RP, Proksch P, Insecticidal meliacarpins (C-seco limonoids) from *Melia azedarach*. *Phytochemistry* **50**:977–982 (1999).
- 57 Leitão GG, Abreu LF, Costa FN, Brum TB, Ramos DF, Silva PEA, *et al*, Preparative isolation of antimycobacterial shoreic acid from *Cabralea canjerana* by high speed countercurrent chromatography. *Natural Product Communications* **3**:1995-1997 (2008).

- 58 Ntonifor NN, Mueller-Harveya I, Van Emden HF, Brown RH, Antifeedant activities of crude seed extracts of tropical African spices against *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Int J Trop Insect Sci* **26**:78-85 (2006).
- 59 Abdel-Rahman HR and Al-Mozini RN, Antifeedant and toxic activity of some plant extracts against larvae of cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pak J Biol Sci* **10**:4467-4472 (2007).
- 60 Shadia EA and Azza AEE, Insecticidal activity of some wild plant extracts against cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pak J Biol Sci* **10**:2192-2197 (2007).
- 61 Zapata N, Budia F, Viñuela E, Medina P, Antifeedant and growth inhibitory effects of extracts and drimanes of *Drimys winteri* stem bark against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). *Ind Crop Prod* **30**:119–125 (2009).
- 62 Seffrin RC, Shikano I, Akhtar Y, Isman MB, Effects of crude seed extracts of *Annona atemoya* and *Annona squamosa* L. against the cabbage looper, *Trichoplusia ni* in the laboratory and greenhouse. *Crop Prot* **29**:20–24 (2010).
- 63 Haouas D, Flamini G, Halima-Kamel MB, Hamouda MHB, Feeding perturbation and toxic activity of five *Chrysanthemum* species crude extracts against *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera; Noctuidae). *Crop Prot* **29**:992-997 (2010).
- 64 Farag M, Ahmed MHM, Yousefa H, Abdel-Rahman AA, Repellent and insecticidal activities of *Melia azedarach* L. against cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Z Naturforsch* **66**:129 – 135 (2011).
- 65 Bernarys EA and Singer M, Contrasted foraging tactics in two species of polyphagous caterpillars. *Acta Zool Acad Sci Hung* **48**: 117-135 (2002).
- 66 Greenberg SM, Showler AT, Liu T-X, Effects of neem-based insecticides on beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Science* **12**:17-23 (2005).
- 67 Liu T-X, Xu H-H and Luo W-C, Chapter 8 Opportunities and potentials of botanical extracts and products for management of insect pests in cruciferous vegetables., in *Naturally Occurring Bioactive Compounds*, vol.3, ed. by Rai M and Carpinella MC. Advances in Phytomedicine, pp.171-197 (2006).
- 68 Satyan RS, Malarvannan S, Eganathan P, Rajalakshmi S, Parida A, Growth inhibitory activity of fatty acid methyl esters in the whole seed oil of madagascar periwinkle (Apocyanaceae) against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol* **102**:1197-202 (2009).

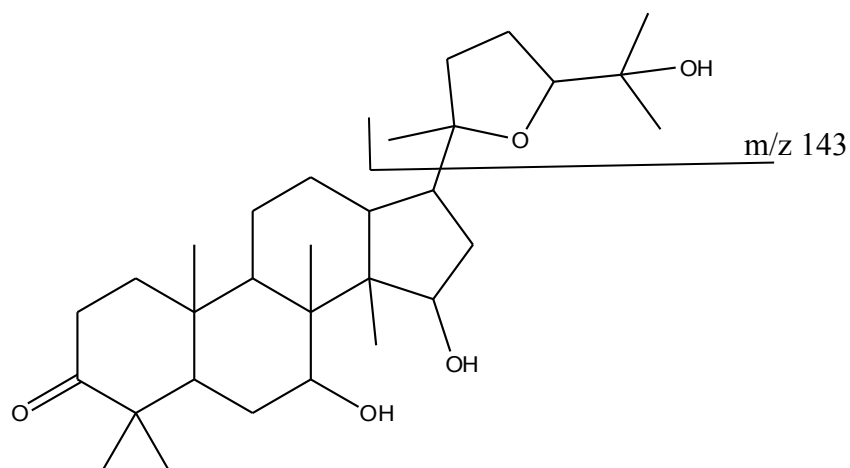


- 69 Hilker M. and Meiners T, Plants and insect eggs: How do they affect each other?. *Phytochemistry* **72**:1612–1623 (2011).
- 70 Liang GM, Chen W, Liu T-X, Effects of three neem-based insecticides on diamondback moth (Lepidoptera Plutellidae). *Crop Prot.* **22**:333–340 (2003).
- 71 Martinez SS and Van Emden HF, Sublethal concentrations of azadirachtin affect food intake, conversion efficiency and feeding behavior of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *B Entomol Res* **89**: 65-71 (1999).
- 72 Martinez SS and Van Emden HF, Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. *Neotrop Entomol* **30**:113-125 (2001).
- 73 Ma D-L, Gordh G, Zalucki MP, Biological effects of azadirachtin on *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed on cotton and artificial diet. *Aust J Entomol* **39**:301-304 (2000).
- 74 Koul O, Isman MB, Effects of azadirachtin on the dietary utilization and development of the Variegated Cutworm *Peridroma saucia*. *J Insect Physiol* **37**:591-598 (1991).
- 75 Isman MB,. Growth inhibitory and antifeedant effects of azadirachtin on six noctuids of regional economic importance. *Pesticide Sci* **38**:57-63 (1993).
- 76 Baskar K, Sasikumar S Muthu C, Kingsley S, Ignacimuthu S, Bioefficacy of *Aristolochia tagala* Cham. against *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae). *Saudi Journal of Biological Sciences* **18**: 23–27 (2011).
- 77 Fantinou AA, Perdakis DC, Stamogiannis N, Effect of larval crowding on the life history of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Eur J Entomol* **105**:626-630 (2008).
- 78 Mordue (Luntz) JA, Blackwell A, Azadirachtin: an update. *J Insect Physiol* **39**:903-924 (1993).
- 79 Adel MM and Sehnal F, Azadirachtin potentiates the action of ecdysteroid agonist RH-2485 in *Spodoptera littoralis*. *J Insect Physiol* **46**:267-274 (2000).
- 80 Bogorni PC and Vendramim JD, Efeito subletal de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em Milho. *Neotrop Entomol* **34**:311-317 (2005).

## Supporting information



**Figure S1:** MS spectrum from the compound **1**.



**Figure S2:** Fragmentation of compound **1** to yield the base peak at  $m/z$  143.

## 6. DISCUSSÃO GERAL

Este estudo demonstrou que extratos de frutos e sementes de *C. canjerana* subsp. *canjerana*, apresentam diversos efeitos sobre a mosca-das-frutas-sul-americana *A. fraterculus* e a lagarta-do-cartucho *S. frugiperda*. Tal constatação, aliada a identificação de triterpenos, compostos bioativos que agem de diferentes formas contra várias ordens de insetos (Mordue (Luntz) & Nisbet, 2000), indica que esta planta, a exemplo dos demais representantes da família Meliaceae, apresenta potencial para a prospecção de compostos ativos a serem empregados no controle de insetos (Roel & Vendramin, 2006)

As atividades biológicas mais evidentes foram a deterrência à alimentação para adultos de *A. fraterculus* e para larvas de *S. frugiperda*, já relatados para extratos e inseticidas à base de nim e outras meliáceas (Aerts & Mordue (Luntz), 1997; Wheeler & Isman, 2001; Akhtar *et al.*, 2008; Pavela, 2009 ). Diversos efeitos negativos sobre o desenvolvimento foram constatados para ambos insetos. Entretanto, como descrito na literatura observou-se diferenciações entre os efeitos em função da estrutura vegetal, do solvente e da ordem do inseto (Bogorni & Vendramin, 2003; Matos *et al.*, 2006). O extrato de fruto em acetato de etila foi o mais efetivo para *A. fraterculus*, e os extratos de sementes tanto acetato de etila, quanto etanólico foram mais efetivos para *S. frugiperda*.

Apesar dos extratos serem administrados de forma distinta, afetaram negativamente o desenvolvimento de ambos os insetos. Ambos insetos desenvolveram anormalidades, as quais assemelham-se a anormalidades já descritas em estudos que empregaram extratos, inseticidas a base de nim e azadiractina, sobre tefritídeos e noctuídeos (Schmutterer 1990; Singh, 2003; Ma *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2011).

Os efeitos observados neste estudo, em ambos os insetos, indica que *C. canjerana* apresenta compostos de ação similar aos descritos para outras meliáceas, particularmente o nim (Mordue (Luntz) & Nisbet 2000; Mordue (Luntz) *et al.*, 2005). Uma vez que os efeitos correspondem a

alterações fisiológicas dos insetos, resultantes da interferência entre o crescimento e o processos de ecdise, devido a uma interrupção na síntese e liberação de ecdisteróides (hormônio de muda) e também de outras classes de hormônios.

A presença de triterpenóides e limonóides nos extratos de frutos e sementes em acetato de etila vem a comprovar os efeitos obtidos sobre ambos os insetos, e era esperada em função de *C. canjerana* pertencer a família Meliaceae, onde já há o registro destes compostos para diversos dos seus representantes (Simões *et al.*, 2007; Regnault-Roger *et al.*, 2004) incluindo o gênero *Cabrlea* onde destaca-se a presença de triterpenos dammaranos nos ramos e hastes (Braga *et al.*, 2006) e nos frutos e sementes (Sarria *et al.*, 2011).

A ocorrência de compostos com propriedades inseticidas nos extratos de *C. canjerana* indica sua potencialidade de uso no Manejo Integrado de Pragas tanto para *S. frugiperda* quanto para *A. fraterculus*.

## 7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados da avaliação da atividade biológica de extratos de frutos e sementes em acetato de etila e etanol e frações de *C. canjerana* sobre a mosca-das-frutas sul-americana *A. fraterculus* e a lagarta-do-cartucho *S. frugiperda*, conclui-se que:

- Os extratos de frutos e sementes obtidos com acetato de etila apresentaram deterrência à alimentação para adultos de *A. fraterculus* e para larvas de *S. frugiperda*, respectivamente.
- O extrato de fruto obtido com acetato de etila apresentou maior toxicidade para adultos de *A. fraterculus*, enquanto que os extratos de sementes obtidos com acetato de etila e etanol foram mais tóxicos para larvas de *S. frugiperda*.
- Todos os extratos de *C. canjerana* provocaram deterrência à oviposição para adultos de *A. fraterculus*.
- Todos os extratos de *C. canjerana* induziram diversas anormalidades em imaturos e adultos de ambos os insetos.
- Entre os extratos de *C. canjerana* testados, os mais promissores a serem utilizados no controle de *A. fraterculus* e *S. frugiperda* foram os extraídos com acetato de etila.
- O estudo fitoquímico indicou que o extrato obtido por maceração com acetato de etila de semente de *C. canjerana* apresentou compostos bioativos, particularmente triterpenóides.
- O principal composto isolado da fração 3 mais ativa (composto 1) corresponde à um triterpeno damarano denominado 3-keto-21,24-epoxi-dammarane-7,15,25-triol.
- O extrato de semente em acetato de etila na concentração de 2000mg/Kg não apresentou toxicidade à ratos durante os 14 dias de observação. A DL<sub>50</sub> estimada para este produto encontra-se entre 500 e 5000 mg/Kg, sendo classificado na Categoria III de Toxicidade de acordo com a OECD 425.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aerts, R.J.; A. Mordue (Luntz), J. (1997). Feeding Deterrence and Toxicity of Neem Triterpenoids. **Journal of Chemical Ecology**. 23: 2117-2132.

Akhtar, Y.Y.; Yeoung, R.; Isman, M.B. (2008). Comparative bioactivity of selected extracts from Meliaceae and some commercial botanical insecticides against two noctuid caterpillars, *Trichoplusia ni* and *Pseudaletia unipuncta* . **Phytochemistry Reviews**. 7: 77-88.

Bogorni, P.C.; Vendramim, J.D. (2003). Bioatividade de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **Neotropical Entomology**.. 32: 665-669.

Braga, P.A.C.; Soares, M.S.; Silva, F.M.G.F.; Vieira, P.C.; Fernandes, J.B.; Pinheiro, A.L. (2006) Dammarane triterpenes from *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae): Their chemosystematic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**. 34:282-290.

Ma, D-L.; Gordh, G.; Zalucki, M.P. (2000). Biological effects of azadirachtin on *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed on cotton and artificial diet. **Australian Journal of Entomology**. 39: 301-304.

Matos, A.P.; Nebo, L.; Calegari, E.R.; Batista-Pereira, L.G.; Vieira, P.C.; Fernandes, JB.; Silva, M. F.G.F.; Ferreira Filho, P.; Rodrigues, R.R. (2006). Atividade biológica de extratos orgânicos de *Trichilia* spp. (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae) em dieta artificial. **Bioassay**. 1:1-6.

- Mordue (Luntz), J.A.; Nisbet, A.J. (2000). Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. 29: 615-632.
- Mordue (Luntz) A.J.; Morgan, E.D.; Nisbet, A.J. (2005). Azadirachtin, a natural product in insect control. In: GILBERT L.I; IATROU K.; GILL S.S. (Ed.), **Comprehensive molecular insect science**. Oxford: Elsevier. p.117-135.
- Pavela, R. (2009). Effectiveness of some botanical insecticides against *Spodoptera littoralis* Boisduvala (Lepidoptera: Noctuidae), *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) and *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Plant Protection Science**. 45:161-167.
- Regnault-Roger, C.; Philogène, B.J.R.; Vincent, C. (2004). **Biopesticidas de origen vegetal**. Madrid, Barcelona e México: Edição Mundi-Prensa. 337p.
- Roel, A.R.; Vendramim, 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**. 36:1049-1054.
- Sarria, A.L.; Soares, M.S.; Matos, A.P.; Fernandes, J.B.; Vieira, P.C.; Silva, M.F.G. F. (2011). . Effect of triterpenoids and limonoids isolated from *Cabralea canjerana* and *Carapa guianensis* (Meliaceae) against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Z. Naturforsch.** 66: 245-250.
- Schmutterer, H. (1990). Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review Entomology**. 35: 271–297.

Silva, M.A.; Alvarenga, C.D.; Bezerra-Silva, G.C.D.; Mastrangelo, T.; Lopes-Mielezrski, G.N.; Giustolin, T. (2011). Toxic effects of neem seed cake on the larval-pupal (prepupal) stage of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Fruits**. 66: 363-369.

Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (2007). **Farmagnosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC. 1104 p.

Singh, S. (2003). Effects of aqueous extract of neem seed kernel and azadirachtin on the fecundity, fertility and post-embryonic development of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* and the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Applied Entomology**. 127: 540–547.

Wheeler, D.A.; Isman, M.B. (2001). Antifeedant and toxic activity of *Trichilia americana* extract against the larvae of *Spodoptera litura*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. 98:9-16.