

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PESQUISA E PÓS-  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE TIMBÓ (*Derris scandens* Aubl. e *Deguelia floribundus* Benth) SOBRE *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae) E *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).

MARCIO RODRIGO ALECIO

MANAUS  
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PESQUISA E PÓS-  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MARCIO RODRIGO ALECIO

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE TIMBÓ (*Derris scandens* Aubl. e *Deguelia floribundus* Benth) SOBRE *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae) E *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pesquisa e Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Conservação e Uso de Recursos Genéticos Vegetais da Amazônia.

Orientador: D.Sc. MURILO FAZOLIN

Co-orientador: D.Sc. VALDIR FLORÊNCIO DA VEIGA JÚNIOR

MANAUS  
2012

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Alecio, Marcio Rodrigo

A366a      Atividade biológica de extratos de timbó (*Derris scandens* Aubl. e *Deguelia floribundus* Benth) sobre *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae) e *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) / Marcio Rodrigo Alecio. - Manaus: UFAM, 2012.  
206 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2012.  
Orientador: D.Sc. Murilo Fazolin  
Co-orientador: D.Sc. Valdir Florêncio da Veiga Júnior

1. Inseticida natural 2. Controle de pragas 3. Toxicidade 4. Rotenona 5. Deguelina I. Fazolin, Murilo (Orient.) II. Veiga Júnior, Valdir Florêncio da (Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 582.772.4(043.2)

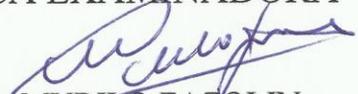
MARCIO RODRIGO ALECIO

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE TIMBÓ (*Derris scandens* Aubl. e *Deguelia floribundus* Benth) SOBRE *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae) E *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).

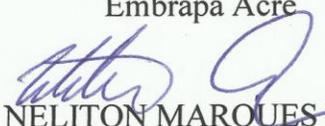
Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pesquisa e Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Conservação e Uso de Recursos Genéticos Vegetais da Amazônia.

Aprovada em 29 de agosto de 2012.

BANCA EXAMINADORA



D.Sc. MURILO FAZOLIN  
Embrapa Acre



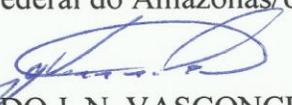
D.Sc. NELITON MARQUES DA SILVA  
Universidade Federal do Amazonas/UFAM



D.Sc. BEATRIZ RONCHI TELES  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA



D.Sc. MARCIA REIS PENA  
Universidade Federal do Amazonas/UFAM



D.Sc. GERALDO J. N. VASCONCELOS  
Universidade Federal do Amazonas/UFAM

## DEDICO

A minha nona (avó) Albina Garmus Alecio (*in memoriam*),  
aos meus Pais (Sergio Alecio e Izabel Alecio) e  
ao meu filho (João Victor Barros Alecio)

## AGRADEÇO

A Deus, ser superior que intervém por nós, dando-nos força e segurança para prosseguir a vida.

A Universidade Federal do Amazonas e a Embrapa Acre pela oportunidade de desenvolver este estudo.

Aos Coordenadores do Curso de Biotecnologia (Spartacco Astolfi, José Odair e Edmar Andrade) pelo esforço e brilhante condução desta Pós-Graduação.

Aos docentes que foram responsáveis pelos preciosos conhecimentos adquiridos.

Ao mestre e orientador Dr. Murilo Fazolin pelos ensinamentos, amizade, conselhos, críticas, correções e sugestões essenciais para realização deste trabalho, bem como pelos 12 anos de orientação e de conhecimentos repassados. Sempre serei muito grato por tudo o que o senhor fez por mim. Muito obrigado meu pai da pesquisa.

Ao mestre e co-orientador Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior pelos ensinamentos, críticas, correções e sugestões essenciais para o redirecionamento e conclusão deste estudo.

A Joelma Lima Vidal Estrela pela amizade e valiosa colaboração ao longo do desenvolvimento dos experimentos e conclusão da Tese.

A banca examinadora pelas valiosas contribuições e sugestões oferecidas.

A todos meus familiares, em especial aos meus pais (Sergio e Izabel), irmãos (Jean e Renata), Tia Nega e Nona (*in memorian*) pela compreensão, incentivo, carinho e por sempre terem contribuído para as minhas conquistas, compartilhando de meus planos, tornando seus os meus ideais. Sem vocês eu não chegaria até aqui.

A Suziane B. Alves pelo apoio, ajuda, atenção, amor, compreensão e sugestões oferecidas.

Ao meu filho (João Victor B. Alécio) que com sua inocência recarrega diariamente minhas energias.

Aos meus sobrinhos (Guilherme e Jean Gabriel) que chegaram trazendo mais alegria para a nossa família.

Aos meus sogros (Inês e Melque) pelo apoio e ajuda disponibilizada para o desenvolvimento deste estudo, especialmente a Senhora Inês, que muitas vezes abriu mão de seus afazeres e adiou seus compromissos para nos auxiliar nesta jornada.

Aos amigos e amigas do curso de doutorado, da Ufam e de Manaus, em especial a Darcilene, Adriana, Marcia, Raquel, Raimundo Júnior e Francis pelo acolhimento, amizade, companheirismo e contribuições.

Aos amigos e amigas do Laboratório de Entomologia da Embrapa Acre: Tiboca, Pedro, Gildo, Ana Suzette, Janaina, Elizângela, André, Francisca, Luiara e Aninha pela amizade, companheirismo e ajuda oferecida ao longo dos experimentos.

Aos meus grandes amigos Robson de Oliveira Galvão e Romeu de Carvalho Andrade Neto que muito contribuíram para a realização deste trabalho, auxiliando na realização dos bioensaios, mesmo nos finais de semana, compartilhando dúvidas, oferecendo ajuda e sugestões.

Ao amigo e Ex. Superintendente do Incra Carlos Augusto Lima Paz (Cardoso) pela amizade, incentivo, apoio, compreensão, sugestões e liberação para a realização desta Tese.

Aos amigos João Thaumaturgo Neto (Superintendente do Incra) e João Ricardo de Oliveira (Chefe da Divisão de Desenvolvimento) pela amizade, apoio, compreensão, incentivo e liberação para conclusão da Tese.

Ao amigo Joaquim dos Santos Neto pela fundamental ajuda durante as coletas dos timbós nos municípios de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima, Rodrigues Alves e Guajará.

Aos amigos e amigas de Rio Branco: Helen, Mídia, Edini, Leonardo, Tadeu, Glorinha, Claudia, Cristina Fernandes, Hildebrando, Socorro, Ionara, Letícia, John Lennon, Elízio, Vlayrton, Geiza, Eduardo Pacca, Joaquim, Vlayrton e Kosme pelo apoio e incentivo.

A Dr<sup>a</sup> Giselle Mariano Lessa de Assis pela essencial contribuição durante as análises estatísticas para definição dos grupos de plantas estudados.

Ao Dr. Jacson Rondinelli da Silva Negreiros pela disponibilidade de laboratório e reagentes e pelo incentivo para conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Flavio Pimentel e Inayara pelo auxílio para a definição da metodologia de obtenção dos extratos e realização de análises químicas.

A Priscilla Oliveira pela realização dos fracionamentos dos extratos e análises químicas, correções e sugestões.

Aos professores da UFAC D.Sc. Sebastião Elviro de Araújo e D.Sc. Josué Bispo pelas contribuições, sugestões e oportunidade para a realização do estágio de docência.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro para realização da Tese de Doutorado.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para realização deste estudo, o meu muito obrigado.

## RESUMO

A abundância, o potencial inseticida e indícios de sinergismo entre os constituintes majoritários de extratos de timbó (*Derris* e *Deguelia*) e a necessidade de controle de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae) e de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) estimularam a realização desta pesquisa, que objetivou avaliar os efeitos biológicos de extratos de timbó e de suas frações comparados à rotenona purificada, isoladamente e combinados em diferentes concentrações, sobre adultos de *C. tingomarianus* e de lagartas de *S. frugiperda*. Foram coletadas amostras de raízes de plantas de timbó nos estados do Acre e do Amazonas e obtidos extratos a quente utilizando clorofórmio como solvente. Os extratos das plantas de timbó foram agrupados em seis grupos distintos e os bioensaios foram desenvolvidos pelas vias de intoxicação de contato tóxico, de contato por superfície contaminada e por ingestão alimentar, com delineamento experimental inteiramente casualizado. Os valores de mortalidade das duas espécies de insetos foram submetidos à análise de Probit para determinação das  $CL_{50}$ ,  $DL_{50}$  e  $TL_{50}$ . As demais variáveis foram submetidas à análise de variância, quando possível, utilizando-se o teste de Scott-Knott ( $P > 0,05$ ) para agrupamento das médias dos tratamentos. A intoxicação por ingestão alimentar é a via de contato mais efetiva para adultos de *C. tingomarianus* e lagartas de *S. frugiperda*. A toxicidade dos timbós é variável e está relacionada à composição química dos extratos, a forma de exposição e a espécie de inseto alvo. A rotenona utilizada isoladamente não foi tóxica para adultos de *C. tingomarianus* e apresentou baixa toxicidade para lagartas de *S. frugiperda*, potencializando seus efeitos biológicos sobre as lagartas quando associada com as frações dos extratos de timbó contendo deguelina e os constituintes A e B. A toxicidade dos extratos de timbó para adultos de *C. tingomarianus* pode estar relacionada à atuação conjunta de diversos constituintes. Extratos com elevados teores de rotenona e deguelina são indicadores de toxicidade para lagartas de *S. frugiperda*. A associação do constituinte A com o constituinte B provavelmente provoca mortalidades na fase pré-pupa e o peso de pupa de *S. frugiperda* pode ser reduzido pela atuação conjunta de vários constituintes dos extratos de timbó. O constituinte A pode atuar como antagonista de mortalidade de lagartas, provocar deformações e afetar a viabilidade de adultos de *S. frugiperda*. Os extratos de timbó G1 e G3 apresentam a maior toxicidade para os insetos e podem ser considerados como os mais promissores para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos para o controle de adultos de *C. tingomarianus* e de lagartas de *S. frugiperda*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Inseticida natural, controle de pragas, toxicidade, rotenona, deguelina.

## ABSTRACT

The abundance, potential insecticide and evidence of synergism among the major constituents of timbo extracts (*Derris and Deguelia*) and the need to control of *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae) and *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) stimulated the realization of this study, which aimed to evaluate the biological effects of timbo extracts and its purified fractions compared to rotenone, as well as combined in different concentrations, on adults of *C. tingomarianus* and *S. frugiperda* larvae. Samples timbo roots were collected of plants in the Acre and Amazonas states, and obtained extracts by hot extraction of dry material method. The timbo extracts were grouped into six distinct groups and the bioassays were carried out by means of topical contact, contact by contaminated surface (filter-paper) and intake of contaminated diet in a completely randomized design. The mortality values of two insect species were submitted to Probit analysis to determine the LC<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub> and LT<sub>50</sub>. The other variables were subjected to variance analysis, when possible, using the Scott-Knott test ( $P > 0.05$ ) for grouping treatment means. The intoxication by intake of contaminated diet/leaves is the most effective mean of contact for adults of *C. tingomarianus* and *S. frugiperda* larvae. The toxicity of timbo species extracts is variable and is related to the chemical composition of the extracts, as well as at form of exposure and the target insect species. Rotenone alone was not toxic to adult *C. tingomarianus* and showed low toxicity to *S. frugiperda* larvae, enhancing their biological effects on the insects/larvae when associated with the fractions containing timbo extracts, constituent A, constituent B and deguelin. The toxicity of timbo extracts for *C. tingomarianus* adult may be related to the combined action of several constituents. Extracts containing high levels of rotenone and deguelin are indicators of toxicity to *S. frugiperda* larvae. The association the constituent A with constituent B probably causes mortalities in the pre-pupal and pupal weight of *S. frugiperda*. The extract of timbo G1 and G3 showed the highest toxicity to insects and can be considered as the most promising for the development of biotechnology products for the control of *C. tingomarianus* adults and *S. frugiperda* larvae.

**Key Words:** Natural pest control, toxicity, rotenone, deguelin.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Plantas de timbó coletadas em diversas localidades dos Estados do Acre e do Amazonas. *Deguelia floribundus* (A e B) e *Derris scandes* (C, D e E).....28
- Figura 2 – Rotenóides que podem ser encontrados em raízes de timbó (*Derris* e *Deguelia*).....39
- Figura 3 – Adulto de vaquinha-do-feijoeiro *C. tingomarianus* (A); larva de vaquinha-feijoeiro (B) e sistema radicular do feijão atacado por larvas de vaquinhas (C).....49
- Figura 4 – Sintomas do mosaico severo transmitido por larvas e adultos de vaquinhas às partes vegetativas aéreas de plantas de feijoeiro.....51
- Figura 5 – Danos provocados pela vaquinha-do-feijoeiro logo após a emissão dos primeiros folíolos em plantas de feijoeiro (A); folhas (B e C) e órgãos tenros reprodutivos (D).....52
- Figura 6 – Lagartas-do-cartucho do milho *S. frugiperda* (A), danos causados pelas lagartas nas folhas (B e C) e nas espigas de milho (D) e insetos adultos (E).....55
- Figura 7 – Raízes de timbó coletadas no Estado do Acre.....68
- Figura 8 – Locais de coleta das amostras de raízes e estacas de timbó nos Estados do Acre e Amazonas.....69
- Figura 9 – Estacas de timbó plantadas em vasos contendo solo rico em matéria orgânica (A e B) e coleção de trabalho implantada no campo experimental da Embrapa Acre (C e D)....70
- Figura 10 – Raízes dos timbós depositadas em bandejas plásticas (A) e processo de secagem em estufa com circulação de ar forçado (B).....71
- Figura 11 – Cromatogramas de extratos de raízes de timbó coletados nos Estados do Acre (A) e do Amazonas (B).....77
- Figura 12 – Dispersão gráfica dos escores da variável canônica relativo aos grupos estabelecidos pelo método de agrupamento de Tocher.....79
- Figura 13 – Impregnação de papel-filtro em diferentes concentrações de extratos de timbó e de rotenona (A) e placas de Petri com dez vaquinhas adultas (B).....81

Figura 14 – Imobilização dos insetos por congelamento em freezer (A); aplicação tópica dos produtos na face ventral dos indivíduos (B) e placa de Petri com folha de feijão e dez adultos de <i>C. tingomarianus</i> (C).....	82
Figura 15 – Etapas do processamento de imagens para o cálculo do consumo foliar de adultos de <i>C. tingomarianus</i> em folhas feijão (Cultivar Perola) no Programa Quant 1.0. Folha escaneada com resolução de 300 dpi (A), substituição de cores (B), filtro mediana (C), redução de cores (D) e resultado do processamento (E).....	83
Figura 16 – Folhas de feijão mergulhadas nas diferentes concentrações dos produtos (A), depositadas sobre papel toalha para eliminação do solvente (B), transferidas para placa gerbox e infestadas com cinco insetos adultos (C) e mantidas em câmara climatizada (D).....	84
Figura 17 – Copos plásticos descartáveis contendo ovos, lagartas e um pedaço de dieta de 4 cm <sup>3</sup> para alimentação dos insetos (A), lagartas distribuídas em copos plásticos descartáveis acondicionados em armários em ambiente climatizado (B), adultos de <i>S. frugiperda</i> sexados e distribuídos aos pares em gaiolas de PVC para realização de posturas de ovos em cones de papel (C) preparo de dieta para lagartas de <i>S. frugiperda</i> (D e E).....	113
Figura 18 – Frações obtidas do extrato de <i>D. floribundus</i> do Grupo 2 – G2 (AM04MAO).....	115
Figura 19 – Frações obtidas do extrato de <i>D. scandens</i> do Grupo 3 – G3 (AM21ML).....	116
Figura 20 – Frações obtidas do extrato de <i>D. scandens</i> do Grupo 5 – G5 (AM24GUA).....	116
Figura 21 – Cromatogramas das frações de extratos de timbó analisadas por Cromatografia em fase Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de Massa (EM).....	118
Figura 22 – Espectro de massa da fração do extrato de timbó G3F6sob.....	119
Figura 23 – Espectro de massa da fração do extrato de timbó G3F6sol.....	120
Figura 24 – Espectro de massa da fração do extrato de timbó G5F6.....	121
Figura 25 – Espectro de massa da fração do extrato de timbó G5F7.....	122
Figura 26 – Proposta de fragmentação de massa para o constituinte B.....	123
Figura 27 – Proposta de fragmentação de massa do constituinte A.....	123

Figura 28 – Proposta de fragmentação de massa para rotenona e deguelina.....	124
Figura 29 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H para a fração do extrato de timbó G5F7.....	125
Figura 30 – Bioensaios desenvolvidos com lagartas de <i>S. frugiperda</i> por superfície contaminada. Discos de papel-filtro impregnados com 0,2 mL dos produtos (A) e placas de petri infestadas com uma lagarta aproximadamente de 3° instar (B).....	127
Figura 31 – Bioensaio desenvolvido com lagartas de <i>S. frugiperda</i> por contato tópico, mantendo apenas uma lagarta aproximadamente de 3° instar por placa de Petri.....	128
Figura 32 – Dieta alimentícia de lagartas de <i>S. frugiperda</i> depositada em Becker para adição de 1 mL das diferentes concentrações dos produtos (A), caixa tipo gerbox contendo dieta contaminada com as diferentes concentrações dos produtos testados (B) e copos descartáveis de 50 mL contendo a dieta contaminada e uma lagarta de <i>S. frugiperda</i> (C).....	129
Figura 33 – Lagartas de <i>S. frugiperda</i> submetidas ao extrato de timbó G3 (AM21ML) por ingestão de dieta contaminada apresentando sintomas de redução da alimentação, retardo do crescimento e prologamento de ecdises (A e B) e deformações (C)....	139
Figura 34 – Lagartas de <i>S. frugiperda</i> 10 dias após o início dos bioensaios por ingestão de dieta contaminada com extratos de timbó G1 (AM26GUA), G2 (AM04MAO), G3 (AM21ML), G4 (AM22CZS), G5 (AM24GUA) e G6 (AM02ML e AM25GUA) e com a rotenona purificada.....	162
Figura 35 – Pré-pupas mortas de <i>S. frugiperda</i> produzidas pelos extratos e frações de timbó....	164
Figura 36 – Pupas de <i>S. frugiperda</i> viáveis (A) e não viáveis (B).....	178
Figura 37 – Adultos de <i>S. frugiperda</i> com deformações, apresentando asas e pernas atrofiadas e dificuldade para se desvencilharem dos casulos.....	179

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Rendimentos e teores de rotenona de extratos brutos de raízes de timbó obtidos por extração à frio (maceração), a quente e ultrasom.....	73
Tabela 2 – Rendimento de extratos e teores dos constituintes majoritários em relação à massa seca de raízes de timbó utilizadas.....	75
Tabela 3 – Quantificação dos constituintes majoritários de extratos de raízes de timbó coletadas nos Estados do Acre e Amazonas.....	76
Tabela 4 – Grupos de plantas de timbó coletadas nos Estados do Acre e Amazonas selecionados para obtenção dos extratos e realização dos bioensaios sobre lagartas de <i>S. frugiperda</i> e adultos de <i>C. tingomarianus</i> por ingestão alimentar, contato tópico e contato em superfície contaminada.....	78
Tabela 5 – Concentrações de extratos de raízes de timbó e de rotenona determinadas para realização dos bioensaios por contato tópico e por ingestão de folhas contaminadas.....	86
Tabela 6 – Mortalidade de adultos de <i>C. tingomarianus</i> submetidos aos extratos de raízes dos seis grupos de timbó e à rotenona purificada por contato tópico.....	88
Tabela 7 – Mortalidade de adultos de <i>C. tingomarianus</i> submetidos aos extratos de raízes dos seis grupos de timbó e à rotenona purificada por ingestão de folhas contaminadas.....	89
Tabela 8 – Concentração Letal (CL <sub>50</sub> ) do extrato bruto de <i>D. scandens</i> integrante do Grupo 1 (G1) à adultos de <i>C. tingomarianus</i> por ingestão de folhas contaminadas.....	91
Tabela 9 – Tempo Letal (TL <sub>50</sub> ) do extrato bruto de <i>D. scandens</i> integrante do Grupo 1(G1) à adultos de <i>C. tingomarianus</i> por ingestão de folhas contaminadas.....	91
Tabela 10 – Quantificação dos constituintes majoritários de extratos de raízes de timbó coletadas nos Estados do Acre e Amazonas.....	97
Tabela 11 – Consumo foliar de adultos de <i>C. tingomarianus</i> submetidos aos extratos de raízes de seis grupos de timbó e à rotenona purificada por contato tópico.....	100

Tabela 12 – Consumo foliar de adultos de <i>C. tingomarianus</i> submetidos aos extratos de raízes de seis grupos de timbó e à rotenona purificada por ingestão de folhas contaminadas.....	101
Tabela 13 – Resultados experimentais de RMN de <sup>1</sup> H (δ em ppm, CDCl <sub>3</sub> , 500MHz) para a rotenona e deguelina.....	125
Tabela 14 – Concentrações de extratos de raízes de timbó e de rotenona purificada utilizadas para realização dos bioensaios por contato tópico e ingestão de dieta contaminada sobre lagartas de <i>S. frugiperda</i> .....	131
Tabela 15 – Frações dos extratos de raízes de timbó avaliadas por ingestão de dieta contaminada sobre lagartas de <i>S. frugiperda</i> .....	131
Tabela 16 – Combinação de concentrações entre frações do extrato de timbó do Grupo 3 (G3) (AM21ML) e com a rotenona purificada sobre lagartas de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada.....	132
Tabela 17 – Combinação de concentrações entre frações do extrato de timbó do Grupo 5 (G5) (AM24GUA) e com rotenona purificada sobre lagartas de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada.....	133
Tabela 18 – Mortalidade de lagartas de <i>S. frugiperda</i> avaliadas por contato tópico com os extratos dos seis grupos de timbó ( <i>D. scandens</i> e <i>D. floribundus</i> ) e com rotenona purificada.....	136
Tabela 19 – Mortalidade de lagartas de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada com os extratos dos seis grupos de timbó ( <i>D. scandens</i> e <i>D. floribundus</i> ) e com a rotenona purificada.....	138
Tabela 20 – Mortalidade de lagartas de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada com frações de extratos de timbó dos grupos G2, G3 e G5.....	141
Tabela 21 – Mortalidade de lagartas de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada com frações de extrato de timbó do Grupo 3 – G3 (AM21ML) avaliadas de forma isolada e combinadas com outras frações deste extrato e com a rotenona purificada.....	143

Tabela 22 – Mortalidade de lagartas de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada com frações do extrato de timbó integrante do Grupo 5 – G5 (AM24GUA) avaliadas de forma isolada e combinadas com outras frações e com a rotenona purificada.....	145
Tabela 23 – Concentração (CL <sub>50</sub> ) e dose (DL <sub>50</sub> ) letal e Razão de Toxicidade (RT <sub>50</sub> ) de extratos e frações de timbó para lagartas de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada.....	147
Tabela 24 – Tempo letal (TL <sub>50</sub> ) e Razão de Toxicidade (RT <sub>50</sub> ) dos extratos, frações e combinações de frações de timbó com a rotenona purificada sobre lagartas de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada.....	148
Tabela 25 – Razão de Toxicidade (RT <sub>50</sub> ) entre os Tempos Letais (TL <sub>50</sub> ) de diferentes concentrações e grupos de extratos de timbó comparados às frações isoladas e combinadas de extratos e associadas com a rotenona purificada.....	150
Tabela 26 – Razão de Toxicidade (RT <sub>50</sub> ) entre os Tempos Letais (TL <sub>50</sub> ) de diferentes concentrações e grupos de extratos de timbó comparados às frações de extratos isoladas e combinadas de extratos e associadas com a rotenona purificada.....	151
Tabela 27 – Duração do período larval (dias) de lagartas de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada com os extratos de raízes de seis grupos de timbó ( <i>D. scandens</i> e <i>D. floribundus</i> ) e com a rotenona purificada.....	153
Tabela 28 – Duração do período larval (dias) de lagartas de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada com frações de extratos de raízes de timbó ( <i>D. scandens</i> e <i>D. floribundus</i> ).....	156
Tabela 29 – Duração do período larval de lagartas de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada com frações do extrato de timbó do Grupo 3 – G3 (AM21ML) avaliadas de forma isolada e combinadas com outras frações deste extrato e com a rotenona purificada.....	157
Tabela 30 – Duração do período larval (dias) de lagartas de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada com frações do extrato de timbó do Grupo 5 – G5 (AM24GUA) avaliadas de forma isolada e combinadas com outras frações de timbó e com a rotenona purificada.....	159

Tabela 31 – Peso de pupas (g) de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada com extratos de raízes de timbó de seis grupos ( <i>D. scandens</i> e <i>D. floribundus</i> ) e com rotenona purificada.....	167
Tabela 32 – Peso de pupas (g) de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada com frações de extratos de raízes de timbó dos grupos G2, G3 e G5.....	167
Tabela 33 – Peso de pupas (g) de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada com frações do extrato de timbó do Grupo 3 – G3 (AM21ML) avaliadas de forma isolada e combinadas com outras frações e com a rotenona purificada.....	168
Tabela 34 – Peso de pupas (g) de lagartas de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada com frações do extrato de timbó do Grupo 5 – G5 (AM24GUA) avaliadas de forma isolada e combinadas com outras frações e com a rotenona purificada.....	170
Tabela 35 – Mortalidade de pupas de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada com diferentes extratos de raízes de timbó ( <i>D. scandens</i> e <i>D. floribundus</i> ) e com rotenona purificada, proporcional à quantidade de lagartas que atingiram a fase de pupa.....	173
Tabela 36 – Mortalidade de pupas de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada com diferentes frações de extratos de raízes de timbó ( <i>D. scandens</i> e <i>D. floribundus</i> ) proporcional a quantidade de lagartas que atingiram a fase de pupa.....	173
Tabela 37 – Mortalidade de pupas de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada com frações do extrato de timbó do Grupo 3 – G3 (AM21ML) avaliadas de forma isolada e combinadas com outras frações e com a rotenona purificada proporcional a quantidade de lagartas que atingiram a fase de pupa.....	174
Tabela 38 – Mortalidade de pupas de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada com frações do extrato de timbó do Grupo 5 – G5 (AM24GUA) avaliadas de forma isolada e combinadas com outras frações e com a rotenona purificada proporcional a quantidade de lagartas que atingiram a fase de pupa.....	176
Tabela 39 – Constituintes de frações de extratos de timbó identificados por Cromatografia em fase Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de Massa (EM).....	180

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	21
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 Geral.....	25
2.2 Específicos.....	25
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	26
3.1 Histórico do uso de plantas inseticidas.....	26
3.2 Os timbós.....	27
3.2.1 Princípios ativos dos timbós.....	38
3.3 Vaquinha-do-feijoeiro ( <i>Cerotoma tingomarianus</i> Bechyné).....	48
3.4 Lagarta-do-cartucho do milho ( <i>Spodoptera frugiperda</i> Smith).....	54
4. CAPÍTULO 1.....	63
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE TIMBÓ ( <i>Derris scandes</i> Aubl. e <i>Deguelia floribundus</i> Benth.) EM ADULTOS DE <i>Cerotoma tingomarianus</i> Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae).....	63
RESUMO.....	64
ABSTRACT.....	65
4.1 INTRODUÇÃO.....	66
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	68
4.2.1 Coleta e processamento de raízes e estacas de timbó.....	68
4.2.2 Obtenção dos extratos brutos de timbó.....	71
4.2.3 Quantificação dos constituintes majoritários dos extratos brutos de timbó e seleção de plantas para os bioensaios.....	73

4.2.4 Desenvolvimento dos bioensaios.....	79
4.2.4.1 Contato em superfície contaminada (papel-filtro).....	80
4.2.4.2 Contato tópico.....	81
4.2.4.3 Ingestão de folhas contaminadas.....	83
4.2.4.4 Determinação das concentrações dos produtos utilizadas nos bioensaios.....	85
4.2.4.5 Análise dos dados.....	86
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
4.3.1 Efeitos dos extratos de timbó comparados à rotenona purificada sobre a mortalidade de adultos de <i>C. tingomarianus</i> .....	87
4.3.2 Efeito dos extratos de timbó comparados à rotenona purificada sobre o consumo foliar de adultos de <i>C. tingomarianus</i> por contato tópico e ingestão de folhas contaminadas.....	98
4.4 CONCLUSÃO.....	106
5. CAPÍTULO 2.....	107
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE TIMBÓ ( <i>Derris scandens</i> Aubl. e <i>Deguelia floribundus</i> Benth.) SOBRE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).....	107
RESUMO.....	108
ABSTRACT.....	109
5.1 INTRODUÇÃO.....	110
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	112
5.2.1 Criação de <i>S. frugiperda</i> em condições de laboratório.....	112
5.2.2 Fracionamento dos extratos de timbó.....	114
5.2.3 Identificação dos constituintes das frações dos extratos de timbó por Cromatografia Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de Massa (EM).....	117

5.2.4	Identificação dos constituintes das frações dos extratos de timbó por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	124
5.2.5	Desenvolvimento dos bioensaios.....	126
5.2.5.1	Contato em superfície contaminada (papel-filtro).....	127
5.2.5.2	Contato tópico.....	128
5.2.5.3	Ingestão de dieta contaminada.....	128
5.2.5.4	Determinação das concentrações dos produtos utilizadas nos bioensaios.....	130
5.2.6	Análise dos dados.....	133
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	135
5.3.1	Efeito de extratos e frações de timbó e da rotenona purificada sobre a mortalidade de lagartas de <i>S. frugiperda</i> por contato tópico e por ingestão de dieta contaminada.....	135
5.3.2	Efeito de extratos e frações de timbó e da rotenona purificada sobre a duração do período larval de lagartas de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada.....	152
5.3.3	Efeito de extratos e frações de timbó e da rotenona purificada sobre a fase de pré-pupa e pupa de lagartas de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada.....	163
5.3.4	Efeitos biológicos de constituintes majoritários de extratos de timbó sobre lagartas de <i>S. frugiperda</i> por ingestão de dieta contaminada.....	179
5.4	CONCLUSÃO.....	182
6.	CONCLUSÕES FINAIS.....	184
7.	REFERÊNCIAS.....	186

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e de milho (*Zea mays* L.), culturas de grande importância econômica e social (FAO, 2010; MAPA, 2010; CONAB, 2012; IBGE, 2012) e que são constantemente atacadas por diversas pragas, o que resulta em grandes perdas de produção (GALLO et al., 2002).

A vaquinha-do-feijoeiro *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae) é citada entre as pragas de maior importância para o feijão-comum (GALLO et al., 2002; FAZOLIN e ESTRELA, 2004; TEIXEIRA et al., 2007). Já a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada a principal praga do milho no Brasil (CRUZ et al., 1999; SARMENTO et al., 2002; WAQUIL et al., 2008).

A utilização de inseticidas convencionais ainda é a principal tática utilizada no manejo integrado de insetos-praga (BUSATO et al., 2006) e pode acarretar diversos problemas, tais como: elevação dos custos de produção, contaminação ambiental, desequilíbrio biológico, redução de inimigos naturais, altos níveis residuais em alimentos, intoxicações do produtor rural e do consumidor e seleção de populações de insetos resistentes (HENANDEZ e VENDRAMIM, 1996; ALTIERI et al., 2003; YU, 2006; YU e MCORD, 2007).

Face aos problemas causados pelos inseticidas sintéticos ao ambiente e ao homem, surgiu nas últimas décadas a percepção e a necessidade de se desenvolver tecnologias e produtos alternativos em relação aos métodos químicos convencionais para o controle de insetos-praga (VENDRAMIM, 1997; VIEGAS JÚNIOR, 2003).

Compostos oriundos do metabolismo secundário de plantas despontam como fontes potenciais para a produção de novos inseticidas (VILLALOBOS, 1996). A utilização de extratos,

óleos e pós de plantas popularmente conhecidas como inseticidas naturais se inserem nesse contexto e podem ser alternativas para o manejo de insetos-praga (GUERRA, 1985; SILVA et al., 2002; BOGORNIE e VENDRAMIM, 2003).

Os inseticidas naturais contam teoricamente com a vantagem de serem eficientes, seguros, de fácil obtenção e aplicação, menos agressivos ao ambiente, seletivos, biodegradáveis, com menor probabilidade de selecionarem espécies resistentes, viáveis economicamente e com aplicabilidade em programas de manejo integrado de pragas (OLIVEIRA e VENDRAMIM, 1999; BRITO et al., 2004; SOUSA et al., 2005), adequando-se aos anseios da sociedade moderna na busca por alimentos saudáveis (BALDIN et al., 2009).

O controle de pragas utilizando plantas com ação inseticida cada vez mais tem ganhado espaço e atenção dos diversos segmentos da ciência (MELO et al., 2011). Os efeitos dos inseticidas naturais sobre os insetos são variáveis, podendo ser tóxico, repelente, causar esterilidade e deformações, modificar o comportamento e o desenvolvimento ou reduzir a alimentação (ARNASON et al., 1990; GUSMÃO et al., 2002).

O Brasil é um país mega-biodiverso, possui um grande número de ecossistemas, de espécies que interagem dentro desses ecossistemas e de alelos que diferenciam os indivíduos em cada população de cada espécie (CLEMENT, 2001).

Neste contexto destaca-se a biodiversidade da floresta Amazônica, que apresenta elevado potencial para a produção de compostos secundários de plantas com ação inseticida (PLETSCH e SANT'ANA, 1995). Plantas conhecidas como timbós, pertencentes aos gêneros *Derris* e *Deguelia*, acumulam compostos secundários, sendo amplamente encontradas na região Amazônica (COSTA et al., 1986; LIMA, 1987; TOZZI, 1998). São tradicionalmente utilizadas

pelos índios em pescarias (MARINOS et al., 2004; KOTZE et al., 2006) e devido às suas toxicidades (LUITGARDS-MOURA et al., 2002; ALECIO et al., 2010; CORREA, 2011; PENA, 2012) tornam-se promissoras para o desenvolvimento de novos inseticidas.

Há distorções na literatura sobre a toxicidade causada pelos extratos de timbós. A rotenona, por ser um dos constituintes majoritários, é apontada como a principal substância tóxica presente nos extratos de timbó para insetos (MARINOS et al., 2004; AZEVEDO et al., 2007; LUCIO et al., 2011). Trata-se de um isoflavonóide cristalino, inodoro e insípido, biossintetizado pela via do metabolismo secundário e que aparece geralmente acompanhado de outros compostos flavonoídicos rotenóides, tais como, deguelina, tefrosina, toxicarol e 12a-hidroxirotenona (LIMA, 1987; LIMA e COSTA, 1998; JIANG et al., 2012).

Por outro lado, diversos trabalhos destacam que a rotenona apresenta baixa toxicidade quando utilizada isoladamente e que depende da associação de outros compostos para apresentar ação inseticida (LIMA, 1987; LIMA e COSTA, 1998; CORREA, 2011; PENA, 2012), ao mesmo tempo em que novos constituintes foram isolados a partir de extratos de timbós e apresentaram efeitos biológicos sobre artrópodes (LI et al., 2011; JIANG et al., 2012).

A ação inseticida isolada e combinada dos constituintes dos extratos de timbó e da rotenona purificada não foi estudada para adultos de *C. tingomarianus* e para lagartas de *S. frugiperda*. O conhecimento dessas interações é fundamental para o desenvolvimento de produtos inseticidas biotecnológicos a partir dos timbós, uma vez que diferentes combinações de constituintes podem atuar como sinergistas, potencializadores, neutros ou antagonistas quanto às suas toxicidades.

Os sinergistas são substâncias que em doses subletais aumentam a letalidade de inseticidas (BERNARD e PHILOGENE, 1993) e constituem importante ferramenta para determinar os mecanismos envolvidos na resistência de insetos a inseticidas (BECKEL et al., 2006). A ação do sinergista minimiza a quantidade de inseticida necessária para o controle de insetos, pois age como um substrato alternativo, inibindo a capacidade do inseto de destoxificar o produto (CASIDA, 1970), aumentando assim a letalidade dos mesmos nas populações resistentes (BRINDLEY e SELIM, 1990). Além disso, os sinergistas quando misturados com inseticidas podem minimizar a contaminação ambiental dos resíduos dos agrotóxicos persistentes e preservar insetos benéficos (RAFFA e PRIESTER, 1985).

Sendo assim, a abundância, o potencial inseticida e os indícios de atuação conjunta dos constituintes majoritários de extratos de timbó (*Derris* e *Deguelia*), aliada à importância econômica da vaquinha-do-feijoeiro e da lagarta-do-cartucho do milho, assim como à necessidade do desenvolvimento de produtos e métodos alternativos para o controle de insetos-praga, baseados em princípios biotecnológicos, estimularam a realização desta pesquisa.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar a atividade biológica de extratos de timbó (*Derris* e *Deguelia*) sobre a vaquinha-do-feijoeiro (*Cerotoma tingomarianus* Bechyné) e a lagarta-do-cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda* Smith).

### **2.2 Específicos**

Avaliar os efeitos dos extratos de timbó comparados à rotenona purificada sobre a mortalidade e o consumo foliar por adultos de *C. tingomarianus*;

Determinar as  $CL_{50}$ ,  $DL_{50}$  e  $TL_{50}$  de extratos de timbó comparados à rotenona purificada para adultos de *C. tingomarianus*;

Avaliar os efeitos dos extratos de timbó e suas frações em relação à rotenona purificada, de forma isolada e em diferentes combinações de concentrações, sobre a mortalidade de lagartas, duração dos períodos larval e pupal e peso e mortalidade de pupas de *S. frugiperda*;

Determinar as  $CL_{50}$ ,  $DL_{50}$ ,  $TL_{50}$  e  $RT_{50}$  de extratos e frações de timbó e da rotenona purificada sobre lagartas de *S. frugiperda*.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Histórico do uso de plantas inseticidas

O controle de pragas na agricultura vem sendo realizado com o uso de plantas inseticidas há vários séculos. Os primeiros inseticidas botânicos utilizados foram a nicotina extraída do fumo *Nicotiana tabacum* L, a piretrina extraída do piretro *Chrysanthemum cinerariifolium* Calli, a rotenona obtida de *Derris* spp. e *Deguelia* spp., a sabadina e outros alcaloides extraídos da sabadila *Schoenocaulon officinale* Lind e a rianodina obtida de *Rhynchospora* sp. (GALLO et al., 2002)

Durante os primeiros 50 anos do século XX predominaram, para o combate às pragas agrícolas, produtos inseticidas naturais de origem inorgânica e orgânica (MARICONI, 1963; VIEIRA e FERNANDES, 1999). Os inorgânicos mais utilizados foram os arseniatos de cálcio e chumbo (verde paris), cupratos (calda bordalesa), enxofre em pó, vários sulfatos, cal, fluorsilicato de bário, aminosselenossulfito de potássio (criolite) e óleos minerais. Destes, os arseniatos mostravam-se extremamente tóxicos ao homem, animais superiores e o ambiente (VIEIRA e FERNANDES, 1999).

Dentre os orgânicos de origem natural foram muito utilizados os alcalóides como a nicotina (MARICONI, 1963), nor-nicotina (MARICONI, 1981), os piretróides como a piretrina e a aletrina (VIEIRA e FERNANDES, 1999), os rotenóides, tendo a rotenona como principal exemplo (Corbett, 1940), e em menor escala alguns quassinóides como a quassina (KLOCKE et al., 1991).

Nas décadas de 50 a 70 ocorreu um grande avanço no desenvolvimento da síntese orgânica, inclusive de produtos com atividade inseticida, passando a ser utilizados o HCH (hexacloroetano), DDT, aldrin, dieldrin e clordano (VIEIRA e FERNANDES, 1999).

A partir da década de 60 a proteção ao ambiente começou a preocupar cientistas, usuários e consumidores. Assim, estudos sobre o processo de interação inseto-planta foram iniciados, buscando entender os mecanismos de adaptação na natureza (CAMPANHOLA, 1990). O efeito dessa filosofia refletiu nas décadas seguintes, quando novos produtos passaram a ser planejados e sintetizados, buscando maior seletividade a insetos alvo, preocupando-se em preservar os demais animais do mesmo habitat, incluindo predadores naturais de insetos indesejados (VIEIRA e FERNANDES, 1999).

A biodegradabilidade dos produtos passou a ser um requisito importante, até fundamental, nas novas avaliações e planejamento de agentes inseticidas (MARICONI, 1981). Com isso, devido à necessidade de se dispor de novos compostos para o efetivo controle de pragas sem os problemas de contaminação, as pesquisas com inseticidas botânicos voltaram a ser realizadas e passaram a adquirir grande importância nas últimas décadas (VIEGAS JÚNIOR, 2003).

### **3.2 Os timbós**

A palavra timbó é de origem tupi: ti = sumo, suco e mbo = cobra, significando sumo de cobra, suco venenoso, suco que mata (CORBETT, 1940). Trata-se de uma planta conhecida pela sua toxicidade, principalmente para insetos e peixes. Segundo TOZZI (1998) esse vegetal é amplamente encontrado na Região Amazônica, tanto em floresta primária como em áreas já desbravadas (Figura 1).



Figura 1 – Plantas de timbó coletadas em diversas localidades dos Estados do Acre e do Amazonas. *Deguelia floribundus* (A e B) e *Derris scandes* (C, D e E) Fotos: Alecio (2010).

O conhecimento da toxicidade dos timbós para insetos não é recente. Essas plantas já eram usadas para o controle de pragas e em pescarias pelos indianos e chineses desde o século

VIII. Outras referências remontam os tempos de Anchieta, Piso, Castelnau, Wallace, Spruce e Martius (séculos X a XIII) (CORBETT, 1940).

De acordo com LIMA (1987), os timbós já eram cultivados ou apenas explorados pelos nativos antes do descobrimento da América por Cristóvão Colombo. No Brasil, sabe-se que indígenas de diversas regiões, particularmente da Amazônia, realizam suas pescas com o uso dessas plantas, principalmente em ocasiões de grandes festas, quando necessitam de maiores quantidades de alimentos. Provavelmente foi isto que Anchieta se referia ao falar das “pescarias fantásticas” que presenciou nos rios da Amazônia.

Nas pescarias, os indígenas empregam raízes frescas dos timbós que batidas e agitadas na água produzem um líquido leitoso, com cheiro muito forte e peculiar. Sob a ação desse suco, mesmo muito diluído, os peixes perdem o equilíbrio, sobem aturdidos à superfície, nadam descontrolados para as margens dos rios, podendo ser capturados com facilidade. Em águas paradas a mortalidade pode ser total (CORBETT, 1940; LIMA, 1987).

AMARAL (2004) identificou o uso de preparados de timbó como o método de pesca mais comum utilizado pelos indígenas das etnias Ashaninkas e Kaxinawás (Município de Marechal Taumaturgo, Estado do Acre) para captura de várias espécies de Curimatidae e Loricariidae em pequenos rios, chamados naquela região de “*igarapés*”.

PIRES (1978) relata que na Região Amazônica é frequente encontrar plantações de timbó em fundos de quintal ou em locais onde existiram antigas habitações de índios ou de caboclos e que os habitantes dessa região usavam raízes de timbó para a pesca e, eventualmente, para matar os piolhos dos animais domésticos.

As plantas conhecidas como timbós pertencem a vários gêneros (*Derris*, *Deguelia*, *Thephrosia*, *Millettia*, *Serjania*, etc.) e a diversas famílias (Fabaceae, Papilionaceae, Sapindaceae, Compositae e Cariocaraceae, etc.) (CORBETT, 1940; LIMA, 1987). Na América do Sul os timbós são conhecidos por diversos nomes: na Amazônia brasileira, por timbó, tinguí e cunambi; no Peru e na Colômbia, por cube e barbasco; na Guiana, por haiari e em Suriname, por nekoe (PIRES, 1978).

Fusée-Aublet, em 1.775, fez a descrição botânica de um timbó nativo da América do Sul e lhe deu o nome de *Robina nicou* (LECOINTE, 1936 *apud* CORBETT, 1940). Em 1.930, o botânico Killip E. P. descreveu as duas espécies de *Derris* mais usadas para o combate de pragas, o barbasco originário do Peru, que foi identificado como *Derris nicou* e o timbó vermelho ou timbó urucu, do baixo Amazonas, que foi classificado como *Derris urucu* (ROARK, 1936 *apud* CORBETT, 1940).

Segundo LIMA (1987) há muitas espécies de timbó, mas as de uso mais generalizado na Amazônia são o timbó vermelho, *D. urucu* (Killip et Smith) Macbride e o timbó branco, *D. nicou* (Killip et Smith) Macbride. Essas duas espécies pertenciam ao gênero *Deguelia*, e passaram para o gênero *Derris*, em revisão feita por Francis Macbride, que as colocou na família das fabáceas.

Essas duas espécies de timbó apresentam diferenças em relação à fecundidade, rusticidade, arquitetura da planta e produtividade. No timbó vermelho, as hastes se tornam escandentes desde novas e entrelaçam-se formando um teto compacto que cobre o solo. Já o timbó branco mantém suas hastes eretas que somente depois de muitos anos se tornam escandentes. O timbó vermelho apresenta produção de até quatro vezes mais raízes e melhor proteção ao solo do que o timbó branco (LIMA, 1987).

Outra espécie de timbó usada como planta inseticida é a *Derris elliptica*, estudada primeiramente por Kazuo Nagai, em 1902, foi levada da Ásia Tropical para o Japão. Esse pesquisador observou que o princípio ativo desta planta era um produto cristalino, ao qual foi dado o nome de rotenona (CORBETT, 1940). Posteriormente, essa espécie conhecida como tubá, toeba ou timbó asiático, foi introduzida em Parintins-AM por imigrantes japoneses possivelmente para uso como inseticida e/ou adubo verde (LIMA e COSTA, 1991).

Entre os anos de 1880 a 1940 o controle de pragas, com o uso de extratos e óleos de plantas atingia seu apogeu. Os timbós apresentavam-se como um dos grupos mais importantes para essa finalidade, quando uma grande quantidade de trabalhos de pesquisa e experiências foi realizada com extratos de raízes de timbó por diversos pesquisadores da época, em vários países (CAMINHA FILHO, 1940; CORBETT, 1940).

Com isso, devido à grande disponibilidade dessas plantas na Amazônia e a enorme procura do mercado, em 1939 a Região Amazônica passou a exportar raízes dos timbós através do porto de Belém-PA para vários países e estados brasileiros. No Brasil, os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro eram os principais compradores e no exterior, os Estados Unidos e a França destacavam-se entre os países que importavam as maiores quantidades (LIMA, 1947).

Nessa época, havia vários moinhos em operação em Manaus-AM e Belém-PA e o produto exportável era o pó das raízes dos timbós utilizado para a extração da rotenona, com a qual eram preparados diversos produtos de largo emprego no combate às pragas das lavouras e aos insetos de hábitos domésticos, além do combate a ectoparasitos de animais domesticados (LIMA, 1987).

Passava ainda, pelos portos brasileiros, o pó de timbó proveniente do Peru, embarcado pelo porto de Iquitos (LIMA, 1947).

Após a II Guerra Mundial, com o surgimento dos inseticidas sintéticos o comércio do pó das raízes dos timbós entrou em colapso, os moinhos fecharam e a atividade de pesquisa com a cultura foi completamente desativada (PIRES, 1978). Entretanto, face aos grandes problemas causados pelos inseticidas sintéticos ao ambiente e ao homem muitos cientistas reiniciaram, nas últimas décadas, pesquisas com plantas inseticidas buscando novas alternativas para o controle de insetos que apresentem segurança, seletividade, biodegradabilidade, viabilidade econômica e aplicabilidade em programas integrados de controle de insetos-praga (VIEGAS JÚNIOR, 2003).

Deste modo, diversos cientistas voltaram a pesquisar a aplicabilidade dos timbós para o controle de pragas nas últimas décadas (COSTA et al., 1986; LIMA e COSTA, 1998; PEREIRA e FAMADAS, 2004; ALECIO et al., 2010; CORREA, 2011, PENA, 2012).

COSTA et al. (1986) estudaram o efeito do extrato aquoso das raízes de timbó (*D. urucu*) no controle de piolhos (*Haematopinus tuberculatus* Burmeister) em búfalos e verificaram que, quando aplicado por meio de pulverizações, o extrato foi eficiente ao combate dos insetos, apresentando a mesma eficácia em uma amplitude de 0,25 a 2% (m v<sup>-1</sup>) pelo menos até sete dias após a aplicação. Concluíram que a eficiência do timbó pode ser comparada a dos melhores produtos químicos utilizados no combate do piolho, com a vantagem de poder ser cultivado na própria fazenda, a baixo custo e estando prontamente disponível para uso.

AZEVEDO et al. (2005) testaram o efeito de diversos produtos naturais para controle de adultos de *Bemisia tabaci* Gennadius biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) na cultura do meloeiro (*Cucumis melo* L), em condições de casa de vegetação e campo, e identificaram que o extrato de

timbó foi mais eficiente no controle de adultos desses insetos no início do cultivo e para ninfas, no final do ciclo.

CORREA (2006) determinou a toxicidade do extrato de *Deguelia floribundus* Benth em *Toxoptera citricidus* Kirkald (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphidoidea) pela ação de contato por pulverização, encontrando valor para CL<sub>50</sub> de 1,75% e 5,75% (v v<sup>-1</sup>), respectivamente para os extratos alcoólicos e aquosos. Estas concentrações foram consideradas promissoras para o controle do inseto-praga.

ALECIO et al. (2005) avaliaram o potencial inseticida do extrato de raízes de *Derris rariflora* Macbride sobre o gorgulho-do-milho (*Sitophilus zeamais* Mots) em condições de laboratório pela via de intoxicação de superfície contaminada em papel-filtro e determinaram a CL<sub>50</sub> de 0,82 µl do extrato cm<sup>-2</sup>.

O efeito biocida de pó de raízes de *Deguelia utilis* (A.C.Sm.) foi avaliado por Marinos et al. (2004) como regulador de larvas do mosquito *Anopheles benarroch* Gabaldon, sendo verificado que 3,1 g do pó L<sup>-1</sup> de água é suficiente para controlar 80% e 90% da população dos insetos em 24 e 48 horas, respectivamente.

LUITGARDS-MOURA et al. (2002) determinaram o efeito de contato em superfície contaminada (papel-filtro) do extrato alcoólico de *Derris amazonica* Killip para larvas de *Lutzomyia longipalpis* Lutz (Diptera: Psychodidae) e obtiveram a concentração letal média (CL<sub>50</sub>) de 21,2% (m v<sup>-1</sup>).

COSTA et al. (1999a) avaliaram a diferença entre espécies de timbó (*D. nicou*, *D. urucu* e *D. elliptica*) coletadas em diferentes regiões da Amazônia no controle de larvas da *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) e observaram uma grande variação de eficiência na

mortalidade dos insetos dentro de cada espécie de timbó, com resultados de mortalidades que variaram desde praticamente nulos até altamente letais para o inseto. Segundo COSTA et al. (1999b), esta diferença na mortalidade dos indivíduos ensaiados foi devida aos diferentes teores de rotenona contido nos pós das raízes de cada planta, conforme observado por meio da análise de correlação, que foi significativa entre os teores deste princípio ativo e a capacidade de controle de *M. domestica*. Os diferentes teores de rotenona, encontrado em plantas de mesma espécie de timbó originadas de regiões diferentes podem ser devido ao isolamento que as populações foram submetidas durante a época do quaternário, formando assim, os chamados “refúgios florestais” (COSTA et al., 1999a).

GUSMÃO et al. (2002) avaliaram a atividade larvicida de extratos etanólicos de *D. urucu* (Fabaceae) contra o mosquito *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) e obtiveram a CL<sub>50</sub> de 17,6 mg mL<sup>-1</sup>, com mortalidade de 100% dos insetos na concentração de 150 mg mL<sup>-1</sup>, 24 h após a aplicação do extrato. Nesta concentração, as larvas apresentaram matriz peritrófica imperfeita, danos do epitélio do intestino médio e excretaram uma grande quantidade de fezes amorfas, enquanto que as larvas do tratamento controle não produziram fezes durante o período de ensaio.

EFROM et al. (2011) avaliaram a seletividade de doses comerciais de produtos fitossanitários naturais, usados no sistema de produção orgânica, por contato tópico sobre adultos do predador *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae) e não observaram toxicidade do extrato comercial de timbó (Rotenat®), contendo pelo menos 5% de rotenona, em todas as doses testadas (1, 3, 6 e 12 µL mL<sup>-1</sup>).

RATTANAPAN (2009) estudou o mecanismo de toxicidade do extrato de *D. elliptica* sobre *Spodoptera exigua* Hubner pelo método de imersão de lagartas e verificou que a toxicidade

aumentou consideravelmente quando a concentração da substância e o tempo de exposição foram aumentados. As CL<sub>50</sub> determinadas foram de 69,15 ppm, 51,32 ppm e 46,60 ppm em 24, 48 e 72 horas, respectivamente.

DAHLEM et al. (2009) avaliaram a utilização de produtos alternativos para controle *Diabrotica speciosa* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) e *Sternechus subsignatus* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) na cultura de feijão-vagem (*Vigna unguiculata* L. Walp) em sistema orgânico e verificaram que o extrato comercial de timbó (Rotenat®), contendo rotenona, não foi eficiente para os insetos.

ALECIO et al. (2010) avaliaram a ação inseticida do extrato de timbó *D. amazonica* para adultos de *Cerotoma arcuatus* Olivier (Coleoptera: Chrysomelidae) e determinaram os valores de CL<sub>50</sub> de 15,14 µL do extrato mL<sup>-1</sup> (por ingestão de folhas contaminadas) e 0,45 µL do extrato cm<sup>-2</sup> (por superfície contaminada) e de DL<sub>50</sub> de 1,44 µL do extrato g<sup>-1</sup> do inseto (por contato tópico). Os autores concluíram que o extrato é tóxico e inibe a alimentação de *C. arcuatus* a partir da concentração de 1% (m v<sup>-1</sup>).

ALECIO et al. (2011) verificaram que extrato de *D. floribundus* provocou baixos valores de mortalidade de adultos de *C. tingomarianus* por contato tópico e por ingestão de folhas contaminadas, porém reduziu a alimentação dos insetos, sendo considerado como promissores para o controle alternativo da praga.

CORREA (2011) avaliou a toxicidade de extratos de duas espécies de timbó (*D. rariflora* e de *D. floribundus*) e da rotenona purificada sobre *Tetranychus desertorum* Banks (Acari: Tetranychidae) em folhas de pimentão e obteve valores de CL<sub>50</sub> de 2% e 4,4% (m v<sup>-1</sup>) para os

extratos etanólicos e aquoso de *D. rariflora*, respectivamente, de 13,8% (m v<sup>-1</sup>) para o extrato etanólico de *D. floribundus* e de 26,6% (m v<sup>-1</sup>) para o extrato acetônico de *D. rariflora*.

MASCARO et al. (1998) determinaram a dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) do extrato alcoólico do pó de raízes de *Derris* spp. para três espécies de peixes filogeneticamente diferentes, *Collosoma macropomum* Curvier (Tambaqui), *Oreochromis niloticus* Niloticus (Tilápia), *Plecostomus* sp (cascudo) e um mamífero roedor (*Rattus norvegicus* Berkenhout). As DL<sub>50</sub> para as três primeiras espécies foram de 2,6, 4,8 e 14,2 µg do extrato mL<sup>-1</sup> de água, respectivamente. Já para os mamíferos, a DL<sub>50</sub> foi de 100 mg do extrato kg<sup>-1</sup> do roedor. Segundo estes autores, as diferenças entre os valores das DL<sub>50</sub>, principalmente entre os peixes e os ratos são devidas a fatores farmacocinéticos que se relacionam com as diferentes barreiras textuais gástricas encontradas pelos rotenóides quando administrados pela via oral em mamíferos, que dificultam a ocorrência de concentrações plasmáticas capazes de produzirem efeitos sistêmicos tóxicos significativos.

MAINI e MORALLO (1993) estudaram o efeito de *D. elliptica* aplicado em pulverização sobre caracóis e lesmas e verificaram que o extrato aquoso da raiz foi tóxico a 2.000 ppm, enquanto que o extrato do caule proporcionou 30% de mortalidade a 10.000 ppm.

PEREIRA e FAMADAS (2004) realizaram testes laboratoriais para avaliar a eficiência do extrato alcoólico de raízes do timbó *Dahlstedtia pentaphylla* (Taub.) Burk. sobre o carrapato de bovinos *Boophilus microplus* Canestrini da região do Vale do Paraíba. Os experimentos foram desenvolvidos com larvas de sete a dez dias não alimentadas e teleóginas (fêmeas ingurgitadas). As CL<sub>50</sub> determinadas foram de 1,65% e 2,87% (m v<sup>-1</sup>), respectivamente para teleóginas e larvas.

TOZZI (1998) realizou coletas de plantas de timbó dos gêneros *Derris* e *Deguelia* em vários países da América do Sul e verificou que as espécies de timbós podem ser encontradas

tanto em áreas de floresta densa como em capoeiras, clareiras ou em locais sombreados próximos às margens de riachos, em solos argilosos ou arenosos, neutros a muito ácidos. Na natureza as plantas de timbós pertencentes a estes gêneros são bastante semelhantes entre si. Além disso, o solo, insolação, sombreamento, umidade, idade e posição de ramos (se nas partes apicais, intermediárias ou basais) podem alterar a morfologia das plantas, que podem levar a equívocos taxonômicos ou dificultar a correta identificação dos exemplares no campo.

De acordo com LIMA (1987) os timbós são amplamente encontrados na Região Amazônica e podem ser cultivados com facilidade por apresentarem um bom desenvolvimento em ambientes precipitação anual entre 1.900 mm a 3.500 mm, o que viabiliza o seu uso como inseticida natural. A principal forma de propagação é a vegetativa e deve ser feita no início da estação chuvosa, onde se consegue mais de 90% de pegamento. A rebrota ocorre em mais ou menos uma semana e aos três anos de idade o rendimento de uma plantação de timbó, com espaçamento de 3m x 2m, pode atingir nove toneladas ha<sup>-1</sup> de raízes frescas.

Entretanto, plantas multiplicadas somente vegetativamente podem perder a capacidade de reprodução por semente, uma vez que espécies floridas são encontradas somente em áreas de floresta densa, o que pode ser constatado pela quase total ausência de material reprodutivo encontrado nos herbários das instituições de pesquisa (TOZZI, 1998).

Os timbós, quando cultivados em espaçamento de 2,0m x 2,0m ou 2,0m x 3,0m, formam sobre o solo uma manta vegetal de boa espessura, que proporciona grande proteção ao solo por evitar a incidência direta do sol e da chuva. Debaxo desta manta as radículas se apresentam ricas em nodosidades resultantes da simbiose com a bactéria *Rhizobium* spp. (LIMA, 1947).

### 3.2.1 Princípios ativos dos timbós

Os extratos de raízes de timbó apresentam grande diversidade de constituintes em suas raízes (MENDES, 1960; LÔBO et al., 2010; JIANG et al., 2012). Os teores de princípios ativos das plantas podem variar com a variação dos fatores ecológicos (nutrientes, água, luz e aspectos fitossanitários), genéticos e fisiológicos (BROWN JÚNIOR, 1988; CASTRO et al., 2004; JIANG et al., 2012).

A rotenona é citada como um dos principais constituintes dos extratos de timbó com propriedades inseticidas e acaricidas. Entretanto, é comumente disponível na forma de pó de raízes dos timbós, contendo de 1 a 5% ( $\text{m m}^{-1}$ ) de ingredientes ativos, ou como extratos que geralmente contém até 45% desses rotenóides (FANG e CASIDA, 1999; COLL, 2005). As espécies de timbó que apresentam os maiores teores de rotenona pertencem aos gêneros *Derris* e *Deguelia* e a maior concentração desta substância é encontrada nas raízes desses vegetais, sendo que seu teor pode variar de 5 a 13% ( $\text{m m}^{-1}$ ), dependendo da espécie (COSTA, 1999a).

A rotenona é um isoflavonóide cristalino, inodoro e insípido, biossintetizado pela via do metabolismo secundário, pouco solúvel em água e com excelente solubilidade em clorofórmio, éter, acetona, tetracloreto de carbono e nos derivados do etileno. Nos extratos de timbó, a rotenona aparece geralmente acompanhada de outros constituintes flavonoídicos rotenóides, tais como deguelina, tefrosina, sumatrol, toxicarol, elliptona e malacol (Figura 2) (MORS, 1978). A deguelina e a tefrosina também apresentam atividades inseticidas (CORBETT, 1940; CRAVERO et al., 1976; SILVA et al., 2002), todavia suas toxicidades são, respectivamente, três e sete vezes menores para insetos do que a rotenona (LIMA, 1987).

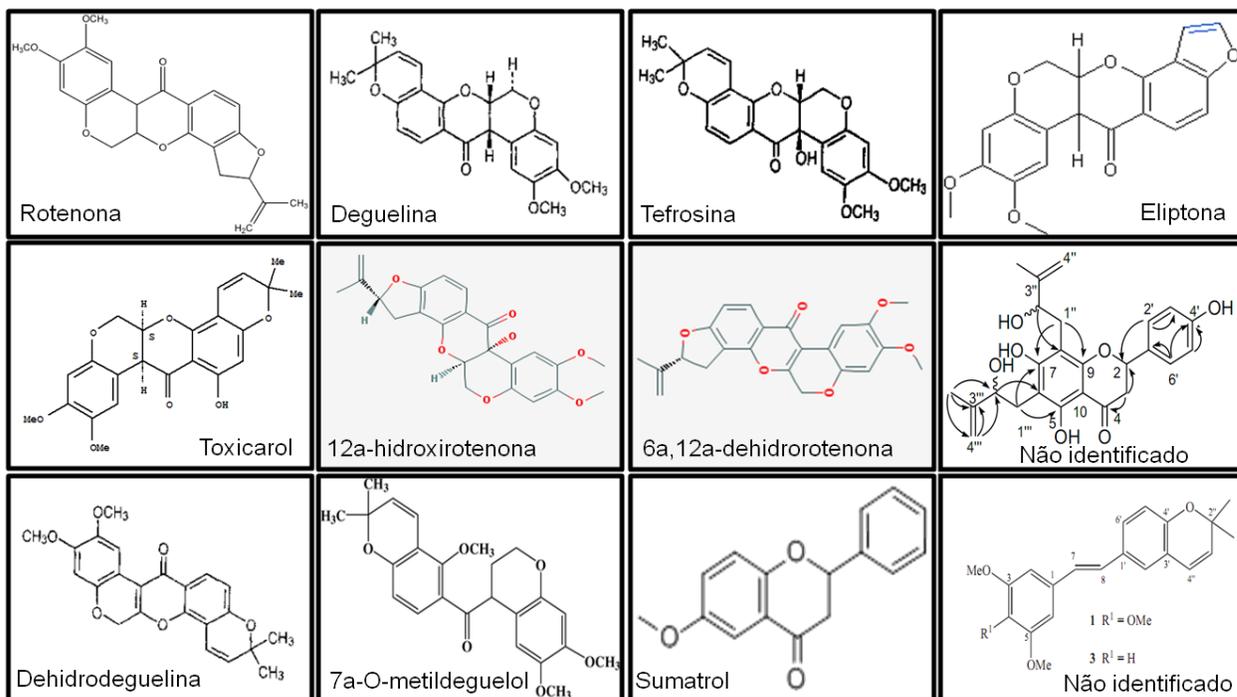


Figura 2 – Rotenóides que podem ser encontrados em raízes de timbó (*Derris* e *Deguelia*)

A maioria dos estudos desenvolvidos com extratos de raízes de plantas dos gêneros *Derris* e *Deguelia* para o controle de insetos-praga atribuiu a toxicidade dos timbós à rotenona (CORBETT, 1940; CRAVERO et al., 1976; LIMA, 1987; CROMBIE e WHITING, 1998; AZEVEDO et al., 2005; ALECIO et al., 2010; LUCIO et al., 2011).

A rotenona, presente em extratos de timbó, causa a morte dos animais por meio da inibição da cadeia respiratória mitocondrial, bloqueando a fosforilação do ADP a ATP, sendo peixes e insetos altamente sensíveis (MASCARO et al., 1998). Os sintomas que os insetos intoxicados com rotenona apresentam são: diminuição do consumo de oxigênio/redução da respiração e ataques que provocam convulsões e conduzem finalmente a paralisias e morte por parada respiratória (SILVA et al., 2002). De acordo com GALLO et al. (2002), a rotenona atua primariamente como um potente inibidor da enzima NADH óxido-redutase, da cadeia respiratória

e a intoxicação nos insetos é manifestada por meio da redução dos batimentos cardíacos, depressão de movimentos respiratórios e redução no consumo de oxigênio.

CAVALHEIRO et al. (2004) verificaram que a aplicação de 4  $\mu\text{M}$  de rotenona inibiu o complexo I da cadeia respiratória do fungo *Candida albicans*, provocando uma diminuição de cerca de 30% na taxa de respiração ( $29 \text{ nmol min}^{-1} \text{ O}_2 \text{ mg de proteína}^{-1}$ ). Colman-Saizarbitoria, et al. (2009) observaram que a rotenona inibiu o complexo I da cadeia respiratória (acoplamento NADH ubiquinona oxidorreductase) do crustáceo *Artemia salina* Leach (Anostraca: Artemiidae) e consideraram a rotenona como um inibidor mitocondrial clássico do Complexo I da cadeia respiratória (acoplamento NADH ubiquinona oxidorreductase).

Os efeitos de diversas substâncias citotóxicas sobre os níveis de ATP de células de insetos (Sf9) cultivadas “*in vitro*” foram comparadas por SAITO (2005), que verificou que a rotenona diminuiu substancialmente a respiração mitocondrial e reduziu o teor de ATP de células avaliadas em meio de cultura.

PHILOGENE et al. (2004) destaca que a rotenona apresenta alta toxicidade para insetos porque atua sobre o sistema nervoso e os mecanismos de respiração celular. DUCROT (2004) relata que a rotenona pode exercer efeito antialimentar e por sua vez afetar potencialmente atividades biológicas ou alterações hormonais para causar a morte a insetos. Segundo GOSSELIN (1984) e SILVA et al. (2002), a rotenona é tóxica para insetos por ingestão e contato, reunindo, de acordo com CRAVERO et al. (1976), duas formas de intoxicação usadas para controlar insetos-praga.

CAMINHA FILHO (1940) destaca que a rotenona apresenta grande valor como inseticida contra as pragas dos vegetais, tais como: coccídeos (Coleoptera), cochonilhas e pulgões

(Hemiptera), piolhos (Anoplura), vespas (Hymenoptera), mariposas e borboletas (Lepidoptera), etc., tanto no estágio adulto como em diversos períodos de desenvolvimento dos insetos (ovos, larvas, lagartas, crisálidas e pupas). É também eficiente para os ectoparasitas de animais domésticos e do homem, tais como: pulgas (Siphonaptera), piolhos (Anoplura), carrapatos (Acarina) e bernes (Diptera).

SAITO e LUCHINI (1998) relatam que a rotenona é eficaz no controle de besouros e lagartas, porém sua toxicidade pode ser mais ou menos ativa de acordo com a espécie de inseto e, sua ação, pode demorar um pouco para se manifestar.

A atividade anti-alimentar de diversos pesticidas foi avaliada por NAWNOT et al. (1987) contra várias pragas de produtos armazenados, concluindo que contra a *Homogyne alpina* L. a rotenona obtida de *D. elliptica* foi a substância mais efetiva.

FAZOLIN et al. (2002) obtiveram resultados satisfatórios quando avaliaram o efeito sobre de diferentes concentrações de rotenona extraída de *D. urucu* sobre a mortalidade e o consumo foliar de adultos de *C. tingomarianus* em casa de vegetação. Os autores concluíram que a concentração de 0,13% (m v<sup>-1</sup>) de rotenona foi eficiente para o controle da praga, provocando significativas mortalidades e inibição de alimentação dos insetos.

Produtos a base de rotenona foram extensivamente usados contra o besouro do Colorado *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae), uma das pragas mais importantes da batata no hemisfério norte (COSTA et al., 1997; COX, 2002). A rotenona também tem sido utilizada para a captura de peixes durante pesquisas científicas, onde têm sido observadas evidências de uma rápida recolonização (da ordem de 3 a 12 dias) em poças de maré submetidas ao envenenamento com esta substância (LARDNER et al., 1993; ROSA et al., 1997).

AZEVEDO et al. (2007) avaliaram a eficiência de diversos produtos naturais no controle de *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (Coleoptera: Bruchidae) em feijão caupi (*V. unguiculata*) armazenado e verificaram que extrato comercial de timbó (Rotenat<sup>®</sup>) a base de rotenona, avaliado na concentração de 7,5 mL.L<sup>-1</sup>, foi o produto mais eficiente no controle do caruncho em feijão-caupi armazenado.

O extrato de oleoresina de jacatupé (*Pachyrrizus tuberosus* Lam), nas concentrações 0,03% e 0,06% (m v<sup>-1</sup>), contendo 15 mg L<sup>-1</sup> de rotenona, foi efetivo no controle de *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae) por contato e ingestão (LUCIO et al., 2011).

PINTO (1937) empregou a rotenona como carrapaticida com sucesso, sob a forma de pó das raízes em solução de sabão em água, como também recomendou o seu uso no tratamento de pediculose e no combate aos bernes e piolhos.

Em ratos, WARE (1993) verificou que a rotenona tem uma dose letal (DL<sub>50</sub>) de aproximadamente 350 mg kg<sup>-1</sup> de peso vivo. LAPA et al. (1978) concluíram que a rotenona, quando injetada em ratos em baixas concentrações, induz a bradicardia, hipotensão e parada respiratória.

CORBETT (1940) verificou que a concentração de 1,2.10<sup>-3</sup> g de rotenona L<sup>-1</sup> de água (m v<sup>-1</sup>) foi tóxica para peixes acarás *Geophagus brasiliensis* (Quoy e Gaimard, 1824) (Perciformes: Cichlidae) cerca de trinta minutos após a sua aplicação e que a morte dos animais ocorreu aparentemente por paralisia respiratória, embora os batimentos cardíacos continuassem por algum tempo, depois de sustados os movimentos respiratórios.

Para TOKARNIA et al. (2000) a rotenona, apesar de ser muito tóxica para peixes, é de baixa toxidez para animais de sangue quente e, experimentalmente, plantas produtoras deste princípio ativo (timbós) não tem se revelado tóxicas para bovinos e outros animais domésticos.

Muitos são os fatores que destacam a rotenona presente em extratos de timbó para o controle de pragas. Não apresenta fitotoxicidade (REYNOLDS, 1989), é biodegradável e fotossensível, pois quando exposta à luz degrada-se em até três dias (MOREIRA et al., 2005). Quando aplicada na natureza, decompõe-se mais rapidamente do que a nicotina e a piretrina e pode ser considerada praticamente inócua para o homem, devido a sua baixa concentração nas misturas (MARICONI, 1981).

Por outro lado, alguns estudos não comprovaram a toxicidade da rotenona para artrópodes (MARINOS et al., 2004; AZEVEDO et al., 2007; GUIRADO et al., 2007; ALMEIDA, 2010; EFROM et al., 2011). Ainda, outros trabalhos destacaram que a rotenona apresenta baixa toxicidade quando utilizada isoladamente e que sua ação depende da associação de outros compostos para apresentar toxicidade para insetos (DECKER, 1942; TYLER, 1979; COSTA et al., 1999b; LI et al., 2011; PENA, 2012), ao mesmo tempo em que novos constituintes foram isolados e identificados a partir de extratos de timbó e apresentaram efeitos biológicos sobre artrópodes (MORS, 1978; GASSA et al., 2005; WU et al., 2008; BABU et al., 2010; HYMAVATHI et al., 2011; JIANG et al., 2012).

ALMEIDA (2010) verificou que um defensivo botânico comercial, com pelo menos 5% ( $\text{m v}^{-1}$ ) de rotenona, apresentou baixa eficiência inseticida sobre ninfas de *Euphalerus clitoriae* Burckhardt e Guajará (Hemiptera: Psyllidae), obtendo os maiores valores de mortalidade dos insetos (16,9%) na maior concentração avaliada ( $0,6\% \text{ v v}^{-1}$ ). Efeito semelhante foi obtido por

LIMA et al. (2008) quando estudaram a eficiência do extrato comercial de timbó (Rotenat<sup>®</sup>) sobre lagartas de *S. frugiperda* sob infestação natural na cultura do milho cultivado em agroecossistema de várzea. Neste estudo, a concentração de 0,5% (v v<sup>-1</sup>) do extrato de timbó com pelo menos 5% de rotenona apresentou baixa eficiência no controle da praga.

A ação inseticida de diversos produtos alternativos foi avaliada por GUIRADO et al. (2007) para o controle de *C. arcuatus* na cultura do girassol em condições de campo, sendo verificado que a rotenona utilizada na concentração de 1% (m v<sup>-1</sup>) não foi eficiente para o controle do inseto.

Os efeitos biológicos dos extratos de *D. urucu* e *D. utillis* foram estudados por COSTA et al. (1999a) em populações de *M. domestica*, que verificaram que a espécie *D. urucu* foi mais eficiente, mesmo tendo menores teores de rotenona em suas raízes. Estes autores levantaram a hipótese de que outras substâncias, além da rotenona, poderiam estar agindo no controle das larvas.

DECKER (1942) relata que o extrato bruto de *D. elliptica* é mais eficiente do que a rotenona para insetos e que o efeito inseticida de raízes de timbó pode estar relacionado à atuação conjunta da rotenona com outras substâncias presentes em extratos de timbó, entre elas a deguelina e o toxicarol. TYLER (1979) afirmou que as raízes de timbó podem conter rotenona, deguelina, toxicarol ou tefrosina, compostos estruturalmente semelhantes e que podem possuir propriedades inseticidas.

CORREA (2011) verificou que o extrato de timbó *D. rariflora* apresentou elevada toxicidade sobre o ácaro do pimentão *T. desertorum*, enquanto que a rotenona purificada não foi

tóxica para os indivíduos, provocando apenas 2,5% de mortalidade dos ácaros na maior concentração avaliada (1% m v<sup>-1</sup>).

CATTO et al. (2009) avaliaram a rotenona na forma de extrato da raiz de *D. nicou* sobre o carrapato *B. microplus* e verificaram que o produto foi eficiente contra a infestação de larvas, porém produziu insuficiente grau de atividade antiparasitária contra o carrapato nos testes *in vitro* e em animais experimentalmente infestados. Também não diminuiu significativamente as infestações por teleóginas (fêmeas ingurgitadas) no ensaio a campo.

Além da rotenona, MORS (1978) isolou de raízes de *D. urucu* outros princípios ativos, entre eles uma saponina de alto poder espumífero, denominada de derrisídeo. O autor destaca que no complexo tóxico dos timbós, esta saponina parece desempenhar ação de agente dispersivo da rotenona.

MENDES (1960) verificou significativa variação na composição química de 153 extratos de plantas de timbó de mesma espécie (*D. nicou*), que foram atribuídas aos diferentes locais de coleta e a variação de idade das plantas. Neste estudo, os teores dos constituintes dos extratos variaram de 12,5% a 61,1% (m v<sup>-1</sup>) para rotenona, de 12,7% e 79% (m v<sup>-1</sup>) para deguelina e de 2,2% a 64,7% (m v<sup>-1</sup>) para outros constituintes, o que permitiu o autor classificar as plantas em dois grupos (A e B). Plantas pertencentes ao grupo A apresentavam ¼ de rotenona, 2/4 de deguelina e ¼ de outros constituintes e as integrantes do grupo B possuíam 3/6 de rotenona, 2/6 de deguelina e 1/6 de outros compostos em seus extratos.

A toxicidade de nove compostos isolados de *D. scandens* foi avaliada por HYMAVATHI et al. (2011) para quatro espécies de insetos-praga de grãos armazenados (*Callosobruchus chinensis* L., *Sitophilus oryzae* L., *Rhyzopertha dominica* L. e *Tribolium castaneum* H.),

utilizando bioensaios de fumigação. A sensibilidade dos indivíduos aos compostos variou com o tempo de exposição, concentração e espécies de insetos, sendo alcançado 100% de mortalidade dos indivíduos após 24 h com os compostos osajin, scandinone, sphaerobioside e genisteína contra todos os insetos testados, enquanto laxifolin e lupalbigenin apresentaram 100% de mortalidade de *T. castaneum* e *R. dominica* 72 h após o início dos bioensaios.

A ação inseticida de dois compostos (khayasin e 2'S-methylbutanoylproceranolide) isolados de *Xylocarpus moluccensis* Lam comparados à rotenona purificada foi avaliada por ingestão de folhas contaminadas sobre larvas do besouro do coqueiro *Brontispa longissima* Gestro (Coleoptera: Chrysomelidae), criadas em laboratório, sendo observado que os dois compostos foram mais potentes do que a rotenona purificada em uma concentração de 50 mg mL<sup>-1</sup> (LI et al., 2011).

MAGALHÃES et al. (2003) encontraram entre os flavonoides isolados de *D. hatschbachii* três novos constituintes (escandenina, robustato de metila e 4',5-diidroxí-6-3,3-dimetilalila-7-metoxiflavanona), que foram identificados pela comparação de dados espectroscópicos (RMN, RMN-2D e EM/EM).

A partir de extratos de *D. laxiflora*, WU et al. (2008) isolaram e caracterizaram por análise espectroscópica as estruturas de nove compostos, sendo sete considerados novos: O-trans-cinnamoylglutanol (1), 22β-hidroxi-12-oleanen-3-ona (2), 15α, 16α-epoxi-12-oleanen-3-ona (3), 29-hidroxi-12-oleanene-3,22-diona (4), 22β,29-dihydroxy-12-oleanen-3-ona (5), 2,3-(metilenodioxi)-4-metoxi-5-metilfenol (8), e 2,3,6-trimetoxi-5-metilfenol (9), bem como dois primeiros isolados de fontes naturais: 25-cycloartene-3,24-diona (6) e 24ξ-hidroxi-25-cycloarten-3-ona (7).

LÔBO et al. (2009) isolaram e identificaram cinco estilbenos a partir das folhas do "timbó vermelho" (*D. rufescens* var. *urucu*): 4-metoxilonchocarpeno (1); 3,5-dimetoxi-4'-hidroxi-3'-prenil-*trans*-estilbeno (2), lonchocarpeno (3), 3,5-dimetoxi-4'-O-prenil-*trans*-estilbeno (4) e pteroestilbeno (5). Os constituintes 2 e 4 foram relatados como novos produtos naturais, porém o composto 2 já havia sido citado como produto de síntese.

Três novos diidrofavonóides, denominados urucuol A, B e C e o diidrofavonol isotirumalina foram isolados e identificados por LÔBO et al. (2010) a partir do extrato etanólico das folhas de *D. urucu* (Fabaceae). As estruturas destes compostos foram elucidadas por uma extensiva análise espectroscópica de RMN uni e bidimensional, UV, IV e dados de EM, além de comparação com dados da literatura. Os compostos isolados foram avaliados quanto ao seu potencial sequestrador do radical DPPH e apresentaram baixo poder antioxidante quando comparados ao antioxidante comercial *trans*-resveratrol.

BABU et al. (2010) realizaram estudo fitoquímico da planta de *Derris scandens* Benth (Fabaceae) utilizando métodos espectroscópicos, especialmente RMN 1D e 2D e massa análise espectral, que resultou no isolamento de um novo derivado de isoflavonas, o scandinone A, além de 11 compostos conhecidos.

JIANG et al. (2012) isolaram e caracterizaram 12 compostos (11 conhecidos e 1 não relatado na literatura) a partir de extratos das partes aéreas de *Derris trifoliata* Lour e avaliaram suas toxicidades sobre *A. salina*, onde verificaram que oito constituintes (rotenona, tefrosina, 12a-hidroxirotenona, deguelina, 6a,12a-dehidrorotenona, dehidrodeguelina, 7a-o-metildeguelol e 4'-hidroxi-7-metoxiflavanona) apresentaram toxicidade significativa (CL<sub>50</sub> entre 0,06 a 9,95 mg

mL<sup>-1</sup>) e que o novo composto isolado apresentou baixa toxicidade (CL<sub>50</sub> = 211,31 mg mL<sup>-1</sup>) para o crustáceo.

Deste modo, há um grande interesse ecológico e econômico nesses princípios ativos como agentes controladores de insetos-praga na agricultura ou em certas relações planta-inseto (CROMBIE e WHITING, 1998).

### **3.3 Vaquinha-do-feijoeiro (*Cerotoma tingomarianus* Bechyné)**

A vaquinha da espécie *Cerotoma tingomarianus* Bechyné é um coleóptero, da família Chrysomelidae, considerada como a principal praga da cultura do feijão-comum na região Amazônica (Fazolin e Gomes, 1993).

Os crisomelídeos do gênero *Cerotoma* causam prejuízos a muitos vegetais, tais como feijão-comum *P. vulgaris* (TEIXEIRA et al., 1996; GALLO et al., 2002), feijão-caupi *V. unguiculata* (STONE e SARTORATO, 1994; FAZOLIN, 1995; FREIRE FILHO et al., 2005) e soja *Glycine max* L. (LINK e COSTA, 1978), desde a germinação até a colheita.

FAZOLIN e ESTRELA (2004) observaram para a cultura do feijão-comum, cultivar Pérola, decréscimos de produtividade de 34,4% com a ocorrência de 66% de desfolhamento na fase de florescimento das plantas. O nível populacional de *C. tingomarianus* que causa dano econômico é observado com frequência nas condições amazônicas.

Os adultos de *C. tingomarianus* são insetos de coloração preta com manchas amarelas nos élitros e medem de 4 a 6 mm de comprimento (Figura 3A). Os ovos são elípticos e amarelados e cada fêmea põe em média 1.200 ovos no solo, em regiões próximas à base das plantas (NAVA et al., 2003). As larvas (Figura 3B) eclodem cerca de sete dias após a postura, passam por três

instares em aproximadamente nove dias, são de coloração branco leitosas, alongadas, com cerca de 10 mm de comprimento, possuindo a cabeça e o último segmento abdominal escuro (QUINTELA et al., 1991).

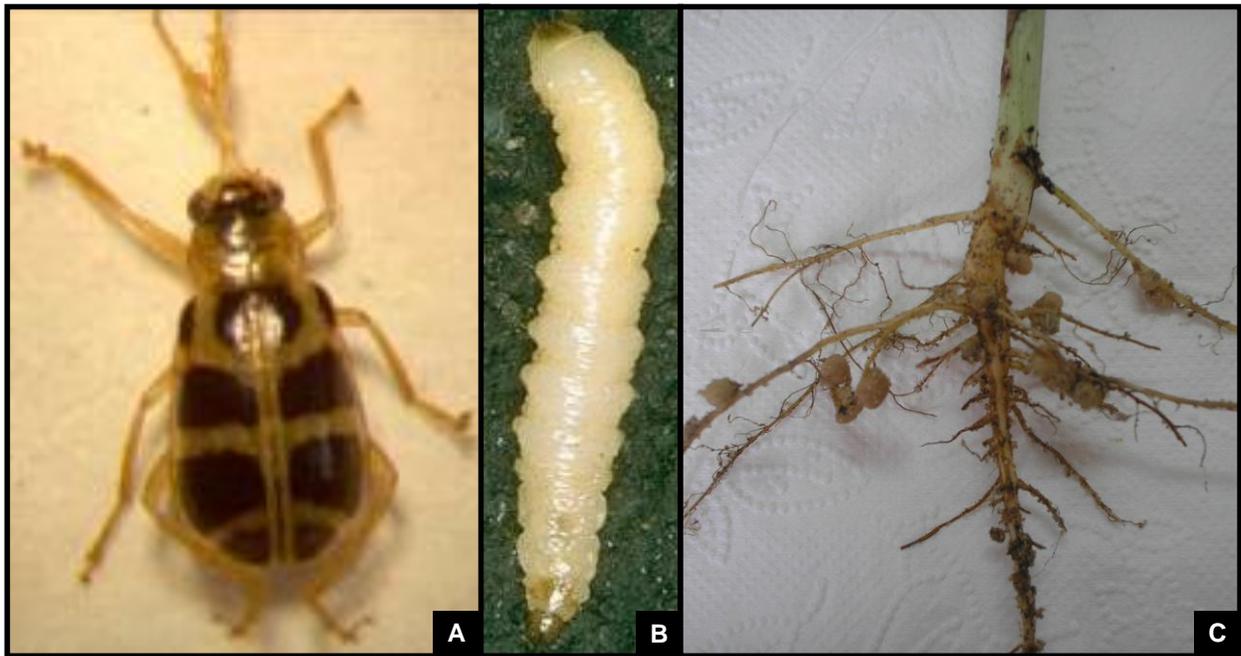


Figura 3 – Adulto de vaquinha-do-feijoeiro *C. tingomarianus* (A); larva de vaquinha-feijoeiro (B) e sistema radicular do feijão atacado por larvas de vaquinhas (C). Fotos: Fazolin e Alecio (2009).

Segundo STONE e SARTORATO (1994) as larvas vivem no solo e alimentam-se de raízes, nódulos e partes subterrâneas do caule (Figura 3C). Em populações elevadas deixam marcas ou perfurações no local do ataque (SARTORATO et al., 1983), limitando a fixação do nitrogênio atmosférico em até 45% (LAYTON e BOETHEL, 1987; TEIXEIRA et al., 1996). Em altas infestações podem provocar danos às sementes em germinação, prejudicando a emergência e o desenvolvimento das plantas (SALAS et al., 1999; HOHMANN e MARTINEZ,

2000; AIDAR et al., 2002). Nesta fase, os insetos atacam as folhas cotiledonares e os danos são semelhantes àqueles provocados pelos adultos (SARTORATO et al., 1983).

As plantas, com o sistema radicular severamente danificado pelas larvas, atrofiam e as folhas basais tornam-se amareladas, com envelhecimento prematuro (SARTORATO et al., 1983; STONE e SARTORATO, 1994).

Segundo NAVA et al. (2003), as larvas provocam os maiores danos nos primeiros dias após a emergência das plantas. Isso porque nesse período o crescimento das plântulas depende da utilização das reservas nutricionais armazenadas nos cotilédones e somente com o crescimento a planta desenvolve o sistema radicular, passando a assimilar os nutrientes. Além disso, de acordo com VARGAS e HUNGRIA (1997), a associação com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico está sendo iniciada nesta época, já que os primeiros nódulos nitrificadores são visíveis apenas aos oito dias após a germinação.

Entretanto, alguns autores relatam que as plantas podem compensar o ataque nas raízes por meio de diversos mecanismos, entre eles aumento do crescimento radicular e/ou aumento do número de nódulos nitrificadores (RILEY et al., 1987). Outros pesquisadores acreditam que essa compensação pode não ocorrer com o aumento da densidade larval da praga, devido ao grande decréscimo na matéria seca das raízes e dos nódulos (NAVA et al., 2003), que afetam a assimilação e a absorção de água, de nutrientes e de oxigênio e a translocação de seiva, além de facilitar a atuação patógenos, provocar redução da área foliar, da altura e da produtividade das plantas (SCHROEDER et al., 1992). As larvas e os adultos ao se alimentarem podem transmitir o vírus causador do mosaico severo do feijão (*Cowpea severe mosaic virus* – CPSMV) (Figura 4) (RAJNAUTH et al., 1987; SALAS et al., 1999; FREIRE FILHO et al., 2005).



Figura 4 – Sintomas do mosaico severo transmitido por larvas e adultos de vaquinhas às partes vegetativas aéreas de plantas de feijoeiro. Fotos: Hickel (2006).

Entretanto, é na fase adulta que as vaquinhas provocam os danos mais severos às plantas de feijoeiro. Atacam preferencialmente a parte aérea, iniciando essa atividade logo após a emissão dos primeiros folíolos (Figura 5A), consumindo folhas (Figura 5B e 5C), cotilédones e órgãos reprodutivos tenros (Figura 5D), provocando conseqüentemente a redução de área fotossintética e de produção. Em altas populações consomem até a gema apical, o que pode provocar a morte das plantas (SALAS et al., 1999; GALLO et al., 2002; FREIRE FILHO et al., 2005).

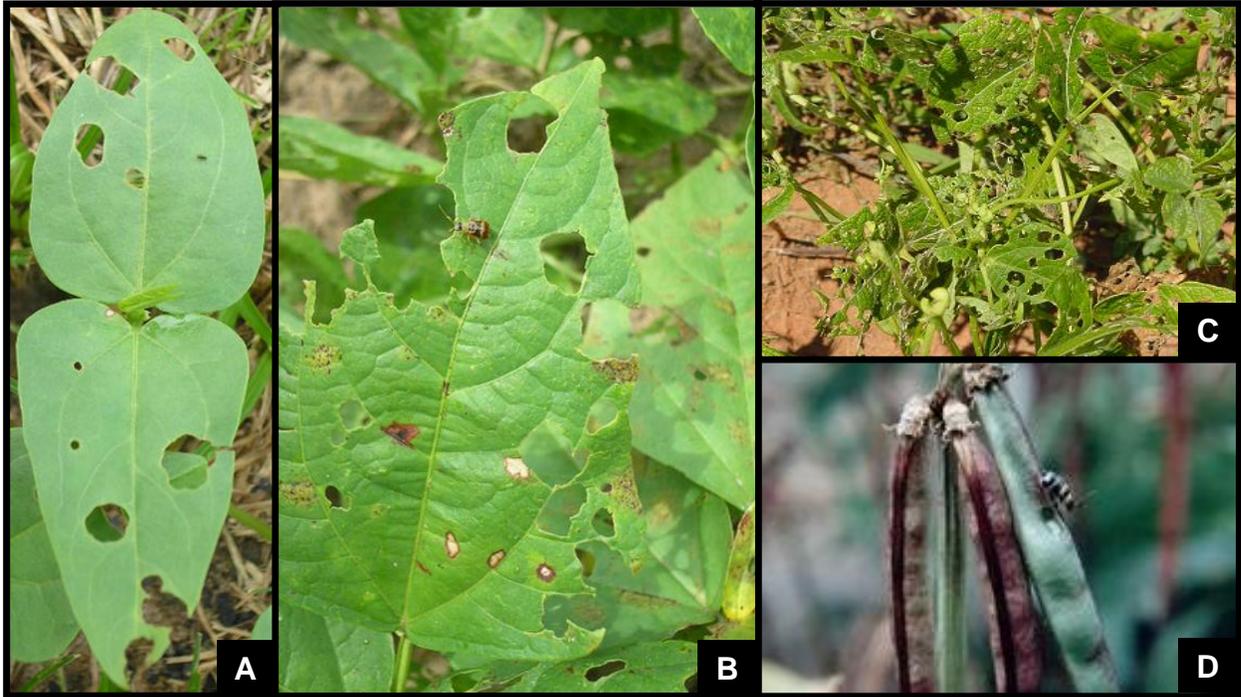


Figura 5 – Danos provocados pela vaquinha-do-feijoeiro logo após a emissão dos primeiros folíolos em plantas de feijoeiro (A); folhas (B e C) e órgãos tenros reprodutivos (D). Fotos: Alecio (2006).

De acordo com SARTORATO et al. (1983) e ZIMMERMANN et al. (1988) a cultura suporta certo nível de desfolhamento sem perdas significativas na produção. Contudo, níveis de desfolhas iguais ou superiores a 25% na fase vegetativa (GALLO et al., 2002), no florescimento e no enchimento de vagens (VIEIRA, 1981; SARTORATO et al., 1983) causam prejuízos economicamente significativos.

FAZOLIN e GOMES (1993) citam a espécie *C. tingomarianus* como a praga de maior importância para a cultura do feijão no Estado do Acre, por provocar desfolhamento severo nas plantas e reduzir a capacidade fotossintética, principalmente no período seco, que coincide com o maior pico populacional e os maiores danos ocasionado pela espécie, apesar da população dos indivíduos ocorrerem durante todo o ano.

Para o controle de adultos do gênero *Cerotoma*, via pulverização, há apenas um inseticida (beta-ciflutrina – piretróide) registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA (MAPA, 2012). Mesmo assim, é comum observar agricultores utilizando produtos químicos convencionais de forma inadequada e indiscriminada para o controle desses insetos na cultura do feijão-comum.

Nesse contexto, surge a necessidade do desenvolvimento de estudos que visam à descoberta de técnicas alternativas de controle em relação aos métodos químicos convencionais, que sejam menos agressivos ao ambiente e eficiente na redução populacional de *C. tingomarianus*. Para atender a esta demanda foram reiniciadas pesquisas buscando a descoberta de novas moléculas e de produtos alternativos para o controle desses insetos-praga (FAZOLIN et al., 2005; GUIRADO et al., 2007; CATTO et al., 2009; MIGLIORINI et al., 2010).

FAZOLIN et al. (2005) verificaram que o óleo de *Piper aduncum* L. foi tóxico a adultos de *C. tingomarianus* em concentrações a partir de 0,04% (m v<sup>-1</sup>) por contato em superfície contaminada e superiores a 4,1% (m v<sup>-1</sup>) por contato tópico. Os insetos apresentaram distúrbios fisiológicos quando submetidos às concentrações do óleo acima de 2,5% (m v<sup>-1</sup>) por contato tópico.

MIGLIORINI et al. (2010) avaliaram a eficiência de extratos vegetais no controle de *D. speciosa* em laboratório e verificaram que os extratos de timbó (*Ateleia glazioveana* Baill), de noz-moscada (*Myristica fragans* Houtt) e de cinamomo (*Melia azedarach* Linnaeus) foram os mais eficientes por terem ocasionado redução significativa do número de insetos adultos vivos a partir do sexto dia após a aplicação de extratos, com valores de mortalidade que variaram entre

80,4% e 100% dos insetos. Apesar disso, os autores desqualificaram o produto como opção para tratamento de infestações que requerem um controle imediato de insetos-praga.

### **3.4 Lagarta-do-cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda* Smith)**

A lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1.797) (Lepidoptera: Noctuidae), é um inseto polígrafo de alta capacidade de dispersão que se alimenta de um grande número de vegetais cultivados (algodão, alfafa, amendoim, arroz, aveia, batata, cana-de-açúcar, hortaliças, milho, soja e trigo), principalmente gramíneas, sendo considerada a praga mais importante da cultura do milho no Brasil (GALLO et al., 2002; CRUZ e MONTEIRO, 2004).

As perdas de produção na cultura do milho ocasionadas pelas lagartas de *S. frugiperda* podem chegar a 38,7% (WILLIAMS e DAVIS, 1990; CRUZ et al., 1997; FIGUEIREDO et al., 2005). Os maiores danos ocorrem na fase em que a planta apresenta de 10 a 12 folhas (GASSEN, 1994), podendo ocorrer a destruição completa das plantas em elevada infestação (SILVA et al., 1983). As dimensões dessas perdas podem variar em função da cultivar utilizada, da fase fenológica, do sistema de produção empregado e do local de plantio, uma vez que o inseto ocorre durante todo o ciclo do vegetal (BUNTIN, 1986; VALICENTE e COSTA, 1995; SARMENTO et al., 2002)

A espécie *S. frugiperda* possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde a região central dos EUA até a Argentina e em algumas ilhas a oeste da Índia (PEDIGO, 1989). É também conhecida como lagarta militar, lagarta do milharal e lagarta dos capinzais (CARVALHO, 1970). Os adultos apresentam hábito noturno, acasalam-se três dias após a emergência. A postura é feita normalmente nas folhas das plantas, principalmente nos primeiros quatro dias após a cópula.

Cada fêmea coloca em média 1.360 ovos, podendo variar entre 1.000 a 2.000 ovos, que são recobertos por filamentos brancos, escamas e pêlos (FERRAZ, 1982; VALICENTE e COSTA, 1995).

As lagartas-do-cartucho (Figura 6A) eclodem num período de dois a cinco dias após a ovoposição, possuem coloração que varia de pardo-escuro até quase preta e apresentam três linhas longitudinais branco-amareladas na parte dorsal do corpo (FERRAZ, 1982). Durante a fase larval o inseto pode apresentar de quatro a sete instares, variando conforme a genética, fonte de alimento (natural ou artificial), temperatura e sexo. A duração desta fase é de 12 a 30 dias, quando a lagarta chega a atingir aproximadamente 50 mm de comprimento (LUCCHINI, 1977; LORDELLO et al., 1980; PARRA e HADDAD, 1989).

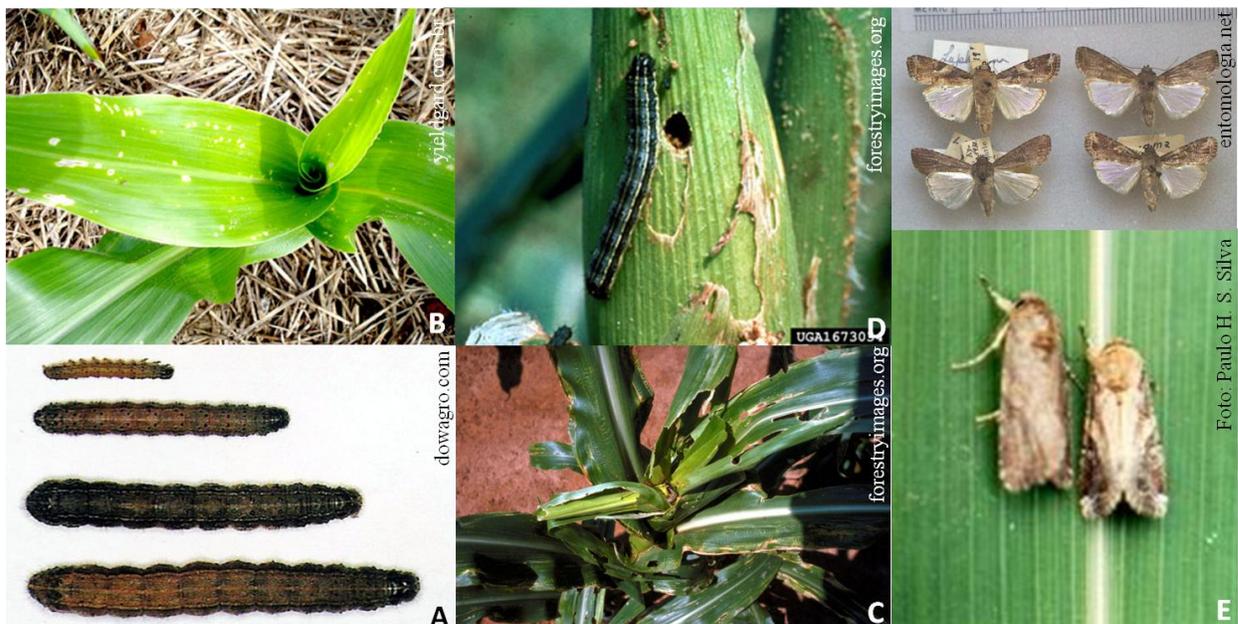


Figura 6 – Lagartas-do-cartucho do milho *S. frugiperda* (A), danos causados pelas lagartas nas folhas (B e C) e nas espigas de milho (D) e insetos adultos (E).

As lagartas recém-eclodidas iniciam o ataque na cultura do milho pelo parênquima foliar (Figura 6B), o que confere um aspecto transparente às folhas, passando a perfurá-las em instares posteriores (Figura 6C). Quando ocorre ataque severo nos estágios iniciais pode causar a morte das plantas, reduzindo a população inicial (SILVA et al., 1983). A partir do 4º instar as lagartas atacam preferencialmente os “cartuchos” do milho, podendo destruí-los completamente por consumirem grande parte das suas folhas antes da abertura. Em ocorrências tardias podem atacar a espiga (Figura 6D), destruindo a palha e os grãos, além de propiciarem a entrada de patógenos e umidade, determinando o apodrecimento das mesmas (WAQUIL et al., 1982; ÁVILA et al., 1997).

Tais características de ocorrência de *S. frugiperda* se devem também à alta mobilidade da espécie e a sua capacidade para colonizar rapidamente os cultivos de milho quando as condições são favoráveis para o seu desenvolvimento normal e sobrevivência (MURUA e VIRLA, 2004). Devido, principalmente, ao canibalismo que se manifesta nesta espécie a partir do terceiro instar é comum encontrar apenas uma lagarta por cartucho. Os danos mais severos são causados por insetos de quinto e sexto instares (WAQUIL et al., 1982; GASSEN, 1994; ÁVILA et al., 1997).

Ao completar o desenvolvimento, a lagarta-do-cartucho penetra no solo e se transforma em pupa, que possui coloração avermelhada e mede aproximadamente 15 mm. Em campo a fase de pupa tem duração média de 11 dias (VALICENTE e COSTA, 1995) e em condições de laboratório este período pode variar entre 8 e 11 dias (SILVEIRA et al., 1997; SARMENTO et al., 2002).

Os adultos de *S. frugiperda* (Figura 6E) emergem à noite, medem aproximadamente de 3,5 cm de envergadura, apresentam acentuado dimorfismo sexual, as asas anteriores são de coloração pardo-escuras e as posteriores são branco-acinzentadas (FERRAZ, 1982; CRUZ, 1995).

A lagarta-do-cartucho é de difícil controle devido a uma série de fatores, entre eles a sua ampla gama de hospedeiros, a grande capacidade de dispersão durante o período de cultivo e capacidade de se alojar no interior do cartucho do milho, o que torna difícil o contato com os inseticidas aplicados (SILVA e CROCOMO, 2007). Além disso, o hábito migratório rápido e de longo alcance das lagartas de *S. frugiperda* serve como mecanismo de escape para determinados patógenos, no caso de controle biológico, cuja eficácia depende da densidade do hospedeiro (KNIPLING, 1980).

O controle de *S. frugiperda* geralmente é realizado com produtos químicos sintéticos, não seletivos, e que demandam progressivamente maiores números de aplicações. Essas aplicações frequentemente são tardias e acima do nível de controle, os quais nem sempre são eficientes (GRÜTZMACHER et al., 2000), podendo acarretar diversos problemas, tais como: desequilíbrio biológico, altos níveis residuais em alimentos, eliminação de inimigos naturais, intoxicação dos aplicadores e seleção de populações de insetos resistentes, entre outros efeitos diretos e indiretos (HENANDEZ e VENDRAMIM, 1996; DIEZ-RODRIGUEZ e OMOTO, 2001). A resistência de *S. frugiperda* foi detectada para inseticidas fosforados, carbamatos e piretróides (YONG e MCMILLIAN, 1979; YU, 1992; DIEZ-RODRÍGUEZ e OMOTO, 2001; YU e MCORD, 2007).

A busca de outros métodos e produtos para o controle de pragas tem sido crescentes e inclui a utilização de meios menos agressivos ao ambiente (VENDRAMIM, 1997). Produtos naturais provenientes de plantas pode ser uma alternativa ao manejo da *S. frugiperda*, se

inserindo nesse contexto a utilização de extratos e óleos de plantas popularmente conhecidos como inseticidas naturais (GUERRA, 1985; BOGORNIE e VENDRAMIM, 2003).

Foram realizados diversos estudos nos últimos anos com o propósito de desenvolver novos métodos e produtos para o controle de *S. frugiperda* (MIKOLAJCZAK e REED, 1987; PÉREZ et al., 1998; BRITO et al., 2004; MATOS et al., 2006; ROEL e VENDRAMIN, 2006; PAVELA, 2008; LIMA et al., 2010).

MIKOLAJCZAK e REED (1987) avaliaram a ação inseticida de extratos etanólicos de *Trichilia connaroides* (Wight e Arn.), *Trichilia prieureana* A. Juss, *Trichilia roka* Chiov e *Trichilia triphyllaria* C. DC. em *S. frugiperda* e obtiveram mortalidades iguais ou superiores a 80% dos insetos. Em estudo semelhante MATOS et al. (2006) verificaram a ocorrência de altas taxas de mortalidade e distúrbios fisiológicos de extratos hexânico e metanólico de *Trichilia clausenii* C. DC. em *S. frugiperda* em condições de laboratório.

RODRÍGUEZ e VENDRAMIM (1997) adicionaram extratos aquosos de *Trichilia casaretti* C. DC., *Trichilia catigua* A. Juss, *T. clausenii*, *Trichilia elegans* A. Juss e *Trichilia pallida* Swartz à dieta artificial de lagartas de *S. frugiperda* e verificaram que os produtos afetaram o desenvolvimento dos insetos, sendo que o extrato aquoso de ramos de *T. pallida* a 1% (v v<sup>-1</sup>) provocou mortalidade total das lagartas.

O desenvolvimento de lagartas de *S. frugiperda* em genótipos de milho tratados com extrato acetato etila de *T. pallida* a 0,001% (m v<sup>-1</sup>) foi afetado, sendo alongada a fase larval e diminuído o peso de lagartas e pupas (ROEL e VENDRAMIN, 1999).

ROEL et al. (2000) destacam que o extrato acetato de etila de folhas e de ramos de *T. pallida*, impregnado em folhas de milho, provoca mortalidade larval de 100% de lagartas de *S.*

*frugiperda* em concentração igual ou superior a 0,05% (m v<sup>-1</sup>), afeta a sobrevivência e alonga a fase larval do inseto a 0,006% (m v<sup>-1</sup>), não ocasionando qualquer efeito aparente em concentração igual ou inferior a 0,0008% (m v<sup>-1</sup>). As lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas tratadas com o mesmo extrato desde a eclosão são mais afetadas do que às alimentadas a partir dos dez dias de idade.

ROEL e VENDRAMIN (2006) observaram ocorrência de efeito residual em lagartas de diferentes idades de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de milho contaminadas com extratos de *T. pallida*, sendo mais afetadas as lagartas que tiveram contato com o produto tóxico logo após a eclosão do que aquelas alimentadas a partir dos 10 dias de idade.

MARTINEZ e EMDEN (2001) avaliaram a redução do crescimento, deformidades e mortalidade de lagartas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) provocadas por Azadiractina e verificaram que o período de dois dias de alimentação prolongou os instares larvais, reduziu a taxa média de crescimento relativo, impediu a ecdise, provocou anormalidades morfológicas e ocasionou mortalidade dos insetos, de forma dependente da dose. Quando as concentrações mais altas foram empregadas os efeitos apareceram logo após o tratamento e a mortalidade foi elevada. Muitos insetos morreram após permanecerem inativos por vários dias ou durante ecdises prolongadas. Em concentrações mais baixas, se a ecdise foi completada, alterações no crescimento e anormalidades geralmente ocorreram nos estádios subsequentes.

PRATES et al. (2003) determinaram a CL<sub>50</sub> de 2,67 mg mL<sup>-1</sup> do extrato aquoso de folhas do nim (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre *S. frugiperda* em condições de laboratório. PÉREZ et al. (1998) avaliaram três inseticidas naturais derivados do nim no controle da lagarta-do-cartucho

do milho em condições de campo e destacaram que, apesar de não terem superado o inseticida sintético comparado no estudo, os extratos naturais foram eficientes com 3 a 4 aplicações.

LIMA et al. (2008) avaliaram a eficiência de inseticidas naturais à base de nim (*NeemAzal-T/S* e o *Dalneem* emulsionável) e de timbó (*Rotenat*<sup>®</sup>) para o controle de *S. frugiperda* na cultura do milho em agroecossistema de várzea por em duas épocas de semeadura, sob infestação natural a campo, e verificaram que a concentração de 0,5% (v v<sup>-1</sup>) do extrato de timbó, com pelo menos 5% de rotenona, apresentou baixa eficiência no controle do inseto. Os produtos comerciais à base de nim avaliados na mesma concentração apresentaram maior toxicidade do que o produto à base de rotenona e foram menos eficientes do que o inseticida convencional padrão (*Match CE 0,1*).

LIMA et al. (2010) avaliaram a bioatividade de formulações de *A. indica* em lagartas de *S. frugiperda* e verificaram que os inseticidas comerciais *Xentari*<sup>®</sup> (10 g L<sup>-1</sup>) *Neemseto*<sup>®</sup> (10 mL L<sup>-1</sup>) provocam mortalidades de 75,0% e 82,9% das lagartas, respectivamente, nos testes de imersão de folhas e também reduzem o peso larval, peso pupal e a longevidade dos insetos.

O efeito tóxico de extratos aquosos de folhas de *Anacardium occidentale* L., *Guarea trichilioides* L. e *M. azedarach* foi confirmado para lagartas de *S. frugiperda* por BRITO et al. (2004), que concluíram que todas as plantas testadas apresentam atividade inseticida, com destaque para o extrato obtido da espécie *M. azedarach* que causou 100% de mortalidade dos insetos.

Os efeitos de extratos de plantas de *Polygonum hydropiperoides* Michx., *Solanum nigrum* L. e *Calliandra pittieri* Standl foram avaliados sobre lagartas de *S. frugiperda* (LIZARAZO et al., 2008), sendo obtidos os melhores resultados com os extratos de *P. hydropiperoides* extraídos com diclorometano, em diferentes doses, no qual foi verificado 100% de mortalidade após 12

dias aplicação e um efeito antialimentar representado pela redução do consumo de folhas de milho. Neste estudo, os autores atribuíram a ação tóxica dos extratos a presença da rotenona, apesar de terem destacado a necessidade da realização de estudos adicionais para verificação dos efeitos causados pelos demais constituintes, incluindo a possibilidade de ocorrência de sinergismo entre as moléculas.

PAVELA (2008) realizou estudos de laboratório para determinar os efeitos dos extratos de três espécies do gênero *Reynoutria* (*R. bohemica*, *R. japonica* e *R. sachaliensis*) sobre o desenvolvimento, alimentação e mortalidade de lagartas de *S. littoralis* e verificou que os extratos não alteraram a alimentação dos insetos. No entanto, diminuíram significativamente o crescimento das lagartas e a eficiência de conversão do alimento ingerido e digerido. A conversão do alimento ingerido foi menor, quando comparado com lagartas do tratamento controle. A utilização dos extratos na dieta provocou prolongamento do desenvolvimento das larvas e toxicidade crônica. Os extratos das três espécies de plantas provocaram mortalidade das lagartas com resultados semelhantes ( $CL_{50}$  variou de 0,5 a 1 mg g<sup>-1</sup> em todos os extratos) e a inibição do crescimento das lagartas foi variada. O extrato mais eficiente foi de *R. bohemica*, híbrido interespecífico ( $CL_{50}$  foi de 1,24 mg g<sup>-1</sup>), seguido pelo o extrato de *R. japonica* ( $CL_{50}$  de 6,72 mg g<sup>-1</sup>) e o menos eficiente foi o extrato *R. sachaliensis* ( $CL_{50}$  de 9,48 mg g<sup>-1</sup>).

SANTIAGO et al. (2008) avaliaram os efeitos de extratos de plantas na biologia de *S. frugiperda* mantida em dieta artificial e verificaram que o extrato aquoso do fruto verde de *Ricinus communis* L. apresentou bioatividade, nos parâmetros duração larval e pupal e peso de pupa. O extrato aquoso de *Ruta graveolens* L. reduziu o peso de pupa. A dieta contendo extrato de folhas e ramos de *Momordica charantia* L. reduziu a viabilidade larval e o peso de pupa. O

extrato aquoso de folhas de *Lippia sidoides* Cham. não afetou as fases larval e pupal, reduziu a postura e a viabilidade de ovos e aumentou a longevidade de adultos de *S. frugiperda*. A viabilidade de pupa não foi afetada pelos extratos.

O óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) apresentou atividade inseticida para lagartas de *S. frugiperda*, provocando mortalidade e redução alimentar pelo teste de ingestão e toxicidade aguda pelo teste de contato tópico, sendo também observados sintomas de neurotoxicidade, como agitação, hiperatividade e o efeito knock-down (LIMA et al., 2009).

A grande maioria desses estudos foi realizada com plantas pertencentes à família Meliaceae, gêneros *Azadirachta*, *Trichilia* e *Melia*. Portanto, diante da vasta biodiversidade amazônica e da necessidade de desenvolvimento de novos métodos e produtos para o combate a insetos-praga, torna-se imprescindível o desenvolvimento de pesquisas com outras espécies plantas que possuem potencial inseticida, tais como os timbós dos gêneros *Derris* e *Deguelia*.

## 4. CAPÍTULO 1

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE TIMBÓ (*Derris scandes* Aubl. e *Deguelia floribundus* Benth.) EM ADULTOS DE *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae)

MANAUS  
2012

## RESUMO

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) possui grande importância econômica e social no Brasil e apresenta baixa produtividade devido ao ataque de diversas pragas, com destaque para a vaquinha da espécie *Cerotoma tingomarianus* Bechyné, que ocasiona danos à cultura desde a germinação até a colheita, resultando em grandes perdas de produção. O controle desta praga é realizado pelo uso indiscriminado de inseticidas convencionais. Extratos de plantas são fontes potenciais para o desenvolvimento de novos inseticidas, apresentando teoricamente menores riscos ao ambiente, aplicador e consumidor. Plantas de timbó dos gêneros *Derris* e *Deguelia* são amplamente encontradas na região Amazônica, possuem diversos compostos com propriedades tóxicas, sendo promissores para o desenvolvimento de novos inseticidas. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos biológicos de extratos de timbó (*Derris scandes* Aubl. e *Deguelia floribundus* Benth.) comparados à rotenona purificada sobre adultos de *C. tingomarianus*. Os extratos de timbó obtidos a quente de raízes de plantas coletadas nos estados do Acre e do Amazonas foram agrupados em seis grupos distintos (G1, G2, G3, G4, G5 e G6), de acordo com as suas características químicas e juntamente com a rotenona purificada foram avaliados por ingestão de folhas contaminadas, por contato tópico e por contato em superfície contaminada em adultos de *C. tingomarianus*. As concentrações utilizadas para os extratos variaram de 0,25% a 5% ( $\text{m v}^{-1}$ ) por ingestão de folhas contaminadas e de 5% a 40% ( $\text{m v}^{-1}$ ) por contato tópico e por contato em superfície contaminada. Para a rotenona purificada as concentrações variaram de 1% a 8% ( $\text{m v}^{-1}$ ) para todas as vias de intoxicação. Os experimentos foram repetidos por três vezes, com delineamento inteiramente casualizado, contendo pelo menos cinco tratamentos e quatro repetições. Foram avaliados os valores de mortalidade e de consumo foliar dos insetos, utilizando a análise de Probit para determinação das  $\text{CL}_{50}$  e  $\text{TL}_{50}$ . Os extratos de timbó e a rotenona purificada não apresentaram eficiência por contato em superfície contaminada. Por ingestão de folhas contaminadas e por contato tópico os extratos G3, G4, G5 e G6 e a rotenona purificada provocaram baixos valores de mortalidade e não inibiram a alimentação dos insetos, independente da concentração e da forma de exposição. Os maiores valores de mortalidade e de inibição do consumo foliar foram obtidos pela via de intoxicação por ingestão de folhas contaminadas, com destaque para o extrato de timbó G1 que apresentou valores de mortalidade superiores a 50% dos insetos ( $\text{CL}_{50}$  de  $6,3 \text{ mg mL}^{-1}$ , com  $\text{TL}_{50}$  de 102 horas) e inibiu a alimentação dos indivíduos em até 75%, apresentando elevada toxicidade para adultos de *C. tingomarianus*. As variações qualitativas e quantitativas dos constituintes dos extratos de timbó influenciaram decisivamente nos efeitos biológicos causados à adultos de *C. tingomarianus*, indicando que os elevados valores de mortalidade e de inibição da alimentação dos insetos são promovidos pela atuação conjunta dos constituintes presentes em extratos de timbó. O extrato G1 apresentou a composição química mais diversificada e ocasionou a maior toxicidade, sendo promissor para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos no controle de adultos de *C. tingomarianus*.

**Palavras Chave:** Inseticidas botânicos, controle alternativo, toxicidade, rotenona.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the biological effects of extracts of timbo (*Derris scandes* Aubl and *Deguelia floribundus* Benth.) compared with the purified rotenone on adults of *Cerotoma tingomariaus*. The extracts were obtained by hot extraction of dry material of plants collected in the states of Acre and Amazonas were grouped into six distinct groups (G1, G2, G3, G4, G5 and G6), according to their chemical characteristics and together with the purified rotenone were evaluated by ingestion of infected leaves, by topical contact and by contaminated surface. The concentrations used of the extracts ranged from 0.25% to 5% (v m<sup>-1</sup>) to the ingestion of infected leaves and from 5% to 40% (v m<sup>-1</sup>) to the contact topic and contaminated surface. For the purified rotenone the concentrations ranged from 1% to 8% (v m<sup>-1</sup>) for all means of intoxication. Trials were replicated three times, with a completely randomized design, containing at least five treatments and four replications. Were evaluated the values of mortality and leaf consumption of insects, through Probit analysis to determine the LC<sub>50</sub> and LT<sub>50</sub>. Timbo extracts and purified rotenone did not show efficiency by contaminated surface. By ingestion of infected leaves and by topical contact the G3, G4, G5 and G6, as well as the purified rotenone caused low levels of mortality and did not inhibit the feeding of insects, regardless of the concentration and form of exposure. The highest values of mortality and inhibition of leaf consumption were obtained by ingestion of infected leaves, with emphasis to G1 timbo extract that showed mortality values higher than 50% of insects (LC<sub>50</sub> of 6.3 mg mL<sup>-1</sup> with LT<sub>50</sub> 102 hours) and inhibit the feeding of up to 75% in individuals with a very high toxicity to adult *C. tingomarianus*. The qualitative and quantitative variations of the constituents of timbo extracts showed biological effects on the adults of *C. tingomarianus*, indicating that high values of mortality and inhibition of feeding insects are promoted by the combined action of the constituents present in timbo extract. The extract G1 has presented more varied chemical composition and has caused the greatest toxicity, being promising for the development of biotechnology products aiming the control of adult *C. tingomarianus*.

**Key Words:** Botanical insecticides, alternative control, toxicity, rotenone.

## 4.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão (*P. vulgaris*), com produção média anual estimada em 3,5 milhões de toneladas, sendo cultivado por pequenos, médios e grandes produtores, em diversificados sistemas de produção e em todas as regiões brasileiras, revestindo-se de grande importância econômica e social (MAPA, 2010; IBGE, 2012). Entre os diversos tipos de grãos do feijão-comum, merece destaque o tipo carioca, que representa 70% do mercado consumidor brasileiro (PELOSO e MELO, 2005).

Apesar de representar um papel fundamental na economia e na dieta da população brasileira, a produtividade do feijão-comum no Brasil é baixa, mesmo diante de técnicas de melhoramento empregadas na cultura (BERTOLDO et al., 2009), devido à diversos fatores, destacando-se entre eles a ocorrência de pragas, que causam danos à cultura desde a semeadura até após a colheita (VIEIRA et al., 2006; BOIÇA JUNIOR et al., 2008; JESÚS et al., 2011).

Entre as pragas de maior importância econômica para a cultura do feijoeiro no Brasil destacam-se os crisomelídeos do gênero *Cerotoma*, que atacam todas as estruturas das plantas e são responsáveis por grandes perdas de produção (SALAS et al., 1999; GALLO et al., 2002; TEIXEIRA e FRANCO, 2007).

Na região Amazônica, a espécie *C. tingomarianus* é considerada a principal praga da cultura do feijão-comum, por provocar desfolhamento severo nas plantas e reduzir a capacidade fotossintética, principalmente no período seco, que coincide com o maior pico populacional e os maiores danos ocasionado pela espécie, apesar da população dos indivíduos ocorrerem durante todo o ano (FAZOLIN e GOMES, 1993).

FAZOLIN e ESTRELA (2004) observaram para a cultura do feijão-comum, cultivar Pérola, decréscimos de produtividade de 34,4% com a ocorrência de 66% de desfolhamento na fase de florescimento das plantas. O nível populacional de *C. tingomarianus* que causa dano econômico é observado com frequência nas condições amazônicas.

A aplicação de defensivos químicos convencionais tem sido o método de controle predominante, com o agravante de existir apenas um inseticida registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA para o controle de adultos de *C. tingomarianus* via pulverização (MAPA, 2012), o que induz o uso inadequado e indiscriminado de produtos químicos convencionais pelos agricultores. MARTINEZ (2002) afirma que o controle químico da vaquinha no feijão-comum além de ecologicamente indesejável mostra-se insatisfatório.

Os extratos de timbó são promissores para o desenvolvimento de novos inseticidas (AZEVEDO et al., 2005; ALECIO et al., 2010; PENA, 2012) e estimularam a realização desta pesquisa, que teve como objetivo avaliar a atividade biológica de extratos de timbó (*Derris* e *Deguelia*) comparados à rotenona purificada sobre adultos de *C. tingomarianus*.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em dois Centros de Pesquisa da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, Centro de Pesquisa Agroflorestal, em Rio Branco/AC e Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza/CE e na Universidade Federal do Amazonas – Ufam, em Manaus/AM.

### 4.2.1 Coleta e processamento de raízes e estacas de timbó

No período de março de 2009 a julho de 2010 foram realizadas expedições a campo (autorização para coleta de material botânico, fungo e microbiológico no Cegen/Sisbio n.º. 13.464-2) para a coleta de raízes e estacas de timbó (Figura 7) em 29 (vinte e nove) localidades diferentes dos estados do Acre (Municípios de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Rodrigues Alves) e Amazonas (Municípios de Manaus e Guajará). Os locais de coleta das plantas mapeados e estão indicados na Figura 8.



Figura 7 – Raízes de timbó coletadas no Estado do Acre. Fotos: Alecio (2010).

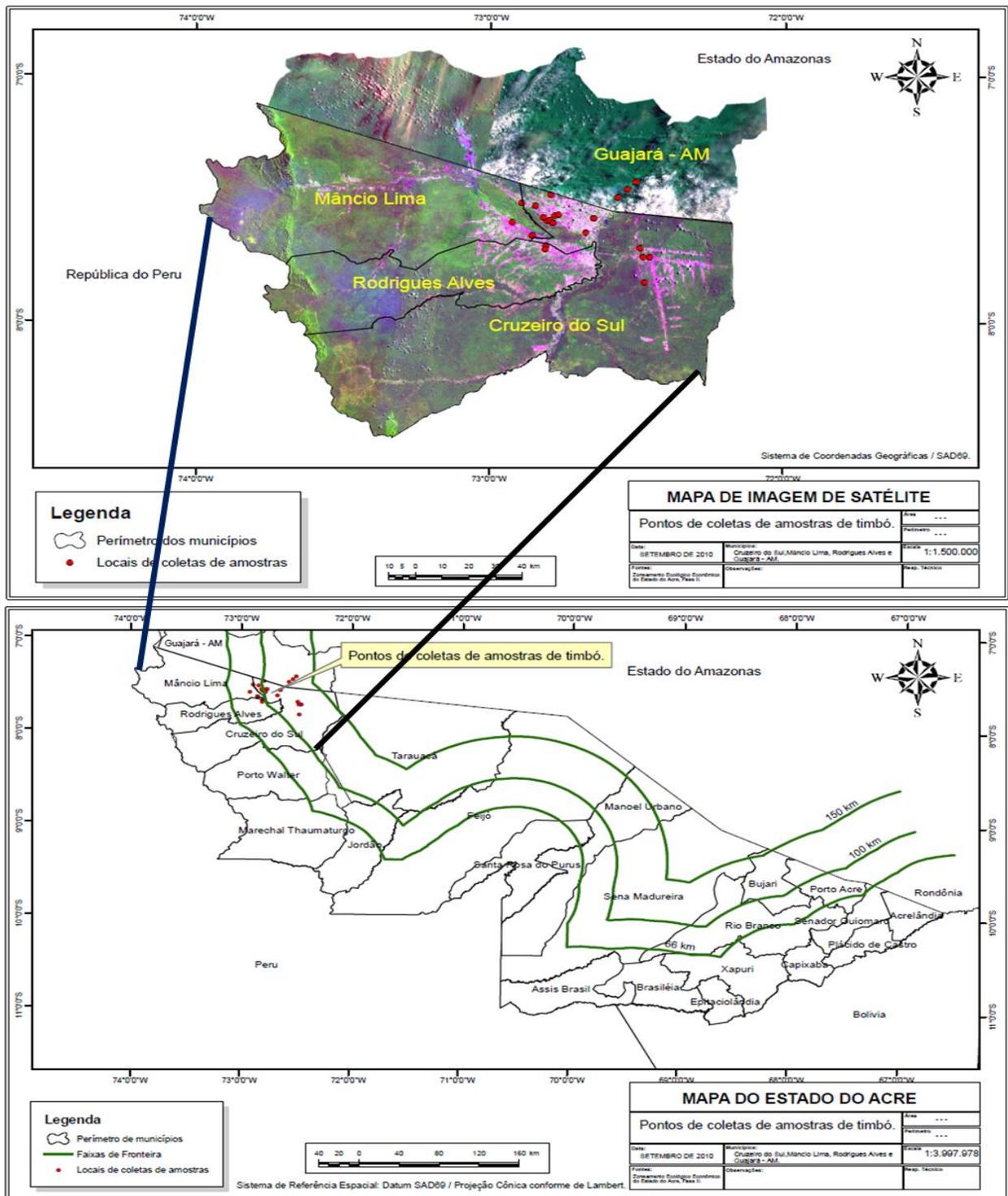


Figura 8 – Locais de coleta das amostras de raízes e estacas de timbó nos Estados do Acre e Amazonas.

O material vegetal coletado foi acondicionado em sacos plásticos e transportado ao Laboratório de Entomologia Agrícola da Embrapa Acre para processamento. As estacas foram plantadas em vasos (Figura 9A), contendo solo rico em matéria orgânica, mantidas com sombreamento parcial e irrigadas diariamente (Figura 9B). Após o brotamento das estacas e aclimação das mudas, o material propagativo foi transplantado em campo para montagem de uma coleção de trabalho (Figura 9C).



Figura 9 – Estacas de timbó plantadas em vasos contendo solo rico em matéria orgânica (A e B) e coleção de trabalho implantada no campo experimental da Embrapa Acre (C e D).  
Fotos: Alecio (2010; 2012).

As raízes dos timbós transportadas ao laboratório foram lavadas, reduzidas a pedaços menores, depositadas em bandejas plásticas (Figuras 10A) e secas em estufa com circulação de ar forçado à temperatura de 40 °C até atingir peso constante (Figura 10B). O material seco foi triturado em moinho tipo faca até ser reduzido à pó e acondicionado em sacos plásticos escuros para posterior obtenção dos extratos.



Figura 10 – Raízes dos timbós depositadas em bandejas plásticas (A) e processo de secagem em estufa com circulação de ar forçado (B). Fotos: Alecio (2010).

#### 4.2.2 Obtenção dos extratos brutos de timbó

Para definição do método de extração que proporcionasse os maiores rendimentos de extrato e de rotenona em relação à massa seca das raízes de timbó foram realizadas extrações preliminares, baseadas em estudos desenvolvidos por SAE-YUN et al. (2006) e D'ANDREA et al. (2007), com os métodos de extração por maceração, ultrassom e a quente. Em todos os métodos de extração foi utilizada a proporção de 20 g de pó de raízes secas de timbó para cada 100 mL de solvente (clorofórmio p. a. estabilizado com amileno).

Pelo método de maceração a frio, os extratos brutos foram obtidos utilizando frascos de vidro âmbar para acondicionar o pó de raízes e o solvente, que foram mantidos à temperatura ambiente ( $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ ) pelo período de sete dias. Por ultrassom os extratos brutos foram obtidos utilizando temperatura de  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  pelo período de três horas, subdivido em três intervalos de uma hora cada para realização de processos sucessivos de extração e filtragem. A extração à quente foi realizada com auxílio de um aquecedor provido de agitador magnético, para abrigar um balão

volumétrico com capacidade para 250 mL, contendo pó de raízes de timbó e o solvente mantidos em banho maria à temperatura de 40°C pelo período de quatro horas.

As luzes do laboratório foram parcialmente apagadas e os recipientes utilizados para obtenção dos extratos foram protegidos contra a incidência direta de luminosidade durante a realização de todas as extrações para evitar a fotodecomposição.

Os extratos brutos foram filtrados em funil de Buchner e levados ao evaporador rotativo para eliminação do solvente, utilizando temperatura de 40°C e vácuo entre 20 a 25 pol de Hg. Posteriormente, os extratos foram retirados dos balões volumétricos, acondicionados em recipientes de vidro âmbar e mantidos em ambiente refrigerado à temperatura média de 5°C.

Os extratos foram submetidos à análises em cromatógrafo líquido de alta eficiência – CLAE para determinação dos teores de rotenona, conforme metodologia descrita no item 4.2.3. Os rendimentos dos extratos e os teores de rotenona quantificados em relação à massa seca das raízes de timbó utilizadas (Tabela 1) não apresentaram diferença entre os métodos de extração. Por este motivo, devido à conveniência, rapidez e praticidade, o método de extração a quente foi selecionado para obtenção dos extratos. Além disso, devido à baixa disponibilidade de material vegetal de algumas amostras, foram selecionadas raízes de 17 (dezesete) plantas das 29 (vinte e nove) coletadas para obtenção dos extratos e realização de análises cromatográficas para definição das plantas a serem utilizadas nos bioensaios.

Tabela 1 – Rendimentos e teores de rotenona de extratos brutos de raízes de timbó obtidos por extração à frio (maceração), a quente e ultrasom.

Amostra	A frio (maceração)			A quente			Ultrasom		
	rendimento <sup>1</sup>	mg mg <sup>-2</sup>	g 100g <sup>-3</sup>	rendimento <sup>1</sup>	mg mg <sup>-2</sup>	g 100g <sup>-3</sup>	rendimento <sup>1</sup>	mg mg <sup>-2</sup>	g 100g <sup>-3</sup>
AM04CZS	39,27%	0,46	18,10	33,79%	0,47	15,92	36,16%	0,48	17,40
AM05CZS	35,11%	0,48	16,92	34,69%	0,48	16,58	32,57%	0,44	14,27
AM06CZS	43,01%	0,42	18,11	43,78%	0,42	18,30	43,72%	0,41	17,71
AM08CZS	22,46%	0,39	8,75	22,8%	0,41	9,26	23,34%	0,43	9,94
AM13RA	25,77%	0,35	9,05	25,64%	0,32	8,18	24,98%	0,39	9,69
AM09CZS	22,12%	0,46	10,13	23,89%	0,40	9,48	20,47%	0,43	8,80
AM11RA	24,1%	0,47	11,36	24,18%	0,47	11,39	23,64%	0,51	12,13
AM12RA	13,04%	0,42	5,52	17,58%	0,41	7,12	15,27%	0,45	6,93
AM15CZS	21,83%	0,29	4,98	25,32%	0,25	6,43	18,43%	0,28	5,25
AM16CZS	26,65%	0,41	10,82	23,83%	0,39	9,39	22,03%	0,39	8,66
AM18CZS	0,71%	0,12	0,08	0,85%	0,17	0,15	0,53%	0,08	0,04
AM20ML	16,89%	0,38	6,45	17,01%	0,37	6,35	17,36%	0,39	6,74
AM4MAO	8,52%	0,11	0,91	8,76%	0,11	0,94	8,84%	0,11	0,95

1. Rendimento do extrato (%) em relação à massa seca das raízes de timbó utilizadas; 2. mg de rotenona mg<sup>-1</sup> de extrato; 3. g de rotenona 100<sup>-1</sup> g de pó das raízes de timbó.

#### 4.2.3 Quantificação dos constituintes majoritários dos extratos brutos de timbó e seleção de plantas para os bioensaios

Os extratos obtidos à quente e em triplicata de raízes das plantas de timbó selecionadas, de acordo com o descrito no item 4.2.2, foram submetidos à análises cromatográficas em duplicata para quantificação dos constituintes majoritários.

As análises foram realizadas na Embrapa Agroindústria Tropical utilizando cromatógrafo líquido Varian, modelo ProStar, equipado com bomba de alta pressão LC-10ATVP, válvula de gradiente quaternário, degaseificador de membrana a vácuo, câmara de mistura para alta e baixa pressão, amostrador automático e detector de ultravioleta com fonte de deutério.

A coluna utilizada foi a de fase reversa C18 modelo Zorbax SB com 4.6x150mm, previamente lavada com acetonitrila (Merck-LiChrosolv<sup>®</sup>) a um fluxo constante de 1 mL min<sup>-1</sup> durante 30 minutos (Bomba B).

Foi utilizada como fase móvel as misturas de ácido fórmico e água ultrapura obtida em aparelho Millipore<sup>®</sup> (90:10 v v<sup>-1</sup> – Bomba A) e metanol e ácido fórmico (90:10 v v<sup>-1</sup> – Bomba B), a um fluxo constante de 1 mL min<sup>-1</sup> com o seguinte gradiente: de 0-10min (40-80% B) e de 10-30min (80%B). Antes de cada corrida o sistema foi estabilizado por 10 minutos com uma mistura de ácido fórmico e água na proporção de (90:10 v v<sup>-1</sup>).

Foram utilizados rotenona (Sigma Aldrich<sup>®</sup> ≥ 95% de pureza) e deguelina (Sigma Aldrich<sup>®</sup> ≥ 98%) para determinação das curvas padrão. Os demais constituintes majoritários dos extratos foram quantificados por normalização e integração da área dos picos. Os padrões de rotenona e deguelina utilizados e as amostras dos extratos de raízes de timbó foram preparados utilizando clorofórmio p.a. como solvente. Todas as amostras foram filtradas em membrana de 0.45um (13mm) e alíquotas de 20µl foram injetadas através do amostrador automático Varian 410 com tempo de corrida de 30 min, temperatura constante de 30 °C e detecção dos picos a 210 nm.

Os rendimentos dos extratos (Tabela 2) e de seus constituintes majoritários (Tabela 3 e Figuras 11A e 11B) apresentaram variações qualitativas e quantitativas em relação às amostras das plantas utilizadas. As plantas coletadas no Acre apresentaram maiores teores de rotenona e deguelina enquanto que, duas amostras provenientes do Amazonas (AM04MAO e AM26GUA) apresentam maior diversidade e grandes diferenças nos teores de seus constituintes quando comparadas às demais. Por este motivo, essas duas amostras foram previamente selecionadas e formaram os dois primeiros grupos de plantas utilizados para o desenvolvimento dos bioensaios.

Tabela 2 – Rendimento de extratos e teores dos constituintes majoritários em relação à massa seca de raízes de timbó utilizadas.

Item	Amostra	Rendimento do extrato <sup>1</sup>	Rendimento dos constituintes majoritários de extratos de timbó (g de constituinte 100g <sup>-1</sup> de raízes secas de timbó = %)									
			Rotenona	Deguelina	A <sup>2</sup>	B <sup>2</sup>	C <sup>2</sup>	D <sup>2</sup>	E <sup>2</sup>	F <sup>2</sup>	G <sup>2</sup>	H <sup>2</sup>
1	AM01ML <sup>3</sup>	26,76±1,33	10,59±0,53	14,39±0,71	0,16±0,01	0,48±0,02	1,13±0,06	-	-	-	-	-
2	AM02ML <sup>3</sup>	25,99±0,96	11,59±0,43	12,19±0,45	0,18±0,01	0,74±0,03	1,30±0,05	-	-	-	-	-
3	AM05CZS <sup>3</sup>	25,33±2,34	11,31±1,04	12,49±1,15	0,19±0,02	0,42±0,04	1,00±0,09	-	-	-	-	-
4	AM06CZS <sup>3</sup>	39,55±1,78	17,73±0,80	18,52±0,83	0,17±0,01	0,95±0,04	2,15±0,10	-	-	-	-	-
5	AM09RA <sup>3</sup>	26,55±1,80	11,25±0,76	13,41±0,91	0,16±0,01	0,49±0,03	1,23±0,08	-	-	-	-	-
6	AM11RA <sup>3</sup>	24,57±2,40	10,60±1,04	11,95±1,17	0,14±0,01	0,54±0,05	1,21±0,12	-	-	-	-	-
7	AM15CZS <sup>3</sup>	26,42±0,77	11,03±0,32	13,30±0,39	0,13±0,01	0,59±0,02	1,36±0,04	-	-	-	-	-
8	AM16CZS <sup>3</sup>	22,59±6,63	9,87±2,90	11,03±3,24	0,12±0,04	0,53±0,15	1,04±0,30	-	-	-	-	-
9	AM18CZS <sup>3</sup>	1,06±0,23	0,46±0,10	0,48±0,10	0,01±0,01	0,05±0,01	0,07±0,02	-	-	-	-	-
10	AM21ML <sup>3</sup>	23,59±2,71	11,58±1,33	10,81±1,24	0,12±0,01	0,37±0,04	0,74±0,09	-	-	-	-	-
11	AM22CZS <sup>3</sup>	46,86±2,44	18,31±0,95	26,01±1,36	0,37±0,02	0,56±0,03	1,61±0,08	-	-	-	-	-
12	AM23CZS <sup>3</sup>	30,41±0,51	13,78±0,23	15,20±0,26	0,16±0,01	0,35±0,01	0,91±0,02	-	-	-	-	-
13	AM24GUA <sup>4</sup>	24,24±2,22	10,54±0,97	10,74±0,98	0,11±0,01	1,19±0,11	1,66±0,15	-	-	-	-	-
14	AM25GUA <sup>4</sup>	23,46±4,68	9,91±1,97	11,70±2,33	0,19±0,04	0,52±0,10	1,12±0,22	-	-	-	-	-
15	AM27CZS <sup>3</sup>	32,06±2,82	14,10±1,24	15,58±1,37	0,22±0,02	0,72±0,06	1,42±0,13	-	-	-	-	-
16	AM26GUA <sup>4</sup>	3,33±0,38	0,30±0,03	0,28±0,03	-	0,10±0,01	0,02±0,00	0,24±0,03	-	-	2,12±0,24	0,10±0,01
17	AM04MAO <sup>4</sup>	10,70±1,30	1,25±0,13	0,07±0,01	0,15±0,02	0,07±0,01	0,01±0,00	0,04±0,00	1,48±0,16	0,69±0,07	5,29±0,56	-

1. g de extrato 100g<sup>-1</sup> de raízes secas de timbó; 2. Constituintes desconhecidos presentes em extratos de raízes de timbó; 3. Amostras de timbó coletadas no Estado do Acre; 4. Amostras de timbó coletadas no Estado do Amazonas.

Tabela 3 – Quantificação dos constituintes majoritários de extratos de raízes de timbó coletadas nos Estados do Acre e Amazonas.

Item	Amostra	Constituintes majoritários de extratos de raízes de timbó obtidos a quente (g do constituinte 100g <sup>-1</sup> de extrato = %)									
		Rotenona	Deguelina	A <sup>1</sup>	B <sup>1</sup>	C <sup>1</sup>	D <sup>1</sup>	E <sup>1</sup>	F <sup>1</sup>	G <sup>1</sup>	H <sup>1</sup>
1	AM01ML <sup>2</sup>	39,56±1,19	53,77±0,89	0,61±0,14	1,79±0,87	4,23±1,00	-	-	-	-	-
2	AM02ML <sup>2</sup>	44,57±0,80	46,89±0,70	0,70±0,14	2,84±0,45	5,00±1,06	-	-	-	-	-
3	AM05CZS <sup>2</sup>	44,46±0,89	49,09±0,46	0,74±0,08	1,63±0,46	3,94±0,46	-	-	-	-	-
4	AM06CZS <sup>2</sup>	44,83±0,51	46,84±0,42	0,43±0,10	2,41±0,32	5,43±0,25	-	-	-	-	-
5	AM09RA <sup>2</sup>	42,39±0,20	50,52±0,56	0,59±0,12	1,85±0,29	4,64±0,32	-	-	-	-	-
6	AM11RA <sup>2</sup>	43,15±0,96	48,65±0,64	0,57±0,15	2,20±0,37	4,94±0,43	-	-	-	-	-
7	AM15CZS <sup>2</sup>	41,74±2,51	50,34±2,58	0,49±0,08	2,24±0,39	5,13±0,34	-	-	-	-	-
8	AM16CZS <sup>2</sup>	43,70±3,16	48,82±2,29	0,53±0,19	2,33±0,29	4,60±1,14	-	-	-	-	-
9	AM18CZS <sup>2</sup>	43,14±0,62	45,10±2,03	0,58±0,22	4,33±0,80	6,80±1,14	-	-	-	-	-
10	AM21ML <sup>2</sup>	49,10±0,17	45,84±0,36	0,51±0,18	1,55±0,04	3,15±0,60	-	-	-	-	-
11	AM22CZS <sup>2</sup>	39,08±0,37	55,50±0,52	0,78±0,07	1,19±0,18	3,43±0,39	-	-	-	-	-
12	AM23CZS <sup>2</sup>	45,30±0,48	49,99±0,65	0,54±0,16	1,15±0,11	2,99±0,52	-	-	-	-	-
13	AM24GUA <sup>3</sup>	43,49±0,60	44,29±0,52	0,43±0,12	4,92±0,38	6,86±0,25	-	-	-	-	-
14	AM25GUA <sup>3</sup>	42,24±0,77	49,89±0,60	0,80±0,06	2,22±0,20	4,78±0,48	-	-	-	-	-
15	AM27CZS <sup>2</sup>	43,98±0,29	48,60±0,65	0,67±0,12	2,26±0,16	4,44±0,62	-	-	-	-	-
16	AM26GUA <sup>3</sup>	8,99±0,70	8,43±0,91	0,04±0,02	3,00±0,15	0,63±0,18	7,32±0,97	0,11±0,05	0,08±0,01	63,62±4,75	2,94±1,38
17	AM04MAO <sup>3</sup>	11,71±2,36	0,67±0,61	1,37±0,34	0,63±0,17	0,07±0,05	0,37±0,43	13,85±2,09	6,46±0,93	49,41±7,56	-

1. Constituintes desconhecidos presentes em extratos de raízes de timbó; 2. Amostras de timbó coletadas no Estado do Acre; 3. Amostras de timbó coletadas no Estado do Amazonas.

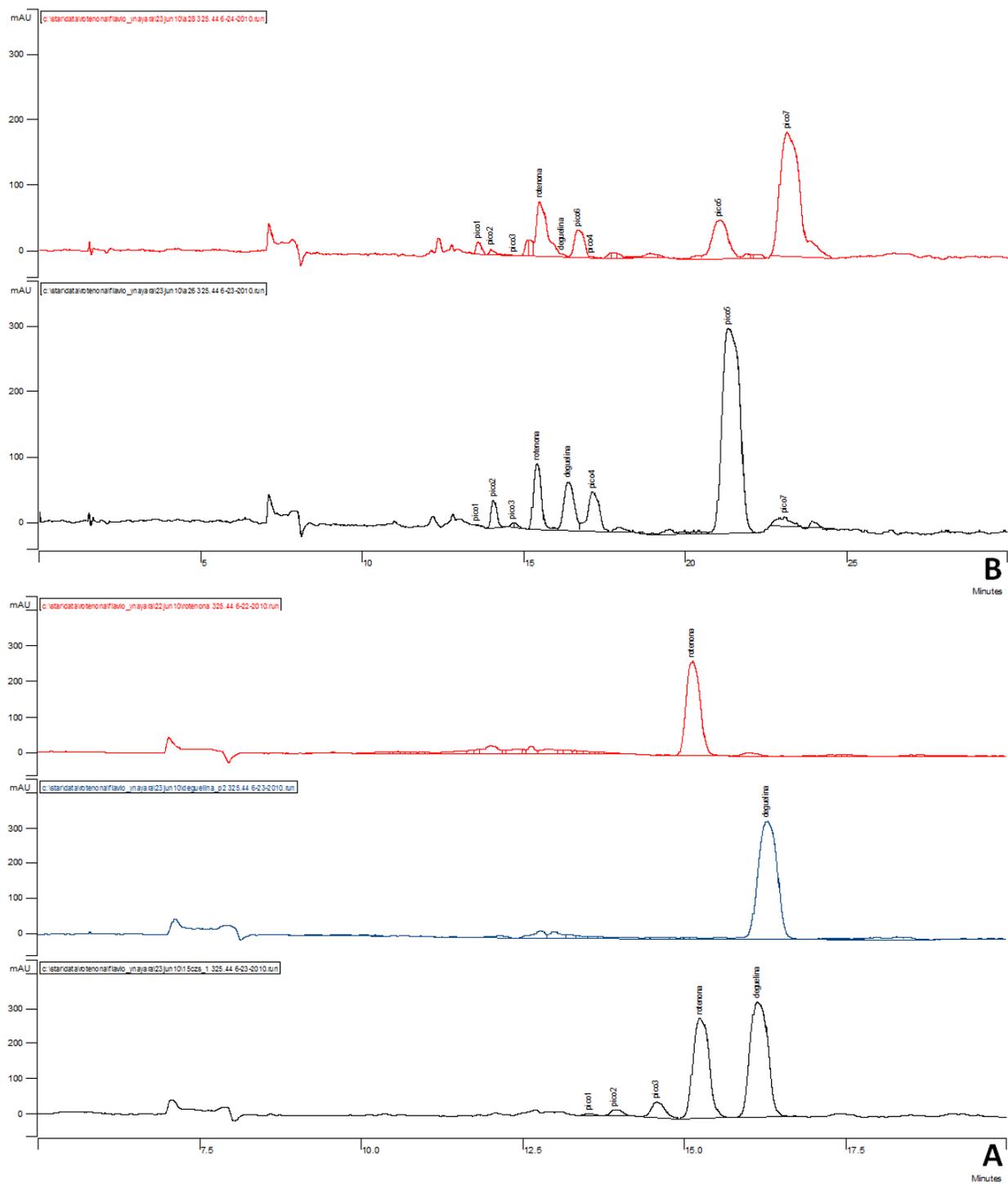


Figura 11 – Cromatogramas de extratos de raízes de timbó coletados nos Estados do Acre (A) e do Amazonas (B).

Tabela 4 – Grupos de plantas de timbó coletadas nos Estados do Acre e Amazonas selecionados para obtenção dos extratos e realização dos bioensaios sobre lagartas de *S. frugiperda* e adultos de *C. tingomarianus* por ingestão alimentar, contato tópico e contato em superfície contaminada.

Grupo (G) de extrato	Amostra	Espécie	Local de coleta
G1	AM26GUA	<i>Derris scandens</i> Aubl.	Guajará/AM
G2	AM04MAO	<i>Deguelia floribundus</i> Benth.	Manaus/AM
G3	AM21ML	<i>Derris scandens</i> Aubl.	Mâncio Lima/AC
G4	AM22CZS	<i>Derris scandens</i> Aubl.	Cruzeiro do Sul/AC
G5	AM24GUA	<i>Derris scandens</i> Aubl.	Guajará/AM
G6	AM 02 ML	<i>Derris scandens</i> Aubl.	Mâncio Lima/AC
	AM06CZS*	<i>Derris scandens</i> Aubl.	Cruzeiro do Sul/AC
	AM15CZS**	<i>Derris scandens</i> Aubl.	Cruzeiro do Sul/AC
	AM25GUA**	<i>Derris scandens</i> Aubl.	Guajará/AM
	AM27CZS***	<i>Derris scandens</i> Aubl.	Cruzeiro do Sul/AC

\* Avaliado somente por contato tópico para *S. frugiperda*; \*\* Avaliado somente por ingestão de dieta contaminada para *S. frugiperda*; \*\*\*Avaliado somente para *C. tingomarianus*.

Os valores dos teores dos constituintes majoritários dos extratos das amostras das plantas remanescentes foram submetidos à análise multivariada pelo método de agrupamento de Tocher (Rao, 1952), utilizando a distância generalizada de Mahalanobis ( $D^2$ ) como medida de dispersão de dissimilaridade. A análise agrupou os extratos em quatro grupos distintos, que juntamente com os dois grupos previamente definidos formaram os seis grupos de plantas (G1, G2, G3, G4, G5 e G6) selecionados para as avaliações toxicológicas (Tabela 4). A dispersão dos escores dos quatros últimos grupos formados foram avaliados pela técnica das variáveis canônicas e podem ser visualizados na Figura 12.

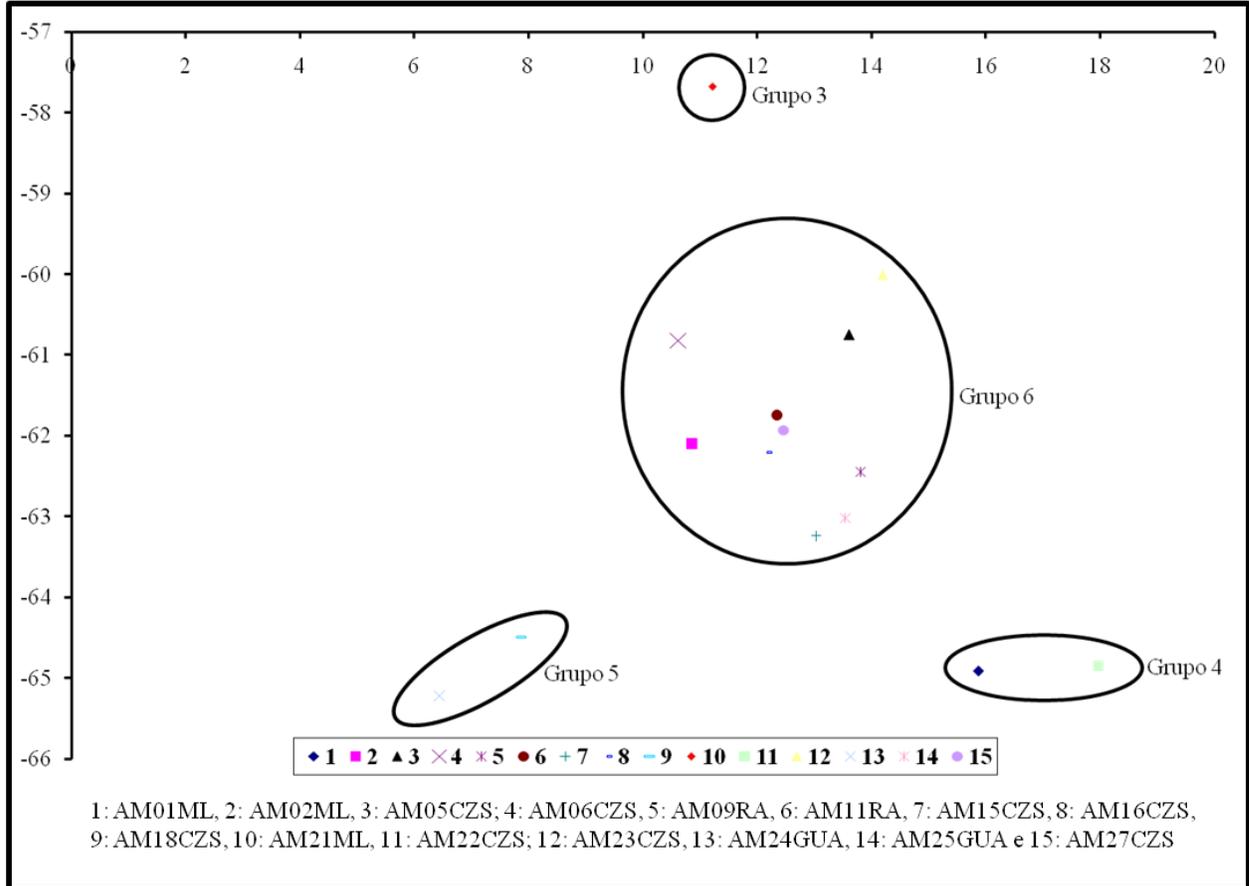


Figura 12 – Dispersão gráfica dos escores da variável canônica relativo aos grupos estabelecidos pelo método de agrupamento de Tocher.

#### 4.2.4 Desenvolvimento dos bioensaios

Os bioensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Entomologia da Embrapa Acre para avaliar os efeitos biológicos de extratos brutos de timbó sobre adultos de *C. tingomarianus* comparados à rotenona purificada (Sigma Aldrich®  $\geq 95\%$  de pureza) pelas vias de intoxicação de contato em superfície contaminada (papel-filtro), contato tópico e por ingestão de folhas contaminadas.

Para todos os experimentos foram utilizados adultos de *C. tingomarianus* não sexados coletados em campo com rede entomológica, em áreas cultivadas com feijão-comum (Cultivar Pérola) sem tratamentos fitossanitários, e padronizados de acordo com o tamanho ( $5 \pm 1$  mm).

As concentrações e os volumes dos produtos utilizados (extratos de timbó e rotenona purificada) para realização dos bioensaios, bem como o número de insetos por placa de Petri, tempo de congelamento para paralisação dos movimentos de *C. tingomarianus* e o tempo de duração para avaliação dos experimentos foram determinados por meio da realização de testes preliminares segundo as três formas de exposição dos insetos, conforme metodologia descrita nos itens 4.2.4.1, 4.2.4.2 e 4.2.4.3. Foram utilizados como solventes a acetona p.a. para os efeitos de contato tópico e de contato em superfície contaminada e o álcool etílico p.a. 50% para a via de ingestão de folhas contaminadas.

As folhas de feijão-comum utilizadas para o desenvolvimento dos bioensaios foram padronizadas de acordo com o tamanho ( $7,0 \pm 1,0$  cm de comprimento) e coloração (verde claro), sendo previamente mergulhadas por dois segundos em hipoclorito de sódio a 1% ( $v v^{-1}$ ) e em água destilada, com a finalidade de eliminar a poeira, microorganismos indesejáveis e o hipoclorito residual. Todos os bioensaios foram desenvolvidos em câmaras climatizadas tipo B.O.D., a temperatura de  $25 \pm 3$  °C, fotofase de 12 horas e umidade relativa de  $65 \pm 5\%$ .

#### **4.2.4.1 Contato em superfície contaminada (papel-filtro)**

Discos de papel-filtro de 7 cm de diâmetro foram impregnados com 0,5 mL das diferentes concentrações dos produtos (extratos de timbó e rotenona purificada) e mantidos em câmara de fluxo laminar por cerca de 2 minutos para eliminação do solvente. Em seguida foram colocados

em placas de Petri e infestados com dez adultos de *C. tingomarianus*, que permaneceram sem alimentação durante o bioensaio, constituindo uma parcela experimental (Figura 13). Os experimentos tiveram duração de dois dias (48 horas) e foram repetidos por três vezes, com delineamento inteiramente casualizado e quatro repetições, sendo avaliada a mortalidade dos indivíduos com 24 e 48 horas.

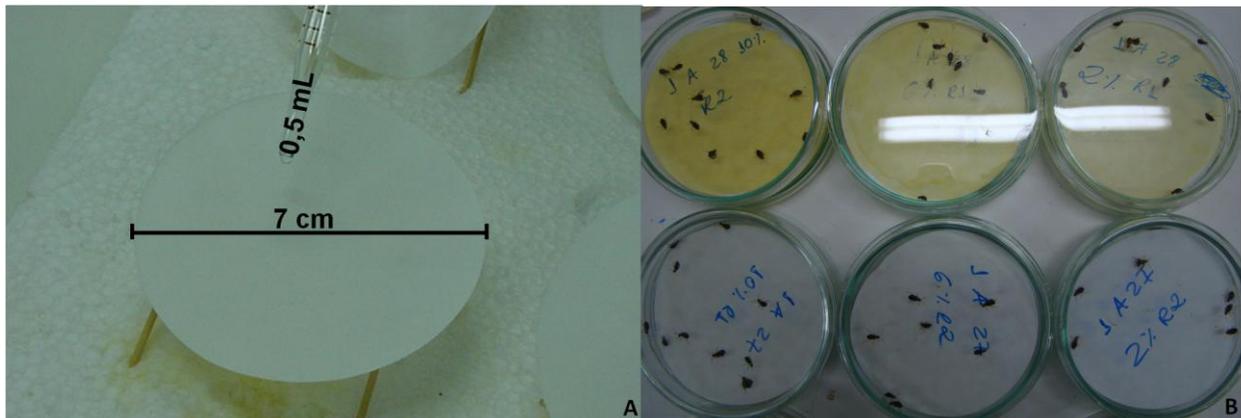


Figura 13 – Impregnação de papel-filtro em diferentes concentrações de extratos de timbó e de rotenona (A) e placas de Petri com dez vaquinhas adultas (B). Fotos: Alecio (2010).

#### 4.2.4.2 Contato tópico

Adultos de *C. tingomarianus* foram imobilizados por congelamento em freezer (-16 °C) por três minutos e receberam 1µl das diferentes concentrações dos extratos de timbó e de rotenona purificada na face ventral do pronoto, utilizando para essa aplicação uma micro-seringa graduada com capacidade para 10µl. No tratamento controle foi aplicado em cada inseto apenas o solvente (acetona). Em cada placa de Petri foram mantidos dez insetos adultos, que receberam como alimento a cada 48 horas uma folha de feijão-comum livre de contaminantes químicos (Figura 14). Os experimentos tiveram duração de seis dias, sendo avaliada a mortalidade dos insetos com intervalos de 24 horas.

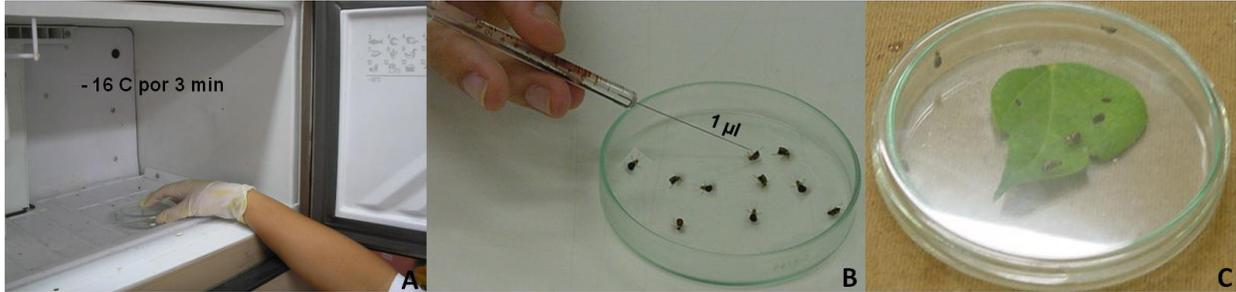


Figura 14 – Imobilização dos insetos por congelamento em freezer (A); aplicação tópica dos produtos na face ventral dos indivíduos (B) e placa de Petri com folha de feijão e dez adultos de *C. tingomarianus* (C). Fotos: Alecio (2010).

O consumo foliar médio de folhas de feijão provocado pelos insetos sobreviventes foi avaliado com intervalos de 48 horas durante os seis dias de duração dos experimentos, por meio da medição da área foliar remanescente, utilizando o Programa Quant 1.0 (VALLE et al., 2003). As folhas consumidas pelos insetos foram coladas em papel branco no tamanho A4, recortadas, escaneadas com resolução de 300 dpi e com fundo azul, sendo gravadas no formato tif (Figura 15A) para processamento. Cada imagem contendo uma folha foi processada no Programa Quant 1.0 por meio dos procedimentos sucessivos de substituição de cores por seleção e amostragem (Figura 15B), filtro mediana (Figura 15C), redução para cinco cores (Figura 15D) e resultados (Figura 15E). A imagem binarizada de cada folha permitiu a determinação da área foliar consumida pelos insetos com seus respectivos valores de consumo em  $\text{cm}^2$ .

As parcelas experimentais, o número de repetições e o delineamento estatístico seguiram a metodologia descrita no item 4.2.4.1.

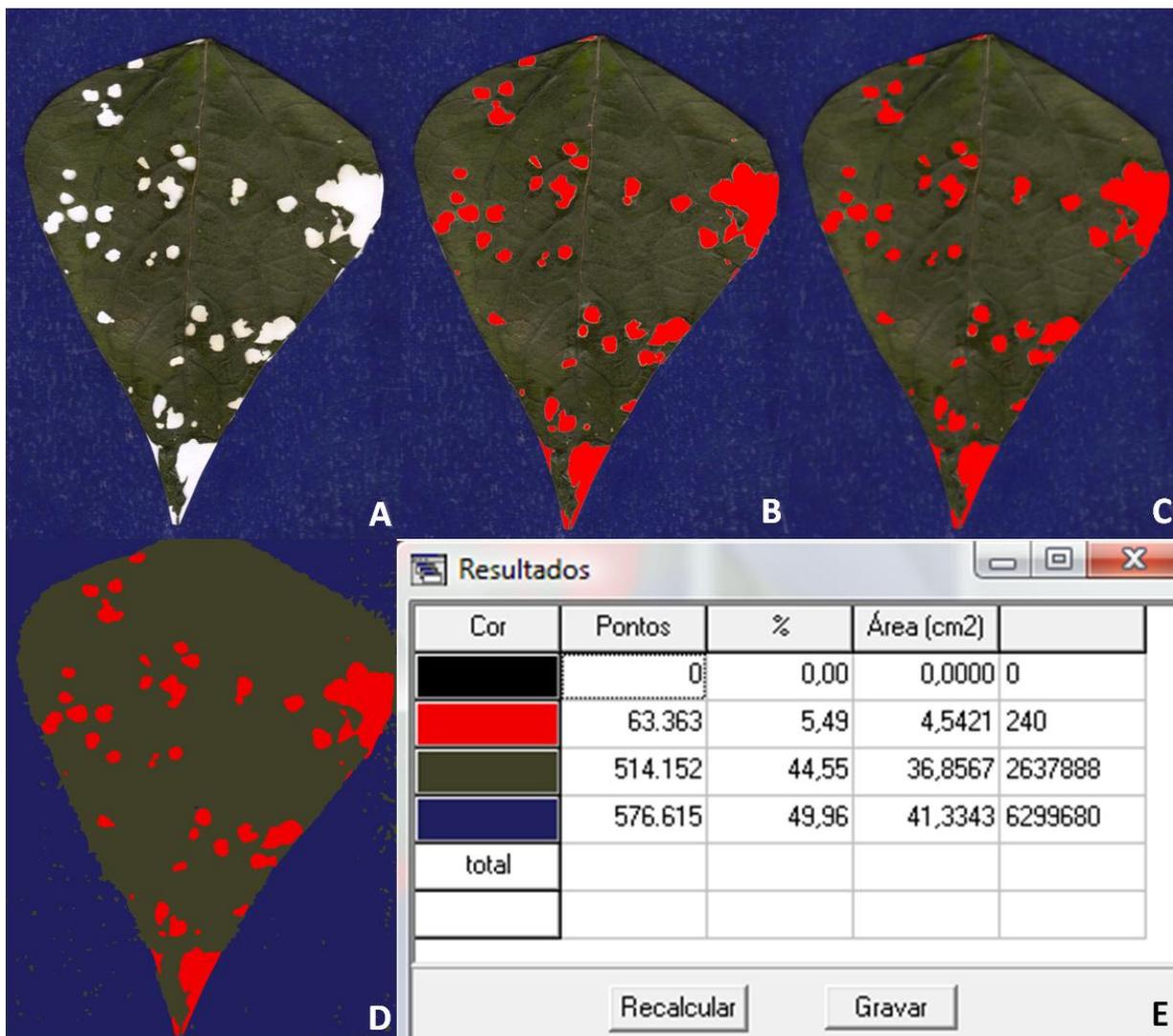


Figura 15 – Etapas do processamento de imagens para o cálculo do consumo foliar de adultos de *C. tingomarianus* em folhas feijão (Cultivar Perola) no Programa Quant 1.0. Folha escaneada com resolução de 300 dpi (A), substituição de cores (B), filtro mediana (C), redução de cores (D) e resultado do processamento (E). Fotos: Alecio (2010).

#### 4.2.4.3 Ingestão de folhas contaminadas

Folhas de feijão-comum livres de contaminantes químicos foram mergulhadas em 5 mL das diferentes concentrações dos extratos de raízes de timbó e da rotenona purificada (Figura 16A) e depositadas sobre papel toalha para volatilização do solvente (álcool etílico p.a. 50%)

(Figura 16B) pelo período de cinco minutos. No tratamento controle as folhas foram mergulhadas apenas no solvente.

As folhas de feijão-comum contaminadas foram transferidas individualmente para caixas tipo gerbox de 121 cm<sup>2</sup>, contendo no fundo gesso previamente umedecido para evitar o ressecamento das folhas. Cada caixa foi infestada com cinco adultos de *C. tingomarianus* (Figura 16C) e mantida em câmara climatizada (Figura 16D), constituindo uma parcela experimental. As folhas de feijão de todas as placas foram substituídas por outras igualmente tratadas a cada 48 horas de duração dos experimentos.



Figura 16 – Folhas de feijão mergulhadas nas diferentes concentrações dos produtos (A), depositadas sobre papel toalha para eliminação do solvente (B), transferidas para placa gerbox e infestadas com cinco insetos adultos (C) e mantidas em câmara climatizada (D). Fotos: Alecio (2010).

Foi adotado o mesmo procedimento experimental utilizado para avaliação do efeito por contato com superfície contaminada, descrito no item 4.2.4.1, sendo avaliada a mortalidade e o consumo foliar dos insetos a cada 24 e 48 horas, respectivamente, durante os dez dias de duração dos bioensaios. O consumo foliar médio dos insetos sobreviventes foi determinado seguindo-se a mesma metodologia utilizada para avaliação do efeito por contato tópico, descrito no item 4.2.4.2.

#### **4.2.4.4 Determinação das concentrações dos produtos utilizadas nos bioensaios**

Para determinação das concentrações dos produtos utilizadas nos experimentos foram realizados bioensaios preliminares de acordo com a metodologia descrita nos itens 4.2.4.1, 4.2.4.2 e 4.2.4.3, com objetivo de se obter uma ampla faixa resposta de mortalidade dos insetos quando possível, ou seja, determinar quais as concentrações indicadas dos extratos de raízes de timbó e de rotenona purificada que provocavam baixa (próximo a 0%) e alta (próximo a 100%) mortalidade de adultos de *C. tingomarianus*, segundo as três formas de exposição dos insetos.

Para isso, os extratos de raízes de timbó dos seis grupos de plantas selecionadas (Tabela 4) e a rotenona purificada, em concentrações que variaram de 0 a 40% (m v<sup>-1</sup>), foram diluídos em acetona p.a. para os bioensaios de contato em superfície contaminada (papel-filtro) e por contato tópico e em álcool etílico p.a. 50% para a via de intoxicação de ingestão de folhas contaminadas.

Os produtos não provocaram mortalidade de adultos de *C. tingomarianus* durante os testes preliminares por contato em superfície contaminada, não sendo possível a obtenção da ampla faixa resposta de mortalidade nesta via de intoxicação. Dentro da ampla faixa de resposta de mortalidade obtida por ingestão de folhas contaminada e por contato tópico foram definidas as concentrações dos extratos de raízes de timbó e da rotenona purificada utilizadas para realização dos bioensaios definitivos (Tabela 5).

Tabela 5 – Concentrações de extratos de raízes de timbó e de rotenona determinadas para realização dos bioensaios por contato tópico e por ingestão de folhas contaminadas.

Produto	Forma de exposição dos produtos aos insetos	Solvente	Nº. de tratamentos	Concentrações (m v <sup>-1</sup> )
Extratos de raízes de timbó	Contato tópico	Acetona p.a.	06	0% (controle), 5%, 10%, 20%, 30% e 40%
	Ingestão de folhas contaminadas	Álcool etílico p.a. 50%	06	0% (controle), 1%, 2%, 3%, 4% e 5%.
Rotenona purificada Sigma Aldrich® 95%	Contato tópico	Acetona p.a.	06	0% (controle), 1%, 2%, 4%, 6% e 8%
	Ingestão de folhas contaminadas	Álcool etílico p.a. 50%		

Nota: Foram incluídas as concentrações de 0,25%, 0,50% e 0,75% (m v<sup>-1</sup>) para o extrato de raízes de *D. scandens* (AM26GUA) integrante do Grupo 1 (G1) avaliado por ingestão de folhas contaminadas, que passou a conter 9 tratamentos, em função de elevados valores de mortalidade provocados nesta faixa de concentrações.

#### 4.2.4.5 Análise dos dados

Os valores de mortalidade dos insetos foram corrigidos pela mortalidade natural da testemunha, utilizando a fórmula de ABBOTT (1925). Quando os níveis de mortalidade, devido ao efeito dos produtos, atingiram valores superiores a 50% do total de insetos avaliados foram submetidos à análise de Probit, de acordo com a metodologia descrita por FINNEY (1971), utilizando-se o programa de análises estatísticas SAS (SAS INSTITUTE, 2001), para a determinação das concentrações (CL<sub>50</sub>), doses (DL<sub>50</sub>) e tempos letais (TL<sub>50</sub>).

Os valores de consumo foliar dos insetos foram corrigidos pelos desvios padrão médios dos tratamentos controle (testemunhas), para uniformização dos dados, sendo submetidos à análise conjunta de variância, agrupando-se as médias dos tratamentos pelo teste de SCOTT-KNOTT (1974) (P≤0,05).

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos de raízes de timbó dos seis grupos de plantas selecionadas (Tabela 4) e a rotenona purificada, avaliados por contato em superfície contaminada (papel-filtro), não provocaram mortalidade de adultos de *C. tingomarianus* durante a realização dos bioensaios preliminares e, por este motivo, os experimentos definitivos não foram realizados por esta via de intoxicação.

#### 4.3.1 Efeitos dos extratos de timbó comparados à rotenona purificada sobre a mortalidade de adultos de *C. tingomarianus*.

A mortalidade de adultos de *C. tingomarianus* permaneceu abaixo de 13% para todos os extratos dos seis grupos de timbó e de 19% para a rotenona purificada por contato tópico, com valores de mortalidade insignificantes ou nulos nas menores concentrações dos produtos (Tabela 6). Nesta via de intoxicação, o extrato G2 provocou mortalidade de *C. tingomarianus* somente nas primeiras 48 horas de avaliação dos experimentos, diferentemente dos demais produtos avaliados, uma vez que os extratos G3 e G4 apresentaram mortalidades distribuídas ao longo do período de avaliação dos bioensaios e os extratos G1, G5 e G6 concentraram suas mortalidades nas últimas 48 horas de duração dos experimentos (96 a 144 h) (Tabela 6).

Em relação aos bioensaios por ingestão de folhas contaminadas, o extrato G1 promoveu os maiores índices de mortalidade, merecendo destaque as concentrações de 0,75% e 1% (m.v<sup>-1</sup>) que ocasionaram 46% e 87% de mortalidade de *C. tingomarianus*, respectivamente. O extrato G4 provocou mortalidade inferior a 13%, ao passo que os extratos G2, G3, G5 e G6, bem como a rotenona purificada, provocaram valores de mortalidade entre 13% e 30% (Tabela 7).

Tabela 6 – Mortalidade de adultos de *C. tingomarianus* submetidos aos extratos de raízes dos seis grupos de timbó e à rotenona purificada por contato tópico.

Mortalidade média e desvio padrão (%)																	
Trat (T)	Concentração de extratos (m v <sup>-1</sup> )	G1* AM26GUA				G2* AM04MAO				G3* AM21ML				G4* AM22CZS			
		48 h	96 h	144 h	TOTAL	48 h	96 h	144 h	TOTAL	48 h	96 h	144 h	TOTAL	48 h	96 h	144 h	TOTAL
T1	0%	0,0	0,0	0,0	0,0±0,0	0,0	0,0	0,0	0,0±0,0	0,0	0,0	0,0	0,0±0,0	0,0	0,0	0,0	0,0±0,0
T2	5%	0,0	0,0	1,3	1,3±3,5	0,0	0,0	0,0	0,0±0,0	0,0	0,0	1,3	1,3±3,5	0,2	0,0	1,0	1,3±3,5
T3	10%	0,5	0,0	2,0	2,5±4,6	5,0	0,0	0,0	5,0±5,3	0,9	0,0	2,8	3,8±5,2	1,6	0,5	0,7	2,8±5,1
T4	20%	0,6	0,0	1,9	2,5±4,6	3,8	0,0	0,0	3,8±7,4	1,0	9,4	0,0	10,4±18	1,1	0,4	1,1	2,6±4,9
T5	30%	1,4	0,0	2,3	3,7±5,2	3,8	0,0	0,0	3,8±7,4	2,0	3,0	5,0	10,0±12	1,2	0,8	0,8	2,8±5,1
T6	40%	1,4	0,0	3,6	5,0±5,4	7,5	0,0	0,0	7,5±8,9	3,5	1,8	3,5	8,8±8,3	0,0	1,7	2,3	4,0±5,6

\*G1: Grupo 1 (*D. scandens* - AM26GUA); G2: Grupo 2 (*D. floribundus* - AM04MAO); G3: Grupo 3 (*D. scandens* - AM21ML); Trat.: Tratamento (T).

Tabela 6 – Mortalidade de adultos de *C. tingomarianus* (continuação...).

Mortalidade média e desvio padrão (%)																		
Trat (T)	Concentração de extratos (m v <sup>-1</sup> )	G5* AM24GUA				G6* AM 02 ML				G6* AM27CZS				Rotenona purificada				
		48 h	96 h	144 h	TOTAL	48 h	96 h	144 h	TOTAL	48 h	96 h	144 h	TOTAL	Concentração (m v <sup>-1</sup> )	48 h	96 h	144 h	TOTAL
T1	0%	0,0	0,0	0,0	0,0±0,0	0,0	0,0	0,0	0,0±0,0	0,0	0,0	0,0	0,0±0,0	0%	0,0	0,0	0,0	0,0±0,0
T2	5%	0,0	0,0	0,0	0,0±0,0	0,0	1,3	0,0	1,3±3,5	0,9	0,0	2,8	3,8±5,2	1%	2,5	1,7	0,0	4,2±5,1
T3	10%	0,0	0,0	0,0	0,0±0,0	0,0	0,9	0,3	1,3±3,5	1,3	0,0	5,0	6,3±5,2	2%	1,3	4,5	0,0	5,8±5,1
T4	20%	0,0	0,0	2,5	2,5±7,1	0,0	0,9	4,3	5,1±5,5	2,5	2,5	5,0	10,0±5,3	4%	2,5	5,0	2,5	10,0±6,0
T5	30%	0,0	0,0	6,3	6,3±7,4	0,0	2,7	6,3	9,0±6,5	2,5	3,8	5,0	11,3±6,4	6%	2,5	7,5	2,5	12,5±4,5
T6	40%	0,0	0,0	10,0	10,0±10	0,0	3,7	5,2	8,9±8,4	1,3	1,3	10,0	12,5±4,6	8%	6,3	10,0	2,0	18,3±5,8

\* G4: Grupo 4 (*D. scandens* - AM22CZS); G5: Grupo 5 (*D. scandens* - AM24GUA); G6: Grupo 6 (*D. scandens* - AM02ML e AM27CZS); Trat.: Tratamento (T).

Tabela 7 – Mortalidade de adultos de *C. tingomarianus* submetidos aos extratos de raízes dos seis grupos de timbó e à rotenona purificada por ingestão de folhas contaminadas.

Mortalidade média e desvio padrão (%)																			
Trat (T)	Concentração de extratos (m v <sup>-1</sup> )	G1* AM26GUA						G2* AM04MAO						G3* AM21ML					
		48 h	96 h	144 h	192 h	240 h	TOTAL	48 h	96 h	144 h	192 h	240 h	TOTAL	48 h	96 h	144 h	192 h	240 h	TOTAL
T1	0%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0±0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0±0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0±0,0
T2	0,25%	1,8	2,7	3,6	5,4	3,6	17,2±4,8	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
T3	0,5%	4,2	5,2	5,2	6,2	7,3	28,1±7,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
T4	0,75%	5,7	9,1	5,7	13,7	11,4	45,7±5,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
T5	1%	5,0	24,8	47,1	6,2	5,0	87,9±6,7	0,0	0,0	2,4	5,6	2,4	10,4±5,9	1,6	0,0	2,1	0,0	0,5	4,2±4,6
T6	2%	3,2	4,3	4,3	11,8	7,5	31,1±9,8	0,8	0,0	2,4	6,4	4,8	14,3±8,3	1,4	0,0	2,1	2,1	4,2	9,7±9,8
T7	3%	0,7	2,0	3,3	1,3	0,7	7,9±7,2	0,9	0,0	6,3	8,2	4,5	19,9±7,3	2,1	0,0	3,5	2,1	0,7	8,3±6,2
T8	4%	0,7	0,7	2,0	2,7	0,7	6,8±9,9	1,0	0,0	6,8	6,8	7,8	22,3±15	2,4	0,0	3,0	1,2	1,8	8,3±6,8
T9	5%	0,0	2,0	2,0	2,6	0,0	6,5±9,6	0,0	0,0	4,0	13,0	10,0	27,0±7,7	10,8	0,0	9,8	7,8	1,0	29,3±10

\*G1: Grupo 1 (*D. scandens* - AM26GUA); G2: Grupo 2 (*D. floribundus* - AM04MAO); G3: Grupo 3 (*D. scandens* - AM21ML); Trat.: Tratamento (T); NA: Não avaliada.

Tabela 7 – Mortalidade de adultos de *C. tingomarianus* (continuação...).

Mortalidade média e desvio padrão (%)																			
Trat (T)	Concentração de extratos (m v <sup>-1</sup> )	G4* AM22CZS						G5* AM24GUA						G6* AM 02 ML					
		48 h	96 h	144 h	192 h	240 h	TOTAL	48 h	96 h	144 h	192 h	240 h	TOTAL	48 h	96 h	144 h	192 h	240 h	TOTAL
T1	0%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0±0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0±0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0±0,0
T2	1%	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	1,3±3,5	0,0	0,0	0,0	1,1	2,2	3,3±4,1	1,1	1,5	0,7	0,0	0,7	4,0±5,6
T4	2%	0,0	0,0	1,0	1,0	0,5	2,5±4,6	1,1	0,0	3,1	5,1	2,8	12,1±5,2	1,0	0,5	1,9	1,9	0,0	5,3±7,8
T5	3%	0,5	1,6	0,5	0,0	0,0	2,6±4,9	0,0	3,0	4,2	2,0	4,1	13,3±7,6	0,0	2,6	3,1	1,0	0,0	6,8±5,6
T6	4%	0,5	0,0	2,1	1,1	0,0	3,8±7,4	2,2	3,1	2,6	3,5	5,4	16,8±5,3	2,2	1,5	3,0	5,2	1,5	13,5±8,9
T7	5%	1,1	0,0	2,1	0,5	0,0	3,8±5,2	1,1	2,6	7,4	4,1	3,7	18,9±5,9	4,2	2,5	5,1	2,5	3,4	17,8±7,3

\* G4: Grupo 4 (*D. scandens* - AM22CZS); G5: Grupo 5 (*D. scandens* - AM24GUA); G6: Grupo 6 (*D. scandens* - AM 02 ML); Trat.: Tratamento (T).

Tabela 7 – Mortalidade de adultos de *C. tingomarianus* (continuação...).

Mortalidade média e desvio padrão (%)															
Trat (T)	Concentração do extrato (m v <sup>-1</sup> )	G6* AM27CZS						Rotenona purificada							
		48 h	96 h	144 h	192 h	240 h	TOTAL	Concentração (m.v <sup>-1</sup> )	48 h	96 h	144 h	192 h	240 h	TOTAL	
T1	0%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0±0,0	0%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0±0,0
T2	1%	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0	2,5±4,6	1%	0,0	1,7	0,0	0,0	1,7	3,3±3,9	
T4	2%	0,0	3,3	2,2	0,0	3,3	8,9±3,6	2%	1,1	1,7	1,1	1,1	1,7	6,7±7,2	
T5	3%	0,0	3,3	2,2	1,1	3,3	10,0±7,6	4%	1,7	1,7	3,3	3,3	1,7	11,7±7,7	
T6	4%	1,1	3,3	0,0	5,7	2,5	12,6±3,7	6%	3,3	3,3	3,3	5,1	1,7	16,7±9,6	
T7	5%	0,0	2,3	4,7	3,5	4,7	15,1±4,2	8%	3,3	5,1	5,1	5,1	3,1	21,7±8,7	

\* G6: Grupo 6 (*D. scandens* - AM27CZS); Trat.: Tratamento (T).

Ao contrário dos resultados obtidos por contato tópico, os valores de mortalidade dos insetos por ingestão de folhas contaminadas foram menores nas primeiras 48 horas de avaliação dos experimentos, sendo distribuídos ao longo das avaliações para os extratos G4, G5 e G6 e concentradas no período intermediário e final (144 a 240 h) para os extratos G1, G2 e G3 (Tabela 7).

Os valores de mortalidade de adultos de *C. tingomarianus* observados permitiram realizar as determinações toxicológicas (CL<sub>50</sub> e TL<sub>50</sub>) somente para o extrato G1 por ingestão de folhas contaminadas, em função dos demais produtos avaliados não terem provocado mortalidades superiores a 50% dos insetos. O valor determinado para CL<sub>50</sub> foi de 6,3 mg mL<sup>-1</sup> (Tabela 8), com TL<sub>50</sub> de 102 horas (Tabela 9).

Tabela 8 – Concentração Letal (CL<sub>50</sub>) do extrato bruto de *D. scandens* integrante do Grupo 1 (G1) à adultos de *C. tingomarianus* por ingestão de folhas contaminadas.

Extrato	Intoxicação	GL	N	Inclinação ± EP	CL <sub>50</sub> (IC 95%)	χ <sup>2</sup>	Prob
G1	Ingestão de folhas contaminadas	5	480	1,05±0,14	6,3 (5,5 – 7,4)	44	0,05

GL: graus de liberdade; n: número de insetos usados no bioensaio; EP: erro-padrão da média; CL<sub>50</sub>: concentração letal; IC 95%: intervalo de confiança a 95% de probabilidade; χ<sup>2</sup>: qui-quadrado; Prob.: probabilidade; CL<sub>50</sub>: mg de extrato.mL<sup>-1</sup>.

Tabela 9 – Tempo Letal (TL<sub>50</sub>) do extrato bruto de *D. scandens* integrante do Grupo 1(G1) à adultos de *C. tingomarianus* por ingestão de folhas contaminadas

Extrato	Intoxicação	Concentração	Inclinação ± EP	TL <sub>50</sub> (IC 95%)	χ <sup>2</sup>	Prob
G1	Ingestão de folhas contaminadas	1% (m v <sup>-1</sup> )	0,88±0,07	102 (87 – 117)	55	0,04

EP: erro-padrão da média; TL<sub>50</sub>: tempo letal; IC 95%: intervalo de confiança a 95% de probabilidade; X<sup>2</sup>: qui-quadrado; Prob.: probabilidade.

Apesar das baixas concentrações dos extratos de timbó utilizadas por ingestão de folhas contaminadas (0,25% a 5% m v<sup>-1</sup>), em comparação à aplicação tópica (5% a 40% m v<sup>-1</sup>), foram

observados maiores valores de mortalidade nos bioensaios de ingestão de folhas contaminadas, apontando esta via de intoxicação como eficaz para o controle de adultos de *C. tingomarianus*. Isso pode ter ocorrido pelo fato de, nos bioensaios por ingestão de folhas contaminadas, os insetos ficarem expostos simultaneamente ao contato tarsal e ingestão do produto tóxico. Por contato tópico os insetos receberam para alimentação folhas de feijão-comum livre dos extratos de timbó e da rotenona purificada, o que pode ter reduzido o efeito tóxico dos produtos sobre a mortalidade de *C. tingomarianus*. Além disso, as barreiras naturais apresentadas pela estrutura do corpo dos insetos podem ter sido determinantes para evitar a absorção dos produtos tóxicos, reduzindo suas ações inseticidas quando aplicados topicamente.

Esses resultados evidenciaram que adultos de *C. tingomarianus* são mais sensíveis aos extratos de timbó pela via de intoxicação por ingestão de folhas contaminadas do que por contato tópico e apresentaram tolerância aos produtos pelo efeito de contato por superfície contaminada, semelhantemente aos resultados obtidos por ALECIO et al. (2010), que obtiveram maior toxicidade do extrato de *D. amazonica* para adultos de *C. arcuatus* por ingestão de folhas contaminadas do que por contato tópico e por contato em superfície contaminada.

A concentração equivalente a  $CL_{50}$  ( $0,63\% \text{ m v}^{-1}$ ) determinada é inferior aos valores das determinações toxicológicas obtidos em estudos similares desenvolvidos para avaliar a toxicidade de diferentes espécies de timbó para insetos, onde foram calculados valores de  $CL_{50}$  variáveis entre  $1,5\%$  e  $5,75\% \text{ (m v}^{-1}\text{)}$  (GUSMÃO et al., 2002; CORREA, 2006 e ALECIO et al., 2010). Tais resultados apontam o extrato G1 como causador de elevada toxicidade para adultos de *C. tingomarianus* por ingestão de folhas contaminadas, ao contrário dos demais agrupamentos e da rotenona purificada utilizada isoladamente, que provocam baixos valores de mortalidade dos insetos.

Extratos comerciais de timbó, contendo pelo menos 5% ( $m\ v^{-1}$ ) de rotenona, também provocaram baixa toxicidade sobre adultos do predador *C. montrouzieri* por contato tópico (EFROM et al., 2011) e sobre ninfas de *E. clitoriae* por contato de pulverização (ALMEIDA, 2010).

Apesar dos produtos terem provocado baixos valores de mortalidade de adultos de *C. tingomarianus*, para a grande maioria das concentrações avaliadas, houve resposta de tendência crescente de mortalidade. Isso ocorreu em função do aumento das concentrações e do tempo de exposição dos insetos aos extratos de todas as plantas avaliadas por ingestão de folhas contaminadas.

Os maiores valores de mortalidade foram atingidos nas últimas 24 horas de duração dos experimentos, sugerindo que os extratos de timbó, quando ingeridos, não possuem efeito imediato sobre a mortalidade e não provocam o efeito knock-down em adultos de *C. tingomarianus*, mesmo em altas concentrações, à semelhança dos resultados obtidos por RATTANAPAN (2009) e MIGLIORINI et al. (2010).

MIGLIORINI et al. (2010) observaram mortalidades significativas de crisomelídeos adultos apenas a partir do sexto dia após a aplicação do extrato de timbó (*A. glazioviana*), o que para os autores foi motivo de desqualificação do produto como opção para tratamento de infestações que requerem um controle imediato de insetos-praga.

As variações entre os períodos de maior ocorrência de mortalidade de *C. tingomarianus* ao longo da duração dos experimentos, pelas duas vias de intoxicação avaliadas com os extratos de timbó, podem estar relacionadas à diferença na composição química dos extratos enquadrados nos diferentes grupos de timbó, onde a presença ou ausência de determinadas concentrações de

constituintes podem determinar as respostas sobre a velocidade e as taxas com que os extratos provocam mortalidade de *C. tingomarianus*.

GOSSELIN (1984) e SILVA et al. (2002) relatam que a rotenona é tóxica para insetos por ingestão e contato, reunindo, de acordo com CRAVERO et al. (1976), duas formas de intoxicação usadas para controlar insetos-praga. Entretanto, nas duas vias de intoxicação, a rotenona purificada provocou baixos valores de mortalidade de *C. tingomarianus* e que foram concentrados somente no período intermediário de duração dos experimentos, demonstrando que sua ação demora um pouco a se manifestar, resultado que também foi observado por SAITO e LUCHINI (1998) quando avaliaram a eficácia da rotenona para o controle de besouros e lagartas.

Uma hipótese para explicar os reduzidos valores de mortalidade de *C. tingomarianus* pode estar relacionada à possibilidade de degradação e consequente redução dos efeitos tóxicos da rotenona purificada 96 horas após sua utilização. MOREIRA et al. (2005) destacam que a rotenona é fotossensível e instável ao calor e ao ar e, quando exposta à luz, degrada-se em até três dias. A rotenona tem sido utilizada para captura de peixes durante pesquisas científicas, onde tem sido observado evidências de uma rápida recolonização (na ordem de 3 a 12 dias) em poças de maré submetidas ao envenenamento com esta substância (LARDNER et al., 1993; ROSA et al., 1997), o que reforça a hipótese levantada.

A baixa toxicidade da rotenona para insetos também foi registrada em outros estudos. GUIRADO et al. (2007) avaliaram a ação inseticida de diversos produtos alternativos para o controle de *C. arcuatus* e verificaram que a rotenona utilizada na concentração de 1% ( $m v^{-1}$ ) não foi eficiente para o controle do inseto. CORREA (2011) verificou que o extrato de timbó *D. rariflora* apresentou elevada toxicidade sobre o ácaro do pimentão *T. desertorum*, enquanto que a rotenona purificada não foi tóxica para os indivíduos.

Por outro lado, diversos trabalhos apontam a rotenona como o principal princípio ativo inseticida presente em extratos de timbó (CROMBIE e WHITING, 1998; GUSMÃO et al., 2002; NALI et al., 2004; AZEVEDO et al., 2007; ALECIO et al., 2010; LUCIO et al., 2011; LI et al., 2011). Entretanto, esses estudos foram realizados com pó ou com extratos de raízes de timbó ricos em rotenona e não com o princípio ativo purificado, fato que pode ter induzido os autores a atribuírem a toxicidade dos timbós exclusivamente ou principalmente à rotenona.

Tais conclusões podem ter sido obtidas devido à propriedade da rotenona atuar na inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (acoplamento NADH ubiquinona oxidoredutase), bloqueando a absorção celular de oxigênio e a fosforilação do ADP à ATP (SINGER e RAMSAY, 1994; MASCARO et al., 1998; CAVALHEIRO et al., 2004; COLMAN-SAZARBITORIA et al., 2009).

Os insetos intoxicados com rotenona, presente em extratos de timbó, apresentam diminuição do consumo de oxigênio, redução da taxa de respiração e ataques que provocam convulsões e conduzem, finalmente, a paralisias e morte por parada respiratória (GOODMAN e GILMAN, 1985; SILVA et al., 2002). Entretanto, estes sintomas não foram observados nas avaliações realizadas quando os insetos foram submetidos à rotenona purificada, sendo verificados somente nos bioensaios conduzidos por ingestão de folhas contaminadas com o extrato de timbó G1.

Esses resultados sugerem que o efeito tóxico de extratos de timbó pode estar associado à presença de outros compostos rotenóides bioativos, tais como deguelina, tefrosina, toxicarol, sumatrol, elliptona e malacol (LIMA, 1947), além de outras substâncias desconhecidas, que podem atuar conjuntamente com a rotenona elevando as toxicidades dos timbós para insetos-praga.

Essa hipótese foi levantada por outros pesquisadores (DECKER, 1942; TYLER, 1979; COSTA et al., 1997; LI et al., 2011) e fortalecida pelo isolamento e caracterização de novos constituintes tóxicos encontrados em extratos de timbós (MAGALHÃES et al., 2003; BABU et al., 2010; LÔBO et al., 2010; JIANG et al., 2012), o que justificaria a comprovada ação inseticida desses vegetais (HIEN et al., 2003; KOTZE et al., 2006; ALECIO et al., 2010; CORREA, 2011).

HYMAVATHI et al. (2011) avaliaram a toxicidade de nove compostos isolados de *D. scandens* para quatro insetos-praga de grãos armazenados (*C. chinensis*, *S. oryzae*, *R. dominica* e *T. castaneum*), utilizando bioensaios de fumigação, e verificaram que a sensibilidade dos indivíduos aos compostos variou com o tempo de exposição, concentração e espécies de insetos, sendo alcançado 100% de mortalidade dos indivíduos 24 h após o início dos experimentos com os compostos osajin, scandinone, sphaerobioside e genisteína contra todos os insetos avaliados, enquanto que o laxifolin e o lupalbigenin provocaram 100% de mortalidade de *T. castaneum* e *R. dominica* 72 h após a aplicação.

LI et al. (2011) avaliaram a ação inseticida da rotenona purificada e de dois compostos (khayasin e 2'S-methylbutanoylproceranolide) isolados de *X. moluccensis* sobre larvas do besouro do coqueiro *B. longissima* criadas em laboratório, pela via de intoxicação de ingestão de folhas contaminadas, e verificaram que os dois compostos isolados de *X. moluccensis* foram mais potentes do que a rotenona purificada em uma concentração de 50 mg mL<sup>-1</sup> (m v<sup>-1</sup>).

JIANG et al. (2012) isolaram 12 compostos (11 conhecidos e 1 não relatado na literatura) a partir de extratos das partes aéreas de *D. trifoliata* e avaliaram suas toxicidades sobre *A. salina*, onde verificaram que oito constituintes (rotenona, tefrosina, 12a-hidroxirotenona, deguelina, 6a,12a-dehidrorotenona, dehidrodeguelina, 7a-o-metildeguelol e 4'-hidroxi-7-metoxiflavanona)

apresentaram toxicidade significativa ( $CL_{50}$  entre 0,06 a 9,95 mg mL<sup>-1</sup>) e que o novo composto isolado apresentou baixa toxicidade ( $CL_{50} = 211,31$  mg mL<sup>-1</sup>) para o crustáceo.

Esses resultados sugerem que a rotenona necessita da atuação conjunta de outros constituintes de extratos de timbó para promover valores aceitáveis de mortalidade de *C. tingomarianus*, podendo inclusive não ser a principal substância tóxica presente nos extratos de timbó para esses insetos.

Essa tendência é reforçada pelo fato dos extratos das plantas selecionadas dos grupos G3, G4, G5 e G6, que possuem os maiores teores de rotenona e deguelina e a menor diversidade de constituintes, terem apresentado os menores valores de mortalidade de *C. tingomarianus*.

Por outro lado, com base na composição química, foi verificado que os extratos G1 e G2 possuem a maior diversidade de constituintes e os menores teores de rotenona e deguelina e apresentaram os maiores valores de mortalidade dos insetos, merecendo destaque o extrato G1, que além dos baixos e equilibrados teores de rotenona e deguelina, apresentou baixa quantidade do constituinte “A”, elevados teores do constituinte “G”, sendo o único a conter o constituinte “H”. Quando comparada à composição química do extrato G2, o extrato G1 possui maiores teores dos compostos “D” e “G” e quantidades proporcionalmente mais baixas dos constituintes “E” e “F” (Tabela 10).

Tabela 10 – Quantificação dos constituintes majoritários de extratos de raízes de timbó coletadas nos Estados do Acre e Amazonas.

Grupo (G)	Amostra	Espécie	Constituintes majoritários (g do constituinte 100g <sup>-1</sup> de extrato = %)									
			Rotenona	Deguelina	A*	B*	C*	D*	E*	F*	G*	H*
G1	AM26GUA	<i>D. scandens</i>	8,99	8,43	0,04	3,00	0,63	7,32	0,11	0,08	63,62	2,94
G2	AM04MAO	<i>D. floribundus</i>	11,71	0,67	1,37	0,63	0,07	0,37	13,85	6,46	49,41	-
G3	AM21ML	<i>D. scandens</i>	49,10	45,84	0,51	1,55	3,15	-	-	-	-	-
G4	AM22CZS	<i>D. scandens</i>	39,08	55,50	0,78	1,19	3,43	-	-	-	-	-
G5	AM24GUA	<i>D. scandens</i>	43,49	44,29	0,43	4,92	6,86	-	-	-	-	-
G6	AM02ML	<i>D. scandens</i>	44,57	46,89	0,70	2,84	5,00	-	-	-	-	-
	AM27CZS	<i>D. scandens</i>	43,98	48,60	0,67	2,26	4,44	-	-	-	-	-

\* Constituintes não identificados presentes nos extratos de raízes de timbó

A composição química diferenciada apresentada pelo extrato G1 indica que a mortalidade de *C. tingomarianus* pode estar sendo afetada diretamente pela atuação combinada ou isolada dos constituintes “A”, “G” e “H”, encontrados em proporções diferentes neste extrato quando comparado aos demais.

Desse modo, o constituinte “A”, presente em quantidades diminutas no extrato G1 e em maiores quantidades nos extratos dos demais grupos de timbó, pode estar atuando como antagonista de promoção de mortalidade de *C. tingomarianus*, possivelmente por reduzir a ação inseticida de outros constituintes e/ou aumentar a capacidade de destoxificação dos insetos submetidos aos extratos dos outros grupos de timbó e os constituintes “G” e “H” podem estar atuando de forma isolada ou em sinergia com a rotenona, deguelina e outros constituintes promovendo elevados valores de mortalidade do extrato G1.

Desse modo, as especificidades químicas apresentadas pelo extrato G1 são desejáveis e podem ser determinantes para promoção de mortalidade de *C. tingomarianus*, o que requer o desenvolvimento de estudos mais detalhados para confirmação das hipóteses levantadas e indicam que, os teores de rotenona e deguelina não devam ser os únicos constituintes considerados como parâmetros de referência para selecionar plantas de timbó com elevada ação inseticida.

#### **4.3.2 Efeito dos extratos de timbó comparados à rotenona purificada sobre o consumo foliar de adultos de *C. tingomarianus* por contato tópico e ingestão de folhas contaminadas**

A maior inibição de consumo foliar de adultos de *C. tingomarianus* submetidos ao contato tópico com extratos de timbó e com a rotenona purificada foram provocados pelos extratos G2 e G6 (AM27CZS), na concentração de 40% (m v<sup>-1</sup>), que reduziram percentualmente o consumo

foliar dos insetos em 55% e 34%, respectivamente, quando comparados aos respectivos valores dos tratamentos controle (Tabela 11).

Por ingestão de folhas contaminadas, os extratos G1, G2, G3 e G6 também foram significativamente efetivos na inibição do consumo foliar de adultos de *C. tingomarianus*, com destaque para o extrato G1, que provocou os menores valores de alimentação dos insetos entre todos os produtos avaliados. Nas concentrações de 1% e 2% ( $\text{m v}^{-1}$ ) do extrato G1, os valores de consumo foliar dos indivíduos foram de 65% a 77% menores do que os provocados pelos insetos nos tratamentos controle (Tabela 12).

Apesar das concentrações avaliadas topicamente terem sido maiores, o fato dos adultos de *C. tingomarianus* terem mantido contato direto com os produtos poderia justificar os maiores valores de inibição de consumo foliar dos insetos por ingestão de folhas contaminadas em comparação à via de contato tópico.

Os extratos G1 e G2 por ingestão de folhas contaminadas e G2 por contato tópico mantiveram os valores médios diários individuais de consumo foliar de adultos de *C. tingomarianus* remanescentes abaixo de  $0,71 \text{ cm}^2$ , com destaque para as concentrações de 1% ( $\text{m v}^{-1}$ ) do extrato G1 e de 4% ( $\text{m v}^{-1}$ ) para o extrato G2 que apresentaram os menores valores médios diários individuais de consumo foliar neste estudo,  $0,41 \text{ cm}^2$  e  $0,43 \text{ cm}^2$ , respectivamente.

Tabela 11 – Consumo foliar de adultos de *C. tingomarianus* submetidos aos extratos de raízes de seis grupos de timbó e à rotenona purificada por contato tópico.

Consumo foliar média total (cm <sup>2</sup> )																	
Trat (T)	Concentração de extratos (m v <sup>-1</sup> )	G1* AM26GUA				G2* AM04MAO				G3* AM21ML				G4* AM22CZS			
		48 h	96 h	144 h	TOTAL	48 h	96 h	144 h	TOTAL	48 h	96 h	144 h	TOTAL	48 h	96 h	144 h	TOTAL
T1	0%	16,5	15,6	19,7	51,8 a	22,2	18,7	13,1	54,0 a	18,1	18,1	16,1	52,3 a	18,3	17,5	15,4	51,2 a
T2	5%	12,7	15,6	22,2	50,5 b	14,1	14,9	11,4	40,4 a	14,1	17,7	20,1	51,9 b	11,7	16,5	17,9	46,1 b
T3	10%	17,9	16,7	16,9	51,5 b	5,0	18,8	11,1	34,9 a	16,4	16,4	19,0	51,7 b	13,5	18,3	21,2	53,0 b
T4	20%	15,9	15,4	18,1	49,4 b	3,6	15,8	18,2	37,6 a	13,7	16,2	18,4	48,4 b	14,3	22,3	28,7	65,3 c
T5	30%	15,8	14,0	19,1	48,8 b	1,7	18,1	7,9	27,6 a	12,8	13,9	20,7	47,3 b	16,4	26,1	27,8	70,3 c
T6	40%	15,6	16,2	19,3	51,1 d	0,6	14,9	8,7	24,3 a	10,4	15,1	23,1	48,6 c	19,3	22,8	27,6	69,7 e

\*G1: Grupo 1 (*D. scandens* - AM26GUA ); G2: Grupo 2 (*D. floribundus* - AM04MAO ); G3: Grupo 3 (*D. scandens* - AM21ML); G4: Grupo 4 (*D. scandens* - AM22CZS); G5: Grupo 5 (*D. scandens* - AM24GUA); G6: Grupo 6 (*D. scandens* - AM 02 ML e AM27CZS); Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P > 0,05).

Tabela 11 – Consumo foliar de adultos de *C. tingomarianus* (continuação...).

Consumo foliar média total (cm <sup>2</sup> )																		
Trat (T)	Concentração de extratos (m v <sup>-1</sup> )	G5* AM24GUA				G6* AM 02 ML				G6* AM27CZS				Rotenona purificada				
		48 h	96 h	144 h	TOTAL	48 h	96 h	144 h	TOTAL	48 h	96 h	144 h	TOTAL	Concentração (m v <sup>-1</sup> )	48 h	96 h	144 h	TOTAL
T1	0%	16,5	18,9	17,1	52,5 a	23,8	14,5	17,6	55,9 a	13,5	18,3	24,2	56,0 a	0%	17,7	18,9	16,1	52,7 a
T2	5%	15,4	16,7	19,2	51,3 b	21,8	13,8	16,8	52,4 b	11,4	16,2	17,7	45,3 b	1%	18,3	15,5	15,8	49,6 b
T3	10%	16,3	18,3	20,3	54,9 b	20,4	12,8	20,8	54,1 b	14,0	22,7	19,8	56,6 b	2%	17,8	19,2	15,1	52,1 b
T4	20%	16,7	17,2	18,4	52,3 b	17,3	19,1	19,9	56,3 b	10,0	13,1	17,0	48,5 b	4%	16,7	17,1	16,0	49,8 b
T5	30%	13,2	17,5	17,9	48,6 b	18,1	13,5	14,9	46,6 b	10,3	11,6	19,8	41,7 b	6%	16,5	17,2	15,4	49,1 b
T6	40%	15,4	19,2	20,4	55,0 d	18,0	18,2	18,6	54,7 d	10,4	9,7	17,2	37,2 b	8%	13,9	14,1	17,2	45,2 c

\* G5: Grupo 5 (*D. scandens* - AM24GUA); G6: Grupo 6 (*D. scandens* - AM02ML e AM27CZS); Trat.: Tratamento (T); Coeficiente de Variação – CV: T1 (9,1%), T2 (15,4%), T3 (17,3%), T4 (13,6%), T5 (11,9%) e T6 (18,5%); Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P > 0,05).

Tabela 12 – Consumo foliar de adultos de *C. tingomarianus* submetidos aos extratos de raízes de seis grupos de timbó e à rotenona purificada por ingestão de folhas contaminadas.

Consumo foliar média total (cm <sup>2</sup> )																			
Trat (T)	Concentração de extratos (m v <sup>-1</sup> )	G1* AM26GUA						G2* AM04MAO						G3* AM21ML					
		48 h	96 h	144 h	192 h	240 h	TOTAL	48 h	96 h	144 h	192 h	240 h	TOTAL	48 h	96 h	144 h	192 h	240 h	TOTAL
T1	0%	13,9	15,7	13,8	14,1	16,8	74,3 a	17,6	11,2	16,3	16,7	14,9	76,7 a	17,0	20,1	12,7	8,3	14,2	72,4 a
T2	0,25%	11,2	10,0	11,2	11,2	12,7	56,3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
T3	0,5%	12,0	8,9	12,0	10,3	8,5	51,7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
T4	0,75%	11,8	8,9	7,0	5,5	3,8	37,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
T5	1%	6,5	5,1	3,1	1,5	0,5	16,8 a	12,8	10,1	15,0	9,9	11,7	59,5 b	11,0	19,6	13,9	12,8	7,4	64,7 b
T6	2%	8,7	4,6	2,5	5,3	4,7	25,8 a	10,1	8,5	17,9	10,2	8,2	54,9 b	16,8	16,6	10,0	13,7	8,1	65,2 c
T7	3%	4,9	9,5	4,8	10,7	9,4	39,4 a	3,5	8,2	16,2	5,5	6,6	39,9 a	12,3	19,7	10,4	8,3	12,7	63,4 b
T8	4%	10,3	14,8	6,7	8,5	10,0	50,4 b	5,3	5,3	10,5	7,2	6,1	34,4 a	11,6	17,0	9,6	12,1	13,7	63,9 c
T9	5%	9,8	5,7	5,2	11,6	9,4	41,7 a	9,1	5,4	15,6	6,4	6,0	42,4 a	9,6	10,9	11,3	9,5	8,4	49,8 a

\*G1: Grupo 1 (*D. scandens* - AM26GUA); G2: Grupo 2 (*D. floribundus* - AM04MAO); G3: Grupo 3 (*D. scandens* - AM21ML); Trat.: Tratamento (T); NA: Não avaliada; Coeficiente de Variação – CV: T1 (5,4%), T5 (11,8%), T6 (17,1%), T7 (13,1%), T8 (18,8%) e T9 (15,8%); Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P > 0,05).

Tabela 12 – Consumo foliar de adultos de *C. tingomarianus* (continuação...).

Mortalidade média (%)																			
Trat (T)	Concentração de extratos (m.v <sup>-1</sup> )	G4* AM22CZS						G5* AM24GUA						G6* AM 02 ML					
		48 h	96 h	144 h	192 h	240 h	TOTAL	48 h	96 h	144 h	192 h	240 h	TOTAL	48 h	96 h	144 h	192 h	240 h	TOTAL
T1	0%	14,4	13,7	12,9	16,0	13,6	70,6 c	13,4	14,7	13,1	15,7	17,4	74,3 a	9,5	13,2	11,6	16,9	22,9	74,1 a
T2	1%	9,8	11,7	12,3	14,8	15,3	63,9 c	11,9	14,3	15,9	15,7	15,0	72,8 c	9,2	17,1	13,4	17,0	16,4	73,1 c
T4	2%	7,8	8,0	15,8	15,9	16,4	63,9 b	8,9	10,7	13,2	15,4	15,6	63,8 c	11,5	12,8	14,7	16,8	11,8	67,6 c
T5	3%	10,9	12,7	15,2	13,7	13,9	66,4 c	7,3	10,3	13,6	14,9	19,4	65,5 c	8,8	10,8	15,8	15,8	20,1	71,4 c
T6	4%	6,9	11,5	17,4	18,4	14,7	68,9 b	7,9	12,4	14,9	15,3	14,8	65,3 c	10,1	12,2	20,8	15,2	9,7	68,2 c
T7	5%	7,0	9,9	15,2	22,2	15,2	69,6 a	6,1	8,3	15,9	16,2	15,9	62,4 b	11,1	13,1	13,3	15,3	9,8	62,6 b

\* G4: Grupo 4 (*D. scandens* - AM22CZS); G5: Grupo 5 (*D. scandens* - AM24GUA); G6: Grupo 6 (*D. scandens* - AM 02 ML); Trat.: Tratamento (T); Coeficiente de Variação – CV: T1 (5,4%), T5 (11,8%), T6 (17,1%), T7 (13,1%), T8 (18,8%) e T9 (15,8%); Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P > 0,05).

Tabela 12 – Consumo foliar de adultos de *C. tingomarianus* (continuação...).

Mortalidade média (%)														
Trat (T)	Concentração do extrato (m v <sup>-1</sup> )	G6* AM27CZS						Rotenona purificada						
		48 h	96 h	144 h	192 h	240 h	TOTAL	Concentração (m v <sup>-1</sup> )	48 h	96 h	144 h	192 h	240 h	TOTAL
T1	0%	19,5	13,4	10,3	18,7	12,5	74,4 a	0%	14,4	12,9	13,1	17,3	14,3	71,9 a
T2	1%	15,8	12,2	8,9	11,7	9,1	57,8 b	1%	20,3	14,0	6,4	12,5	11,5	64,7 b
T4	2%	14,4	11,7	8,2	14,4	10,9	59,6 b	2%	18,9	12,4	10,2	14,5	8,9	64,8 c
T5	3%	16,9	9,5	8,0	11,7	9,8	56,1 b	4%	20,7	11,0	10,5	14,1	12,9	69,2 c
T6	4%	21,5	12,1	4,6	14,1	9,1	61,4 c	6%	13,6	13,1	11,9	15,3	11,7	65,6 c
T7	5%	14,9	15,3	11,2	10,3	9,2	60,9 b	8%	19,1	14,4	8,2	8,2	8,3	58,2 b

\* G6: Grupo 6 (*D. scandens* - AM27CZS); Trat.: Tratamento (T). Coeficiente de Variação – CV: T1 (5,4%), T5 (11,8%), T6 (17,1%), T7 (13,1%), T8 (18,8%) e T9 (15,8%); Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P > 0,05).

Esses resultados estão abaixo dos valores médios diários de consumo foliar (1,23 cm<sup>2</sup>) de adultos de *C. tingomarianus* em feijoeiro cv. Pérola determinados por FAZOLIN e ESTRELA (2004). Isto indica que os extratos G1 e G2 inibem a alimentação dos insetos, corroborando os resultados obtidos por ALECIO et al. (2010) que observaram ocorrência de distúrbios fisiológicos e inibição da alimentação de adultos de *C. arcuatus* intoxicados por ingestão de folhas contaminadas com o extrato de timbó *D. amazonica*.

Nas duas vias de intoxicação, ocorreram os menores valores de consumo foliar durante as primeiras 48 horas de avaliação dos experimentos, em todos os extratos de timbó, principalmente nas maiores concentrações (Tabelas 11 e 12), sugerindo que em primeiro momento os adultos de *C. tingomarianus* rejeitam folhas de feijão contaminadas com os extratos.

Nessas observações, os extratos de timbó G1 e G2 por ingestão de folhas contaminadas e G2 por contato tópico mantiveram o consumo foliar de adultos de *C. tingomarianus* reduzido até o final dos experimentos, com destaque para o extrato G1 que foi o único a reduzir o consumo foliar com o passar do tempo, atingindo os valores diários mais baixos de alimentação dos indivíduos no último período de avaliação dos bioensaios (192 a 240 horas). Nos demais extratos, os adultos de *C. tingomarianus* aumentaram gradativamente o consumo foliar após o período inicial (0 a 48 horas), que foi restabelecido ao final das avaliações.

Por outro lado, os extratos de timbó G4, G5 e G6 (AM 02 ML), bem como a rotenona purificada, não reduziram o consumo foliar dos insetos, independente da concentração e da forma de exposição aos produtos, indicando que a composição química desses extratos e que a rotenona purificada utilizada isoladamente não inibem a alimentação de adultos de *C. tingomarianus*.

O extrato G1, apesar de ser da mesma espécie da maioria dos agrupamentos, apresenta constituição química bastante distinta, proporcionando os maiores valores de redução de consumo foliar. Este extrato possui os menores teores de rotenona e deguelina, conforme discutido anteriormente, o que indica que estes constituintes isoladamente não são determinantes para inibir a alimentação de adultos de *C. tingomarianus* e que este efeito está relacionado à atividade inseticida de outros constituintes.

Neste sentido, a presença de outros compostos secundários torna o extrato G1 diferenciado, sugerindo que a concentração de 1% ( $\text{m v}^{-1}$ ) apresenta a quantidade necessária e a relação adequada entre os constituintes capaz de provocar elevada toxicidade para adultos de *C. tingomarianus* por ingestão de folhas contaminadas.

Os resultados evidenciam que os valores de mortalidade e de consumo foliar de adultos de *C. tingomarianus* provocados pelos diferentes grupos de extratos de timbó e pela rotenona purificada estão relacionadas à forma de exposição dos insetos aos produtos, a baixa toxicidade da rotenona purificada quando utilizada isoladamente e a variação da composição química dos extratos.

As grandes diferenças qualitativas e quantitativas entre os constituintes dos extratos dos seis grupos de timbó influenciaram decisivamente nos seus efeitos tóxicos, sendo este provavelmente os motivos pelos quais alguns trabalhos apontam elevada toxicidade para esses vegetais (AZEVEDO et al., 2007; ALECIO et al., 2010; CORREA, 2011), enquanto outros não confirmam essa tendência (DAHLEM et al., 2009; ALMEIDA, 2010; EFROM et al., 2011), mesmo quando estudadas plantas de mesma espécie.

As raízes das plantas fornecedoras dos extratos dos seis grupos de timbó, apesar de serem representantes da mesma espécie (*D. scandens*), exceto para o extrato G2 (*D. floribundus*), foram coletadas em locais diferentes, com idade e condições edafoclimáticas aparentemente distintas e apresentaram grandes variações na composição química dos extratos, à semelhança dos resultados obtidos por MENDES (1960).

As possíveis variações dos fatores edafoclimáticos (nutrientes, água, luz e aspectos fitossanitários), genéticos e fisiológicos propiciados pelos diferentes locais de coleta, podem ter sido determinantes para provocarem as variações de composição química dos extratos (CASTRO et al., 2004) e conseqüentemente as diferentes respostas de mortalidade e de consumo foliar de adultos de *C. tingomarianus*.

Esses resultados indicam a necessidade de realização de estudos desses quimiótipos para averiguar a influencia dessas variações sobre a concentração dos constituintes químicos nos extratos das raízes dos timbós, com o objetivo de identificar fatores ecológicos e selecionar genótipos com mecanismos fisiológicos mais eficazes na síntese de quantidades adequadas de princípios biologicamente ativos.

Da mesma forma é necessária a realização de estudos sobre a quimiotaxonomia do extrato de timbó G1, visando determinar a toxicidade de seus princípios ativos isolados e combinados. Com isso, seria possível a formulação de um inseticida obedecendo à proporcionalidade adequada dos princípios ativos, que sejam eficientemente deletérios para adultos de *C. tingomarianus*.

## 4.4 CONCLUSÃO

Os extratos de timbó e a rotenona purificada não são tóxicos para *C. tingomarianus* quando avaliados pela via de contato por superfície contaminada e por contato tópico;

A via de intoxicação por ingestão de folhas contaminadas foi o meio de contato que provocou a maior toxicidade dos extratos de timbó para adultos de *C. tingomarianus*;

As variações qualitativas e quantitativas dos constituintes dos extratos de timbó influenciaram nos efeitos tóxicos biológicos sobre adultos de *C. tingomarianus*;

Os extratos de timbó G3, G4, G5 e G6 e a rotenona purificada provocaram baixos valores de mortalidade e não reduziram a alimentação dos insetos, independente da concentração e da forma de exposição, e não apresentaram toxicidade para adultos de *C. tingomarianus*.

Os extratos de timbó do grupo G1 (*D. scandens*) e G2 (*D. floribundus*) apresentaram os maiores valores de mortalidade e de inibição de alimentação adultos de *C. tingomarianus* entre todos os produtos avaliados;

A atividade biológica dos extratos de timbó sobre adultos de *C. tingomarianus* pode estar relacionada à atuação conjunta dos diferentes constituintes tóxicos dos extratos desses vegetais;

O extrato de timbó G1 (*D. scandens*) apresentou a composição química mais diversificada e provocou a maior toxicidade para adultos de *C. tingomarianus* a partir da concentração de 1% (m v<sup>-1</sup>), sendo o mais promissor para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos para o controle de adultos de *C. tingomarianus*.

## 5. CAPÍTULO 2

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE TIMBÓ (*Derris scandens* Aubl. e *Deguelia floribundus* Benth.) SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

MANAUS  
2012

## RESUMO

A lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda* Smith - Lepidoptera: Noctuidae) é considerada a praga de maior importância da cultura do milho no Brasil e seu controle é realizado com produtos químicos convencionais, que ocasionam grandes prejuízos aos produtores, consumidores e ambiente. A utilização de inseticidas botânicos, tais como o uso de extratos de timbó (*Derris scandens* Aubl. e *Deguelia floribundus* Benth.), constitui uma alternativa promissora para o manejo de insetos-praga. Este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade biológica de extratos brutos de timbó e de suas frações comparadas à rotenona purificada sobre lagartas de *S. frugiperda*. Foram avaliados extratos brutos de raízes de timbó de seis agrupamentos (G1, G2, G3, G4, G5 e G6) e suas frações comparadas à rotenona purificada pelas vias de intoxicação de ingestão de dieta contaminada, por contato tóxico e por contato em superfície contaminada sobre lagartas de *S. frugiperda*. Os experimentos foram desenvolvidos em condições de laboratório em delineamento inteiramente casualizado e com pelo menos cinco tratamentos e quatro repetições, sendo avaliados os efeitos biológicos dos produtos sobre a mortalidade dos insetos em todas as vias de intoxicação. Por ingestão de dieta contaminada foram avaliados ainda a duração dos períodos larval e pupal, peso e mortalidade de pupas e deformações em adultos de *S. frugiperda*. Os valores de mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* foram submetidos à análise de Probit para determinação das concentrações (CL<sub>50</sub>), doses (DL<sub>50</sub>) e tempos letais (TL<sub>50</sub>) e razão de toxicidade (RT<sub>50</sub>). Os dados referentes às demais variáveis foram submetidos à análise de variância, quando possível, agrupando-se as médias dos tratamentos pelo teste de Scott-Knott (P>0,05). A intoxicação por ingestão de dieta contaminada é a via de contato mais efetiva para *S. frugiperda* e a ação tóxica dos extratos de timbó para as lagartas está relacionada à atuação conjunta de diversos constituintes dos extratos de timbó. O extrato G3 por ingestão de dieta contaminada apresenta a maior toxicidade para *S. frugiperda*, com CL<sub>50</sub> de 0,28 mg de extrato g<sup>-1</sup> de dieta e TL<sub>50</sub> de 10,2 horas. A rotenona purificada possui baixa toxicidade quando utilizada isoladamente, porém provoca mortalidade de pupas e tem seus efeitos biológicos potencializados sobre os insetos quando associada à deguelina e aos constituintes A e B. A associação do constituinte A com o constituinte B provavelmente provoca mortalidade na fase de pré-pupa e o peso de pupas de *S. frugiperda* pode ser reduzido pela atuação conjunta de diversos constituintes dos extratos de timbó. Já o constituinte A quando presente em elevadas concentrações nos extratos pode atuar como antagonista de mortalidade de lagartas, provocar deformações em pupas e afetar a viabilidade dos insetos adultos. Os teores de rotenona e de deguelina podem ser usados como indicativos de toxicidade dos extratos de timbó para *S. frugiperda*, sendo que o extrato G3 possui as quantidades mais adequadas desses constituintes e apresenta a maior toxicidade para esses insetos. Os extratos de timbó com elevados teores de rotenona e deguelina, quantidades intermediárias do constituinte B e baixos teores do constituinte A são os mais promissores para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos para controle de *S. frugiperda*.

**Palavras Chave:** Inseticidas botânicos, controle alternativo, toxicidade, rotenona, deguelina.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the biological effects of timbo extracts (*Derris scandes* Aubl. and *Deguelia floribundus* Benth.) compared with the purified rotenone on *Spodoptera frugiperda* larvae. The extracts were evaluated in six distinct groups (G1, G2, G3, G4, G5 and G6), according to their chemical characteristics. The means of application of timbo extracts were: topical contact, contact by contaminated surface (filter-paper) and intake of contaminated diet. The completely randomized design was used with four replications where was to evaluate the biological effects of biological product on insects mortality in the every means of contamination. By intake of contaminated diet were to evaluate the duration of larval and pupal period, weight and mortality pupae and deformed adults of *S. frugiperda* larvae. The values of mortality of *S. frugiperda* larvae were submitted at Probit analysis to determine the lethal concentrations (LC<sub>50</sub>), lethal doses (LD<sub>50</sub>), lethal time (LT<sub>50</sub>) and toxicity ration (TR<sub>50</sub>). Data concerning other variables were submitted at variance analysis, when possible, through of treatments means grouping by Scott-Knott test (P> 0.05). The intake of contaminated diet is the most effective means of contact for *S. frugiperda* larvae and the toxic action of extracts timbo for the caterpillars is related to the combined action of several constituents of timbo extract. The G3 extract applied through intake of contaminated diet presents the highest toxicity to *S. frugiperda* larvae with LC<sub>50</sub> of 0.28 mg g<sup>-1</sup> and LT<sub>50</sub> of 10.2 hours. The purified rotenone has showed low toxicity when used alone, but causes mortality of pupae and has leveraged its biological effects on insects associated to deguelin, constituent A and constituent B. The association of constituent A with the constituent B probably has caused mortality in the pre-pupal stage and the pupal weight of *S. frugiperda* larvae. The constituent A when present in high concentrations in the extracts can act as an antagonist or affect the viability of adult insects. The contents of rotenone and deguelin can be used as indicators of toxicity of timbo extracts of *S. frugiperda*, being the G3 extract has the most appropriate amounts of these constituents and has the highest toxicity to insects. Timbo extracts containing high levels of rotenone and deguelin, amounts intermediary of constituent B and low levels of constituent A are most promising for the development of biotechnological products for control of *S. frugiperda* larvae.

**Key Words:** Botanical insecticides, alternative control, toxicity, rotenone.

## 5.1 INTRODUÇÃO

O milho (*Z. mays*) é o cereal mais cultivado no mundo e constitui a base da alimentação humana e animal (SILVA, 1995; FAO, 2010). No Brasil é uma cultura de expressão nacional, de grande importância econômica e social, que tem a sua produção afetada pela incidência de diversas pragas durante todo o ciclo (POGUE, 2002; SARMENTO et al., 2002; PRAÇA et al., 2006; WAQUIL et al., 2008).

A lagarta-do-cartucho *S. frugiperda* é considerada a praga de maior importância da cultura do milho no Brasil (CAVE, 2000; CRUZ e MONTEIRO, 2004; CESCINETTO et al., 2005), por ser um inseto polífago de alta capacidade de dispersão que provoca danos desde a emergência até a maturação das plantas (GALLO et al. 2002; MURUA e VIRLA, 2004; BARROS et al., 2010), podendo ocasionar perdas na produção superiores a 38% (WILLIAMS e DAVIS, 1990; CRUZ et al., 1997; FIGUEIREDO et al., 2005).

As lagartas de *S. frugiperda* raspam e perfuram as folhas do milho durante os primeiros instares larvais, podendo destruir completamente as plantas pequenas. Atacam a inserção da espiga na fase reprodutiva da cultura, prejudicando o enchimento de grãos (Cruz et al., 2002; PRAÇA et al., 2006).

O controle de *S. frugiperda* tem sido realizado principalmente com o uso de inseticidas convencionais, geralmente de amplo espectro (GASSEN, 1994; VIANA e PRATES, 2003), que são frequentemente incompatíveis com a utilização de outros métodos de controle, como o biológico (SÁ et al., 2009). Muitas vezes os inseticidas convencionais não produzem o efeito esperado, aumentando os riscos de contaminação ambiental, elevando os custos de produção

(GRÜTZMACHER et al., 2000) e induzindo a seleção de populações resistentes (DIEZ-RODRIGUEZ e OMOTO, 2001; YU et al., 2003; BUSATO et al., 2006; YU e MCORD, 2007).

Os extratos de raízes de plantas de timbó e as combinações controladas de seus princípios ativos podem atender aos requisitos de eficácia, segurança, seletividade e biodegradabilidade, sendo promissores para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos para o controle de insetos-praga, estimulando a realização deste trabalho que teve como objetivo avaliar a atividade biológica de extratos de timbó (*Derris* e *Deguelia*) e de suas frações comparadas à rotenona purificada sobre lagartas de *S. frugiperda*.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em dois Centros de Pesquisa da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, Centro de Pesquisa Agroflorestral, em Rio Branco/AC e Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza/CE e na Universidade Federal do Amazonas – Ufam, em Manaus/AM.

A coleta, processamento, obtenção, quantificação dos constituintes majoritários e seleção dos extratos de raízes de timbó para o desenvolvimento dos bioensaios foram realizadas de acordo com a metodologia descrita nos itens 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3 do Capítulo 1.

Todos os experimentos foram desenvolvidos utilizando lagartas de *S. frugiperda*, aproximadamente de 3º instar, criadas em condições de laboratório de acordo com a metodologia adaptada de Shmidt *et al.* (2001).

### 5.2.1 Criação de *S. frugiperda* em condições de laboratório

Ovos de *S. frugiperda* foram obtidos junto ao Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo da Embrapa, localizado em Sete Lagoas/MG, e por meio de coletas realizadas em campo (Licença Permanente Sisbio 30.700-1) em Rio Branco/AC.

As posturas foram encaminhadas ao Laboratório de Entomologia Agrícola da Embrapa Acre, onde foram transferidas para copos plásticos descartáveis com capacidade para 50 mL contendo 4 cm<sup>3</sup> de dieta para alimentação das lagartas (Figura 17A). Os copos descartáveis foram tampados com discos circulares de acrílico de 4,7 cm de diâmetro e mantidos em ambiente controlado (temperatura de 25±3 °C, umidade relativa de 65±5 % e fotofase de 12 horas)

utilizando estruturas de madeira perfuradas e acomodadas em armários (Figura 17B). As lagartas foram individualizadas após o 3º instar, visando evitar o canibalismo característico da espécie.



Figura 17 – Copos plásticos descartáveis contendo ovos, lagartas e um pedaço de dieta de 4 cm<sup>3</sup> para alimentação dos insetos (A), lagartas distribuídas em copos plásticos descartáveis acondicionados em armários em ambiente climatizado (B), adultos de *S. frugiperda* sexados e distribuídos aos pares em gaiolas de PVC para realização de posturas de ovos em cones de papel (C) preparo de dieta para lagartas de *S. frugiperda* (D e E). Fotos: Alecio (2010).

Após a emergência dos adultos, as mariposas foram sexadas e transferidas aos pares para gaiolas de PVC de 60 cm de altura por 25 cm de diâmetro, contendo cones de papel sobrepostos para as posturas dos insetos (Figura 17C), sendo respeitado o limite máximo de 50 casais por gaiola.

Foi iniciado um novo ciclo de criação de *S. frugiperda* quando as seções de papel com as posturas dos insetos foram transferidas para os copos plásticos descartáveis contendo dieta para alimentação das lagartas. O tempo médio total para cada ciclo de criação de *S. frugiperda* em condições de laboratório foi de 39 dias, subdivididos entre 3, 16, 9 e 11 dias para as fases de incubação de ovos, larvas, pupas e adultos, respectivamente.

A dieta alimentar fornecida para os insetos durante o período larval foi preparada utilizando 166,5 g de feijão, 50,7 g de Levedura, 79,2 g de gérmen de trigo, 5,1 g de ácido ascórbico, 3,2 g de metil parahidroxibenzoato, 1,7 g de ácido ascórbico, 20,5 g de Agar, 4,6 mL de formol, 5 mL de solução inibidora e 1.200 mL de água, ingredientes que rende uma porção de 1,5 kg do alimento.

### **5.2.2 Fracionamento dos extratos de timbó**

Para realização dos fracionamentos foram selecionados extratos de raízes de plantas de timbó dos grupos 2, 3 e 5, por estarem disponíveis em maiores quantidades e por terem apresentado variações quanto aos teores de rotenona e deguelina e outros constituintes analisados por HPLC.

Os métodos cromatográficos utilizados foram de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), realizada com uso de cromatoplasas (Sorbent Technologies) com indicador de fluorescência (F<sub>254</sub>, 200 µm de espessura) e Cromatografia em Coluna aberta (CC), utilizando sílica-gel (Silicycle: 60 – 200 µm / 70 – 230 mesh). O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades de amostras cromatografadas. Os solventes orgânicos utilizados foram de grau p.a. e a detecção das substâncias foi feita por irradiação com lâmpada de UV (365 e 254 nm - Solab Científica) e posterior revelação química.

Foram utilizados como reagente sulfato cérico, ácido sulfúrico e vanilina sulfúrica (MATOS, 1998). As cromatoplasas foram borrifadas com uma solução de sulfato cérico (IV) a 1% (v v<sup>-1</sup>) e ácido sulfúrico a 10 % (v v<sup>-1</sup>) e posteriormente com ácido sulfúrico 10% (v v<sup>-1</sup>) e

vanilina 1% (v v<sup>-1</sup>) diluídos em etanol, na mistura de 1:1, sendo aquecidas por alguns minutos para revelação química (revelador universal).

Cerca de 4 g de cada extrato de raízes de timbó foram submetidos ao fracionamento por meio de coluna cromatográfica (4 cm) em gel de sílica (70-230 mesh), eluída em hexano e acetato de etila em gradiente de eluição, sendo recolhidas ao final do processo 8 frações de cada extrato. As frações foram analisadas por CCD e codificadas numericamente de 1 a 8, conforme ilustrado nas Figuras 18, 19 e 20.

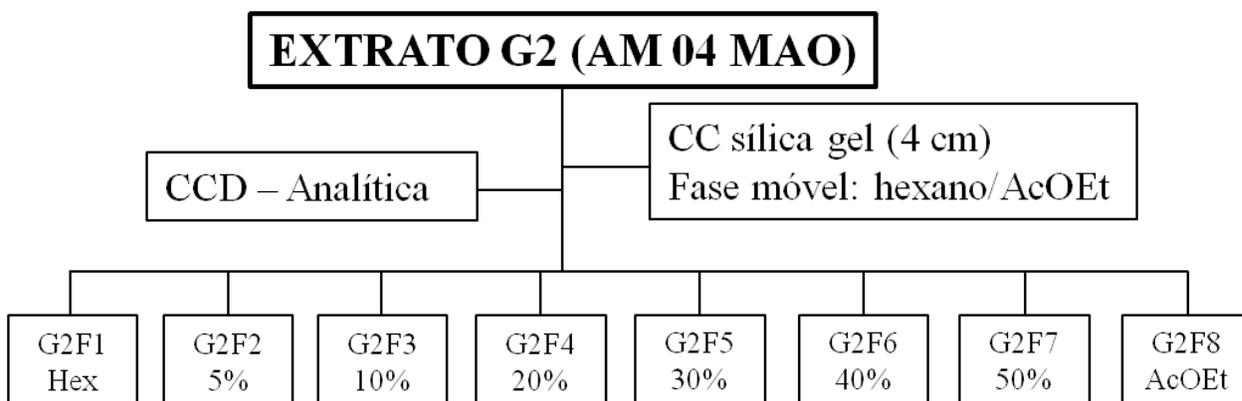


Figura 18 – Frações obtidas do extrato de *D. floribundus* do Grupo 2 – G2 (AM04MAO).

Os rendimentos das frações do extrato G2 analisadas por CCD foram de: 0,1% (G2F1), 0,2% (G2F2), 12,2% (G2F3), 18,8% (G2F4), 19,6% (G2F5), 27,8% (G2F6), 10,3% (G2F7) e 11,1% (G2F8).

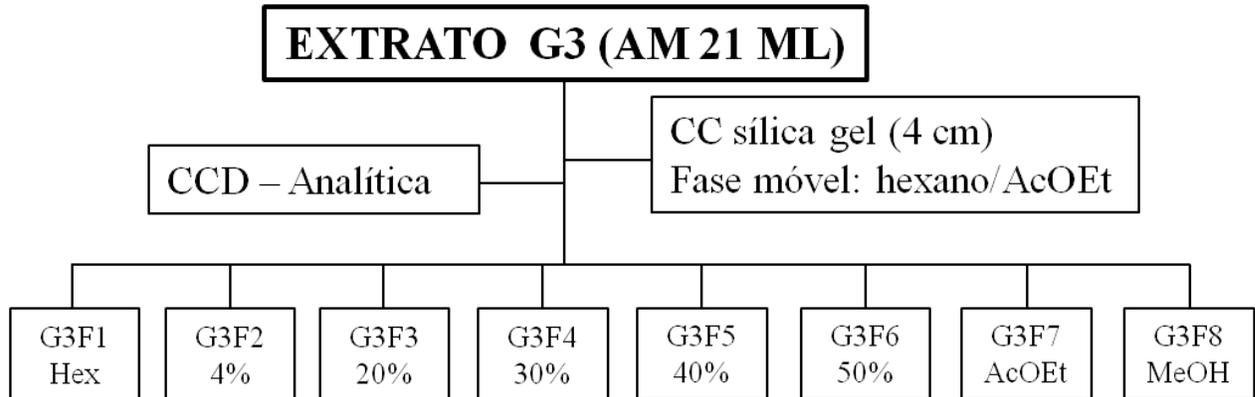


Figura 19 – Frações obtidas do extrato de *D. scandens* do Grupo 3 – G3 (AM21ML).

A fração G3F6 apresentou características físicas diferenciadas e, por este motivo, foi refracionada e subdividida em outras duas frações: G3F6sob (sob: sobrenadante) e G3F6sol (sol: sólida). Os maiores rendimentos de frações do extrato G3 foram obtidos com as frações G3F5 (5,35%), G3F8 (5,66%), G3F6sob (19,33%) e G3F6sol (42,16%). Devido à baixa quantidade de material fracionado, o rendimento das demais frações deste extrato não foi quantificado.

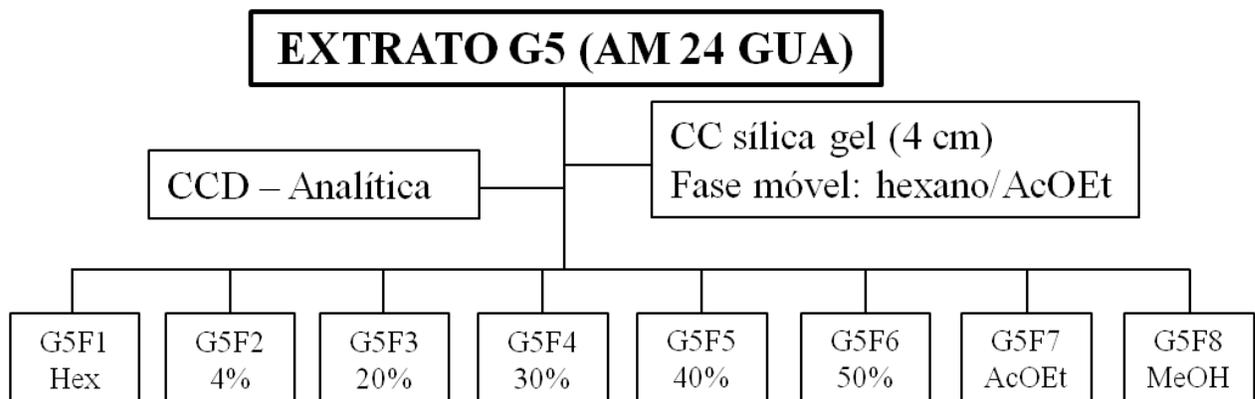


Figura 20 – Frações obtidas do extrato de *D. scandens* do Grupo 5 – G5 (AM24GUA).

As frações G5F8 (7,27%), G5F6 (11,19%), G5F7 (55,48%) apresentaram os maiores rendimentos de frações do extrato G5. As demais frações deste extrato não tiveram o rendimento quantificado, em função da baixa quantidade de material fracionado.

### **5.2.3 Identificação dos constituintes das frações dos extratos de timbó por Cromatografia Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de Massa (EM).**

A identificação dos constituintes majoritários das frações dos extratos de timbó foi realizada no Laboratório de Química do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), por Cromatografia em fase Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de Massa (EM). As frações dos extratos de timbó G3F6sob, G3F6sol, G5F6 e G5F7 foram selecionadas para as análises por estarem disponíveis em maiores quantidades e por terem apresentado diferenças qualitativas e quantitativas quanto às suas composições químicas.

As análises foram realizadas em cromatógrafo gasoso modelo QP-2010 Shimadzu<sup>®</sup>, com detector por espectrometria de massas (CG-EM), coluna VF-1MS da Varian<sup>®</sup> (15,0 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m), utilizando hélio (He) como gás de arraste em fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. A injeção em modo split 1:10 foi realizada com injetor a 250°C. A temperatura do detector foi de 300°C e o forno foi programado de isoterma a 60°C por 2 min, 60 °C a 290°C a 6°C min<sup>-1</sup>, seguido de isoterma de 290°C por 30 min, com tempo de corrida de 67,83 min. Para a detecção foi aplicada a técnica de impacto eletrônico a 70 e V. Os cromatogramas das frações analisadas são apresentados na Figura 21.

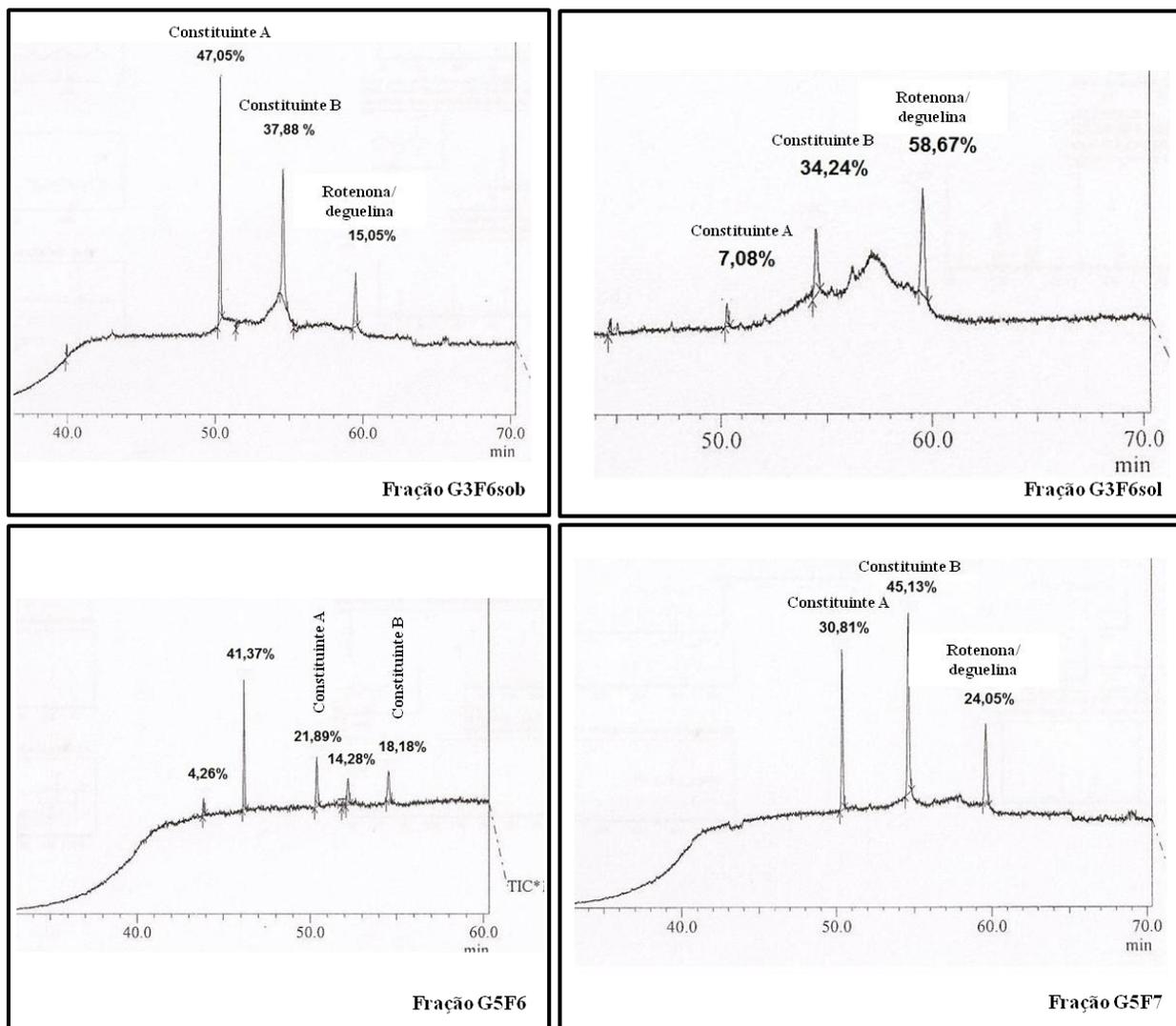


Figura 21 – Cromatogramas das frações de extratos de timbó analisadas por Cromatografia em fase Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de Massa (EM).

Os espectros de massas dos perfis cromatográficos (Figuras 22, 23, 24 e 25) mostraram picos íons moleculares indicativos das presenças de rotenona/deguelina ( $m/z$  igual a 394 Da), não sendo possível identificar os demais picos apenas por CG-EM. Os rotenóides deguelina e rotenona apresentam o mesmo perfil de fragmentação e, portanto, não foi possível distinguí-los apenas por CG-EM. As propostas de fragmentação de massa para os constituintes A e B e para a rotenona são apresentadas nas Figuras 26, 27 e 28.

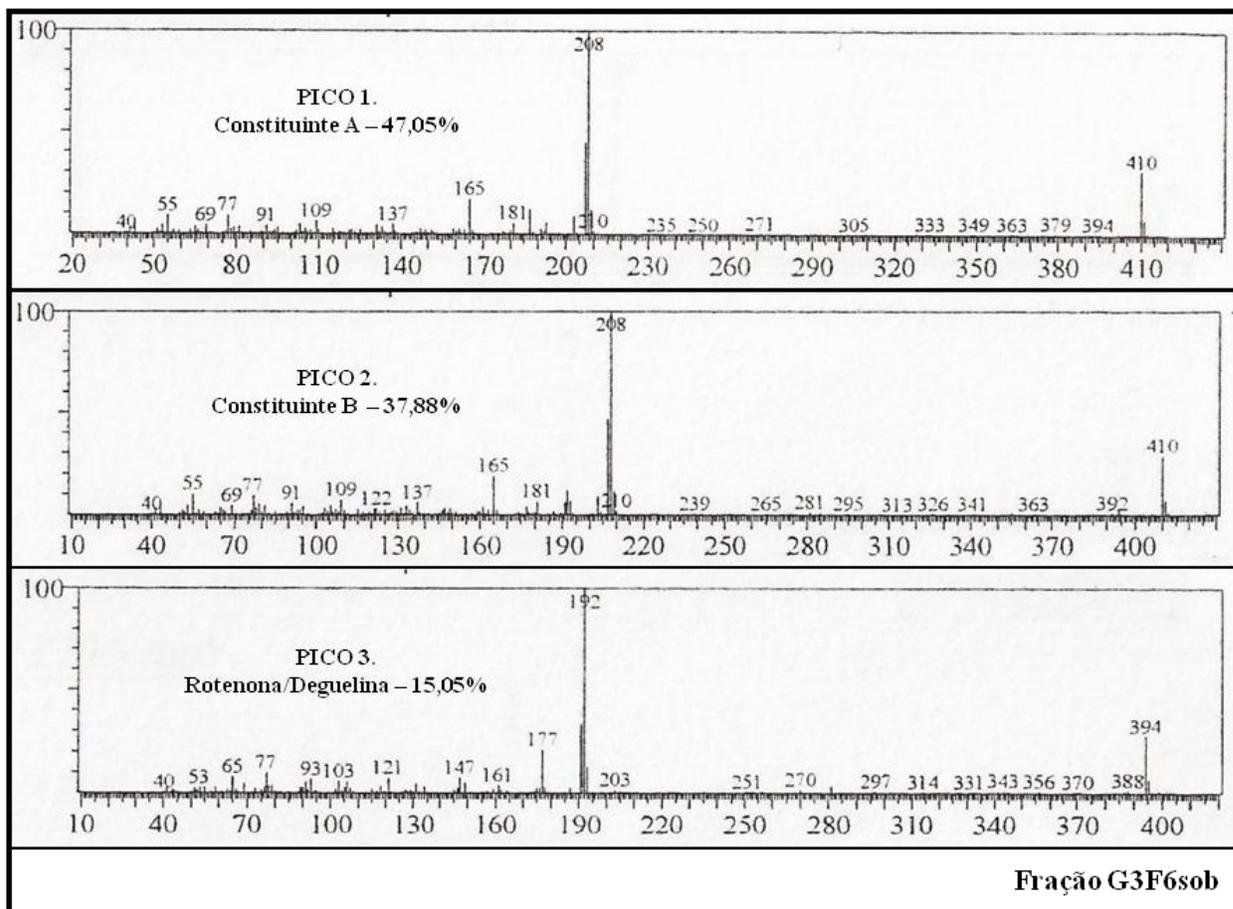


Figura 22 – Especto de massa da fração do extrato de timbó G3F6sob.

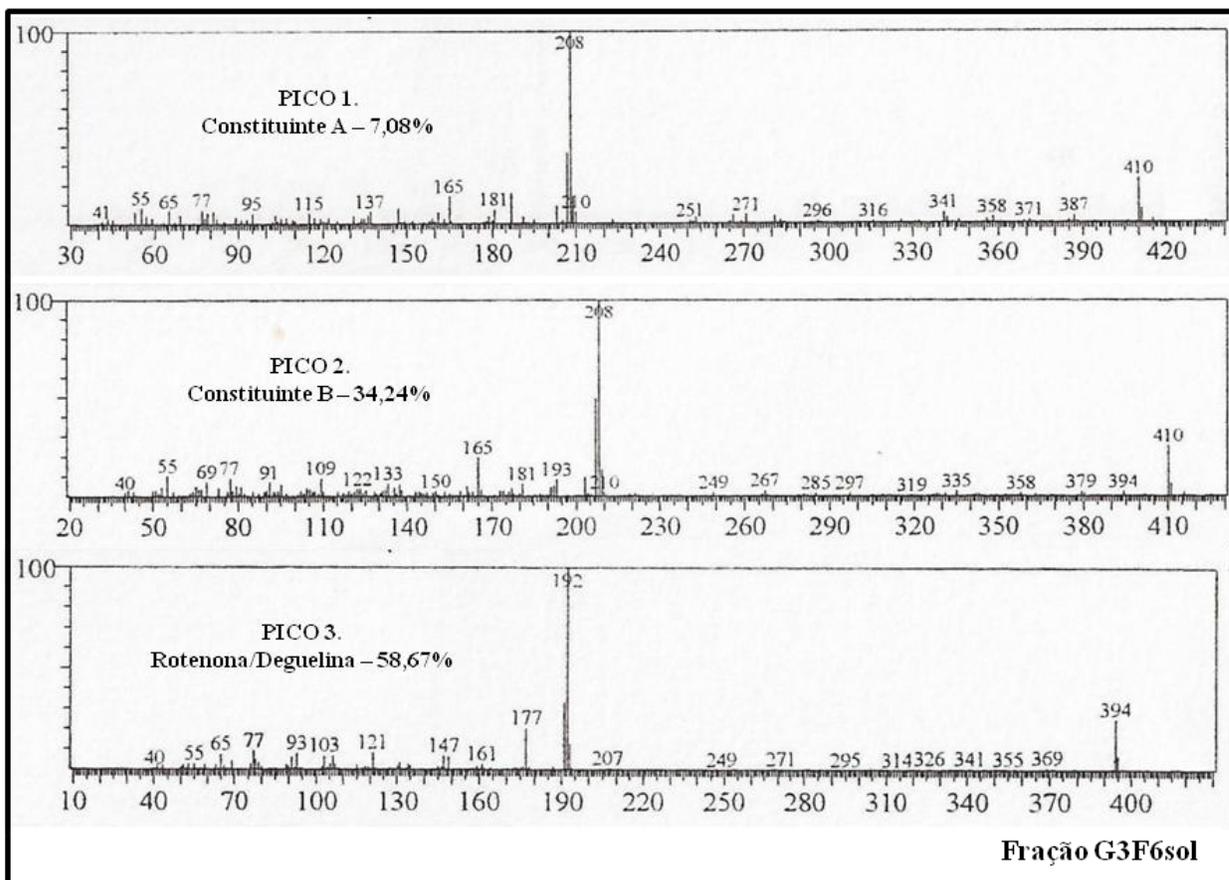


Figura 23 – Espectro de massa da fração do extrato de timbó G3F6sol.

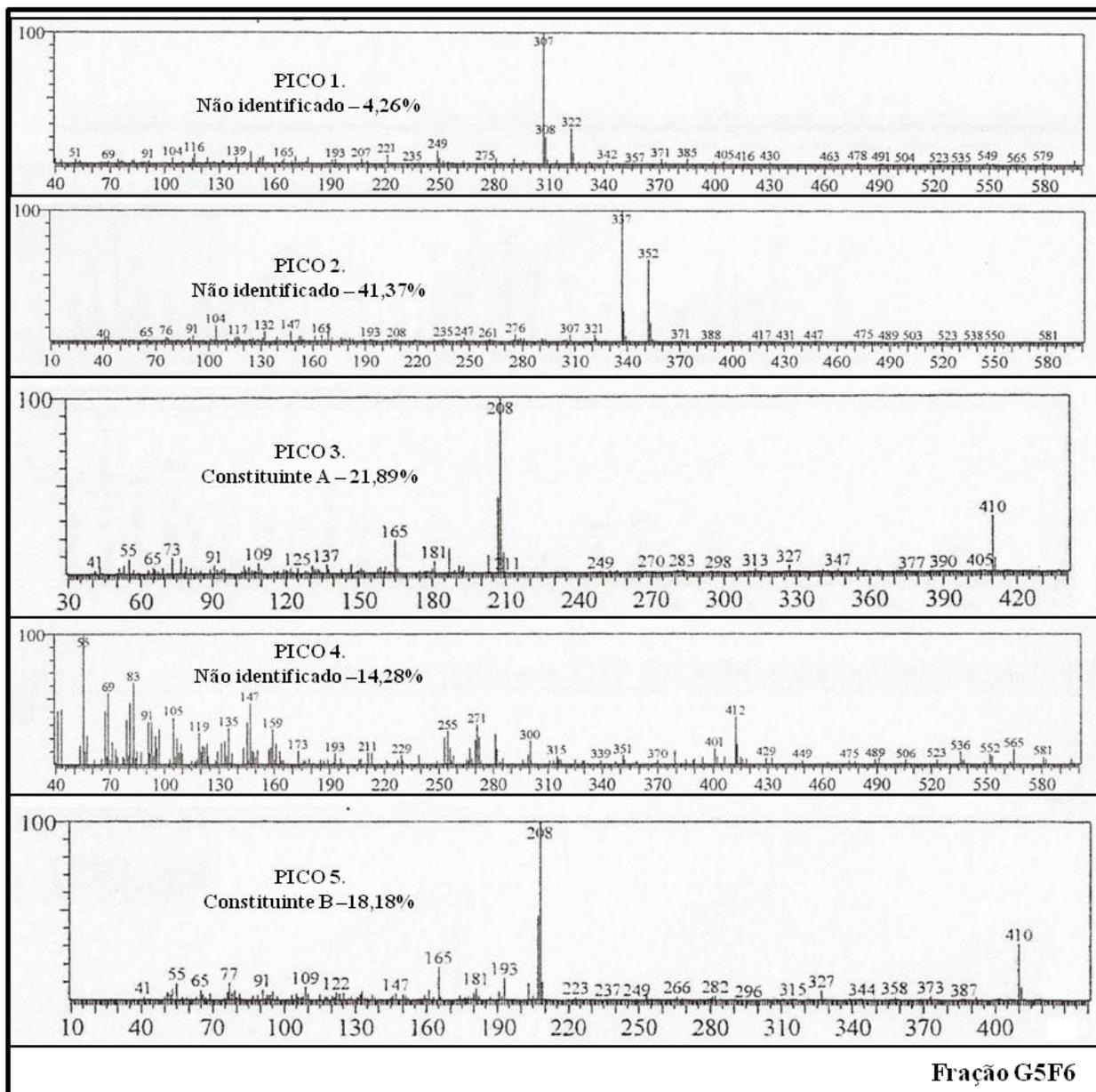


Figura 24 – Espectro de massa da fração do extrato de timbó G5F6.

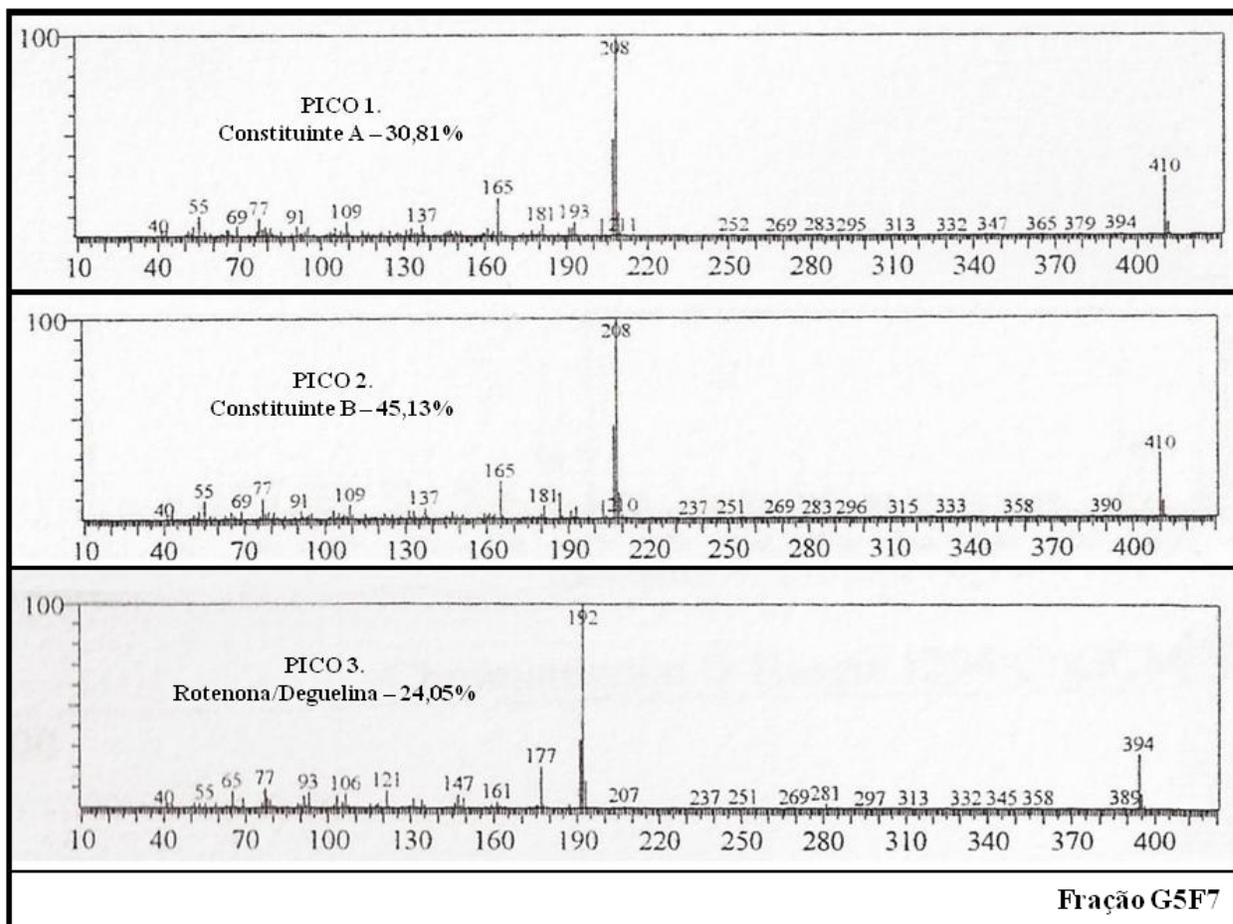


Figura 25 – Especto de massa da fração do extrato de timbó G5F7.

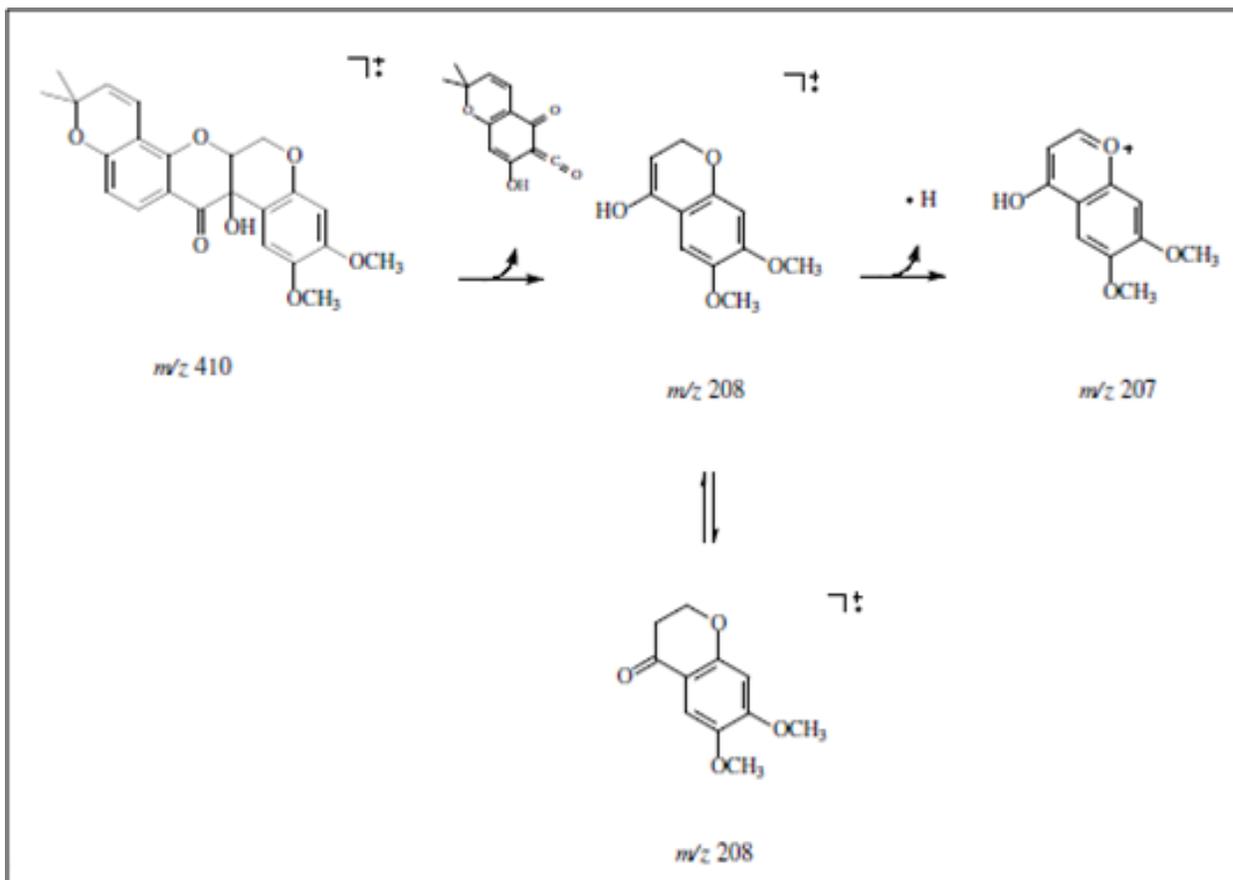


Figura 26 – Proposta de fragmentação de massa para o constituinte B.

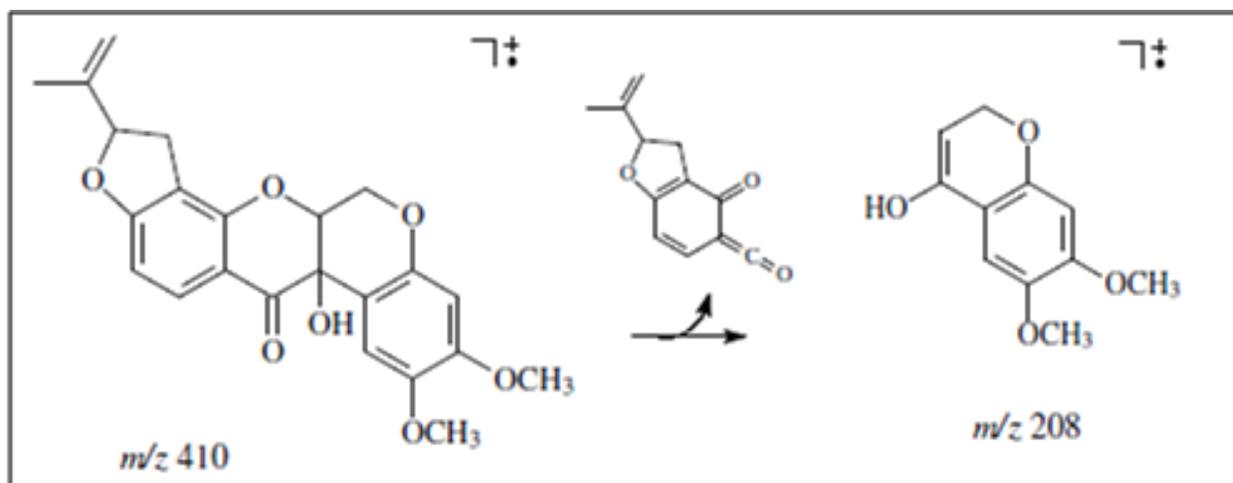


Figura 27 – Proposta de fragmentação de massa do constituinte A.

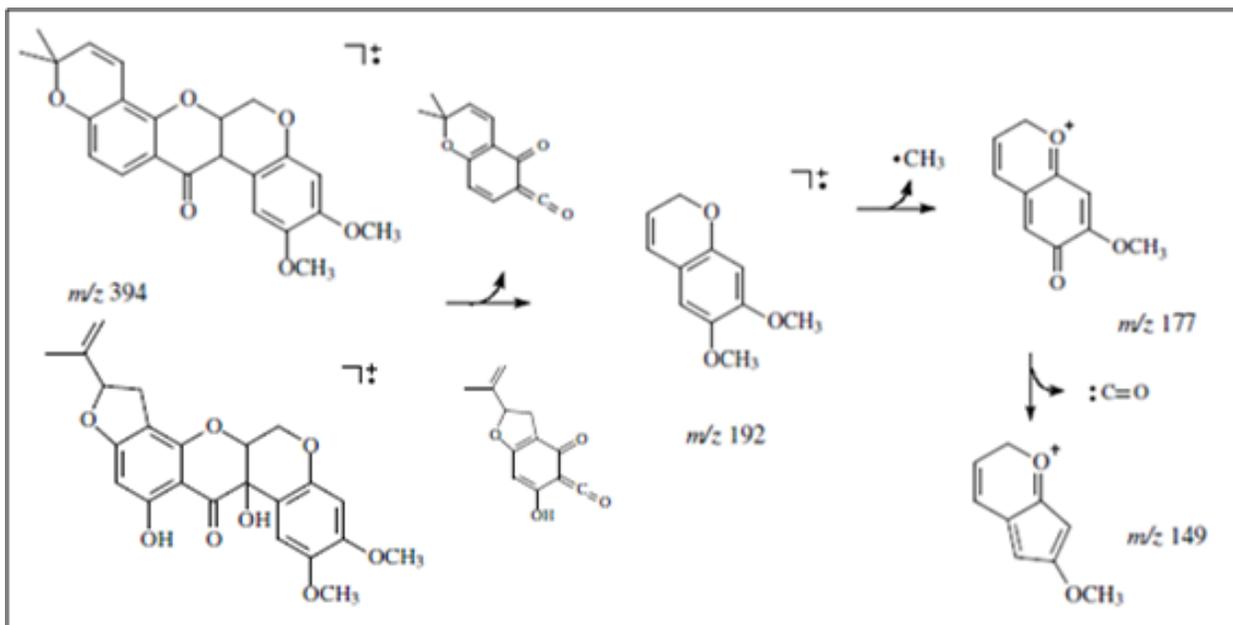


Figura 28 – Proposta de fragmentação de massa para rotenona e deguelina.

#### 5.2.4 Identificação dos constituintes das frações dos extratos de timbó por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$  – 500 MHz) foram registrados utilizando espectrômetro Varian modelo INOVA 500 de 11,7 T, pertencente ao Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA.

O solvente utilizado para as análises foi o clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são expressos em unidades ppm em relação ao TMS e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), d (duplete), dd (duplete duplo), e t (triplete).

Os Resultados experimentais de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$  em ppm,  $\text{CDCl}_3$ , 500MHz) para os rotenóides rotenona e deguelina comparados com a literatura são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Resultados experimentais de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$  em ppm,  $\text{CDCl}_3$ , 500MHz) para a rotenona e deguelina.

H	Rotenona ( $\delta$ ) <sup>exp</sup>	Rotenona ( $\delta$ ) <sup>lit1</sup>	Deguelina ( $\delta$ ) <sup>exp</sup>	Deguelina ( $\delta$ ) <sup>lit2</sup>
1	6,78 (s)	6,71 (s)	6,78 (s)	6,72 (s)
4	6,46 (s)	6,38 (s)	6,46 (s)	6,38 (s)
6	4,61 (dd, 12,1; 3,2)	4,61 (dd, 12,2; 2,5)	4,61 (dd, 12,1; 3,2)	4,56 (dd, 12,4; 3,2)
	4,19 (d, 11,9)	4,17 (d, 12,2)	4,19 (d, 11,9)	4,11 (d, 12,4)
6a	4,94 (s)	4,86 (s)	4,93 (m)	4,84 (m)
12a	3,84 (d)	3,76 (d)	3,84 (d)	3,77 (d)
10	6,52 (d, 8,5 Hz)	6,43 (d, 8,5 Hz)	6,52 (d, 8,5 Hz)	6,38 (d, 8,8 Hz)
11	7,85 (d, 8,5 Hz)	7,76 (d, 8,5 Hz)	7,85 (d, 8,5 Hz)	7,67 (d, 8,8 Hz)
4'	3,33 (dd, 15,9; 9,8)	3,30 (dd, 15,5; 8,2)	6,52 (d, 8,5 Hz)	6,57 (d, 10 Hz)
	2,96 (dd, 15,9; 8,2)	2,92 (dd, 15,5; 8,0)		
5'	5,24 (t, 9,2)	5,21 (t, 9,2)	5,3 (s)	5,48 (d)
7'	5,08 (s)	5,01 (s)	1,39 (s)	1,32 (s)
	4,94 (s)	4,88 (s)		
8'	-	-	1,46 (s)	1,38 (s)
8'-Me	1,78 (s)	1,70 (s)	-	-
O-Me (2)	3,77 (s)	3,70 (s)	3,77 (s)	3,70 (s)
O-Me (3)	3,81 (s)	3,73 (s)	3,81 (s)	3,73 (s)

Por RMN  $^1\text{H}$  foi possível identificar a mistura de rotenona e deguelina na fração G5F7 (Figura 29). Os dados foram comparados com a literatura, sendo possível apenas "sugerir" a presença dessas substâncias, uma vez que seriam necessárias a realização de análises complementares para confirmar a presença desses constituintes.

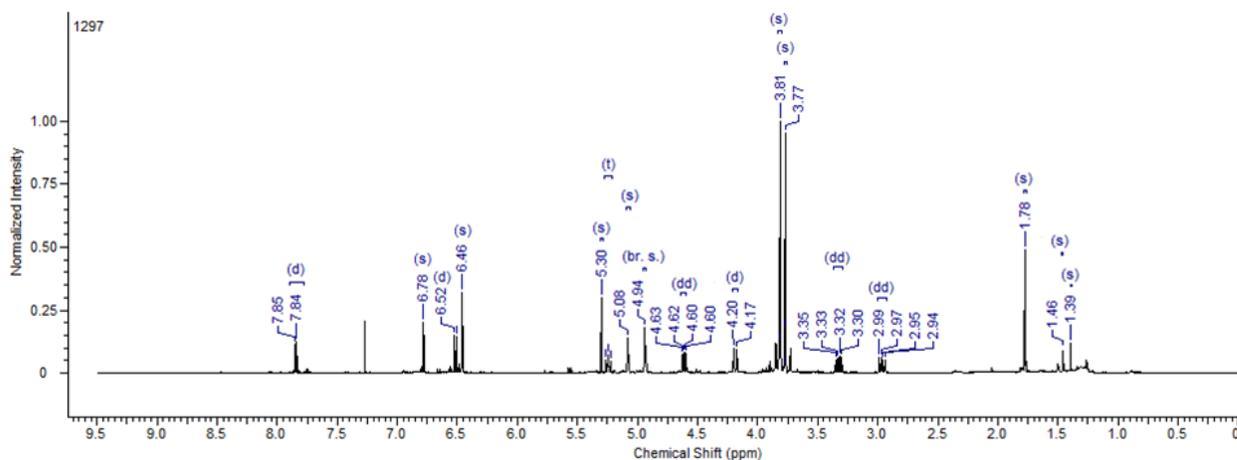


Figura 29 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para a fração do extrato de timbó G5F7.

Dois dubletos, em  $\delta_H$  6,52 e 7,85 (1H,  $J = 9,2$  Hz), atribuídos aos hidrogênios H-10 e H-11 são característicos de rotenóides. O singlete em  $\delta_H$  1,39 e 1,46 são referentes aos hidrogênios das metilas 7' e 8' da deguelina. Para a rotenona esses sinais são um singlete em  $\delta_H$  1,78 para os hidrogênios da metila em 8' e dois singletos em  $\delta_H$  4,94 e 5,08 referentes aos hidrogênios do carbono 7'.

A rotenona apresenta dois duplos dupletos em  $\delta_H$  2,96 e 3,33 referentes aos hidrogênios do carbono 4' enquanto que o duplete em  $\delta_H$  6,52 se refere aos hidrogênio do carbono 4' da deguelina. Os demais sinais são os mesmos para ambas as moléculas.

### **5.2.5 Desenvolvimento dos bioensaios**

Os bioensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Entomologia da Embrapa Acre, para avaliar o efeito tóxico de extratos brutos e de frações majoritárias de raízes de timbó comparadas à rotenona purificada sobre lagartas de *S. frugiperda*, pelas vias de intoxicação de ingestão de dieta contaminada, contato tópico e contato em superfície contaminada (papel-filtro).

Os bioensaios por contato tópico e por superfície contaminada foram desenvolvidos em câmaras climatizadas tipo B.O.D. e os de ingestão de dieta contaminada foram conduzidos em sala climatizada, mantidos a temperatura de  $25 \pm 3$  °C, fotofase de 12 horas e umidade relativa de  $65 \pm 5\%$ .

Foram realizados testes preliminares com todas as formas de exposição dos insetos aos produtos, de acordo com a metodologia descrita nos itens 5.2.5.1, 5.2.5.2 e 5.2.5.3, para determinação das seguintes variáveis: volume e concentração dos produtos a serem utilizados, números de insetos por placa de Petri ou copo descartável e tempo de duração para avaliação dos

experimentos. Os solventes utilizados foram a acetona p.a. para os efeitos de contato em superfície contaminada e de contato tópico e o álcool etílico p.a. 50% para a via de ingestão de folhas contaminadas.

#### 5.2.5.1 Contato em superfície contaminada (papel-filtro)

Discos de papel-filtro de 5 cm de diâmetro foram impregnados com 0,2 mL das diferentes concentrações dos produtos (Figura 30A) e mantidos em câmara de fluxo laminar por cerca de 2 minutos para eliminação do solvente. Posteriormente foram colocados em placas de Petri para em seguida receberem, de forma individualizada, uma lagarta de *S. frugiperda* aproximadamente de 3° instar, que permaneceram sem alimentação até o final das avaliações (Figura 30B). Cada parcela do bioensaio foi constituída por 10 placas de Petri.

Os experimentos tiveram duração de dois dias e foram repetidos por três vezes, com delineamento inteiramente casualizado e quatro repetições, sendo avaliada a mortalidade dos indivíduos com 24 e 48 horas.



Figura 30 – Bioensaios desenvolvidos com lagartas de *S. frugiperda* por superfície contaminada. Discos de papel-filtro impregnados com 0,2 mL dos produtos (A) e placas de petri infestadas com uma lagarta aproximadamente de 3° instar (B). Fotos: Alecio (2010).

### 5.2.5.2 Contato tópico

Foi utilizada uma micro-seringa graduada com capacidade para 10µl para aplicar 1µl das diferentes concentrações dos extratos de timbó e da rotenona purificada na parte central do corpo das lagartas de *S. frugiperda*, aproximadamente de 3º instar. No tratamento controle foi aplicado em cada inseto apenas o solvente (acetona). Em cada placa de Petri foi mantida apenas uma lagarta sem alimento durante o período de avaliações, sendo que cada parcela do bioensaio foi constituída por 10 placas de Petri (Figura 31).

Os experimentos tiveram duração de dois dias e foram repetidos por três vezes, com delineamento inteiramente casualizado e quatro repetições, sendo avaliada a mortalidade dos indivíduos com 24 e 48 horas.

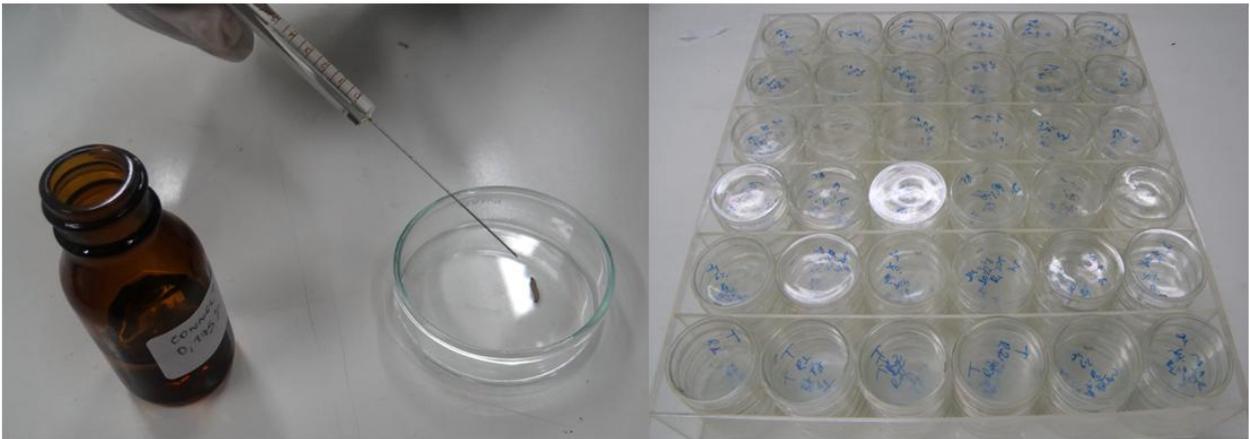


Figura 31 – Bioensaio desenvolvido com lagartas de *S. frugiperda* por contato tópico, mantendo apenas uma lagarta aproximadamente de 3º instar por placa de Petri. Fotos: Alecio (2012).

### 5.2.5.3 Ingestão de dieta contaminada

Para o desenvolvimento dos bioensaios por ingestão alimentar de *S. frugiperda*, 75 g de dieta alimentar dos insetos previamente preparada e resfriada a temperatura de 40 °C foi

depositada em um Becker, ainda na forma liquefeita (Figura 32A). Foram adicionados a dieta de cada Becker 3 mL das diferentes concentrações dos produtos, sendo essa mistura homogeneizada com um bastão de vidro por três minutos. Em seguida, a dieta contaminada foi depositada em uma caixa tipo gerbox quadrada de 11 cm de largura e após a solidificação a dieta foi reduzida a pedaços de aproximadamente 4 cm<sup>3</sup> (Figura 32B).

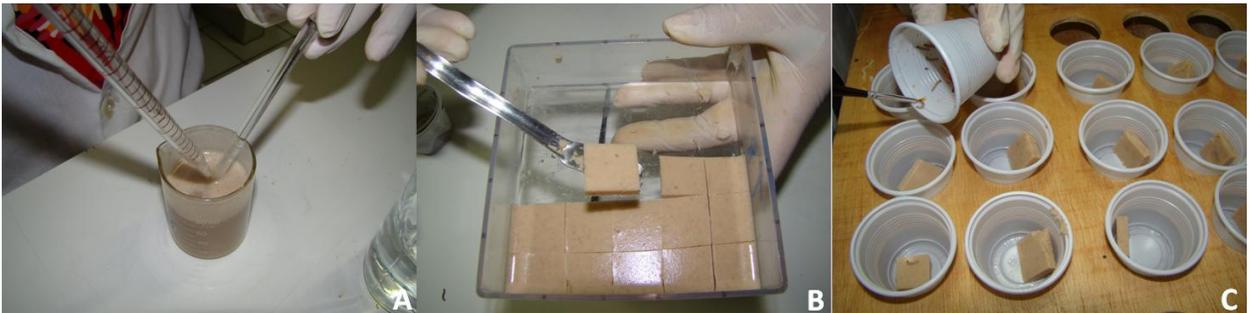


Figura 32 – Dieta alimentícia de lagartas de *S. frugiperda* depositada em Becker para adição de 1 mL das diferentes concentrações dos produtos (A), caixa tipo gerbox contendo dieta contaminada com as diferentes concentrações dos produtos testados (B) e copos descartáveis de 50 mL contendo a dieta contaminada e uma lagarta de *S. frugiperda* (C). Fotos: Alecio (2010).

Esses pedaços da mistura foram depositados individualmente em copos descartáveis com capacidade para 50 mL, que receberam uma lagarta de *S. frugiperda* (Figura 32C). Os recipientes foram fechados com um disco circular de acrílico de 4,7 cm de diâmetro. Cada parcela experimental foi constituída por seis copos descartáveis e os bioensaios foram desenvolvidos com pelo menos cinco tratamentos e quatro repetições.

Foram avaliadas diariamente até a fase adulta dos insetos as seguintes variáveis: mortalidade de lagartas, duração dos períodos larval e pupal, percentual de empupamento, peso e mortalidade de pupas e deformações dos insetos remanescentes.

#### **5.2.5.4 Determinação das concentrações dos produtos utilizadas nos bioensaios**

Foram realizados bioensaios preliminares de acordo com a metodologia descrita nos itens 5.2.5.1, 5.2.5.2 e 5.2.5.3, com intuito de se obter uma ampla faixa resposta de mortalidade dos insetos quando possível, ou seja, determinar quais as concentrações indicadas dos extratos de raízes de timbó e de rotenona purificada que provocam baixa (próximo a 0%) e alta (próximo a 100%) mortalidade dos indivíduos, segundo as três formas de exposição dos insetos.

Para isso, os extratos de raízes de timbó dos seis grupos de plantas selecionadas (Tabela 4) e a rotenona purificada foram diluídos em acetona p.a. e as concentrações variaram de 0% a 0,4% ( $m\ m^{-1}$ ) para todos os produtos avaliados por ingestão de dieta contaminada, de 1% a 8% ( $m\ v^{-1}$ ) para a rotenona purificada e de 0% a 60% ( $m\ v^{-1}$ ) para os extratos de timbó avaliados por contato tópico e por contato em superfície contaminada.

Os produtos não provocaram mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* durante os testes preliminares por contato em superfície contaminada, não sendo possível a obtenção da ampla faixa resposta de mortalidade nesta via de intoxicação. Dentro da ampla faixa de resposta obtida por ingestão de dieta contaminada e por contato tópico foram definidas as concentrações dos extratos de raízes de timbó e da rotenona purificada utilizadas para realização dos bioensaios definitivos (Tabela 14).

Tabela 14 – Concentrações de extratos de raízes de timbó e de rotenona purificada utilizadas para realização dos bioensaios por contato tóxico e ingestão de dieta contaminada sobre lagartas de *S. frugiperda*.

Produto	Forma de exposição	Solvente	Nº. de tratamentos	Concentração (m m <sup>-1</sup> )
Extratos de raízes de timbó	Contato tóxico	Acetona p.a.	07	0% (controle), 10%, 20%, 30%, 40%, 50% e 60%
	Ingestão de dieta contaminada	Acetona p.a.	08	0% (controle), 2.10 <sup>-2</sup> %, 4.10 <sup>-2</sup> %, 8.10 <sup>-2</sup> %, 16.10 <sup>-2</sup> %, 24.10 <sup>-2</sup> %, 32.10 <sup>-2</sup> % e 40.10 <sup>-2</sup> %
Rotenona Purificada	Contato tóxico	Acetona p.a.	06	0% (controle), 1%, 2%, 4%, 6% e 8%
	Ingestão de dieta contaminada	Acetona p.a.	08	0% (controle), 2.10 <sup>-2</sup> %, 4.10 <sup>-2</sup> %, 8.10 <sup>-2</sup> %, 16.10 <sup>-2</sup> %, 24.10 <sup>-2</sup> %, 32.10 <sup>-2</sup> % e 40.10 <sup>-2</sup> %

As frações dos extratos de raízes de timbó que apresentaram rendimento superior a 5% (m v<sup>-1</sup>) do extrato foram avaliadas por ingestão de dieta contaminada de forma isolada (Tabela 15), combinadas com outras frações de mesmo extrato e associadas com a rotenona purificada (Tabelas 16 e 17). As concentrações das combinações utilizadas nestes bioensaios foram definidas com base nas determinações toxicológicas obtidas a partir dos experimentos realizados com os extratos brutos de timbó e com a rotenona purificada, em busca da obtenção do detalhamento dos efeitos associados dos produtos.

Tabela 15 – Frações dos extratos de raízes de timbó avaliadas por ingestão de dieta contaminada sobre lagartas de *S. frugiperda*

Grupo (G)	Frações (F)	Nº. de tratamentos	Concentração das frações (m m <sup>-1</sup> )
G2	G2F4 e G2F5	07	0% (controle), 2.10 <sup>-2</sup> %, 4.10 <sup>-2</sup> %, 8.10 <sup>-2</sup> %, 12.10 <sup>-2</sup> %, 16.10 <sup>-2</sup> % e 20.10 <sup>-2</sup> %.
G3	G3F5, G3F6sol*, G3F6sob**, G3F7 e G3F8	06	0% (controle), 1.10 <sup>-2</sup> %, 2.10 <sup>-2</sup> %, 4.10 <sup>-2</sup> %, 8.10 <sup>-2</sup> % e 12.10 <sup>-2</sup> %.
G5	G5F5, G5F6, G5F7 e G5F8	06	0% (controle), 1.10 <sup>-2</sup> %, 2.10 <sup>-2</sup> %, 4.10 <sup>-2</sup> %, 8.10 <sup>-2</sup> % e 12.10 <sup>-2</sup> %.

\*G3F6sol: Fração obtida da porção sólida do extrato de timbó G3 (AM21ML); \*\*G3F6sob: Fração obtida da porção sobrenadante do extrato de timbó G3 (AM21ML).

Tabela 16 – Combinação de concentrações entre frações do extrato de timbó do Grupo 3 (G3) (AM21ML) e com a rotenona purificada sobre lagartas de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada

Tratamento (T)	Bioensaio 1	Bioensaio 2	Bioensaio 3	Bioensaio 4
	Grupo(G), Fração(F) e concentração (m m <sup>-1</sup> )	Rotenona, Grupo(G), Fração(F) e concentração (m m <sup>-1</sup> )	Rotenona, Grupo(G), Fração(F) e concentração (m m <sup>-1</sup> )	Rotenona, Grupo(G), Fração(F) e concentração (m m <sup>-1</sup> )
T1	Controle (Solvente)	Controle (Solvente)	Controle (Solvente)	Controle (Solvente)
T2	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> %
T3	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F5 1,2.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %	G3F6sol 0,6.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %
T4	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sob 0,4.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> %	G3F6sol 0,6.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> % + F8 0,004%	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %
T5	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sob 1,2.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	G3F6sol 0,6.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %
T6	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4. 10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F5 1,2.10 <sup>-2</sup> %	G3F6sol 0,6.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %
T7	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 1,2.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sob 0,4.10 <sup>-2</sup> %	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,2.10 <sup>-2</sup> %
T8	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sob 1,2.10 <sup>-2</sup> %	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,2.10 <sup>-2</sup> %
T9	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 1,2.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> %	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> %
T10	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 1,2.10 <sup>-2</sup> %	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> % + rotenona 0,04%	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %
T11	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> % + rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %
T12	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 1,2.10 <sup>-2</sup> %	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %
T13	-	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> %
T14	-	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,2.10 <sup>-2</sup> %

Tabela 17 – Combinação de concentrações entre frações do extrato de timbó do Grupo 5 (G5) (AM24GUA) e com rotenona purificada sobre lagartas de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada.

Tratamento (T)	Bioensaio 1	Bioensaio 2
	Grupo(G), Fração(F) e concentração (m m <sup>-1</sup> )	Rotenona, Grupo(G), Fração(F) e concentração (m m <sup>-1</sup> )
T1	Controle (Solvente)	Controle (Solvente)
T2	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %
T3	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %
T4	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 2.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 1,2.10 <sup>-2</sup> %
T5	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 0,4.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 0,4.10 <sup>-2</sup> %
T6	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 2.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 1,2.10 <sup>-2</sup> %
T7	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %
T8	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F8 1,2.10 <sup>-2</sup> %	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F8 1,2.10 <sup>-2</sup> %
T9	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F7 0,4.10 <sup>-2</sup> %
T10	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F7 1,2.10 <sup>-2</sup> %
T11	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %
T12	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 1,2.10 <sup>-2</sup> %
T13	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 0,4.10 <sup>-2</sup> %
T14	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 1,2.10 <sup>-2</sup> %

### 5.2.6 Análise dos dados

Os valores de mortalidade de *S. frugiperda* foram corrigidos pela mortalidade natural da testemunha, utilizando a fórmula de ABBOTT (1925) e somente quando os níveis de mortalidade, devido ao efeito dos produtos, atingiram valores superiores a 50% dos insetos avaliados eram submetidos à análise de Probit, de acordo com a metodologia descrita por FINNEY (1971), utilizando-se o programa de análises estatísticas SAS (SAS INSTITUTE, 2001), para determinação das concentrações (CL<sub>50</sub>), doses (DL<sub>50</sub>) e tempos letais (TL<sub>50</sub>). A razão de toxicidade (RT) foi obtida através do quociente entre a CL<sub>50</sub>, DL<sub>50</sub> e TL<sub>50</sub> do extrato que apresentou menor toxicidade e as CL<sub>50s</sub>, DL<sub>50s</sub> e TL<sub>50s</sub> dos demais extratos.

Os valores referentes à duração dos períodos larval e pupal e peso de pupas dos insetos remanescentes foram corrigidos pelos desvios padrão médios dos tratamentos controle (testemunhas), para uniformização dos dados quando necessário, e submetidos à análise conjunta

de variância para agrupamento das médias dos tratamentos pelo teste de SCOTT-KNOTT (1974) ( $P \leq 0,05$ ). Os dados referentes aos valores de mortalidade de pupas não foram suficientes para realização de análise de variância, sendo os tratamentos analisados por meio de médias e desvios padrão.

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para que fossem realizados os bioensaios preliminares com os extratos de *D. scandens* e *D. floribundus*, representantes de seis grupos de timbó (Tabela 4) e com a rotenona purificada, avaliados por contato em superfície contaminada (papel filtro) sobre lagartas de *S. frugiperda*, foram demandadas grandes quantidades de extratos tendo como resultados baixos valores de mortalidade dos insetos. Por estes motivos e devido à baixa quantidade de extratos disponíveis para realização dos experimentos, os bioensaios definitivos não foram realizados para esta via de intoxicação.

### 5.3.1 Efeito de extratos e frações de timbó e da rotenona purificada sobre a mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* por contato tópico e por ingestão de dieta contaminada

Por contato tópico, os extratos de timbó G3 e G6 nas concentrações de 60% e 30% ( $\text{m v}^{-1}$ ) provocaram os maiores valores de mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* (variação entre 64,2% e 72,5%, respectivamente), enquanto que os extratos G1 e G2 e a rotenona purificada apresentaram valores de mortalidade inferiores a 9%, 18% e 31% dos insetos, respectivamente (Tabela 18).

Tabela 18 – Mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* avaliadas por contato tópico com os extratos dos seis grupos de timbó (*D. scandens* e *D. floribundus*) e com rotenona purificada.

Trat	Concentração de extratos (m v <sup>-1</sup> )	Mortalidade média e desvio padrão (%)							Concentração de rotenona purificada (m v <sup>-1</sup> )	
		G1*	G2*	G3*	G4*	G5*	G6*			
		AM26GUA	AM04MAO	AM21ML	AM22CZS	AM24GUA	AM 02 ML	AM06CZS		
T1	0%	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0	0,0±0	0%	0,0±0,0
T2	10%	7,5±4,6	8,8±8,4	1,7±3,9	25,9±10,5	8,3±7,5	13,3±9,0	5,0±7,8	1%	2,8±5,0
T3	20%	8,8±3,5	6,3±5,2	7,5±10,5	43,3±7,4	21,7±4,8	30,0±7,4	13,3±9,0	2%	8,3±5,0
T4	30%	7,5±4,6	11,3±8,4	10,8±10,8	42,5±11,3	30,0±7,4	72,5±11,4	13,3±10,8	4%	8,3±5,0
T5	40%	8,8±3,5	8,8±6,4	29,2±10,8	38,3±12,0	30,0±4,7	68,3±10,3	36,7±9,4	6%	16,7±5,8
T6	50%	6,3±5,2	10,0±9,2	31,7±11,9	43,3±9,4	40,0±9,3	66,7±11,1	50,8±12,8	8%	30,6±5,9
T7	60%	8,8±6,4	17,5±9,8	64,2±17,8	42,5±10,3	42,5±4,4	58,3±12,8	64,2±11,2	-	-

\*G1: Grupo 1 (*D. scandens* - AM26GUA ); G2: Grupo 2 (*D. floribundus* - AM04MAO ); G3: Grupo 3 (*D. scandens* - AM21ML); G4: Grupo 4 (*D. scandens* - AM22CZS); G5: Grupo 5 (*D. scandens* - AM24GUA); G6: Grupo 6 (*D. scandens* - AM 02 ML e AM06CZS); Trat.: Tratamento (T).

As concentrações dos extratos de timbó superiores a 30% (m v<sup>-1</sup>), quando aplicadas topicamente, não aumentaram a mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* na mesma proporção em que as concentrações foram elevadas, chegando a diminuí-la para o extrato G4. Nessas concentrações elevadas, as lagartas mudaram de instares mais rapidamente, em pequenos intervalos de tempo (4 a 12 horas), quando comparadas as menores concentrações dos extratos (10% e 20% m v<sup>-1</sup>) e ao tratamento controle, o que pode ser uma estratégia de destoxificação ou ocorrência de provável alteração hormonal relacionada à ecdise adotada pelos insetos nessas condições. DUCROT (2004) relata que a rotenona pode exercer efeito antialimentar e por sua vez afetar potencialmente atividades biológicas ou provocar alterações hormonais, causando a morte de insetos.

Por ingestão de dieta contaminada, os valores de mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* foram mais elevados do que por contato tópico, mesmo sendo utilizadas concentrações mais baixas dos produtos. Todos os extratos de timbó, exceto o G1, provocaram valores de mortalidade superiores a 50% dos insetos, com destaque para os extratos G3, G4, G5 e G6 que promoveram mortalidades acima de 70% das lagartas a partir da concentração de 16.10<sup>-2</sup>% (m m<sup>-1</sup>). Nesses bioensaios, os valores máximos de mortalidade dos insetos provocados pelo extrato G1 e pela rotenona purificada foram de 27,1% e 41,7%, respectivamente (Tabela 19).

Tabela 19 – Mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada com os extratos dos seis grupos de timbó (*D. scandens* e *D. floribundus*) e com a rotenona purificada.

Mortalidade média e desvio padrão (%)										
Trat	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	G1* AM26GUA	G2* AM04MAO	G3* AM21ML	G4* AM22CZS	G5* AM24GUA	G6*			Rotenona purificada
							AM 02 ML	AM15CZS	AM25GUA	
T1	0%	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
T2	2.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0	25,0±8,3	35,4±9,2	27,1±15,3	25,0±13,9	39,6±23,5	35,4±7,1	39,6±15,3	18,8±13,9
T3	4.10 <sup>-2</sup> %	2,1±0,0	29,2±23,6	47,9±13,3	45,8±24,8	37,5±17,3	54,2±11,8	60,4±30,8	50,0±12,6	12,5±17,3
T4	8.10 <sup>-2</sup> %	12,5±4,0	29,2±19,2	77,1±13,1	68,8±10,7	66,7±19,2	62,5±14,8	64,6±25,9	64,6±10,7	29,2±23,1
T5	16.10 <sup>-2</sup> %	12,5±4,0	37,5±21,0	81,3±19,4	89,6±8,6	70,8±21,4	77,1±15,3	75,0±17,8	79,2±21,4	33,3±17,8
T6	24.10 <sup>-2</sup> %	18,8±1,8	62,5±13,6	87,5±16,7	95,8±7,7	68,8±18,8	83,3±21,8	77,1±12,4	87,5±14,8	33,3±12,6
T7	32.10 <sup>-2</sup> %	22,9±5,9	64,6±9,6	87,5±12,7	93,8±8,6	81,3±10,7	87,5±11,8	79,2±11,8	89,6±17,7	37,5±14,8
T8	40.10 <sup>-2</sup> %	27,1±4,8	70,8±28,5	93,8±7,4	95,8±7,7	79,2±17,3	87,5±11,8	79,2±17,3	89,6±12,4	41,7±8,9

\*G1: Grupo 1 (*D. scandens* - AM26GUA ); G2: Grupo 2 (*D. floribundus* - AM04MAO ); G3: Grupo 3 (*D. scandens* - AM21ML); G4: Grupo 4 (*D. scandens* - AM22CZS); G5: Grupo 5 (*D. scandens* - AM24GUA); G6: Grupo 6 (*D. scandens* - AM 02 ML, AM15CZS E AM25GUA); Trat.: Tratamento (T).

Apesar dos elevados valores de mortalidade de lagartas de *S. frugiperda*, obtidos ao final dos experimentos por ingestão de dieta contaminada, houve variação na mortalidade acumulada dos insetos em função das concentrações e do tempo de exposição aos extratos de timbó ao longo dos bioensaios. Quando as lagartas foram submetidas às maiores concentrações ( $16.10^{-2}\%$ ,  $24.10^{-2}\%$ ,  $32.10^{-2}\%$  e  $40.10^{-2}\%$   $m\ m^{-1}$ ) do extrato G3, os efeitos tóxicos apareceram logo nos primeiros dias e a mortalidade foi mais elevada, caracterizando o efeito knock-down. Foram observadas mortalidades dos insetos após permanecerem inativos por 2 a 3 dias ou durante ecdises prolongadas. As lagartas remanescentes apresentavam coloração escura, reduziram a alimentação e manifestaram dificuldades para a realização da ecdise (Figura 33). Em concentrações mais baixas, quando a ecdise foi completada, alterações no crescimento e anormalidades (deformações) geralmente foram observadas nos estádios subsequentes.

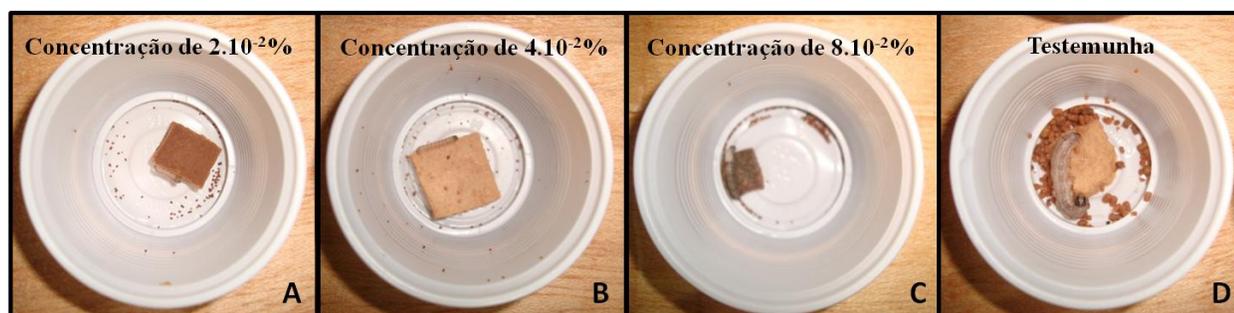


Figura 33 – Lagartas de *S. frugiperda* submetidas ao extrato de timbó G3 (AM21ML) por ingestão de dieta contaminada apresentando sintomas de redução da alimentação, retardo do crescimento e prologamento de ecdises (A e B) e deformações (C). Fotos: Alecio (2011).

Nesses bioensaios, enquanto o extrato G3 apresentou mortalidade de 71% das lagartas na concentração de  $8.10^{-2}\%$  ( $m\ m^{-1}$ ) nos primeiros sete dias de avaliação, a mesma concentração dos extratos G2, G4, G5 e G6 provocou, neste mesmo período, valores médios de mortalidade de 8%, 23%, 44% e 15% dos insetos, respectivamente. A mortalidade média de 71% de lagartas de *S.*

*frugiperda* atingida aos sete dias pela concentração de  $8.10^{-2}\%$   $m\ m^{-1}$  do extrato G3 somente foi alcançada aos 35, 20, 33 e 28 dias pelas concentrações de  $40.10^{-2}\%$ ,  $24.10^{-2}\%$ ,  $32.10^{-2}\%$  e  $40.10^{-2}\%$  ( $m\ m^{-1}$ ) dos extratos G2, G4, G5 e G6, respectivamente. Esses resultados podem ser atribuídos à diferença de composição química dos extratos (Tabela 3), sendo observados elevados valores de mortalidade para aqueles extratos com teores de rotenona e deguelina superiores a 40% ( $m\ m^{-1}$ ), enquanto que o extrato G1 apresentou baixos teores desses constituintes e proporcionou baixa mortalidade de lagartas de *S. frugiperda*.

As frações dos extratos de timbó G2F4, G3F6sol e G5F6, quando avaliadas isoladamente nas concentrações de  $16.10^{-2}\%$ ,  $12.10^{-2}\%$  e  $12.10^{-2}\%$  ( $m\ m^{-1}$ ) por ingestão de dieta contaminada, se destacaram por terem apresentado os maiores valores de mortalidade (20,8%, 54,2% e 37,5%, respectivamente) de lagartas em cada grupo de extrato (Tabela 20).

A fração G3F6sol, constituída por elevados teores de rotenona, de deguelina e do constituinte B e pequena quantidade do constituinte A (Figura 21) indica que esses constituintes, nas quantidades e proporções apresentadas, podem ser apontados como os principais responsáveis pela mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* provocada pelos extratos de timbó.

Entretanto, os valores de mortalidade apresentados pelas frações dos extratos foram inferiores aos observados para os extratos de timbó, principalmente para o G3, que provocou 77,1% de mortalidade das lagartas na concentração de  $32.10^{-2}\%$  ( $m\ m^{-1}$ ), indicando que este extrato possui outros constituintes ou quantidades e proporções mais adequadas para promoverem elevados valores de mortalidade de *S. frugiperda*. Em termos gerais, os valores de mortalidade observados para as frações dos extratos sobre os insetos foram menos expressivos do que os provocados pelos extratos brutos de timbó.

Tabela 20 – Mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada com frações de extratos de timbó dos grupos G2, G3 e G5.

Mortalidade média e desvio padrão (%)													
Trat.	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	G2* (AM04MAO )		Concentração (m m <sup>-1</sup> )	G3* (AM21ML)					G5* (AM24GUA)			
		F4	F5		F5	F6sol	F6sob	F7	F8	F5	F6	F7	F8
T1	0%	0,0±0,0	0,0±0,0	0%	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
T2	2.10 <sup>-2</sup> %	12,5±8,3	4,2±8,3	1.10 <sup>-2</sup> %	8,3±9,6	12,5±8,3	4,2±8,3	0,0±0,0	0,0±0,0	4,2±8,3	12,5±8,3	0,0±0,0	4,2±8,3
T3	4.10 <sup>-2</sup> %	16,7±14	8,3±9,6	2.10 <sup>-2</sup> %	4,2±8,3	29,2±8,3	4,2±8,3	0,0±0,0	4,2±8,3	0,0±0,0	8,3±9,6	16,7±19	0,0±0,0
T4	8.10 <sup>-2</sup> %	12,5±16	0,0±0,0	4.10 <sup>-2</sup> %	33,3±24	45,8±16	8,3±9,6	4,2±8,3	4,2±8,3	0,0±0,0	16,7±14	16,7±14	8,3±9,6
T5	12.10 <sup>-2</sup> %	12,5±8,3	4,2±8,3	8.10 <sup>-2</sup> %	16,7±14	50,0±14	0,0±0,0	12,5±8,3	20,8±16	0,0±0,0	29,2±16	29,2±16	16,7±19
T6	16.10 <sup>-2</sup> %	20,8±8,3	8,3±17	12.10 <sup>-2</sup> %	25,0±9,6	54,2±8,3	0,0±0,0	8,3±9,6	16,7±14	4,2±8,3	37,5±21	20,8±21	12,5±8,3
T7	20.10 <sup>-2</sup> %	16,7±14	4,2±8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*G2: Grupo 2 (*L. floribundus* - AM04MAO ); G3: Grupo 3 (*D. scandens* - AM21ML); G5: Grupo 5 (*D. scandens* - AM24GUA); Trat.: Tratamento (T).

Houve interação positiva na mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* quando as frações obtidas dos extratos de timbó G3 (Tabela 21) e G5 (Tabela 22) foram associadas em baixas concentrações com as frações de mesmo grupo ou com a rotenona purificada. Nesses bioensaios, os maiores valores de mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* foram de 62,5% para a associação da fração G3F6sol com a fração G3F7 (Tabela 21) e de 41,7% para a combinação da fração G5F5 com rotenona purificada (Tabela 22).

É importante destacar que a rotenona purificada, quando utilizada isoladamente na concentração de  $40.10^{-2}\%$  ( $m\ m^{-1}$ ) provocou apenas 41,7% de mortalidade das lagartas (Tabela 19), enquanto que quando avaliada na concentração de  $4.10^{-2}\%$  ( $m\ m^{-1}$ ) associada com as frações G3F6sol, G3F8 e G5F5 na concentração de  $0,4.10^{-2}\%$  ( $m\ m^{-1}$ ) provocou 54,2%, 45,8% e 41,7% de mortalidade dos insetos, respectivamente (Tabelas 21 e 22).

Além disso, quando a rotenona foi associada às frações G3F6sol e G3F8 no mesmo tratamento, a mortalidade dos insetos foi mantida em 50%, mesmo com redução da concentração da rotenona pela metade e da fração G3F6sol em 66% (Tabela 22), o que indica que outros constituintes (deguelina, constituinte A e constituinte B) presentes nas quantidades encontradas nessas frações potencializam a ação tóxica da rotenona sobre a mortalidade de lagartas de *S. frugiperda*. Nessa mesma associação, quando a concentração da fração G3F8 foi reduzida de  $0,4.10^{-2}\%$  para  $0,2.10^{-2}\%$  ( $m\ m^{-1}$ ), a mortalidade dos insetos diminuiu em 34%, sugerindo que os constituintes presentes nesta fração, que não foram identificados, exercem papel determinante nesta associação sobre a mortalidade de lagartas de *S. frugiperda*.

Tabela 21 – Mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada com frações de extrato de timbó do Grupo 3 – G3 (AM21ML) avaliadas de forma isolada e combinadas com outras frações deste extrato e com a rotenona purificada.

Trat* (T)	Bioensaio 1		Bioensaio 2		Bioensaio 3		Bioensaio 4	
	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Mortalidade (%)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Mortalidade (%)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Mortalidade (%)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Mortalidade (%)
T1	0%	0,0±0,0	0%	0,0±0,0	0%	0,0±0,0	0%	0,0±0,0
T2	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	8,3±9,6	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	4,2±8,3	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	12,5±16	Controle (Solvente)	0,0±0,0
T3	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F5 1,2.10 <sup>-2</sup> %	20,8±16	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %	54,2±24	G3F6sol 0,6.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> %	16,7±14	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> %	4,2±0,0
T4	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sob 0,4.10 <sup>-2</sup> %	8,3±9,6	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> %	8,3±9,6	G3F6sol 0,6.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,004%	20,8±16	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	8,3±17
T5	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sob 1,2.10 <sup>-2</sup> %	4,2±8,3	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	4,2±8,3	G3F6sol 0,6.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> % + F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	20,8±16	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	33,3±21
T6	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> %	62,5±9,6	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F5 1,2.10 <sup>-2</sup> %	4,2±8,3	G3F6sol 0,6.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %	50,0±13
T7	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 1,2.10 <sup>-2</sup> %	16,7±14	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sob 0,4.10 <sup>-2</sup> %	12,5±16	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> %	16,7±14	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0
T8	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	33,3±16	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sob 1,2.10 <sup>-2</sup> %	4,2±8,3	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	33,3±14	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,2.10 <sup>-2</sup> %	4,2±17
T9	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 1,2.10 <sup>-2</sup> %	8,3±9,6	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> %	37,5±14	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,2.10 <sup>-2</sup> %	8,3±13

\*Trat.: Tratamento (T).

Tabela 21 – Mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada (continuação...).

Trat* (T)	Bioensaio 1		Bioensaio 2		Bioensaio 3		Bioensaio 4	
	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Mortalidade (%)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Mortalidade (%)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Mortalidade (%)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Mortalidade (%)
T10	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> %	8,3±9,6	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 1,2.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> % + rotenona 0,2.10 <sup>-2</sup> %	20,8±16	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> %	35,8±8,3
T11	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	45,8±17	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> % + rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	25,0±17	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	8,3±4,2
T12	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 1,2.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %	8,3±8,3
T13	-	-	-	-	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0
T14	-	-	-	-	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0

\*Trat.: Tratamento (T).

Tabela 22 – Mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada com frações do extrato de timbó integrante do Grupo 5 – G5 (AM24GUA) avaliadas de forma isolada e combinadas com outras frações e com a rotenona purificada.

Tratamento (T)	Bioensaio 1		Bioensaio 2	
	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Mortalidade (%)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Mortalidade (%)
T1	Controle (Solvente)	0,0±0,0	Controle (Solvente)	0,0±0,0
T2	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> %	20,8±16	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	4,2±8,3
T3	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	4,2±8,3	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	8,3±9,6
T4	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 2.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 1,2.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0
T5	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 0,4.10 <sup>-2</sup> %	8,3±17	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 0,4.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0
T6	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 2.10 <sup>-2</sup> %	20,8±25	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 1,2.10 <sup>-2</sup> %	8,3±17
T7	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	8,3±9,6	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	8,3±17
T8	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F8 1,2.10 <sup>-2</sup> %	16,7±14	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F8 1,2.10 <sup>-2</sup> %	12,5±16
T9	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F7 0,4.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0
T10	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F7 1,2.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0
T11	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	41,7±21
T12	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 1,2.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0
T13	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 0,4.10 <sup>-2</sup> %	16,7±0,0
T14	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 1,2.10 <sup>-2</sup> %	4,2±8,3

PHILOGENE et al. (2004) destaca que a rotenona apresenta elevada toxicidade para insetos porque atua sobre o sistema nervoso e os mecanismos de respiração celular. Segundo GOSSELIN (1984) e SILVA et al. (2002), a rotenona é tóxica para insetos por ingestão e contato, reunindo, de acordo com CRAVERO et al. (1976), duas formas de intoxicação usadas para controlar insetos-praga.

Todas essas constatações foram reforçadas pelos resultados das determinações toxicológicas, quando o extrato de timbó G3 apresentou, por ingestão de dieta contaminada, a maior toxicidade para lagartas de *S. frugiperda*, com  $CL_{50}$  de 0,28 mg de extrato  $g^{-1}$  de dieta (Tabela 23) e  $TL_{50}$  de 10,2 horas para a concentração de  $40.10^{-2}\%$  (Tabela 24). Nesta mesma concentração os extratos G2, G4, G5 e G6 apresentaram valores médios de  $TL_{50}$  de 395, 80, 209 e 134 horas, respectivamente. O extrato G3 apresentou a maior  $RT_{50}$  quando comparado aos demais produtos (Tabelas 23, 24, 25 e 26).

A menor toxicidade para lagartas de *S. frugiperda*, em função dos baixos valores de mortalidade, foi verificada quando os extratos brutos de timbó e suas frações foram avaliados por contato tópico e por ingestão de dieta contaminada, respectivamente. Nessas avaliações, as determinações toxicológicas puderam ser calculadas apenas para os extratos G3 e G6 por contato tópico ( $DL_{50}$  variáveis entre 0,18 a 0,34  $\mu g$  de extrato  $g^{-1}$  de inseto) e para a fração G3F6sol por ingestão de dieta contaminada ( $CL_{50}$  de 0,50 mg de extrato  $g^{-1}$  de dieta para a fração) (Tabela 23).

Tabela 23 – Concentração (CL<sub>50</sub>) e dose (DL<sub>50</sub>) letal e Razão de Toxicidade (RT<sub>50</sub>) de extratos e frações de timbó para lagartas de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada.

Grupo (G)	Espécie/amostra	Produto	Via de intoxicação	GL	n	Inclinação ± EP	CL <sub>50</sub> (IC 95%)	RT <sub>50</sub> <sup>1</sup> (IC 95%)	DL <sub>50</sub> (IC 95%)	RT <sub>50</sub> <sup>2</sup> (IC 95%)	χ <sup>2</sup>	Prob.
G2	<i>D. floribundus</i> / AM04MAO	Extrato	Ingestão de dieta contaminada	7	286	0,45±0,08	1,6 (1,18 – 2,16)	1	-	-	289	0,44
G3	<i>D. scandens</i> / AM21ML	Extrato	Ingestão de dieta contaminada	7	238	0,41±0,05	0,28 (0,17 – 0,39)	5,71	-	-	256	0,2
			Contato tópico	6	70	0,67±0,07	-	-	0,34 (0,30 – 0,40)	1	112	0,01
		G3F6sol	Ingestão de dieta contaminada	5	118	0,43±0,11	0,5 (0,31 – 0,98)	3,20	-	-	120	0,45
G4	<i>D. scandens</i> / AM22CZS	Extrato	Ingestão de dieta contaminada	7	286	0,56±0,05	0,4 (0,30 – 0,50)	4,00	-	-	292	0,39
G5	<i>D. scandens</i> / AM24GUA	Extrato	Ingestão de dieta contaminada	7	238	0,50±0,06	0,7 (0,49 – 0,96)	2,29	-	-	240	0,46
G6	<i>D. scandens</i> / AM02ML	Extrato	Ingestão de dieta contaminada	7	286	0,41±0,06	0,36 (0,21 – 0,50)	4,44	-	-	286	0,49
			Contato tópico	6	70	0,88±0,09	-	-	0,18 (0,16 – 0,20)	1,89	79,9	0,03
	<i>D. scandens</i> / AM06CZS	Extrato	Contato tópico	6	70	0,74±0,07	-	-	0,3 (0,27 – 0,35)	1,13	90	0,05
	<i>D. scandens</i> / AM15CZS	Extrato	Ingestão de dieta contaminada	7	286	0,32±0,06	0,34 (0,15 – 0,53)	4,71	-	-	289	0,44
	<i>D. scandens</i> / AM25GUA	Extrato	Ingestão de dieta contaminada	7	238	0,40±0,06	0,37 (0,22 – 0,51)	4,32	-	-	239	0,46

GL: graus de liberdade; n: número de insetos usados no bioensaio; EP: erro-padrão da média; IC 95%: intervalo de confiança a 95% de probabilidade; χ<sup>2</sup>: qui-quadrado; Prob.: probabilidade; CL<sub>50</sub>: mg de extrato g<sup>-1</sup> de dieta; DL<sub>50</sub>: µg do extrato g<sup>-1</sup> do inseto; RT<sub>50</sub><sup>1</sup>: Razão de Toxicidade da CL<sub>50</sub>; RT<sub>50</sub><sup>2</sup>: Razão de Toxicidade da DL<sub>50</sub>.

Tabela 24 – Tempo letal (TL<sub>50</sub>) e Razão de Toxicidade (RT<sub>50</sub>) dos extratos, frações e combinações de frações de timbó com a rotenona purificada sobre lagartas de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada.

Produto	Tratamento/ Concentração (m m <sup>-1</sup> )	GL	Inclinação ± EP	TL <sub>50</sub> (IC 95%)	RT <sub>50</sub> (IC 95%)	χ <sup>2</sup>	Prob.
Extrato G2 (AM04MAO)	40.10 <sup>-2</sup> %	238	0,39±0,05	394,8 (279,6 – 557,9)	2,5	248,9	0,30
	32.10 <sup>-2</sup> %	238	0,41±0,1	489,3 (261,3 – 685,9)	2,0	240,0	0,45
	24.10 <sup>-2</sup> %	238	0,29±0,05	606,1 (387,6 – 1.080)	1,6	244,4	0,37
Extrato G3 (AM21ML)	40.10 <sup>-2</sup> %	238	0,20±0,04	10,2 (0,9 – 29,0)	95,1	232,4	0,59
	32.10 <sup>-2</sup> %	238	0,25±0,05	35,4 (10,1 – 67,1)	27,4	239,4	0,46
	24.10 <sup>-2</sup> %	238	0,28±0,04	35,2 (15,7 – 59,2)	27,6	237,7	0,49
	16.10 <sup>-2</sup> %	238	0,38±0,05	44,6 (26,1 – 64,4)	21,8	239,2	0,46
	8.10 <sup>-2</sup> %	238	0,44±0,04	88,5 (61,8 – 121,2)	11,0	231,2	0,61
	4.10 <sup>-2</sup> %	238	0,28±0,04	253,3 (145,1 – 434,8)	3,8	239,9	0,45
	2.10 <sup>-2</sup> %	238	0,81±0,15	887,2 (761,7 – 1.124)	1,1	247,2	0,33
Frações do extrato G3 (AM21ML)	G3F6sol 8.10 <sup>-2</sup> %	118	0,97±0,28	198,0 (176 – 417)	4,9	120,5	0,42
	G3F6sol 12.10 <sup>-2</sup> %	118	0,90±0,22	153,0 (122 – 212)	6,3	119,0	0,46
	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> %	118	1,08±0,14	169,9 (130 – 205)	5,7	114,5	0,57
Extrato G4 (AM22CZS)	40.10 <sup>-2</sup> %	238	0,39±0,05	80,4 (45,3 – 114,9)	12,1	240,3	0,45
	24.10 <sup>-2</sup> %	238	0,59±0,04	98,2 (78,7 – 120,3)	9,9	198,4	0,97
	32.10 <sup>-2</sup> %	238	0,43±0,06	101,5 (60,1 – 143,5)	9,6	225,6	0,71
	16.10 <sup>-2</sup> %	238	0,61±0,05	110,3 (90,1 – 134,1)	8,8	202,5	0,95
	8.10 <sup>-2</sup> %	238	0,45±0,07	240,9 (154,2 – 333,7)	4,0	238,6	0,48
	4.10 <sup>-2</sup> %	238	0,33±0,07	622,5 (405,2 – 1.083)	1,6	241,8	0,42
	2.10 <sup>-2</sup> %	238	0,34±0,06	713,9 (471,4 – 1.372)	1,4	241,0	0,43

EP: erro-padrão da média; TL<sub>50</sub>: tempo letal em horas; RT<sub>50</sub> obtida através do quociente entre a RT<sub>50</sub> do produto que apresentou menor toxicidade e as RT<sub>50s</sub> dos demais produtos; IC 95%: intervalo de confiança a 95% de probabilidade; X<sup>2</sup>: qui-quadrado; Prob.: probabilidade.

Tabela 24 – Tempo letal (TL<sub>50</sub>) e Razão de Toxicidade (RT<sub>50</sub>) (continuação...).

Produto	Tratamento/ Concentração (m m <sup>-1</sup> )	GL	Inclinação ± EP	TL <sub>50</sub> (IC 95%)	RT <sub>50</sub> (IC 95%)	χ <sup>2</sup>	Prob.
Extrato G5 (AM24GUA)	40.10 <sup>-2</sup> %	238	0,41±0,05	208,6 (136,7 – 294,4)	4,7	237,6	0,49
	32.10 <sup>-2</sup> %	238	0,41±0,06	262,6 (166,3 – 372,5)	3,7	239,4	0,46
	16.10 <sup>-2</sup> %	238	0,47±0,06	279,0 (194,7 – 377,6)	3,5	240,6	0,44
	8.10 <sup>-2</sup> %	238	0,35±0,06	360,3 (287,3 – 433,1)	2,7	239,2	0,46
	24.10 <sup>-2</sup> %	238	0,37±0,06	498,2 (345,7 – 810,2)	1,9	242,0	0,41
Extrato G6 (AM02ML)	32.10 <sup>-2</sup> %	238	0,52±0,05	202,9 (144,8 – 266,1)	4,8	231,3	0,61
	24.10 <sup>-2</sup> %	238	0,41±0,06	234,1 (152,4 – 330,7)	4,1	239,7	0,46
	16.10 <sup>-2</sup> %	238	0,36±0,06	268,3 (157,6 – 397,2)	3,6	239,9	0,45
	40.10 <sup>-2</sup> %	238	0,46±0,06	442,0 (316,4 – 608,0)	2,2	247,0	0,33
	8.10 <sup>-2</sup> %	238	0,37±0,06	855,8 (618,3 – 1.401)	1,1	262,3	0,13
	4.10 <sup>-2</sup> %	238	0,43±0,05	831,7 (619,1 – 1.270)	1,2	298,1	0,01
Extrato G6 (AM15CZS)	32.10 <sup>-2</sup> %	238	0,40±0,05	136,8 (91,03 – 194,2)	7,1	238,8	0,47
	40.10 <sup>-2</sup> %	238	0,49±0,06	178,2 (121,6 – 238,9)	5,4	240,9	0,43
	24.10 <sup>-2</sup> %	238	0,43±0,07	253,3 (162,4 – 353,3)	3,8	239,2	0,47
	16.10 <sup>-2</sup> %	238	0,54±0,07	304,7 (230,5 – 400,6)	3,2	239,9	0,45
	8.10 <sup>-2</sup> %	238	0,42±0,06	694,9 (509,6 – 1.029)	1,4	247,8	0,32
	4.10 <sup>-2</sup> %	238	0,34±0,07	726,1 (481,9 – 1.384)	1,3	240,7	0,44

EP: erro-padrão da média; TL<sub>50</sub>: tempo letal em horas; RT<sub>50</sub> obtida através do quociente entre a RT<sub>50</sub> do produto que apresentou menor toxicidade e as RT<sub>50s</sub> dos demais produtos; IC 95%: intervalo de confiança a 95% de probabilidade; X<sup>2</sup>: qui-quadrado; Prob.: probabilidade.

Tabela 24 – Tempo letal (TL<sub>50</sub>) e Razão de Toxicidade (RT<sub>50</sub>) (continuação...).

Produto	Tratamento/ Concentração (m m <sup>-1</sup> )	GL	Inclinação ± EP	TL <sub>50</sub> (IC 95%)	RT <sub>50</sub> (IC 95%)	χ <sup>2</sup>	Prob.
Extrato G6 (AM25GUA)	40.10 <sup>-2</sup> %	238	0,27±0,05	29,7 (10,7 – 53,0)	32,7	238,1	0,49
	32.10 <sup>-2</sup> %	238	0,33±0,05	50,5 (26,4 – 78,7)	19,2	238,0	0,49
	24.10 <sup>-2</sup> %	238	0,27±0,04	31,1 (12,6 – 54,4)	31,2	238,4	0,48
	16.10 <sup>-2</sup> %	238	0,33±0,04	137,3 (84,3 – 213,5)	7,1	239,1	0,47
	8.10 <sup>-2</sup> %	238	0,13±0,05	158,3 (3,2 – 506,0)	6,1	240,0	0,45
	4.10 <sup>-2</sup> %	238	0,17±0,05	267,5 (100,8 – 936,7)	3,6	240,0	0,45
	2.10 <sup>-2</sup> %	238	0,53±0,07	623,2 (493,3 – 815,1)	1,6	269,0	0,08
Frações do extrato G3 (AM21ML) associadas com a rotenona purificada	G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> % + Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	118	0,26±0,08	238,9 (110 – 960)	4,1	119,8	0,44
	G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> % + Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> %	118	0,66±0,20	970,4 (715 – 2.491)	1,0	131,4	0,19

EP: erro-padrão da média; TL<sub>50</sub>: tempo letal em horas; RT<sub>50</sub> obtida através do quociente entre a RT<sub>50</sub> do produto que apresentou menor toxicidade e as RT<sub>50s</sub> dos demais produtos; IC 95%: intervalo de confiança a 95% de probabilidade; X<sup>2</sup>: qui-quadrado; Prob.: probabilidade.

Tabela 25 – Razão de Toxicidade (RT<sub>50</sub>) entre os Tempos Letais (TL<sub>50</sub>) de diferentes concentrações e grupos de extratos de timbó comparados às frações isoladas e combinadas de extratos e associadas com a rotenona purificada.

Produto	Concentração (m m <sup>-2</sup> )						
	2.10 <sup>-2</sup> %	4.10 <sup>-2</sup> %	8.10 <sup>-2</sup> %	16.10 <sup>-2</sup> %	24.10 <sup>-2</sup> %	32.10 <sup>-2</sup> %	40.10 <sup>-2</sup> %
(grupos de extratos de raízes de timbó)							
G2/AM04MAO	-	-	-	-	1,00	1,00	1,12
G3/AM21ML	1,00	3,28	9,67	6,83	17,22	13,82	43,33
G4/AM22CZS	1,24	1,34	3,55	2,76	6,17	4,82	5,50
G5/AM24GUA	-	-	2,38	1,09	1,22	1,86	2,12
G6/AM02ML	-	1,00	1,00	1,14	2,59	2,41	1,00
G6/AM15CZS	-	1,15	1,23	1,00	2,39	3,58	2,48
G6/AM25GUA	1,42	3,11	5,41	2,22	19,49	9,69	14,88

Tabela 26 – Razão de Toxicidade (RT<sub>50</sub>) entre os Tempos Letais (TL<sub>50</sub>) de diferentes concentrações e grupos de extratos de timbó comparados às frações de extratos isoladas e combinadas de extratos e associadas com a rotenona purificada.

Produto (grupos de extratos de raízes de timbó)	Concentração (m m <sup>-2</sup> )						
	2.10 <sup>-2</sup> %	4.10 <sup>-2</sup> %	8.10 <sup>-2</sup> %	16.10 <sup>-2</sup> %	24.10 <sup>-2</sup> %	32.10 <sup>-2</sup> %	40.10 <sup>-2</sup> %
G2/AM04MAO	-	-	-	-	1,6	2,0	2,5
G3/AM21ML	1,1	3,8	11,0	21,8	27,6	27,4	95,1
G4/AM22CZS	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9
G5/AM24GUA	-	-	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3
G6/AM02ML	-	6,3	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7
G6/AM15CZS	-	5,7	4,0	8,8	9,9	9,6	12,1
G6/AM25GUA	6,3	1,6	2,7	3,5	1,9	3,7	4,7
Frações de extratos de raízes de timbó e combinações	Comparação das RT <sub>50s</sub> dos extratos brutos de timbó com as frações isoladas e combinadas com outras frações e com rotenona purificada						
G3F6sol 8.10 <sup>-2</sup> %	5,7	1,2	1,1	3,6	4,1	4,8	2,2
G3F6sol 12.10 <sup>-2</sup> %	1,4	1,3	1,4	3,2	3,8	7,1	5,4
G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> %	1,6	3,6	6,1	7,1	31,2	19,2	32,7
G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> % + Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1
G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> % +G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> % + Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> %	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

As concentrações médias equivalentes às CL<sub>50</sub> obtidas para os extratos de timbó G3 (3.10<sup>-2</sup>% m m<sup>-1</sup>), G4 (4.10<sup>-2</sup>% m m<sup>-1</sup>) e G6 (3,6.10<sup>-2</sup>% m m<sup>-1</sup>) por ingestão de folhas contaminadas são significativamente menores do que às determinadas por esta via de intoxicação para os extratos G2 (16.10<sup>-2</sup>% m m<sup>-1</sup>), G5 (7.10<sup>-2</sup>% m m<sup>-1</sup>) e fração G3F6sol (5.10<sup>-2</sup>% m m<sup>-1</sup>) e por contato tóxico para os extratos G3 (57,9% m v<sup>-1</sup>) e G6 (40,6% m v<sup>-1</sup>).

Em estudos similares, desenvolvidos para avaliar a toxicidade de diferentes espécies de timbó, foram determinados valores de CL<sub>50</sub> variáveis entre 150.10<sup>-2</sup>% e 575.10<sup>-2</sup>% (m v<sup>-1</sup>) para insetos (GUSMÃO et al., 2002; CORREA, 2006 e ALECIO et al., 2010) e de 200.10<sup>-2</sup>% a 2.660.10<sup>-2</sup>% (m v<sup>-1</sup>) para ácaros (CORREA, 2011), indicando que os extratos de timbó G3, G4 e G6 apresentam composição química mais adequada para provocar elevada toxicidade para *S. frugiperda*.

Essas diferenças são evidenciadas pelos valores das  $RT_{50s}$ , onde o extrato G3 apresentou o maior valor desta variável por ingestão de dieta contaminada quando comparado aos demais produtos (Tabelas 23, 24, 25 e 26). Quando as  $RT_{50s}$  dos  $TL_{50s}$  das diferentes concentrações dos extratos brutos de timbó foram comparadas com as associações de frações, a combinação da fração G3F6sol  $1,2 \cdot 10^{-2}\%$  com a fração G3F7  $0,4 \cdot 10^{-2}\%$  se destacou por ter apresentado elevada toxicidade e  $RT_{50}$  superior a da maioria dos extratos (Tabela 26).

Os valores de  $TL_{50}$  e de  $RT_{50}$  obtidos para a combinação das frações dos extratos de timbó (Tabela 26) comprovaram a toxicidade e a ocorrência de sinergismo dessas associações, principalmente da fração G3F6sol com a fração G3F7 sobre a mortalidade de lagartas de *S. frugiperda*, uma vez que quando os produtos foram avaliados isoladamente não foram tóxicos e quando associados, em baixas concentrações, tiveram seus efeitos potencializados, com valores de mortalidade e tempos letais compatíveis aos provocados pelos extratos brutos de timbó. Esses resultados evidenciam que os extratos de timbó precisam apresentar elevados teores de rotenona e deguelina associados aos constituintes A e B, principalmente, para promover elevada toxicidade para lagartas de *S. frugiperda*.

### **5.3.2 Efeito de extratos e frações de timbó e da rotenona purificada sobre a duração do período larval de lagartas de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada**

Todos os extratos de timbó e a rotenona purificada prolongaram a fase larval dos insetos remanescentes por ingestão de dieta contaminada, principalmente nas maiores concentrações, quando comparadas aos tratamentos controle (Tabela 27).

Tabela 27 – Duração do período larval (dias) de lagartas de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada com os extratos de raízes de seis grupos de timbó (*D. scandens* e *D. floribundus*) e com a rotenona purificada.

Duração do período larval e desvio padrão (dias)											
Trat	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	G1* AM26GUA	G2* AM04MAO	G3* AM21ML	G4* AM22CZS	G5* AM24GUA	G6*			Rotenona purificada	CV
							AM 02 ML	AM15CZS	AM25GUA		
T1	0% (controle)	17,1 a	16,7 a	16,8 a	17,1 a	16,9 a	16,9 a	16,7 a	17,1 a	16,6 a	8,4%
T2	2.10 <sup>-2</sup> %	18,8 a	20,6 b	26,3 c	26,7 d	24,1 b	25,1 c	21,6 b	26,6 c	21,0 b	14,4%
T3	4.10 <sup>-2</sup> %	18,1 a	20,9 b	27,6 e	29,9 e	22,8 c	28,2 e	23,1 c	25,9 d	20,9 b	12,5%
T4	8.10 <sup>-2</sup> %	20,4 a	22,4 b	28,7 c	35,5 c	30,8 c	29,5 c	24,6 b	28,2 c	23,8 b	13,6%
T5	16.10 <sup>-2</sup> %	22,4 a	26,0 a	26,1 a	44,8 b	27,1 a	29,7 a	26,0 a	29,1 a	26,3 a	14,2%
T6	24.10 <sup>-2</sup> %	27,6 a	28,6 a	25,6 a	-	29,3 a	28,2 a	34,9 a	30,9 a	28,0 a	16,0%
T7	32.10 <sup>-2</sup> %	24,1 a	31,4 b	29,1 b	-	27,9 b	30,2 b	32,8 b	32,8 b	24,7 b	12,3%
T8	40.10 <sup>-2</sup> %	24,3 a	31,5 b	-	-	35,8 b	34,3 b	32,8 b	32,5 b	25,4 a	13,1%

\*G1: Grupo 1 (*D. scandens* - AM26GUA ); G2: Grupo 2 (*D. floribundus* - AM04MAO ); G3: Grupo 3 (*D. scandens* - AM21ML); G4: Grupo 4 (*D. scandens* - AM22CZS); G5: Grupo 5 (*D. scandens* - AM24GUA); G6: Grupo 6 (*D. scandens* - AM 02 ML, AM15CZS E AM25GUA); Trat.: Tratamento (T); Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P > 0,05); CV: coeficiente de variação.

Nesses bioensaios foram observados valores de prolongamento da fase larval variáveis entre 12,2 a 18,4 dias para os extratos G1, G2, G3, G5 e G6, com destaque para a concentração de  $16.10^{-2}\%$  ( $m\ m^{-1}$ ) do extrato G4, que prolongou a fase larval de *S. frugiperda* em 26,2 dias, enquanto que a rotenona purificada apresentou os menores valores nesta variável (8,7 dias na concentração de  $24.10^{-2}\%$   $m\ m^{-1}$ ).

As frações dos extratos de timbó G3F5, G3F6sol, G3F8, G5F6 e G5F7 (Tabela 28) e suas combinações entre estas frações e com a rotenona purificada (Tabelas 29 e 30) provocaram prolongamentos da fase larval de *S. frugiperda* menos pronunciados, variando de 1,8 a 10,8 dias, em comparação aos extratos brutos de timbó. Já as frações dos extratos G2F4, G2F5, G3F6sob, G3F7, G3F8, G5F5 e G5F8, quando avaliadas isoladamente, não interferiram na duração do período larval de *S. frugiperda*.

Quando as frações G3F6sol ( $1,2.10^{-2}\%$   $m\ m^{-1}$ ) e G5F7 ( $1,78\%$   $m\ m^{-1}$ ) e a rotenona purificada ( $4.10^{-2}\%$   $m\ m^{-1}$ ) foram avaliadas isoladamente, nessas concentrações, não apresentaram efeito sobre a duração do período larval de *S. frugiperda*. Entretanto, quando associadas em diferentes combinações, G3F6sol e G3F7 com as demais frações dos extratos G3 e a rotenona purificada com as frações G3F6sol, G3F7 e G3F8, prolongaram a fase larval de *S. frugiperda*, indicando a ocorrência de ação de regulação de consumo quando essas frações são combinadas.

O tratamento contendo  $2.10^{-2}\%$  ( $m\ m^{-1}$ ) de rotenona purificada associada a  $0,4.10^{-2}\%$  ( $m\ m^{-1}$ ) das frações G3F6sol e G3F8 (Tabela 29) e outro constituído pela combinação das frações G5F7 à  $7,12.10^{-2}\%$  ( $m\ m^{-1}$ ) e G5F6 à  $2.10^{-2}\%$  ( $m\ m^{-1}$ ) (Tabela 30) apresentaram valores de prolongamento do período larval de 10,8 e 15,8 dias, respectivamente. Esses valores são

compatíveis aos resultados obtidos com as maiores concentrações dos extratos de timbó G1, G2, G3, G5 e G6 (12,2 a 18,4 dias) (Tabela 27) e apontam a ocorrência de efeito sinergista entre essas associações, por terem sido avaliadas em concentrações inferiores às usadas com os extratos, o que sugere que as substâncias presentes nessas frações (rotenona, deguelina e os constituintes A e B) são as principais responsáveis pelo alongamento da fase larval de *S. frugiperda* provocado pelos extratos brutos de timbó.

Tabela 28 – Duração do período larval (dias) de lagartas de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada com frações de extratos de raízes de timbó (*D. scandens* e *D. floribundus*).

Duração do período larval e desvio padrão (dias)													
Trat* (T)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	G2* (AM04MAO)		G3* (AM21ML)					G5* (AM24GUA)				CV
		F4	F5	F5	F6sol	F6sob	F7	F8	F5	F6	F7	F8	
T1	0%	15,6 a	15,5 a	16,0 a	16,0 a	16,0 a	16,0 a	16,0 a	14,4 a	14,4 a	14,4 a	14,4 a	6,6%
T2	1.10 <sup>-2</sup> %	-	-	16,6 a	17,1 b	16,8 b	16,1 a	16,6 a	17,9 b	17,5 b	16,1 a	15,4 a	12,4 %
T3	2.10 <sup>-2</sup> %	16,6 b	17,0 c	19,1 d	19,7 d	16,2 b	15,2 a	16,5 b	18,6 d	17,4 c	17,2 c	17,3 c	10,5 %
T4	4.10 <sup>-2</sup> %	17,0 b	17,4 b	19,0 c	21,4 d	19,1 c	15,7 a	16,9 b	16,5 a	18,8 c	17,9 b	17,0 b	9,12
T5	8.10 <sup>-2</sup> %	15,6 a	17,0 b	18,2 c	21,8 e	17,3 b	17,0 b	17,8 c	18,4 c	18,2 c	20,4 d	17,7 c	10,6 %
T6	12.10 <sup>-2</sup> %	15,9 a	16,8 a	18,8 b	22,9 d	16,3 a	16,6 a	19,1 b	17,4 a	20,3 c	18,5 b	17,9 b	10,4 %
T7	16.10 <sup>-2</sup> %	16,4 a	17,7 b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,9 %
T8	20.10 <sup>-2</sup> %	17,4 a	18,2 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,9 %

\*Trat.: Tratamento (T); G2: Grupo 2 (*D. floribundus* - AM04MAO); G3: Grupo 3 (*D. scandens* - AM21ML); G5: Grupo 5 (*D. scandens* - AM24GUA); Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P > 0,05$ ); CV: coeficiente de variação.

Tabela 29 – Duração do período larval de lagartas de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada com frações do extrato de timbó do Grupo 3 – G3 (AM21ML) avaliadas de forma isolada e combinadas com outras frações deste extrato e com a rotenona purificada.

Trat* (T)	Bioensaio 1		Bioensaio 2		Bioensaio 3		Bioensaio 4	
	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Período larval (dias)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Período larval (dias)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Período larval (dias)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Período larval (dias)
T1	0%	15,8 a	0%	16,0 a	0%	14,8 a	0%	14,2±0,7 a
T2	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	17,6 a	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	17,6 b	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	16,6 b	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> %	19,3 b
T3	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F5 1,2.10 <sup>-2</sup> %	19,6 b	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %	21,8 c	G3F6sol 0,6.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> %	15,1 a	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	19,5 b
T4	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + F6sob 0,4.10 <sup>-2</sup> %	19,5 b	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> %	21,7 c	G3F6sol 0,6.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,016.10 <sup>-2</sup> %	14,8 a	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	18,1 b
T5	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sob 1,2.10 <sup>-2</sup> %	21,1 c	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	20,7 c	G3F6sol 0,6.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> % + F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	17,2 b	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %	24,7 c
T6	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> %	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F5 1,2.10 <sup>-2</sup> %	20,5 c	G3F6sol 0,6.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> %	15,8 a	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %	25,0 c
T7	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + F7 1,2.10 <sup>-2</sup> %	21,2 c	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sob 0,4.10 <sup>-2</sup> %	19,4 c	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> %	15,3 a	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,2.10 <sup>-2</sup> %	18,1 b
T8	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	22,0 c	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sob 1,2.10 <sup>-2</sup> %	19,8 c	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	16,2 a	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,2.10 <sup>-2</sup> %	17,6 b
T9	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 1,2.10 <sup>-2</sup> %	18,3 a	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> %	18,7 b	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> %	16,9 b	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> %	19,6 b
T10	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> %	17,3 a	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 1,2.10 <sup>-2</sup> %	21,0 c	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> % + rotenona 0,2.10 <sup>-2</sup> %	18,9 b	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	23,1 c

\*Trat.: Tratamento (T); Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P > 0,05); CV: coeficiente de variação.

Tabela 29 – Duração do período larval de lagartas de *S. frugiperda* (continuação...)

Trat* (T)	Bioensaio 1		Bioensaio 2		Bioensaio 3		Bioensaio 4	
	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Período larval (dias)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Período larval (dias)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Período larval (dias)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Período larval (dias)
T11	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	19,0 b	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> % + rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	19,4 b	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %	20,5 b
T12	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 1,2.10 <sup>-2</sup> %	19,7 c	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %	19,3 b
T13	-	-	-	-	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> %	18,4 b
T14	-	-	-	-	-	-	Rotenona 1% + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,2.10 <sup>-2</sup> %	18,6 b
	CV	12,4%	CV	11,2%	CV	17,6%	CV	15,9%

\*Trat.: Tratamento (T); Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P > 0,05); CV: coeficiente de variação.

Tabela 30 – Duração do período larval (dias) de lagartas de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada com frações do extrato de timbó do Grupo 5 – G5 (AM24GUA) avaliadas de forma isolada e combinadas com outras frações de timbó e com a rotenona purificada.

Tratamento (T)	Bioensaio 1		Bioensaio 2	
	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Período larval (dias)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Período larval (dias)
T1	Controle (Solvente)	15,5 a	Controle (Solvente)	14,7 a
T2	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> %	19,3 b	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	14,4 a
T3	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	21,2 b	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	15,6 b
T4	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 2.10 <sup>-2</sup> %	25,1 c	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 1,2.10 <sup>-2</sup> %	14,6 a
T5	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 0,4.10 <sup>-2</sup> %	24,6 c	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 0,4.10 <sup>-2</sup> %	15,5 b
T6	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 2.10 <sup>-2</sup> %	31,3 d	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 1,2.10 <sup>-2</sup> %	18,9 c
T7	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	26,3 c	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	13,9 a
T8	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F8 1,2.10 <sup>-2</sup> %	27,3 c	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F8 1,2.10 <sup>-2</sup> %	16,3 b
T9	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F7 0,4.10 <sup>-2</sup> %	15,6 b
T10	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F7 1,2.10 <sup>-2</sup> %	16,4 b
T11	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	-
T12	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 1,2.10 <sup>-2</sup> %	16,7 b
T13	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 0,4.10 <sup>-2</sup> %	13,8 a
T14	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 1,2.10 <sup>-2</sup> %	15,8 b
CV		24,7%	CV	18,6%

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P > 0,05); CV: coeficiente de variação.

Entretanto, os prolongamentos da fase larval de *S. frugiperda* provocado por essas associações foram menores do que os ocasionados pelo extrato bruto de timbó G4 (18,7 e 26,2 dias para as concentrações de  $8.10^{-2}\%$  e  $16.10^{-2}\%$   $m\ m^{-1}$ , respectivamente), indicando que este extrato possui quantidades ou proporções mais adequadas desses compostos e/ou outros constituintes que atuam com maior intensidade no prolongamento desta fase das lagartas de *S. frugiperda*.

Produtos inseticidas de origem vegetal possuem efeito após a ingestão, inibindo algumas das funções vitais, tais como reprodução, alimentação, crescimento, sempre na dependência da concentração utilizada antes de provocar mortalidade (RODRÍGUEZ e VENDRAMIM, 1997; ROEL e VENDRAMIM, 1999; OLIVEIRA et al., 2007).

SCHMUTTERER (1990) destaca que os insetos da ordem Lepidoptera são sensíveis ao efeito regulador de crescimento promovido por extratos vegetais e que esse efeito pode resultar em vários defeitos morfogênicos e causar a morte dos insetos, dependendo da concentração do produto. MORDUE et al. (1998) demonstraram que a deterrência alimentar, associadas a alterações no desenvolvimento e na ecdise, são as principais causas da mortalidade em insetos polípagos, como *S. frugiperda*, *S. littoralis* e *Schistocerca gregaria*.

De acordo com MARTINEZ e EMDEN (2001) a inibição de crescimento de lagartas do gênero *Spodoptera* é função da reduzida ingestão de alimentos, pouca habilidade da conversão de nutrientes em crescimento, enquanto o prolongamento da duração da fase larval se verifica em geral pela reduzida ingestão de alimentos em razão da existência de um inibidor ou vários inibidores no alimento. O atraso no desenvolvimento larval pode ser consequência da inadequação nutricional do substrato alimentar (RODRÍGUEZ e VENDRAMIM, 1996) ou da

menor eficiência de conversão do alimento ingerido e digerido, resultado do desvio de parte da energia para a degradação de substâncias tóxicas presentes no referido substrato (TANZUBIL e MCCAFFERY, 1990).

Diversos efeitos biológicos, incluindo o prolongamento da fase larval e atividade antialimentar de *S. frugiperda* causado pela ingestão de produtos de origem natural têm sido relatados na literatura (ROEL e VENDRAMIN, 1999; ROEL et al., 2000; Bogornie e VENDRAMIM, 2003; OLIVEIRA et al., 2007; LIZARAZO et al., 2008; SANTIAGO et al., 2008; CORREIA et al., 2009; LIMA et al., 2010; TIRELLI et al., 2010).

Desse modo, com base nos resultados destacados por esses autores, pode-se inferir que o prolongamento da fase larval de lagartas de *S. frugiperda* foi provocado por efeitos associados das substâncias integrantes dos extratos de timbó, principalmente rotenona, deguelina e os constituintes A e B, adicionadas à dieta alimentar dos insetos, especialmente nas proporções contidas nas frações G3F6sol e G5F7. Além disso, foram observadas visualmente reduções consideráveis no tamanho das lagartas de *S. frugiperda* nos tratamentos que provocaram os maiores prolongamentos da fase larval (Figura 34), sendo necessário que as lagartas remanescentes permanecessem se alimentando por um maior período de tempo, mesmo que em pequenas quantidades, antes de atingirem a fase de pupa, o que reforça a hipótese levantada.

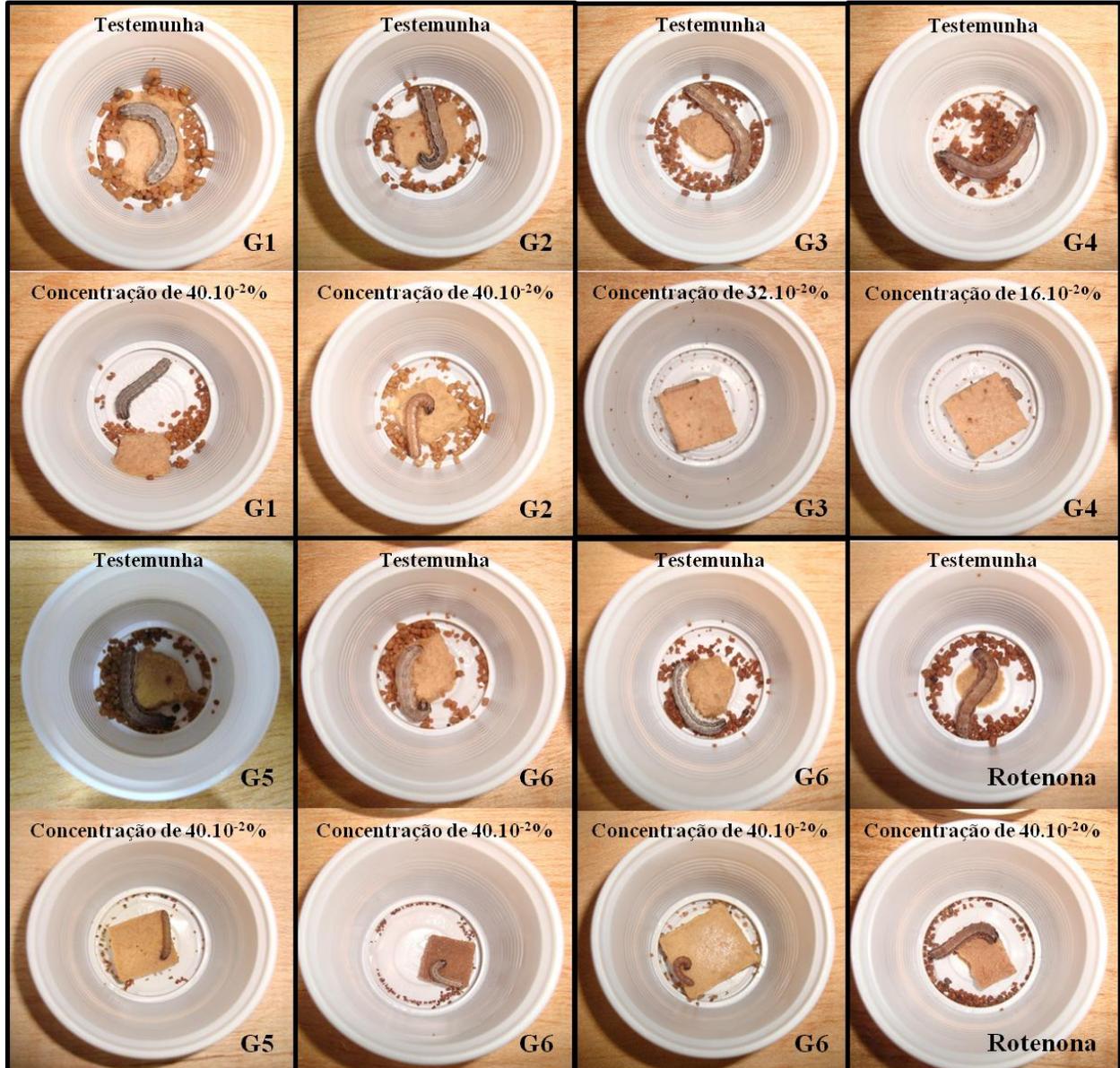


Figura 34 – Lagartas de *S. frugiperda* 10 dias após o início dos bioensaios por ingestão de dieta contaminada com extratos de timbó G1 (AM26GUA), G2 (AM04MAO), G3 (AM21ML), G4 (AM22CZS), G5 (AM24GUA) e G6 (AM02ML e AM25GUA) e com a rotenona purificada. Fotos: Alecio (2011).

O retardo no início da fase de pupa promovido pela alimentação das lagartas de *S. frugiperda* com dieta artificial tratadas com os extratos e frações de timbó isoladamente ou em associação de frações de extratos e com a rotenona purificada sugere que esses princípios ativos

dos timbós podem estar interferindo no sistema neurosecretor do cérebro dos insetos, alterando a formação de cutícula e conseqüentemente as ecdises.

Além disso, o prolongamento da fase larval pode ser devido às alterações promovidas pelos produtos tóxicos no canal alimentar das lagartas de *S. frugiperda*, principalmente na região do mesêntero, que é o principal local de digestão e absorção de alimentos e constitui a região mais vulnerável à ação de elementos estranhos, afetando o crescimento e o desenvolvimento de insetos, bem como de outros eventos fisiológicos (CORREIA et al., 2009).

Esses resultados tornam os extratos de timbó promissores para o controle de *S. frugiperda* não apenas por causar mortalidade, mas também por afetar o desenvolvimento dos insetos, prolongando a fase de larval, o que em condições de campo poderia contribuir para uma maior exposição, deixando-os mais vulneráveis a diversos tipos de agentes de mortalidade, tais como inimigos naturais, ou evitar que os mesmos causem dano à cultura do milho.

Esses efeitos estão incluídos entre ações esperadas para os inseticidas botânicos, que são variáveis sobre os insetos, podendo ser tóxica, repelente, causar esterilidade e deformações e modificar o comportamento, o desenvolvimento ou reduzir a alimentação (BELL et al., 1990; GUSMÃO et al., 2002).

### **5.3.3 Efeito de extratos e frações de timbó e da rotenona purificada sobre a fase de pré-pupa e pupa de lagartas de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada**

O percentual de empupamento foi inversamente proporcional à mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* em todos os tratamentos, excluindo-se os insetos que morreram na fase de pré-pupa (Figura 35). Em todos os extratos de timbó foram observadas mortalidades de *S. frugiperda* na fase de pré-pupa, com percentuais que variaram entre 2,1% a 4,2% em relação ao número total

dos insetos de cada tratamento, principalmente nas maiores concentrações, e se manifestaram, nestes mesmos percentuais, apenas nas frações G2F4, G3F8 e G5F7, sendo ligeiramente aumentados para 6,3% e 10,3% dos indivíduos quando as frações do extrato G3F6sol, G3F8, G5F7 e G5F8 foram associadas.

Esses efeitos podem ser atribuídos principalmente à ação dos constituintes A e B, uma vez que a fração G5F7 possui maiores teores desses dois compostos do que de rotenona e de deguelina (Figura 21) e quando a rotenona foi avaliada isoladamente não provocou mortalidades na fase pré-pupa. Esses resultados sugerem ainda a ocorrência de efeito aditivo ou sinérgico e apontam essas frações como às principais responsáveis pela morte dos insetos na fase pré-pupa.



Figura 35 – Pré-pupas mortas de *S. frugiperda* produzidas pelos extratos e frações de timbó. Fotos: Alecio (2012)

A ocorrência de indivíduos mortos na fase de pré-pupa também foi constatada por GOVINDACHARI (1992), RODRÍGUEZ (1995) e ROEL et al. (2000) quando avaliaram a atividade inseticida de extratos de nim (*Azadirachta indica*) sobre lagartas de *S. frugiperda*. Esse efeito poderia ser hipoteticamente atribuído à ação dos constituintes A e B associados aos demais compostos dos extratos de timbó presentes nas frações G2F4, G3F8 e G5F7 sobre o sistema hormonal do inseto, provocando uma possível redução na concentração do ecdisônio ou atraso de sua liberação na hemolinfa, ou então alteração do nível ou da atividade do hormônio juvenil.

As lagartas de *S. frugiperda* não atingiram o estágio de pupa quando alimentadas com dieta contaminada com extratos de timbó nas concentrações de  $40.10^{-2}\%$  ( $m\ m^{-1}$ ) para o grupo G3, de  $24.10^{-2}\%$ ,  $32.10^{-2}\%$  e  $40.10^{-2}\%$  ( $m\ m^{-1}$ ) para o grupo G4, com a combinação das frações G3F6sol  $1,2.10^{-2}\%$  ( $m\ m^{-1}$ ) e G3F7  $0,4.10^{-2}\%$  ( $m\ m^{-1}$ ) e com a associação da rotenona purificada a  $4.10^{-2}\%$  ( $m\ m^{-1}$ ) com a fração G5F6 a  $0,4.10^{-2}\%$  ( $m\ m^{-1}$ ), em função de elevadas taxas de mortalidade na fase larval e, por este motivo, não foi possível avaliar o efeito desses tratamentos sobre a fase de pupa dos insetos.

A duração do período pupal de *S. frugiperda* variou entre 11,9 e 13,6 dias e não foi afetado significativamente pelos produtos em todos os bioensaios. Estes valores estão próximos dos obtidos por Giolo et al. (2002) (10,65 a 12,72 dias), quando estudaram a biologia de populações de *S. frugiperda* coletadas na cultura do milho e mantidas em laboratório ( $25\pm 1\ ^\circ\text{C}$ , UR  $70\pm 15\%$  e fotofase de 14 h) alimentadas com dieta artificial e são semelhantes aos resultados obtidos por ROEL e VENDRAMIN (1999), BOGORNIE e VENDRAMIM (2005) e SANTIAGO et al. (2008), que também avaliaram produtos naturais sobre *S. frugiperda* e não verificaram alteração na duração do período pupal deste inseto.

O peso de pupas de *S. frugiperda* foi semelhante nos tratamentos controle (variáveis entre 260 a 292 g) de todos os bioensaios (Tabelas 31, 32, 33 e 34), sendo diminuído substancialmente nas maiores concentrações ( $32.10^{-2}\%$  e  $40.10^{-2}\%$   $m\ m^{-1}$ ) dos experimentos desenvolvidos com os extratos brutos de timbó (129 a 213 g) e com a rotenona purificada (188 e 194 g), com destaque para os extratos G3 e G4, onde o peso pupal nas concentrações de  $32.10^{-2}\%$  (129 g) e  $16.10^{-2}\%$  (134 g) ( $m\ m^{-1}$ ) foi reduzido em 52% e 49% quando comparado aos tratamentos controle (271 e 263 g, respectivamente) (Tabela 31).

Quando avaliadas isoladamente, as frações G2F4, G3F6sol, G5F6 e G5F7, a partir das concentrações de  $16.10^{-2}\%$ ,  $8.10^{-2}\%$ ,  $12.10^{-2}\%$  e  $16.10^{-2}\%$  ( $m\ m^{-1}$ ), respectivamente, apesar de menos efetivas, reduziram significativamente o peso das pupas de *S. frugiperda*, com valores variáveis entre 8% e 13%, quando comparados aos tratamentos controle (Tabela 32).

Tabela 31 – Peso de pupas (g) de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada com extratos de raízes de timbó de seis grupos (*D. scandens* e *D. floribundus*) e com rotenona purificada.

Peso médio de pupas e desvio padrão (g)											
Trat* (T)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	G1* AM26GUA	G2* AM04MAO	G3* AM21ML	G4* AM22CZS	G5* AM24GUA	G6*			Rotenona purificada	CV
							AM 02 ML	AM15CZS	AM25GUA		
T1	0%	272 a	273 a	271 a	263 a	272 a	273 a	269 a	271 a	269 a	6,9%
T2	2.10 <sup>-2</sup> %	260 b	256 b	220 a	223 a	236 b	211 b	245 b	214 b	257 b	15,0%
T3	4.10 <sup>-2</sup> %	267 d	271 d	181 a	232 c	238 c	217 b	230 c	207 b	239 c	17,9%
T4	8.10 <sup>-2</sup> %	244 c	216 b	186 a	203 a	217 b	177 a	244 c	191 a	221 b	13,5%
T5	16.10 <sup>-2</sup> %	235 b	189 b	200 b	134 a	206 b	212 b	219 b	204 b	212 b	12,3%
T6	24.10 <sup>-2</sup> %	199 b	220 b	159 a	-	145 a	179 a	194 b	210 b	216 b	13,9%
T7	32.10 <sup>-2</sup> %	201 b	198 b	129 a	-	150 a	187 b	178 b	201 b	188 b	17,7%
T8	40.10 <sup>-2</sup> %	213 b	192 b	-	-	156 a	157 a	189 b	155 a	194 b	12,9%

\*Trat.: Tratamento (T); G1: Grupo 1 (*D. scandens* - AM26GUA ); G2: Grupo 2 (*D. floribundus* - AM04MAO ); G3: Grupo 3 (*D. scandens* - AM21ML); G4: Grupo 4 (*D. scandens* - AM22CZS); G5: Grupo 5 (*D. scandens* - AM24GUA); G6: Grupo 6 (*D. scandens* - AM 02 ML, AM15CZS E AM25GUA); Trat.: Tratamento (T); Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P > 0,05); CV: coeficiente de variação.

Tabela 32 – Peso de pupas (g) de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada com frações de extratos de raízes de timbó dos grupos G2, G3 e G5.

Peso médio de pupas e desvio padrão (g)													
Trat* (T)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	G2* (AM04MAO )		G3* (AM21ML)					G5* (AM24GUA)				CV
		G2F4	G2F5	G3F5	G3F6sol	G3F6sob	G3F7	G3F8	G5F5	G5F6	G5F7	G5F8	
T1	0%	260 a	274 a	266 a	266 a	266 a	266 a	266 a	274 a	271 a	262 a	262 a	8,1%
T2	1.10 <sup>-2</sup> %	-	-	274 a	270 a	279 a	268 a	269 a	261 a	264 a	264 a	272 a	9,2%
T3	2.10 <sup>-2</sup> %	251 a	271 b	268 a	263 a	279 b	271 b	264 a	260 a	258 a	260 a	261 a	9,4%
T4	4.10 <sup>-2</sup> %	249 b	272 c	246 b	230 a	275 c	264 c	260 c	273 c	269 c	250 b	254 b	9,7%
T5	8.10 <sup>-2</sup> %	247 a	267 b	256 b	234 a	272 b	263 b	244 a	260 b	250 a	245 b	250 a	8,7%
T6	12.10 <sup>-2</sup> %	238 a	263 b	259b	232 a	271 b	265 b	255 b	265 b	248 a	243 a	265 a	8,4%
T7	16.10 <sup>-2</sup> %	232 a	264 b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,2%
T8	20.10 <sup>-2</sup> %	233 a	269 b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

\*Trat.: Tratamento (T); G2: Grupo 2 (*D. floribundus* - AM04MAO ); G3: Grupo 3 (*D. scandens* - AM21ML); G5: Grupo 5 (*D. scandens* - AM24GUA); Trat.: Tratamento (T); Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P > 0,05); CV: coeficiente de variação.

Tabela 33 – Peso de pupas (g) de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada com frações do extrato de timbó do Grupo 3 – G3 (AM21ML) avaliadas de forma isolada e combinadas com outras frações e com a rotenona purificada.

Trat* (T)	Bioensaio 1		Bioensaio 2		Bioensaio 3		Bioensaio 4	
	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Peso de pupa (g)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Peso de pupa (g)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Peso de pupa (g)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Peso de pupa (g)
T1	0%	273 a	0%	276 a	0%	283 a	0%	292 a
T2	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	260 a	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	265 a	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	254 b	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> %	270 a
T3	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F5 1,2.10 <sup>-2</sup> %	262 a	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %	210 c	G3F6sol 0,6.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> %	283 a	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	265 a
T4	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + F6sob 0,4.10 <sup>-2</sup> %	261 a	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> %	241 b	G3F6sol 0,6.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,004%	278 a	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	252 b
T5	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sob 1,2.10 <sup>-2</sup> %	229 b	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	257 a	G3F6sol 0,6.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> % + F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	275 a	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %	179 c
T6	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> %	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F5 1,2.10 <sup>-2</sup> %	254 a	G3F6sol 0,6.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> %	270 a	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %	183 c
T7	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + F7 1,2.10 <sup>-2</sup> %	220 b	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sob 0,4.10 <sup>-2</sup> %	250 a	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> %	261 a	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,2.10 <sup>-2</sup> %	266 a
T8	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	257 a	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sob 1,2.10 <sup>-2</sup> %	231 b	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	273 a	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,2.10 <sup>-2</sup> %	256 b
T9	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 1,2.10 <sup>-2</sup> %	258 a	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> %	251 a	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> %	263 a	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> %	226 b
T10	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> %	252 a	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 1,2.10 <sup>-2</sup> %	245 a	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> % + rotenona 0,2.10 <sup>-2</sup> %	241 b	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	183 c

\*Trat.: Tratamento (T); Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P > 0,05); CV: coeficiente de variação.

Tabela 33 – Peso de pupas (g) de *S. frugiperda* (continuação...).

Trat* (T)	Bioensaio 1		Bioensaio 2		Bioensaio 3		Bioensaio 4	
	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Peso de pupa (g)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Peso de pupa (g)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Peso de pupa (g)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Peso de pupa (g)
T11	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	239 b	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> % + rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	238 b	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %	242 b
T12	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 1,2.10 <sup>-2</sup> %	251 a	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %	253 b
T13	-	-	-	-	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> %	266 a
T14	-	-	-	-	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,2.10 <sup>-2</sup> %	277 a
	CV	11,3	CV	10,8%	CV	10,5%	CV	14,6%

\*Trat.: Tratamento (T); Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P > 0,05); CV: coeficiente de variação.

Tabela 34 – Peso de pupas (g) de lagartas de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada com frações do extrato de timbó do Grupo 5 – G5 (AM24GUA) avaliadas de forma isolada e combinadas com outras frações e com a rotenona purificada.

Trat* (T)	Bioensaio 1		Bioensaio 2	
	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Peso de pupa (g)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Peso de pupa (g)
T1	0%	261 a	0%	262 a
T2	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> %	227 b	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	249 b
T3	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	218 b	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	256 a
T4	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 2.10 <sup>-2</sup> %	191 c	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 1,2.10 <sup>-2</sup> %	248 b
T5	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 0,4.10 <sup>-2</sup> %	231 b	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 0,4.10 <sup>-2</sup> %	227 b
T6	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 2.10 <sup>-2</sup> %	222 b	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 1,2.10 <sup>-2</sup> %	245 b
T7	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	189 c	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	272 a
T8	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F8 1,2.10 <sup>-2</sup> %	160 c	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F8 1,2.10 <sup>-2</sup> %	251 b
T9	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F7 0,4.10 <sup>-2</sup> %	259 a
T10	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F7 1,2.10 <sup>-2</sup> %	227 b
T11	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	260 a
T12	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 1,2.10 <sup>-2</sup> %	278 a
T13	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 0,4.10 <sup>-2</sup> %	246 b
T14	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 1,2.10 <sup>-2</sup> %	257 a
	CV	20,2%	CV	12,3%

\*Trat.: Tratamento (T); Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P > 0,05); CV: coeficiente de variação.

Quando as frações foram associadas, houve interação positiva entre as combinações das frações dos extratos G3 e G5 e destas frações com rotenona purificada (Tabelas 33 e 34). Nessas associações, as interações mais efetivas foram promovidas por dois tratamentos, sendo o primeiro constituído pela rotenona purificada ( $2.10^{-2}\%$  m m<sup>-1</sup>) combinada com as frações G3F8 ( $0,2.10^{-2}\%$  m m<sup>-1</sup>) e G3F6sol ( $0,4.10^{-2}\%$  m m<sup>-1</sup>) e o segundo contendo a combinação das frações G5F7 ( $7,12.10^{-2}\%$  m m<sup>-1</sup>) e G5F8 ( $1,2.10^{-2}\%$  m m<sup>-1</sup>), onde as pupas apresentaram peso médio 39% menores (179 e 160 g) do que nos tratamentos controle (292 e 262 g, respectivamente). É importante destacar que esses tratamentos, quando avaliados isoladamente nas mesmas concentrações, não interferiram no peso de pupas dos insetos e, quando isto ocorreu, as concentrações utilizadas foram mais elevadas. Devido à variação de constituição química e a baixa efetividade apresentada pelas frações dos extratos de timbó quando avaliadas isoladamente, os resultados indicam que todos os constituintes dos extratos de timbó (rotenona, deguelina e os constituintes A e B) atuam conjuntamente, promovendo sinergismo entre as substâncias sobre esta variável.

Nas menores concentrações de rotenona purificada, dos extratos de timbó e de suas frações avaliadas isoladamente ou em diferentes combinações não foram observadas reduções significativas no peso de pupas de *S. frugiperda*, apesar de ter ocorrido em algumas dessas concentrações prolongamento da fase larval, conforme resultados apresentados anteriormente. O prolongamento da fase larval sem a correspondente redução no peso de pupas se deva, possivelmente, à presença de doses baixas de substâncias tóxicas inseridas na dieta das lagartas. Segundo TANZUBIL e MCCAFFERY (1990) doses baixas de produtos naturais podem provocar inibição do crescimento e não interferir na alimentação de *S. frugiperda*.

A biomassa das pupas está diretamente relacionada com a quantidade de alimento consumido pelos insetos durante a fase larval (LIMA et al., 2006), o que indica que os extratos de timbó, suas frações e as diferentes combinações entre frações e com a rotenona purificada, que reduziram o peso das pupas, podem ter inibido a alimentação das lagartas de *S. frugiperda*, provocando o efeito de deterrência alimentar nos insetos, o que não foi alvo de mensuração nas avaliações realizadas. A redução da massa na fase de pupa dessa praga também foi observada por ROEL e VENDRAMIN (1999); ROEL et al. (2000); TORRECILLAS e VENDRAMIM (2001); SANTIAGO et al. (2008) e LIMA et al. (2010), quando avaliaram a eficiência de *T. pallida* e *A. indica* para o controle de *S. frugiperda*.

Essa tendência de resultados foi mantida para a mortalidade de pupas. Os extratos de timbó provocaram os maiores valores de mortalidade quando comparados ao número de insetos remanescentes que atingiram a fase de pupa (Tabela 35), seguidos pelas associações entre as frações dos extratos e destas frações com a rotenona purificada (Tabelas 37 e 38). As frações dos extratos (Tabela 36) e a rotenona purificada (Tabela 35), quando avaliadas isoladamente, foram menos eficientes quanto à mortalidade de pupas.

Os maiores valores de mortalidade de pupas de *S. frugiperda* foram obtidos com as concentrações de  $24.10^{-2}\%$  e  $32.10^{-2}\%$  ( $m\ m^{-1}$ ) do extrato G3 e  $16.10^{-2}\%$  ( $m\ m^{-1}$ ) do extrato G4 (Tabela 35) e com as associações da rotenona purificada ( $4.10^{-2}\%$   $m\ m^{-1}$ ) com a fração G3F6sob ( $1,2.10^{-2}\%$   $m\ m^{-1}$ ); das frações G3F6sol ( $1,2.10^{-2}\%$   $m\ m^{-1}$ ) e G3F8 ( $0,4.10^{-2}\%$   $m\ m^{-1}$ ) (Tabela 37) e das frações G5F7 ( $7,12.10^{-2}\%$   $m\ m^{-1}$ ) e G5F6 ( $2.10^{-2}\%$   $m\ m^{-1}$ ) (Tabela 38).

Tabela 35 – Mortalidade de pupas de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada com diferentes extratos de raízes de timbó (*D. scandens* e *D. floribundus*) e com rotenona purificada, proporcional à quantidade de lagartas que atingiram a fase de pupa.

Mortalidade média e desvio padrão (%) de pupa proporcional à quantidade de lagartas que atingiram a fase de pupa										
Trat* (T)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	G1* AM26GUA	G2* AM04MAO	G3* AM21ML	G4* AM22CZS	G5* AM24GUA	G6*			Rotenona purificada
							AM 02 ML	AM15CZS	AM25GUA	
T1	0%	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	4,5±2,1	0,0±0,0	0,0±0,0	4,8±2,1
T2	2.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0	4,2±1,4	15,8±4,0	20,8±4,1	0,0±0,0	9,5±2,7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
T3	4.10 <sup>-2</sup> %	2,1±0,0	0,0±0,0	11,1±3,6	13,3±3,6	0,0±0,0	15,4±3,8	11,8±3,3	0,0±0,0	10,8±3,1
T4	8.10 <sup>-2</sup> %	8,9±1,0	6,5±2,4	30,0±5,0	50,0±5,4	25,0±2,0	20,0±4,1	8,3±2,9	20,0±4,1	10,0±3,1
T5	16.10 <sup>-2</sup> %	8,9±1,0	8,5±1,0	33,3±5,8	100,0±0,0	12,5±1,4	28,6±4,9	16,7±4,1	8,3±4,4	11,1±3,2
T6	24.10 <sup>-2</sup> %	15,4±1,0	10,5±1,4	100,0±0,0	-	25,0±2,4	16,7±4,1	25,0±5,0	25,0±5,0	14,3±3,6
T7	32.10 <sup>-2</sup> %	19,2±2,4	14,5±1,0	100,0±0,0	-	25,0±1,4	33,3±5,8	16,7±4,1	33,3±5,8	20,8±4,1
T8	40.10 <sup>-2</sup> %	22,5±2,7	16,0±2,0	-	-	50,0±5,8	50,0±7,1	42,9±5,3	33,3±5,8	17,4±3,9

\*Trat.: Tratamento (T); G1: Grupo 1 (*D. scandens* - AM26GUA ); G2: Grupo 2 (*D. floribundus* - AM04MAO ); G3: Grupo 3 (*D. scandens* - AM21ML); G4: Grupo 4 (*D. scandens* - AM22CZS); G5: Grupo 5 (*D. scandens* - AM24GUA); G6: Grupo 6 (*D. scandens* - AM 02 ML, AM15CZS E AM25GUA).

Tabela 36 – Mortalidade de pupas de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada com diferentes frações de extratos de raízes de timbó (*D. scandens* e *D. floribundus*) proporcional a quantidade de lagartas que atingiram a fase de pupa.

Mortalidade média e desvio padrão (%) de pupa proporcional à quantidade de lagartas que atingiram a fase de pupa													
Trat* (T)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	G2* (AM04MAO )		Concentração (m m <sup>-1</sup> )	G3* (AM21ML)					G5* (AM24GUA)			
		G2F4	G2F5		G3F5	G3F6sol	G3F6sob	G3F7	G3F8	G5F5	G5F6	G5F7	G5F8
T1	0%	0,0±0,0	0,0±0,0	0%	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
T2	2.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0	0,0±0,0	1.10 <sup>-2</sup> %	5,0±2,2	5,3±2,3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
T3	4.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0	0,0±0,0	2.10 <sup>-2</sup> %	4,8±2,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	5,6±2,4	0,0±0,0	5,0±2,3
T4	8.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0	9,1±2,9	4.10 <sup>-2</sup> %	21,4±4,3	18,2±4,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	11,8±3,3	0,0±0,0	5,3±2,3
T5	12.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0	9,5±3,0	8.10 <sup>-2</sup> %	15,8±3,7	20,0±4,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	4,8±2,2	7,7±2,8	6,7±2,8	11,8±3,3
T6	16.10 <sup>-2</sup> %	5,6±2,4	5,0±2,2	12.10 <sup>-2</sup> %	11,1±3,2	10,0±3,2	0,0±0,0	0,0±0,0	10,0±3,1	0,0±0,0	8,3±3,0	0,0±0,0	10,5±3,2
T7	20.10 <sup>-2</sup> %	11,1±3,2	9,5±3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*Trat.: Tratamento (T); G2: Grupo 2 (*D. floribundus* - AM04MAO ); G3: Grupo 3 (*D. scandens* - AM21ML); G5: Grupo 5 (*D. scandens* - AM24GUA).

Tabela 37 – Mortalidade de pupas de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada com frações do extrato de timbó do Grupo 3 – G3 (AM21ML) avaliadas de forma isolada e combinadas com outras frações e com a rotenona purificada proporcional a quantidade de lagartas que atingiram a fase de pupa.

Trat* (T)	Bioensaio 1		Bioensaio 2		Bioensaio 3		Bioensaio 4	
	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Mortalidade (%)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Mortalidade (%)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Mortalidade (%)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Mortalidade (%)
T1	0%	0,0±0,0	0%	0,0±0,0	0%	0,0±0,0	0%	4,3±2,1
T2	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	10,0±3,1	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	29,2±4,7	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0
T3	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F5 1,2.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %	25,0±5,0	G3F6sol 0,6.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> %	11,8±3,3	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0
T4	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sob 0,4.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> %	21,7±4,2	G3F6sol 0,6.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,004%	27,8±4,6	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	13,6±3,5
T5	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sob 1,2.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	13,0±3,4	G3F6sol 0,6.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> % + F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	5,3±2,3	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %	46,7±5,2
T6	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> %	10,0±3,1	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F5 1,2.10 <sup>-2</sup> %	17,4±3,9	G3F6sol 0,6.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> %	10,0±3,1	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %	22,2±4,4
T7	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 1,2.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sob 0,4.10 <sup>-2</sup> %	33,3±4,9	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> %	10,5±3,2	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,2.10 <sup>-2</sup> %	5,0±2,2
T8	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sob 1,2.10 <sup>-2</sup> %	85,0±3,7	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	7,7±2,8	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,2.10 <sup>-2</sup> %	18,2±3,9
T9	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 1,2.10 <sup>-2</sup> %	100,0±0,0	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> %	15,0±3,4	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0	Rotenona 2.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> %	13,6±3,5
T10	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> %	10,0±3,1	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 1,2.10 <sup>-2</sup> %	17,4±3,9	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,4.10 <sup>-2</sup> % + rotenona 0,2.10 <sup>-2</sup> %	29,2±3,5	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	10,5±3,2

\*Trat.: Tratamento (T).

Tabela 37 – Mortalidade de pupas de *S. frugiperda* (continuação...).

Trat* (T)	Bioensaio 1		Bioensaio 2		Bioensaio 3		Bioensaio 4	
	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Mortalidade (%)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Mortalidade (%)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Mortalidade (%)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Mortalidade (%)
T11	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	25,0±5,0	G3F6sol 1,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F7 0,2.10 <sup>-2</sup> % + rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	41,7±4,5	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %	5,0±2,3
T12	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 1,2.10 <sup>-2</sup> %	18,2±3,9	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,4.10 <sup>-2</sup> %	10,0±3,1
T13	-	-	-	-	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,2.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0
T14	-	-	-	-	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G3F8 0,4.10 <sup>-2</sup> % + G3F6sol 0,2.10 <sup>-2</sup> %	8,3±2,8

\*Trat.: Tratamento (T).

Tabela 38 – Mortalidade de pupas de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada com frações do extrato de timbó do Grupo 5 – G5 (AM24GUA) avaliadas de forma isolada e combinadas com outras frações e com a rotenona purificada proporcional a quantidade de lagartas que atingiram a fase de pupa.

Trat* (T)	Bioensaio 1		Bioensaio 2	
	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Mortalidade (%)	Concentração (m m <sup>-1</sup> )	Mortalidade (%)
T1	Controle (Solvente)	0,0±0,0	Controle (Solvente)	0,0±0,0
T2	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> %	13,3±3,5	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> %	4,3±2,1
T3	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	8,3±3,0	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	9,5±3,0
T4	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 2.10 <sup>-2</sup> %	25,0±4,4	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 1,2.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0
T5	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 0,4.10 <sup>-2</sup> %	17,6±3,9	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 0,4.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0
T6	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 2.10 <sup>-2</sup> %	70,0±4,8	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 1,2.10 <sup>-2</sup> %	20,0±3,9
T7	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	20,0±4,1	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F8 0,4.10 <sup>-2</sup> %	4,8±2,1
T8	G5F7 7,12.10 <sup>-2</sup> % + G5F8 1,2.10 <sup>-2</sup> %	6,7±2,6	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F8 1,2.10 <sup>-2</sup> %	5,9±2,4
T9	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F7 0,4.10 <sup>-2</sup> %	4,2±2,0
T10	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F7 1,2.10 <sup>-2</sup> %	5,3±2,3
T11	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 0,4.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0
T12	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F5 1,2.10 <sup>-2</sup> %	0,0±0,0
T13	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 0,4.10 <sup>-2</sup> %	5,3±2,3
T14	-	-	Rotenona 4.10 <sup>-2</sup> % + G5F6 1,2.10 <sup>-2</sup> %	4,8±2,2

\*Trat.: Tratamento (T).

Apesar de que os dados obtidos nesta variável possam não ser conclusivos, em função do número reduzido de insetos que atingiram a fase adulta em alguns tratamentos e pela impossibilidade de aplicação de teste estatístico, os resultados demonstram que as frações G3F6sob e G3F7 não apresentam efeito sobre a mortalidade de pupas (Tabela 36), uma vez que nestas frações todos os insetos atingiram a fase adulta. Por outro lado, as frações G2F4, G3F5, G3F6sol, G5F6 e G5F8 (Tabela 36), além da rotenona purificada (Tabela 35), provocaram os maiores valores de mortalidade de pupas entre os produtos avaliadas isoladamente. A fração G3F6sol possui 58,7% de rotenona e apresentou resultados similares aos provocados pela rotenona purificada avaliada isoladamente e, por este motivo, os efeitos sobre a mortalidade de pupas de *S. frugiperda* podem ser atribuídos principalmente a presença da rotenona nos extratos de timbó.

Esses resultados mantiveram uma relação com os resultados apresentados pelos tratamentos em fases anteriores dos bioensaios. Foi observada a tendência de maior valor de mortalidade ou menor viabilidade de pupas de *S. frugiperda* para os tratamentos que provocaram os maiores valores de mortalidade de lagartas e de prolongamento da fase larval, assim como menores percentuais de empupamento e de peso de pupas.

As pupas não viáveis (mortas) apresentavam, 5 a 8 dias após o início desta fase, coloração escura, aspecto murcho e retorcido, rompimento do casulo, deformações e normalmente apresentavam pesos menores do que no tratamento controle (Figura 36). Tais constatações indicam que o emprego de extratos de timbó, ricos em rotenona, pode reduzir a viabilidade pupal de *S. frugiperda*, o que conseqüentemente afetará o número de descendentes futuros pela redução do número de insetos adultos.



Figura 36 – Pupas de *S. frugiperda* viáveis (A) e não viáveis (B). Fotos: Alecio (2012).

Além disso, a associação da rotenona purificada ( $4.10^{-2}\%$  m m<sup>-1</sup>) com a fração G3F6sob ( $1,2.10^{-2}\%$  m m<sup>-1</sup>), apesar de não ter provocado efeitos biológicos significativos nas fases de larva e pupa, produziu adultos com deformidades acentuadas. Neste tratamento, dos vinte insetos que atingiram a fase de pupa, dezessete eclodiram dando origem a adultos com alterações (Figura 37), tais como asas e pernas atrofiadas, dificuldades para se desvencilharem dos casulos e mortalidade poucas horas após a eclosão das pupas. A fração G3F6sob diferencia-se quimicamente das demais frações dos extratos de timbó principalmente por possuir o maior teor do constituinte A (47,05%) e a menor quantidade de rotenona (15,05%) e como esse efeito biológico não foi observado quando a rotenona purificada foi avaliada isoladamente, os resultados indicam que a possibilidade do constituinte A afetar a viabilidade dos insetos adultos, impedindo ou dificultando que os indivíduos completem o ciclo, o que a credencia como promissora para composição de formulação de inseticida para *S. frugiperda*.



Figura 37 – Adultos de *S. frugiperda* com deformações, apresentando asas e pernas atrofiadas e dificuldade para se desvencilharem dos casulos. Fotos: Alecio (2012).

#### **5.3.4 Efeitos biológicos de constituintes majoritários de extratos de timbó sobre lagartas de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada**

A composição química dos extratos dos seis agrupamentos (Tabela 3) e das quatro frações de timbó (Figura 21 e Tabela 39) e seus efeitos biológicos avaliados sobre lagartas de *S. frugiperda* por ingestão de dieta contaminada foram distintos e, com base nos resultados obtidos é possível inferir que: os teores de rotenona e deguelina são determinantes para promover elevados valores de mortalidade de lagartas; a rotenona, quando utilizada isoladamente, apresenta baixa toxicidade, porém exerce papel determinante sobre todas as variáveis analisadas, apresentando efeito sinérgico quando associada principalmente com deguelina e constituinte B; elevados teores do constituinte A reduzem, aparentemente, os efeitos tóxicos dos demais constituintes de extratos de timbó sobre a mortalidade dos insetos; os constituintes A e B são provavelmente as substâncias responsáveis por provocar mortalidades na fase de pré-pupa; todos os constituintes dos extratos de timbó analisados (rotenona, deguelina e constituintes A e B), quando associados, apresentam efeito sinérgico, reduzindo o peso de pupas; a mortalidade de pupas é afetada

principalmente pela presença da rotenona e o constituinte A pode ser a substância que afeta a viabilidade de insetos adultos, impedindo ou dificultando que os indivíduos completem o ciclo.

Tabela 39 – Constituintes de frações de extratos de timbó identificados por Cromatografia em fase Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de Massa (EM)

Grupo (G)/ Fração (F)	Constituintes					
	Rotenona/deguelina	A	B	C*	D*	E*
G3F6sol	58,67%	7,08%	34,24%	-	-	-
G3F6sob	15,05%	47,05%	37,88%	-	-	-
G5F6	Não identificado	21,89%	18,18%	4,26%	41,37%	14,28%
G5F7	24,05%	30,81%	45,13%	-	-	-

\* Constituintes não identificados.

As variações entre as quantidades e as proporcionalidades dos diferentes constituintes dos extratos de timbó poderiam justificar as distorções encontradas na literatura quanto à toxicidade dessas plantas para insetos. Diversos trabalhos relatam elevada toxicidade (AZEVEDO et al., 2007; ALECIO et al., 2010; CORREA, 2011), enquanto outros não confirmam esse efeito (DAHLEM et al., 2009; ALMEIDA, 2010; EFROM et al., 2011). Alguns estudos apontam a rotenona como principal constituinte tóxico (MARINOS et al., 2004; AZEVEDO et al., 2007; ALECIO et al., 2010; LUCIO et al., 2011) e outros destacam que esta substancia apresenta baixa toxicidade quando utilizada isoladamente e que depende da associação de outros compostos para apresentar efeito tóxico (CORREA, 2011; LI et al., 2011), ao mesmo tempo em que novos constituintes foram isolados e identificados a partir de extratos desses vegetais e apresentaram efeitos biológicos sobre artrópodes (HYMAVATHI et al., 2011; LI et al., 2011; JIANG et al., 2012).

O fato é que os extratos de timbó, mesmo se tratando de plantas de mesma espécie, apresentaram grande variação de composição química, o que pode estar relacionado às diferenças

genéticas, de idade e das condições edafoclimáticas das plantas, semelhantemente aos resultados obtidos por MENDES (1960), o que refletiu nos efeitos biológicos sobre os insetos.

Desse modo, os resultados podem ajudar a esclarecer essas contradições, indicando que o efeito tóxico dos timbós está associado à atuação conjunta de diversos constituintes e que extratos com elevados teores de rotenona e deguelina associados à presença dos constituintes A e B tendem a apresentar maior toxicidade para lagartas de *S. frugiperda*, demonstrando que os extratos obtidos de plantas de timbó de mesma espécie apresentam efeitos tóxicos variados, dependentes das concentrações, do modo de exposição aos insetos, da composição química e da associação de constituintes, o que poderia justificar as distorções dos resultados encontrados na literatura, deixando claro que a toxicidade desses vegetais depende de diversos fatores, não podendo ser generalizada, sendo necessária a realização de estudos detalhados para melhor elucidar os efeitos de todas essas variáveis para cada espécie de inseto alvo.

Os resultados apresentaram a tendência de efeito inseticida para *S. frugiperda* quando os extratos de timbó apresentam teores elevados de rotenona e deguelina (50% a 60%), quantidades intermediárias do constituinte B (30% a 40%) e baixos teores do constituinte A (10 a 20%). Essas proporções de constituintes podem ser consideradas como as mais adequadas para a seleção de extratos, visando o desenvolvimento de produtos biotecnológicos para o controle de *S. frugiperda*, levando-se em consideração a possibilidade de misturas ou combinações controladas desses constituintes.

## 5.4 CONCLUSÃO

A toxicidade de extratos de timbó para lagartas de *S. frugiperda* é variável e está relacionada à atuação conjunta de diversos constituintes;

A intoxicação por ingestão de dieta contaminada é a via de contato mais efetiva para *S. frugiperda*;

A rotenona apresenta baixa toxicidade quando utilizada isoladamente, porém provoca mortalidade de pupas e apresenta efeito sinérgico, quando associada à deguelina e aos constituintes A e B, sobre todos os efeitos biológicos causados pelos extratos de timbó sobre lagartas de *S. frugiperda*;

Os extratos de timbó que possuem os maiores teores de rotenona e deguelina apresentam a maior toxicidade para lagartas de *S. frugiperda*;

Os teores de rotenona e deguelina podem ser usados como indicativos de toxicidade dos extratos de timbó para lagartas de *S. frugiperda*;

O constituinte A, quando presente em elevadas concentrações nos extratos, possivelmente atua como antagonista de mortalidade de lagartas de *S. frugiperda*;

O constituinte A pode ser a substância que provoca deformações e afeta a viabilidade de adultos de *S. frugiperda*;

Os constituintes A e B provavelmente provocam mortalidades na fase de pré-pupa de *S. frugiperda*;

Os constituintes dos extratos de timbó, quando associados, reduzem o peso de pupas de *S. frugiperda*;

O extrato de timbó do Grupo 3 (G3) possui as quantidades mais adequadas de constituintes e apresenta a maior toxicidade para lagartas de *S. frugiperda*;

Extratos de timbó com elevados teores de rotenona e deguelina, quantidades intermediárias do constituinte B e baixos teores do constituinte A, em suas composições químicas, são os mais promissores para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos para controle de *S. frugiperda*.

## 6. CONCLUSÕES FINAIS

A intoxicação por ingestão alimentar é a via de contato mais efetiva para adultos de *C. tingomarianus* e lagartas de *S. frugiperda*;

A toxicidade dos timbós está relacionada à composição química dos extratos, a forma de exposição e a espécie de inseto-alvo;

A composição química dos extratos de timbó influenciou decisivamente nos efeitos tóxicos biológicos sobre adultos de *C. tingomarianus* e lagartas de *S. frugiperda*;

A rotenona purificada utilizada isoladamente não foi tóxica para adultos de *C. tingomarianus* e apresentou baixa toxicidade para lagartas de *S. frugiperda*;

Extratos com elevados teores de rotenona e deguelina não são tóxicos para adultos de *C. tingomarianus* e apresentam elevada toxicidade para lagartas de *S. frugiperda*;

A rotenona pode apresentar efeito sinérgico sobre os efeitos tóxicos biológicos dos extratos dos timbós em lagartas de *S. frugiperda*, quando associada com deguelina e com os constituintes A e B;

A rotenona não é a principal substância tóxica presente em extratos de timbó para adultos de *C. tingomarianus*;

A toxicidade dos extratos de timbó para adultos de *C. tingomarianus* pode estar relacionada aos efeitos sinérgicos dos constituintes A e B;

O constituinte A pode exercer efeito antagonista de mortalidade de lagartas, provocar deformações e afetar a viabilidade de adultos de *S. frugiperda*;

A associação do constituinte A com o constituinte B pode provocar mortalidades na fase pré-pupa de *S. frugiperda* e o peso de pupa dos insetos pode ser reduzido pela atuação conjunta de vários constituintes dos extratos de timbó;

Extratos com elevados teores de rotenona associados à deguelina são indicadores de toxicidade para lagartas de *S. frugiperda* e de baixo efeito tóxico para adultos de *C. tingomarianus*;

A maior toxicidade para *S. frugiperda* é promovida quando os extratos de timbó são constituídos aproximadamente por  $\frac{3}{10}$  de rotenona,  $\frac{3}{10}$  de deguelina,  $\frac{3}{10}$  do constituinte B,  $\frac{1}{10}$  do constituinte A e pequenas quantidades dos demais constituintes;

Os extratos de timbó G1 e G3 apresentam a maior toxicidade para adultos de *C. tingomarianus* e lagartas de *S. frugiperda*, respectivamente, e são os mais promissores para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos para o controle desses insetos.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- AIDAR, H.; KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L.F. 2002. *Produção do feijoeiro em várzeas tropicais*. Goiania: Embrapa Arroz e Feijão. 326 pp.
- ALECIO, M.R.; Alves, S.B.; Gonzaga, A.D.; Ribeiro, J.D.; Correa, R.S. 2005. Avaliação do potencial inseticida “*in vitro*” do extrato aquoso de raízes de timbó (*Derris rariflora*) sobre *Sitophilus zeamais* Mots In: I Jornada Amazonense de Plantas medicinais. Manaus. *Anais da I Jornada Amazonense de Plantas medicinais*. p. 42.
- ALECIO, M.R.; FAZOLIN, M.; COELHO NETTO, R.A.; CATANI, V.; ESTRELA, J.L.V.; ALVES, S.B.; CORREA, R. DA S.; ANDRADE NETO, R. DE C.; GONZAGA, A.D. 2010. Ação inseticida do extrato de *Derris amazonica* Killip para *Cerotoma arcuatus* Olivier (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Amazonica*. 40(4): 719-728.
- ALECIO, M.R.; FAZOLIN, M.; VEIGA JÚNIOR, V.F.; ESTRELA, J.L.V.; ALVES, S.B.; ANDRADE NETO, R. DE C.; PAIVA, F. de F.G.; MONTEIRO, A.F.M.; DAMACENO, J.E. de O.; CAVALCANTE, A.S. da S.; ALBUQUERQUE, E.S. de A.; OLIVEIRA, P. de A. 2011. Ação inseticida do extrato de *Deguelia floribundus* Benth para *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae). *Anais do V Congresso Brasileiro de Defensivos Agrícolas Naturais*. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna/SP.
- ALMEIDA, M.N. de. 2010. Eficiência de um inseticida botânico no controle de ninfas de *Euphalerus clitoriae* (Hemiptera: Psyllidae). *Revista Controle Biológico (BE-300) On-Line*. 2: Disponível em: [http://www.ib.unicamp.br/profs/eco\\_aplicada](http://www.ib.unicamp.br/profs/eco_aplicada). Acesso em: 20 de março de 2012.
- ALTIERI, M.; SILVA E.N.; NICHOLLS, C. 2003. *O papel da biodiversidade no manejo de pragas*. Ribeirão preto: Holos. 226 p.
- AMARAL, B.D. 2004. Fishing territoriality and diversity between the ethnic populations Ashaninka and Kaxinawá, Breu river, Brazil/Peru. *Acta Amazonica*. 34(1): 75 - 88
- ARNASON, J.T.; PHILOGÈNE, B.J.R.; MORAND, P. 1990. *Insecticide of plant origin*. Washington, DC, American Chemical Society. 214p.
- ATKINS, E.L.; GREYWOOD, E.A.; MACDONALD, R.L. 1973. *Toxicity of pesticides and other agricultural chemicals to honey bees: laboratory studies*. 36pp.

- CESCONETTO, A.O.; FAVERO, S.; OLIVEIRA, A.K.M.; SOUZA, C.C. 2005. Distribuição espacial do dano da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797), em Sidrolândia, Mato Grosso do Sul. *Ensaios e ci.* 9: 305-314.
- D'ANDREA, A.; ALIBONI, A.; SANTIS, A.; MARIANI, S.; GORGOGLIONE, D.; RITIENI, A. 2007. SFE of *Derris elliptica* (Wallich) Benth. roots: Influence of process parameters on yield and purity of rotenone. *J. of Supercritical Fluids.* 42: 330-333.
- ÁVILA, C.J.; DEGRANDE, P.E.; GOMEZ, S.A. 1997. Insetos pragas: reconhecimento, comportamento, danos e controle. In: *Milho: informações técnicas*. Dourados: EMBRAPA-CPAO. p.157-170 (EMBRAPA CPAO: Circular Técnica, 5).
- AZEVEDO, F.R.; GUIMARÃES, J.A.; BRAGA SOBRINHO, R.; LIMA, M.A.A. 2005. Eficiência de produtos naturais para o controle de *Bemisia tabaci* Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em meloeiro. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo. 72(1): 73-79.
- AZEVEDO, F.R.; LEITÃO, A.C.L.; LIMA, M.A.A.; GUIMARÃES, J.A. 2007. Eficiência de produtos naturais no controle de *Callosobruchus maculatus* (Fab.) em feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) armazenado. *Revista Ciência Agronômica.* 38(2): 182-187.
- BABU, T.H.; TIWARI, A.K.; RAO, V.R.S.; ALI, A.Z.; RAO, J.M.; BABU, K.S. 2010. A new prenylated isoflavone from *Derris scandens* Benth. *J. Asian Nat Prod Res.* 12(7): 634-638.
- BALDIN, E.L.L.; PRADO, J.P.M.; CHRISTOVAM, R.S. DAL POGETTO, M.H.F. A. 2009. Uso de pós de origem vegetal no controle de *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de feijoeiro. *BioAssay.* 4(2): 1-6.
- BARROS, E.M.; TORRES, J.B.; BUENO, A.F. 2010. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. *Neotropical Entomology.* 39(6): 996-1001.
- BECKEL, H.S.; LORINI, I.; LAZZARI, S.M.N. 2006. Efeito do sinergista butóxido de piperonila na resistência de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) a deltametrina e fenitrotiom. *Revista Brasileira de Entomologia.* 50(1): 110-114.
- BELL, A.; FELLOWS, L.E.; SIMMONDS, M.S.J. 1990. Natural products from plants for the control of insect pests. In: HODGSON, E.; KUHR, R.J. *Safer insecticide development and use*. New York and Basel. Marcel Dekker. p. 337-383.

- BERNARD, C., PHILOGENE, B.J.R. 1993. Inseticidas synergists: role, importance, and perspectives. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 38: 199-233.
- BERTOLDO, J.G.; COIMBRA, J.L.M.; NODARI, R.O.; GUIDOLIN, A.F.; HEMP, S.; BARILI, L.D.; VALE, N.M.; ROZZETO, D. S. 2009. Stratification of the state of Santa Catarina in macro-environments for bean cultivation. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. Viçosa. 9(4): 335-343.
- BOIÇA JUNIOR, A.L.; JESÚS, F.G.; CARBONEL, S.A.M.; PITTA, R.M.; CHIORATTO, A.F. 2008. Efeito de genótipos de *Phaseolus vulgaris* associados ou não a inseticidas no controle de *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) e *Caliothrips phaseoli* (Hood) (Thysanoptera: Thripidae). *Bol. San. Veg. Plagas*. 34: 27-35.
- BOGORNIE, 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*. Londrina. 32: 665-669.
- BRINDLEY, W.A.; SELIM, A.A. 1990. Synergism and antagonism in the analysis of insecticides resistance. *Environmental Entomology*. 13: 348-353.
- BRITO, C.H.; MEZZOMO, J.A.; BATISTA, J.L.; LIMA, M.S.B.; MURATA, A.T. 2004. Bioatividade de extratos vegetais aquosos sobre *Spodoptera frugiperda* em condições de laboratório. Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. 71: 41-45.
- BROWN JÚNIOR, K.S. 1988. Engenharia ecológica: novas perspectivas de seleção e manejo de plantas medicinais. *Acta Amazônica*. 18(1): 291-303.
- BUNTIN, G.D. 1986. A review of plant response to fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), injury to select field and forage crops. *Florida Entomologist*. 3(69): 549-559.
- BUSATO, G.R.; GRÜTZMACHER, A.D; GARCIA, M.S.; ZOTTI, M.J.; NÖRNBERG, S.D.; MAGALHÃES, T.R.; MAGALHÃES, J.B. 2006. Susceptibilidade de lagartas dos biótipos milho e arroz de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas com diferentes modos de ação. *Ciência Rural*. 36(1): 15-20.
- CASTRO, H.G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. 2004. *Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários*. 2. ed. Viçosa: UFV. 113 p.

- CAMINHA FILHO, A. 1940. *Timbó e rotenona: uma riqueza nacional inexplorada*. Serviço de Informação Agrícola, Rio de Janeiro. 2. ed. 14 pp.
- CAMPANHOLA, C. 1990. *Resistência de insetos a inseticidas: importância, características e manejo*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA. 45 pp.
- CARVALHO, R.P.L. 1970. *Danos, flutuação da população, controle e comportamento de Spodoptera frugiperda (J. E. Smit, 1797) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho*. 170p. Doctor's Thesis, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- CASIDA, J.E. 1970. Mixed-function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergists. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 18: 753-772.
- CATTO, J.B.; BIANCHIN, I.; SANTURIO, J.M.; FEIJO, G.L.D.; KICHEL, A.N.; SILVA, J.M. 2009. Sistema de pastejo, rotenona e controle de parasitas em bovinos cruzados: efeito no ganho de peso e no parasitismo. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* Jaboticabal. 18(4): 37-43
- CAVALHEIRO, R.A.; FORTES, F.; BORECKÝ, J.; FAUSTINONI, V.C.; SCHREIBER, A.Z. 2004. Respiration, oxidative phosphorylation, and uncoupling protein in *Candida albicans*. *Braz J Med Biol Res*. 37(10): 1455-1461.
- CAVE, R.D. 2000. Biology, ecology and use in pest management of *Telenomus remus*. *Biocontrol News and Information*. 21: 21-26.
- CLEMENT, C.R. 2001. Melhoramento de espécies nativas {Improvement of native species}. In: Nass, L.L.; Valois, A.C.C.; Melo, I.S.; Valadares-Inglis, M.C. (Eds.). *Recursos genéticos e melhoramento - plantas*. Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso - Fundação MT, Rondonópolis, MT. p. 423-441.
- CONAB, 2012. *Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos*. Conab. 36p.
- COLL, J. 2005. Cubé Resin Insecticide: Identification and Biological Activity of 29 Rotenoid Constituents. *J. Agric. Food Chem*. 53: 3749-3750.
- COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; MONTILLA, L.; RODRIGUEZ, M.; CASTILLO, A.; HASEGAWA, M. 2009. Xymarginatin: a new acetogenin inhibitor of mitochondrial electron transport from *Xylopiia emarginata* Mart., Annonaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 19(4): 871-875.

- CORBETT, C.E. 1940. *Plantas ictiotóxicas: farmacologia da rotenona*. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo. 157 pp.
- CORREA, R.S. 2006. Toxicidade de extratos de *Lonchocarpus floribundus* Benth (timbó) sobre *Toxoptera citricida* Kirkald (pulgão preto do citros) (Sternorrhyncha: Aphididae). Master's Thesis, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 71pp.
- CORREA, R.S. 2011. Toxicidade de extratos de timbós (*Derris* spp.) sobre *Tetranychus desertorum* (Acari: Tetranychidae) em folhas de pimentão. Doctor's Thesis, Universidade Federal do Amazonas/Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, Amazonas. 72p.
- CORREIA, A.A.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A.A.C.; OLIVEIRA, J. V.; Torres, J. B. 2009. Morphology of the Alimentary Canal of *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) Larvae (Lepidoptera: Noctuidae) Fed on Neem-Treated Leaves. *Neotropical Entomology*. 38(1): 83-91.
- COSTA, J.P.; BELO, M.; BARBOSA, J.C. 1997. Efeitos de Espécies de Timbós (*Derris* spp.: Fabaceae) em Populações de *Musca domestica* L. *An. Soc. Entomol. Brasil*. 26(1): 163-168.
- COSTA, N.A.; NASCIMENTO, C.N.B.; MOURA CARVALHO, L.O.D.; PIMENTEL, E.S. 1986. *Uso do timbó urucu (Derris urucu) no controle do piolho (Haemotopinus tuberculatus) em bubalinos*. Belém: EMBRAPA-CPATU, Belém. 16 pp. (Boletim de Pesquisa, 78).
- COSTA, J.P.C.; ALVES, S.M.; BELO, M. 1999(a). Teores de rotenona em clones de timbó (*Derris* spp., Fabaceae) de diferentes regiões da Amazônia e os seus efeitos na emergência de imagos em *Musca domestica* L. *Acta Amazônica*. 29(4): 563-573.
- COSTA, J. P. C.; ALVES, S. M.; BELO, M. 1999(b). Diferença entre as espécie de timbó (*Derris* spp., Fabaceae) de diferentes regiões da Amazônia no controle de *Musca domestica* L. *Acta Amazônica*. 29(4): 573-583.
- CRAVERO, E.S.; GUERRA. M. DE S.; SILVEIRA, C.P.D. 1976. *Manual de inseticidas e acaricidas: aspectos toxicológicos*. Pelotas: Aimara Ltda. 229 pp.
- CROMBIE, L.; WHITING, A.D. 1998. Biosynthesis in the rotenoid group of natural products: applications of isotope methodology. Oxford. *Phytochemistry*. 49(6): 1479-1507.
- CRUZ, I. 1995. *A lagarta-do-cartucho na cultura do milho*. Sete Lagoas. Embrapa-CNPMS. 45p. (Circular Técnica, 21).

- CRUZ, I.; VALICENTE, F.H.; SANTOS, J.P.; WAQUIL, J.M.; VIANA, P. 1997. *Manual de identificação de pragas da cultura do milho*. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS. 67p.
- CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M.L.C.; OLIVEIRA, A.C.; VASCONCELOS, C.A. 1999. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. *International Journal of Pest Management*. 45(4): 293-296
- CRUZ, I.; MONTEIRO, M.A.R. 2004. Controle biológico da lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum*. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 4p. (Comunicado Técnico).
- COX, C. 2002. Pyrethrins/Pyrethrum. *Journal of Pesticide Reform*. 22: 14-20.
- DAHLEM, A.R.; POSSENTI, J.C.; PAULUS, D. 2009. Produtos alternativos no controle de pragas na cultura do feijão-vagem em sistema orgânico. XIV *Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR*. 4p.
- DECKER, S. 1942. *Inseticidas vegetais*. São Paulo: Secretaria de Agricultura, Indústrias e Comércio do Estado de S. Paulo. 18pp (Boletim da Agricultura).
- DIEZ-RODRIGUEZ, G.I.; OMOTO, C. 2001. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) à lambda-cyhalothrin. *Neotropical Entomology*. 30(2): 311-316.
- DUCROT, P.H. 2004. Contribución de la química al conocimiento de la actividad biopesticida de los productos naturales de origen vegetal. In: Regnault-Roger, C., B.J.R. Philogene y C. Vincent (eds.). *Biopesticidas de origen vegetal*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 337 p.
- EFROM, C.F.S.; REDAELLI, L.R.; MEIRELLES, R.N.; OURIQUE, C.B. 2011. Selectivity of phytosanitary products used in organic farming on adult of *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera, Coccinellidae) under laboratory conditions. *Ciências Agrárias*. Londrina. 32(4): 1429-1438.
- FARONI, L.R.A.; MOLIN, L.; ANDRADE, E.T.; CARDOSO, E.G. 2005. Utilização de produtos naturais no controle de *Acanthoscelides obtectus* em feijão armazenado. *Rev. Bras. Armaz.* 20: 44-48.
- FAO. 2010. Faostat. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 27 de maio de 2012.

- FAZOLIN, M. 1986. *Efeito de diferentes níveis populacionais de Cerotoma sp. no rendimento do caupi (Vigna unguiculata (L.) Walp.)*. EMBRAPA-UEPAE, Rio Branco. 7pp. (Comunicado Técnico, 49).
- FAZOLIN, M.; GOMES, T.C.A. 1993. Dinâmica populacional de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné em caupi e puerária em Rio Branco, Acre. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 3(22): 491-495.
- FAZOLIN, M. 1995. Levantamento dos insetos e flutuação populacional das pragas que ocorrem na cultura do caupi (*Vigna unguiculata (L.) Walp.*, em Rio Branco (AC). *Turrialba* 45: 137-142.
- FAZOLIN, M. 2002. Avaliação de plantas com potencial inseticida no controle da vaquinha-do-feijoeiro- Rio Branco: EMBRAPA Acre 42pp. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 37).
- FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V. 2004. Determinação do nível de dano econômico de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleóptera: Chrysomelidae) em *Phaseolus vulgaris* L. cv. Pérola. *Neotrop. Entomol.* 33: 1-7.
- FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; CATANI, V.; LIMA, M.S.; ALECIO, M.R. 2005. Toxicidade do óleo de *Piper aduncum* L. a adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae). *Neotrop. Entomol.* Londrina. 34(3): 17-24.
- FANG, N.; CASIDA J.E. 1999. Rotenone, Deguelin, Their Metabolites, and the Rat Model of Parkinson's Disease. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2130–2136.
- FERRAZ, M.C.V.D. 1982. *Determinação das exigências térmicas de Spodoptera frugiperda (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) em cultura de milho*. 81pp. Master's Thesis, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo.
- FIGUEIREDO, M.L.C.; PENTEADO-DIAS, A. M.; CRUZ, I. 2005. *Danos provocados por Spodoptera frugiperda na produção de matéria seca e nos rendimentos de grãos, na cultura do milho*. Sete Lagoas: Embrapa/CNPMS. 6pp. (Comunicado Técnico, 130)
- FINNEY, D.J. 1971. *Probit analysis*. 3. th. New Delhi: Cambridge University Prees. 333pp.
- FREIRE FILHO, F.R.; Lima, A.A. L.; Ribeiro, V.Q. 2005. *Feijão-caupi: avanços tecnológicos*. Brasília: Embrapa Meio-Norte. 519pp.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C. DE; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.;

- MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. 2002. *Manual de Entomologia Agrícola*. Piracicaba: Fealq. 920 pp. (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 10).
- GASSA, A.; FUKUI, M.; SAKUMA, M.; NISHIOKA, T.; TAKAHASHI, S. 2005. Rotenoids in the Yam bean *Pachyrrhizus erosus*: Possible defense principles against herbivores. *J. Environ. Entomol. Zool.* 15(4): 251-259.
- GASSEN, D.N. 1994. *Pragas associadas à cultura do milho*. Passo Fundo: Aldeia Norte. 92p.
- GOODMAN, L.S. 1985. Study of pesticide genotoxicity. *Basic Life Sci.* 21: 275 - 326.
- GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.G. 1985. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 7th ed. New York, Toronto, London: Macmillan. p. 1839-1856.
- GOSSELIN, R.E. 1984. *Clinical Toxicology of Commercial Products*. 5th ed. Baltimore/London: Williams e Wilkins. p.111-367.
- GOVINDACHARI, T.R. 1992. Chemical and biological investigations on *Azadirachta indica* (the neem tree). *Current Science*. Bangalore. 63(3): 117-122.
- GRÜTZMACHER, A.D.; LIMA, J.F.M.; CUNHA, U.S.; PORTO, M.P.; MARTINS, JOSÉ F.S.; DALMAZO, G.O. 2000. Efeito de inseticidas e de tecnologia de aplicação no controle da lagarta-do-cartucho na cultura do milho no agroecossistema de várzea. Embrapa CPACT. p.567-573 (Documentos, 70).
- GUERRA, M.S. 1985. *Receituário caseiro: alternativas para o controle de pragas e doenças de plantas cultivadas e de seus produtos*. Brasília: Embrater. 166pp.
- GUIRADO, N.; MENDES, P.C.D.; AMBROSANO, E.J.; ROSSI, F.; ARÉVALO, R.A. 2007. Controle de *Cerotoma arcuatus* com produtos alternativos na cultura de girassol. *Rev. Bras. Agroecologia* 2(1): 587-590.
- GUSMÃO, D.S.; PÁSCOA, V.; MATHIAS, L.; VIEIRA, I.J.C.; BRAZ-FILHO, R.; LEMOS, F.J.A. 2002. *Derris (Lonchocarpus) urucu* (Leguminosae) Extract Modifies the Peritrophic Matrix Structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 97(3): 371-375.
- HIEN, P.P.; GORTNIZKA, H.; KRAEMER, R. 2003. Rotenone – potential and prospect for sustainable agriculture. *Omonrice*. 11: 83-92

- HENANDEZ, C.R.; VENDRAMIM, J.D. 1996. Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Manejo Integr. Plagas*. 42: 14-22.
- HOHMANN, C.L.; CARVALHO, S.M. 1983. Efeito da redução foliar sobre o rendimento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. Itabuna. 12(1): 3-9.
- HOHMANN, C.L.; MARTINEZ, S.S. 2000. *Feijão: Tecnologia de produção*. Londrina, PR. 115pp. (Informe de pesquisa, 135).
- HYMAVATHI, A.; DEVANAND, P.; SURESH BABU, K.; SREELATHA, T.; PATHIPATI, U.R.; MADHUSUDANA, R, J. 2011. Vapor-phase toxicity of *Derris scandens* Benth-derived constituents against four stored-product pests. *J Agric Food Chem*. 59(5): 1653-7.
- IBGE, 2012. Estatística da Produção Agrícola. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=2095eid\\_pagina=1](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2095eid_pagina=1). Acesso em: 20 de maio de 2012.
- ISMAN, M.B. 1995. Leads and prospects for the development of new botanical insecticides. *Rev. Pest. Toxicol*. 3: 1-2.
- JESÚS, F.G.; SANTOS, M.L.; ALMEIDA, A.F.C.M.; SANTANA, M.V.; NOGUEIRA, L.; ARAÚJO, M.S. 2011. Uso de lós óleos vegetais no controle de *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1839) (Coleoptera: Bruchidae). *Bol. San. Veg. Plagas*. 37: 19-26.
- JIANG, C.; LIU, S.; HE, W.; LUO, X.; ZHANG, S.; XIAO, Z.; QIU, X.; YIN, H. (2012). A New Prenylated Flavanone from *Derris trifoliata* Lour. *Molecules*. 17: 657-663.
- KNIPLING, E.F. 1980. Regional management of the fall armyworm – a realistic approach. *Florida entomologist*. 4(63): 468-480.
- KLOCKE, J.A.; HU, M.; CHIU, S.F.; KUBO, I. 1991. Grayanoid diterpene insect antifeedants and insecticides from rhododendron-molle. *Phytochemistry*. 30: 1797-1800.
- KOTZE, A.C.; DOBSON, R.J.; CHANDLER, D. 2006. Synergism of rotenone by piperonyl butoxide in *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in vitro: Potential for drug-synergism through inhibition of nematode oxidative detoxification pathways. *Veterinary Parasitology*. 136: 275-282.
- LARDNER, R.; IVANTSOFF, W.L.; CROWLEY, E.L.M. 1993. Recolonization by fishes of a rocky intertidal pool following repeated defaunation. *Australian Zool*. 29(2): 85-92.

- LAPA, A.J.; TEIXEIRA, J.R.; SOUCAR, C.; VALLE, J.R. 1978. The pharmacology of timbós, toxic plants used to fish. Sessão Integrada - Plantas ictiotóxicas (timbós). *Ciência e Cultura*. São Paulo. 26(7): 49-51.
- LAYTON, M.B.; BOETHEL, D.J. 1987. Reduction in N<sub>2</sub> fixation by soybean in response to insect-induced defoliation. *Journal of Economic Entomology*. Lanham. 80(2): 1319-1324.
- LI, M.Y.; ZHANG, J.; FENG, G.; SATYANANDAMURTY, T.; WU, J. 2011. Khayasin and 2'-S-methylbutanoylproceranolide: Promising candidate insecticides for the control of the coconut leaf beetle, *Brontispa longissima*. *J. Pestic. Sci.*, 36(1): 22–26.
- LINK, D.; COSTA, E.C. 1978. Danos causados por besouros crisomelídeos em soja. *Rev. Cent. Ciênc. Rur.* 8: 245-250.
- LIMA, R.R. 1947. Os timbós da Amazônia brasileira. *Bol. Min. Agric.* 36: 14-29.
- LIMA, R.R. 1987. Informações sobre duas espécies de timbó: *Derris urucu* (Killip *et al* Smith) Macbride e *Derris nicou* (Killip et Smith) Macbride, como plantas inseticidas. Belém: EMBRAPA-CPATU. 23 pp. (Documentos, 42).
- LIMA, R.R.; COSTA, J.P.C. 1991. *Registro de introdução de plantas de culturas pré-colombiana coletadas na Amazônia brasileira*. Belém: EMBRAPA-CPATU. 210 pp. (Documentos, 58).
- LIMA, R.R.; COSTA, J. P. C. da. 1998. *Coleta de plantas de cultura pré-colombiana na Amazônia brasileira*. Belém: EMBRAPA-CPATU. 102pp. (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 107).
- LIMA, F.W.N.; OHASHI, O.S.; SOUZA, F.R.S.; GOMES, F.S. 2006. Evaluation of a maize collection to *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) resistance in laboratory. *Acta Amazonica*. 36(2): 147-150.
- LIMA, J.F.M.; GRÜTZMACHER, A.D.; CUNHA, U.S.; PORTO, M.P.; MARTINS, JOSÉ F.S.; DALMAZO, G.O. 2008. Ação de inseticidas naturais no controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho cultivado em agroecossistema de várzea. *Ciência Rural*. 3(38): 607-613.
- LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G. MORAES, J.C.; MELO, B.A. RODRIGUES, V.G.; GUIMARÃES, P.L. 2009. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper*

- hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Amazonica*. 39(2): 377-382.
- LIMA, M.P.L.; OLIVEIRA, J.V.; GONDIM JUNIOR, M.G.C.; MARQUES, E.J.; CORREIA, A.A. 2010. Bioactivity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss, 1797) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* formulations in larvae of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciênc. agrotec.* Lavras. 34(6): 1381-1389.
- LIZARAZO, K.H.; MENDOZA, C.F.; CARRERO, R.S. 2008. Effect of plant extracts of *Polygonum hydropiperoides*, *Solanum nigrum* and *Calliandra pittieri* in *Spodoptera frugiperda*. *Agronomía Colombiana*. 26(3): 427-434.
- LÔBO, L.T.; SILVA, G.A.; FERREIRA, M.; SILVA, M.N.; SANTOS, A.S.; ARRUDA, A.C.; GUILHON, G.M.S. P.; SANTOS, L.S.; BORGES, R.S.; ARRUDA, MARA, S.P. 2009. Dihydrofavonols from the leaves of *Derris urucu* (Leguminosae): Structural Elucidation and DPPH Radical-Scavenging Activity. *J. Braz. Chem. Soc.* 20(6): 1082-1088.
- LÔBO, L.T.; SILVA, G.A.; FREITAS, M.C.C.; SOUZA FILHO, A.P.S.; SILVA, M.N.; ARRUDA, A.C.; GUILHON, G.M.S.P.; SANTOS, L.S.; SANTOS, A.S.; ARRUDA, M.S.P. 2010. Stilbenes from *Deguelia rufescens* var. *urucu* (Ducke) A.M.G. Azevedo leaves: effects on seed germination and plant growth. *J. Braz. Chem. Soc.* [online]. 2010. 10: 1838-1844.
- LORDELLO, A.L.L.; LARA, F.M.; PARRA, J.R.P. 1980. Preferência para alimentação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera – Noctuidae) em sorgo, em condições de laboratório. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 2(9): 219-241.
- LUCCHINI, F. 1977. *Biologia de Spodoptera frugiperda* (Smith e Abbot, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Níveis de prejuízos e avaliação toxicológica de inseticidas para o seu combate em milho*. 114pp. Master's Thesis, Universidade Federal do Paraná.
- LUCIO, J.A.R.; GOIZ, J.M.J.; MOYA, E.G.; ANDRÉS, M.D.F.; HERNÁNDEZ, C.R.; BÁRCENAS, E.A. 2011. Oleorresina de jícama y calidad de semilla de frijol infestada con *Acanthoscelides obtectus* Say. *Agron. Mesoam*. 22(1): 109-116.
- LUITGARDS-MOURA, J.F.; BERMUDEZ, E.G.C.; ROCHA, A.F.I.; TSOURIS, P.; ROSA-FREITAS, M.G. 2002. Preliminary Assays Indicate that *Antonia ovata* (Loganiaceae) and *Derris amazonica* (Papilionaceae), Ichthyotoxic Plants Used for Fishing in Roraima, Brazil, Have an Insecticide Effect on *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, RJ. 97(5): 737-742.

- MAGALHÃES, A.F.; TOZZI, A.M.G.A.; MAGALHÃES, E.G.; MORAES, V.R.S. 2003. New spectral data of some flavonoids from *Deguelia hatschbachii* A.M.G. Azevedo. *J. Braz. Chem. Soc.* 14(1): 133-137.
- MAINI, P.N.; MORALLO, R.B. 1993. Molluscicidal activity of *Derris elliptica* (Farm. Leguminosae). *Philipp. J. Sci.* 122(1): 61-69.
- MAPA, 2010. Culturas. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas>. Acesso em: 27 de maio de 2012.
- MAPA, 2012. Agrofit. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 27 de maio de 2012.
- MARINOS, C.; CASTRO, J.; NONGRADOS, D. 2004. Biocidal effect del barbasco *Lonchocarpus utilis* (Smith, 1930) as regulator of mosquitoes larvae. *Revista Peruana de Biologia.* 11(1): 87-94.
- MARICONI, F.A. 1963. *Inseticidas e seu emprego no combate às pragas*. 2ª ed. Agron. Ceres Ltda.: São Paulo. 119pp.
- MARICONI, F.A.M. 1981. *Inseticidas e seu Emprego no Combate às Pragas*, 5ª ed., Nobel, São Paulo. 87pp.
- MARONEZE, D.M.; GALLEGOS, D.M.N. 2009. Effect of *Melia azedarach* aqueous extract on the development of immature and reproductive stages of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciências Agrárias*. Londrina. 30(3): 537-550.
- MARTINEZ, S.S.; EMDEN, H.F.V. 2001. Growth Disruption, Abnormalities and Mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) Caused by Azadirachtin. *Neotropical Entomology.* 30(1): 113-125.
- MARTINEZ, S.S. 2002. O nim: *Azadirachta indica* - natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná. 142p.
- MASCARO, U.C.P.; RODRIGUES, L.A.; BASTOS, J.K.; SANTOS, E.; COSTA, J.P.C. 1998. Valores de DL<sub>50</sub> em peixes e no rato tratados com pó de raízes de *Derris* sp. e suas implicações ecotoxicológicas. *Pesq. Vet. Bras.* 18(2): 53-56.
- MATOS, F.J.A. 1998. Introdução a fitoquímica experimental. Fortaleza: Edições UFC, 126p.

- MATOS, A.P.; NEBO, L.; CALEGARI, E.R.; PEREIRA, L.G.B.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F. G.F.; PEREIRA FILHO, F.; 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*. 7(1): 1-7.
- MELO, A.B.; OLIVEIRA, S.R.; LEITE, D.T.; BARRETO, C.F.; SILVA, H.S. 2011. Inseticidas botânicos no controle de pragas de produtos armazenados. *Revista Verde*. 6(4): 1-10.
- MENDES, L.O.T. 1960. Seleção e melhoramento do timbó: II - Estudo de uma população de 153 plantas de timbó macaquinho - *Derris nicou* (Benth.) Timbó improvement: II - Study of a population of 153 plants of timbó macaquinho (*Derris nicou*). *Bragantia* [online]. 19: 273-305.
- MIKOLAJCZAK, K.L.; REED, D.K. 1987. Extractives of seeds of the Meliaceae: Effects on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), *Acalymma vittatum* (F.), and *Artemia salina* Leach. *J. Chem. Ecol.* 13: 99-111.
- 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(1): 83-89.
- MORDUE, A.J.; SIMMONDS, M.S.J.; LEY, S.V.; BLANEY, W.M.; MORDUE, W.; NASIRUDDIN, M.; NISBET, A.J. 1998. Actions of azadirachtin, a plant allelochemical, against insects. *Pesticide Science*. Oxford. 54: 277-284.
- MOREIRA, M.D.; PICANÇO, M.C.; SILVA, E.M.; MORENO, S.C.; MARTINS, J.C. 2005. Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas. In: VENSON, M.; P AULA JÚNIOR, T.S.; P ALLINI, A. (Eds.). *Controle alternativo de pragas e doenças*. Viçosa: EPAMIG/CTZM. p. 89-120.
- MORS, W. 1978. Plantas ictiotóxicas: aspectos químicos. *Ciênc. Cult.* 32: 42.
- MURUA, M.G.; Virla, E.G. 2004. Presencia invernal de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en el área maicera de la Provincia de Tucumán, Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía* 2(105): 46-52.
- NALI, L.R.; 2004; BARBOSA, F.R.; CARVALHO, C.A.L.; SANTOS, J.B.C. 2004. Eficiência de inseticidas naturais e tiametoxam no controle de tripes em videira e seletividade para inimigos naturais. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*. 14: 103-108.

- NAVA, D.E.; HADDAD, M.L.; PARRA, J.R.P. 2003. Danos causados por diferentes densidades de larvas de *Cerotoma arcuatus* em plantas de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília. 10(38): 25-39.
- NAWNOT, J.; HARMATHA, J.; BLOSZY, E. 1987. Secondary plant metabolites with antifeeding activity and their effects on some stored product insects. *In: Internacional Working Conference on Stored – Product Protecion*. Donahaye 4. p. 591-597.
- OLIVEIRA, J.V.; VENDRAMIM, J.D. 1999. Repelência de óleos essenciais e pós vegetais sobre adultos de *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae) em sementes de feijoeiro. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 28: 549-555.
- OLIVEIRA, M.S.S.; ROEL, A.R.; ARRUDA, E.J.; MARQUES, A.S. 2007. Efficiency of extracts of plantas in control of fall armyworm in corn *Spodoptera frugiperda* (J.E.SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciênc. agrotec*. Lavras. 31(2):326-331.
- PARRA, J.R.P.; HADDAD, M.L. 1989. *Determinação do número de instares de insetos*. Piracicaba: Fealg. 49pp.
- PAVELA, R.; VRCHOTOVÁ, N.; SERÁ, B. 2008. Growth inhibitory effect of extracts from *Reynoutria sp.* plants against *Spodoptera littoralis* larvae. *Agrociencia*. 42(5): 573-584.
- POGUE, G.M. 2002. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). *Memoirs of the American Entomological Society*. 43:1-202.
- PEDIGO, L.P. 1989. *Entomology and pest management*. New York. MacMillan. 646pp.
- PELOSO, D.M.J.; MELO, L.C. 2005. *Potencial de rendimento da cultura do feijoeiro-comum*. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. 131p.
- PENA, M.R. 2012. Bioatividade de extratos aquosos e orgânicos de diferentes plantas inseticidas sobre a mosca-negra-dos-citros, *Aleurocanthus woglumi* Ashby 1915 (Hemiptera: Aleyrodidae). Doctor's Thesis, Universidade Federal do Amazonas/Pós-Graduação em Agronomia Tropical, Manaus, Amazonas. 188p.
- PEREIRA, J.R.; FAMADAS, K.M. 2004. Avaliação "in vitro" da eficiência do extrato da raiz do timbó (*Dahlstedtia pentaphylla*) (leguminosae, papilionoidae, millettiedae) sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) na região do vale do Paraíba, São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo. 71(4): 443-450.

- PÉREZ, G.; PADRON, R.; SOTO, R.; BERTSCH, F. 1998. Efecto de três plaguicidas naturais derivados del nim sobre el combate de plagas en col y maiz en el campo y en *Vigna unguiculata* em almacenamiento. *Agronomia-Costarricense*. 2(21): 259-266.
- PHILOGENE, C.; REGNAULT, R.; VINCENT, C. 2004. Productos fitosanitarios insecticidas de origen vegetal: promesas de ayer y de hoy. In: REGNAULT-ROGER, C., B.J.R.; PHILOGENE Y.; VINCENT, C. (eds.). *Biopesticidas de origen vegetal*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 337 p.
- PINTO, A.N. 1937. Os timbós e suas aplicações e possibilidades. *Chimica e Indústria*. 247 p.
- PINTO, G.P. 1953. Estudo sobre a composição química de das raízes de *Derris urucu* Killip e Smith. *Anais da Associação Brasileira de Química*. 4(12): 173-179.
- PIRES, J.M. 1978. Plantas ictiotóxicas – aspectos botânicos. *Ciênc. Cult.* 32: 37-41.
- PLETSCH, M.; SANT'ANA, A.E.G. 1995. Secoundary compound accumulation in plants-The application of plant biotechnology to plant improvement. *Chemistry of Amazon*. 5:51-64.
- PRAÇA, L.B.; SILVA NETO, S.P.; MONNERAT, R.G. 2006. *Spodoptera frugiperda* J.Smith 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) Biologia, amostragem e métodos de controle. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 22p. (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 0102-0110; 199).
- PRATES, H.T.; VIANA, P.A.; WAQUIL, J.M. 2003. Atividade de extrato aquoso de folha de nin (*Azadirachta indica*) sobre *Spodoptera frugiperda*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 3(38): 437-439.
- QUINTELA, E.D.; NEVES, B.P.; QUINDERÉ, M.A.W.; ROBERTS, D.W. 1991. *Principais pragas do caupi no Brasil*. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP. 51pp. (EMBRAPA-CNPAP. Documentos, 35).
- RAFFA, K.F.; PRIESTER, T.M. 1985. Synergists as research tools and control agents in agriculture. *Journal of Agricultural Entomology*. 2: 27-45.
- RAJNAUTH, G.L.; PEGUS, J.E.; HAQUE, S.Q. 1987. Laboratory rearing of *Cerotoma arcuata* (Oliv.), a beetle vector of cowpea severe mosaic virus. *Trop. Agric.* 64: 191-192.
- RATTANAPAN, A. 2009. Effects of rotenone from *Derris* crude extract on esterase enzyme mechanism in the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hubner). *Commun Agric Appl Biol Sci*. 74(2): 437-44.

- REYNOLDS, J.E.F. 1989. Martindale The Extra Pharmacopoeia. *Pharmaceutical Press*. London. 29: 1896.
- RILEY, D.G.; HOUSE, G.J.; DUYN, J.W. 1987. Effects of phorate on soil arthropods and soybean productivity in a North Carolina coastal plain cropping system. *Journal of Economic Science*. London. (4): 317-323.
- RODRÍGUEZ, H.C. 1995. Efeito de extratos aquosos de Meliaceae no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Piracicaba. 100p. Tese (Doutorado em Entomologia)-ESALQ/USP.
- RODRÍGUEZ, H.C.; VENDRAMIM, J.D. 1996. Toxicidad the extractos acuosos de Meliaceae en *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* (J.E. Smith). *Revista da Agricultura*, Piracicaba, 72: 305-318.
- 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*, Piracicaba, 56: 581-586.
- ROEL, A.R.; VENDRAMIM, J.D.; FRIGHETTO, R.T.S. FRIGHETTO, N. 2000. Atividade Tóxica de Extratos Orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *An. Soc. Entomol. Brasil*. 29(4): 799-808.
- ROEL, A.R.; VENDRAMIM, J.D. 2006. Efeito residual do extrato de 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(4): 1049-1054.
- ROSA, R.S.; ROSA, I.L; ROCHA, L.A. 1997. Diversidade da ictiofauna de poças de maré da praia do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* [online]. 14(1): 201-212.
- SAE-YUN, A.; OVATLARNPORN, C.; ITHARAT, A.; WIWATTANAPATAPEE, R. 2006. Extraction of rotenone from *Derris elliptica* and *Derris malaccensis* by pressurized liquid extraction compared with maceration. *Journal of Chromatography*. p.172-176.
- SAITO, S. 2005. Effects of Pyridalyl on ATP Concentrations in Cultured Sf9 Cells. *J. Pestic. Sci.* 30(4): 403-405.

- SAITO, M.L., LUCHINI, F. 1998. Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente. Jaguriúna: Embrapa-CNPMA. 46pp. (EMBRAPA-CNPMA. Documentos, 12).
- SALAS, F.J.S.; BARRADAS, M.M.; PARRA, J.R.P. 1999. Tentativas de transmissão de um isolado do vírus do mosaico severo do caupi (CpSMV-SP) por artrópodos, em laboratório. *Scientia Agrícola*. Piracicaba. (56): 413-420.
- SANTIAGO, G.P.; PÁDUA, L.E.M.; SILVA, P.R.R.; CARVALHO, E.M.S.; MAIA, C.B. 2008. Effects of plant extracts on the biology of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) maintained under artificial diet. *Ciênc. agrotec.* Lavras. 32(3): 792-796.
- SARMENTO, 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. *Biosci J.* 2(18): 41-48.
- SARTORATO, A.; SEIJAS, C.A.R.; YOKOYAMA, M. 1983. *Principais doenças e pragas do feijoeiro comum no Brasil*. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP. 54p. (EMBRAPA-CNPAP. Documentos, 5).
- SÁ, V.G.M.; FONSECA, B.V.C.; BOREGAS, K.G.B.; WAQUIL, J.M. 2009. Sobrevivência e desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuide) em hospedeiros alternativos. *Neotrop Entomol.* 38: 108-115.
- SAS INSTITUTE. 2001. SAS User's Guide: Statistics 8.2. Cary, Estados Unidos. 1028 p.
- SCHROEDER, P.C.; DUYN, J.W.; PATTERSON, R.P. 1992. Nodulation, nitrogen fixation, and organ dry weight of soybean infested with southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae. *Environmental Entomology*. College Park. 5(21): 1002-1006.
- SCHUMUTTERER, H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual Review of Entomology*. Palo Alto. 35: 271-297.
- SCOTT, A.J.; KNOTT, M. 1974. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*. 30: 507-512.
- SILVA, M.T.B.; RUEDELL, J.; CAMPOS, A.E. 1983. Bioecologia e efeito de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) sobre o rendimento de milho semeado em diversas épocas. In: *Reunião técnica do milho, 28. Ata*. Porto Alegre, RS. p.227.

- SILVA, P.H.S. da. 1995. Avaliação de danos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidade) no milho cultivado com dois níveis de fertilidade. 1995. 84 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1995.
- SILVA, G.A.; LAGUNES, J.C.; RODRÍGUEZ, D. 2002. Insecticidas vegetales: Una vieja-nueva alternativa en el control de plagas. *Revista Manejo Integrado de Plagas* (CATIE) 2(3): 21-56
- SILVA, R.F.; CROCOMO, W.B. 2007. Quase letal. *Cultivar: grandes culturas*. Porto Alegre. p. 24-26.
- SILVEIRA, L.C.; VENDRAMIM, J.D.; ROSSETO, C.J. 1997. Efeito de genótipos de milho no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 2(26): 291-298.
- SINGER, T.P.; RAMSAY, R.R. 1994. The reaction site of rotenone and ubiquinone with mitochondrial NADH dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1187: 198-202.
- SOUSA, A.H.; MARACAJÁ, P.B.; SILVA, R.M.A.; MOURA, A.M.N.; ANDRADE, W.G. 2005. Bioactivity of vegetal powders against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) in caupi bean and seed physiological analysis. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. 5(2): 1-5.
- STONE, L.F.; SARTORATO, A. 1994. *O cultivo do caupi: recomendações técnicas*. Brasília: EMBRAPA-SPI. 83 pp. (EMBRAPA-CNPAP. Documentos, 48).
- TALUKDER, F.A.; HOWSE, P.E. 1995. Evaluation of *Aphanamixis polytachya* as a source of repellents, antifeedants, toxicants and protectants in storage against *Tribolium castaneum* (Herbest). *J. Stored Prod. Res.* 31: 55-61.
- TANZUBIL, P.B.; MCCAFFERY, A.R. 1990. Effects of azadirachtin and aqueous neem seed extracts on survival, growth and development of the African armyworm, *Spodoptera exempta*. *Crop Protection*. 9(5): 383-386.
- TEIXEIRA, M.L.F.; COUTINHO, A. FRANCO, A.A. 1996. Effects of *Cerotoma arcuata* (Coleoptera: Chrysomelidae) on predation of nodules and on N<sub>2</sub> fixation of *Phaseolus vulgaris*. *J. Econ. Entomol.* 89: 165-169.
- TEIXEIRA, M.L.F.; FRANCO, A. A. 2007. Infestação por larvas de *Cerotoma arcuata* (Olivier) (Coleoptera: Chrysomelidae) em nódulos de feijoeiro em cultivo com cobertura morta ou em consórcio com milho ou com caupi. *Ciência Rural*. 37(6): 19-25.

- TIRELLI, A.A.; ALVES, D.S.; CARVALHO, G.A.; SÂMIA, R.R.; BRUM, S.S.; GUERREIRO, M.C. 2010. Effect of tanical fractions on biological and nutritional parameters of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciênc. agrotec.* Lavras. 34(6): 1417-1424.
- TOKARNIA, C.H.; DOBEREINER, J.E.; PEIXOTO, P.V. 2000. Plantas tóxicas do Brasil. Rio de Janeiro. 320 pp.
- TORRECILLAS, S.M.; VENDRAMIM, J.D. 2001. Aqueous extract of *Trichilia pallida* and the development of *Spodoptera frugiperda* on corn genotypes. *Scientia Agricola.* 58(1): 27-31.
- TOZZI, A.M.G.A. 1998. A identidade do timbó-verdadeiro: *Deguelia utilis* (A.C.Sm.) A.M.G. Azevedo (Leguminosae: Papilionoideae). *Rev. Brasil. Biol.* 58(3): 511-516.
- TYLER, V.E.; BRADY, L.R.; ROBBERS, J.E. 1979. *Farmacognosia*. Buenos Aires: Editorial EI Ateneo. p. 431-434.
- VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R. 2003. QUANT: software for plant disease severity assessment. *In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY.* 8. Abstract hristchurch, New Zealand. *Australasian Plant Pathology Society.* p.105.
- VALICENTE, F.H.; COSTA, E.F. 1995. Controle da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), com o Baculovirus *Spodoptera*, aplicado via água de irrigação. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil.* 24(1): 61-67.
- VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. 1997. Fixação biológica do nitrogênio em soja. *In: Vargas, M. A. T.; Hungria, M. (Ed.). Biologia dos solos de cerrados.* Planaltina: EMBRAPA-CPAC. p. 295-360.
- VENDRAMIN, J.D. 1997. Uso de plantas inseticidas no controle de pragas. *In: ciclo de palestras sobre agricultura orgânica.* São Paulo. Palestras. Campinas: Fundação Cargill, p.64-69.
- VIEGAS JÚNIOR C.J. 2003. Terpenos com atividade inseticida: Uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quím. Nova.* São Paulo: Araraquara. 3 (26):390-400.
- VIEIRA, C. 1981. Effect of artificial defoliation on the yield of two indeterminate bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *Turrialba.* 31(4): 383-385.
- VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B. 1999. *In Farmacognosia: da Planta ao Medicamento.* SIMÕES, C. M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., UFSC e UFRGS, Florianópolis/Porto Alegre. 1ª. Ed. p. 125-241.

- VIEIRA, C.; Paula Junior, T.J.; Borém, A. 2006. *Feijão*. Viçosa, UFV. 600p.
- VILLALOBOS, M.J.P. 1996. *Plaguicidas naturales de origen vegetal: Estado actual de la investigacion*. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca Y alimentacion. Inia. 35 pp.
- WAQUIL, J.M.; VIANA, P.A.; LORDELLO, A.I.; CRUZ, I.; OLIVEIRA, A.C. 1982. Controle da lagarta-do-cartucho em milho com inseticidas químicos e biológicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2(17): 163-166.
- WAQUIL, J.M.; BOREGAS, K.G.B.; MENDES, S.M. 2008. Viabilidade do uso de hospedeiros alternativos como área de refugio para o manejo da resistência da lagarta- do- cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no cultivo do milho- Bt. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 10p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, 160).
- WARE, G.W. 1993. *The pesticide book*. Fresno: Thomson Publications. 4. ed. p. 57-62.
- WILLIAMS, W.P.; DAVIS, F.M. 1990. Response of corn to artificial infestation with fall armyworm and southwestern corn borer larvae. *Southwestern Entomologist*. Dallas. (15): 163-166.
- WU, J.H.; TUNG, Y.T.; LEE, T.H.; CHIEN, S.C.; KUO, Y.H. 2008. Triterpenoids and aromatics from *Derris laxiflora*. *J. Nat Prod*. 71: 1829-32.
- YONG, J.R.; MCMILLIAN, W.W. 1979. Differential feeding by two strains of fall armyworm larvae on carbaryl surfaces. *Journal of Economic Entomology*. 72: 202-204
- YU, S.J. 1991. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 39: 84-91.
- YU, S.J. 1992. Detection and Biochemical characterization of insecticide resistance in the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*. 3(85): 675-682.
- YU, S.J.; Nguyen, S. N.; Abo-Elghar, G. E. 2003. Biochemical characteristic of insecticide resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pesticide Biochemistry and physiology*. 77: 1-11.
- YU, S.J. 2006. Insensitivity of acetylcholinesterase in a field strain of the fall, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pesticide Biochemistry and physiology*. 84: 135-142.

YU, S.J.; MCORD, E.J. 2007. Lack of cross-resistance to indoxacarb in insecticide-resistant *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Pest Management Science*. 63: 63-67.

ZIMMERMANN, M.J. O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. 1988. *Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade*. Piracicaba-SP. Potafós. 512pp.