

EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DE SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS
SOBRE PARÂMETROS BIOLÓGICOS, NUTRICIONAIS E CELULAR DE *Spodoptera*
frugiperda (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

por

GLAUCILANE DOS SANTOS CRUZ

(Sob Orientação da Professora Valeria Wanderley Teixeira- UFRPE)

RESUMO

A pesquisa teve os seguintes objetivos: 1. Testar ação dos óleos de *Eucalyptus staigeriana* F., *Ocimum gratissimum* L. e *Foeniculum vulgare* Mill. por contato tópico, em doses subletais, nos parâmetros biológicos e reprodutivos de *Spodoptera Frugiperda* (JE Smith); 2. Determinar a composição química e atividade inseticida dos óleos de *F. vulgare*, *Ocimum basilicum* L., *E. staigeriana*, *Eucalyptus citriodora* Hook, *O. gratissimum* e dos seus compostos majoritários limoneno, trans-anethole, citronelal e linalool sobre *S. frugiperda* e; 3. Estudar os compostos limoneno, trans-anethole e limoneno+trans-anethole na nutrição, reprodução e apoptose testicular dessa praga. Os resultados demonstraram que os óleos de *E. staigeriana*, e *F. vulgare* nas DL₂₀ e DL₄₀ interferiram na biologia de *S. frugiperda*. Contudo, o óleo de *O. gratissimum* apresentou melhor resultado alterando diversos parâmetros biológicos e reprodutivos, em todas as DL's. A análise cromatográfica dos óleos demonstrou que os compostos mais comuns foram o limoneno, trans-anethole e o methyl chavicol. Todos os óleos demonstraram atividade inseticida, sendo a maior obtida com o composto trans-anethole, apresentando DL₅₀ de 0,027 mg/g de inseto, e razão de toxicidade de 1194,07, seguido dos óleos que apresentaram essa substância na sua constituição. Todos os tratamentos reduziram a quantidade de lipídeos, proteínas, açúcares totais e glicogênio quando

comparados à testemunha. Entretanto, os resultados mais expressivos foram obtidos com a associação, exceto o de glicogênio que não apresentou diferença entre os tratamentos. Todos os tratamentos reduziram a quantidade de ovos, período de oviposição e longevidade dos adultos de *S. frugiperda*, em comparação com a testemunha. Não houve alteração nos parâmetros de pré-oviposição e pós-oviposição. Os testículos das lagartas tratadas com a associação do trans-anethole+limoneno e com o limoneno isolado apresentaram apoptose. Conclui-se que todos os óleos testados e seu constituinte trans-anethole isolado ou associado ao limoneno apresentam-se promissores para o controle de *S. frugiperda*.

PALAVRAS-CHAVE: Lagarta do cartucho, óleos essenciais, compostos majoritários, biologia, apoptose, nutrição, reprodução.

EFFECT OF ESSENTIAL OILS AND THEIR MAJOR COMPOUNDS ON BIOLOGICAL
PARAMETERS, NUTRITIONAL AND CELLULAR OF *Spodoptera frugiperda*

(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

by

GLAUCILANE DOS SANTOS CRUZ

(Under the direction of Professor Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE)

ABSTRACT

The study had the following objectives: 1. To test the oil action of *Eucalyptus staigeriana* F., *Ocimum gratissimum* L. and *Foeniculum vulgare* Mill. by contact topic at sublethal doses on biological and reproductive parameters of *Spodoptera Frugiperda* (J.E. Smith); 2. To determine the chemical composition and insecticidal activity of the oils of *F. vulgare*, *O. basilicum* L., *E. staigeriana*, *Eucalyptus citriodora* Hook, *O. gratissimum* and their major compounds limonene, trans-anethole, citronellal and linalool on mortality of *S. frugiperda* and 3. To evaluate the effects of compounds limonene, trans-anethole and limonene+trans-anethole on nutrition, reproduction and testicular apoptosis of this pest. The results showed that the oils of *E.staigeriana* and *F.vulgare* at LD₂₀ and LD₄₀ interfered on the biology of *S. frugiperda*. However, *O. gratissimum* presented a better result, changing many biological and reproductive parameters in all LD. Chromatographic analysis of the oils showed that the most commonly found were limonene, trans-anethole and methyl chavicol. All oils showed an insecticidal activity, but the highest activity was obtained from trans-anethole with an LD₅₀ of 0.027 mg/g insect, obtaining a toxicity ratio of 1194.07, followed of the oils that presented the substance in the constitution. All treatments reduced the amount of lipids, protein, total sugars and glycogen when compared to the control. However, the most

significant result was obtained with the association, except that glycogen did not differ between treatments. All treatments reduced the egg number, oviposition period and adult longevity, when compared to the control. There was no change in the pre-oviposition and post-oviposition parameters. The testicles of the treated larvae with the combination of trans-anethole + limonene and isolated limonene showed apoptosis. It was concluded all oils tested and composed of trans-anethole isolated or associated with limonene present promising results in the control of this important pest.

KEY WORDS: Fall armyworm, essential oils, major compounds, biology, apoptosis, nutrition, reproduction.

EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DE SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS SOBRE
PARÂMENTROS BIOLÓGICOS, NUTRICIONAIS E CELULAR DE *Spodoptera*
frugiperda (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

por

GLAUCILANE DOS SANTOS CRUZ

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Entomologia Agrícola.

RECIFE - PE

Fevereiro – 2016

EFEITO DOS ÒLEOS ESSENCIAIS E DE SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS SOBRE

PARÂMENTROS BIOLÓGICOS, NUTRICIONAIS E CELULAR DE *Spodoptera*

frugiperda (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

por

GLAUCILANE DOS SANTOS CRUZ

Comitê de Orientação:

Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

Jose Vargas de Oliveira - UFRPE

EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DE SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS SOBRE
PARÂMENTROS BIOLÓGICOS, NUTRICIONAIS E CELULAR DE *Spodoptera*
frugiperda (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

por

GLAUCILANE DOS SANTOS CRUZ

Orientador:

Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Examinadores:

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

José Vargas de Oliveira - UFRPE

Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro – UFPE

Franklin Magliano Cunha – PNPd/CAPES

Dedico ao meu Senhor Jesus, pelo seu infinito amor e cuidado para comigo. Aos meus pais Antônia de Pádua dos Santos e Jair Faria Cruz (in memorian) e ao meu filho Vinicius Santos por me ensinarem o que é família.

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Amado Deus e Pai, que pagou com preço de sangue a minha vida. E tem dia após dia me ensinado a viver acima das circunstâncias. Vivo por fé e por crer que Ele é quem me capacita, hoje estou aqui de pé, pois aquele que prometeu é fiel para cumprir (Hb 10:23) e o que começou a boa obra não terminará até que se cumpra (Fp 1:6), antes cumprirá com toda a palavra que sai da sua boca (Is 55:11). Sendo assim minha vida é o cumprimento das Suas promessas. Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele a glória, o poder e o domínio para sempre (Rm 11:36).

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola (PPGEA), pela oportunidade de execução deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa, que me possibilitou realizar a pesquisa.

A minha Orientadora Valeria Wanderley Teixeira, por acreditar em meu potencial. Por juntas estabelecermos uma relação que vai além do profissional. Palavras não descrevem a gratidão que tenho em meu coração. Quando lembro dos piores e melhores momentos da minha caminhada sempre vejo você ao meu lado. Porque partilhamos não apenas uma orientação, mais uma história de vida. Volto a dizer que quero ser metade da profissional que és, se assim acontecer, já estarei plenamente satisfeita.

Ao meu co-orientador Álvaro Aguiar Coelho Teixeira pela dedicação, paciência e muitas risadas que damos nas diversas situações, pelos longos processos de submissão de artigos e que sempre com tranquilidade esteve ao meu lado. Por junto à professora Valeria estabelecer um vínculo que transcende a vida acadêmica.

Ao meu co-orientador José Vargas de Oliveira por ter proporcionado todas as condições necessárias à elaboração da minha pesquisa, e não apenas por isso, mais por ser um exemplo de profissional. Dedicado, amigo, contador de piadas. No laboratório de Entomologia Agrícola, vivi momentos que foram de fundamental importância para minha vida. O ambiente familiar proporcionado por todos promoveu uma união que fará falta eternamente.

A todos os professores do PPGEA que contribuíram de forma significativa para minha vida acadêmica.

A Mariana Breda, Douglas Rafael e Kamila Dutra pela parceria contínua nos artigos. Cada conquista realizada em parceria é mais prazerosa. Contar com a ajuda de vocês possibilitou concretizar mais essa etapa. A Franklin Magliano da Cunha por me ajudar nos experimentos de nutrição.

A Carolina Arruda Guedes, Liliane Marques e Aline Fonseca por serem não apenas amigas, mais irmãs, e que posso contar em todos os momentos. O apoio e ombro amigo de vocês são preciosos demais para mim. Ao Sérgio Monteze pela amizade e carinho constante. Quem encontra um amigo fiel terá encontrado um tesouro (Eclesiastes 4: 14). Eu encontrei vocês.

A Andrezo Santos, Wellington Marques, Andresa Cristina, Paollo Augusto e a todos que hoje estão junto conosco no Laboratório de Patologia de Insetos. O Ambiente alegre e descontraído, proporcionado por vocês faz com que as horas passem sem maior percepção de tempo.

A todos que fazem parte do Laboratório de Histologia que sempre foram extremamente receptivos. Sinto-me amada sempre que porventura preciso deles. Em especial à Caroline Guimarães D'assunção que contribuiu de forma significativa para o desenvolvimento dessa tese.

Aos meus pais Jair Faria Cruz e Antônia de Pádua dos Santos que hoje se encontram nos braços do Pai. Contudo, o amor que nutriu nossa história é maior do que a morte. Sigo hoje sem a presença deles, contudo seus valores e ensinamentos estão mais vivos do que nunca. Terminar mais essa etapa, diante de tantos obstáculos, é a melhor forma que tenho de continuar honrando toda uma vida investida em mim.

Aos meus irmãos Isabele Pereira e André Pereira. Eles são resultado de orações. Sempre quis irmãos, e eles, mesmo que um de forma tardia chegaram a minha vida dando cor e sabor. Amo-os incondicionalmente. São verdadeiros exemplos para mim.

Ao meu príncipe Vinicius Santos. Ele é o motivo pelo qual luto, rompo barreiras e alargo fronteiras. Ele é meu amigo, parceiro, estagiário, filho, em fim, palavras jamais vão descrever a importância que ele tem para mim. Presente de Deus dado de forma sublime. Melhor parte de mim. Luta ao meu lado e em vitórias e derrotas comigo está.

A minha atual Pastora e Mãe Rev. Marcia Coelho e a Pastora Tereza Catão e Quintino Orengo (*in memoriam*), que sempre me incentivaram, dando todo suporte espiritual que foi indispensável para vencer cada obstáculo. Por me ensinarem que a maior liberdade do ser humano é depender totalmente do Senhor Jesus. E a minha família em Cristo do Semeador, eles estão sempre comigo, crescemos, lutamos, amadurecemos e aprendemos juntos. Eles estão de mãos dadas comigo. O amor de Cristo na minha vida também é provado através da presença de cada um deles. Nós somos um só corpo e Cristo é a nossa cabeça. Ele nos chamou para sermos um Nele e temos lutado para cumprir esse propósito.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
A Cultura do milho	3
Lagarta-do-cartucho, <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae).....	5
Óleos essenciais	8
Efeito dos inseticidas sobre apoptose celular	12
Efeito de inseticidas na nutrição	15
LITERATURA CITADA	16
2 EFEITOS SUBLETAIS DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE EUCALIPTO (<i>Eucalyptus staigeriana</i>), ALFAVACA BRANCA (<i>Ocimum gratissimum</i>) E ERVA DOCE (<i>Foeniculum vulgare</i>) NA BIOLOGIA E REPRODUÇÃO DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)	23
RESUMO.....	24
ABSTRACT	25
INTRODUÇÃO	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
RESULTADOS	31
DISCUSSÃO	33
AGRADECIMENTOS	37

	LITERATURA CITADA	37
3	COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE INSETICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS EM <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA).....	53
	RESUMO.....	53
	ABSTRACT	54
	INTRODUÇÃO.....	55
	MATERIAL E MÉTODOS.....	56
	RESULTADOS	59
	DISCUSSÃO	60
	AGRADECIMENTOS	64
	LITERATURA CITADA	64
4	EFEITO DO TRANS-ANETHOLE E DO LIMONENO, ASSOCIADOS OU NÃO, SOBRE COMPONENTES NUTRICIONAIS, PARÂMETROS REPRODUTIVOS E APOPTOSE TESTICULAR EM <i>Spodoptera frugiperda</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)	75
	RESUMO.....	76
	ABSTRACT	77
	INTRODUÇÃO.....	78
	MATERIAL E MÉTODOS.....	80
	RESULTADOS	84
	DISCUSSÃO	85
	AGRADECIMENTOS	90
	LITERATURA CITADA	90
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	102

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Muitas táticas de controle podem ser empregadas no manejo de insetos-praga, porém o uso de agrotóxicos é ainda o mais utilizado, por propiciar resultados mais imediatos. Inseticidas com os mais variados modos de ação são comercializados e muitas vezes utilizados de forma desordenada. Sabe-se que muitos inseticidas possuem ação neurotóxica, regulam a metamorfose, alteram a fisiologia alimentar e outros processos fisiológicos dos insetos, como na redução da capacidade reprodutiva, interferindo na sobrevivência e estabelecimento nas culturas. Outro fato já comprovado é o dano celular, provocando a apoptose. Muitas pesquisas têm sido voltadas para uma melhor compreensão desses efeitos (Lima *et al.* 2009, Benzidane *et al.* 2011, Ling & Zang *et al.* 2011, Botton *et al.* 2013).

Mesmo com uma efetividade já comprovada, a utilização desses agrotóxicos de forma desordenada pode acarretar efeitos adversos nos insetos, como a seleção de populações resistentes, devido à pressão de seleção, aumento dos custos de produção das culturas e contaminação ambiental decorrente da baixa degradabilidade dessas substâncias. Assim, métodos alternativos ao controle químico que possuam efetividade no controle dos insetos-praga vêm sendo estudados, a exemplo dos óleos essenciais. Muitas dessas substâncias têm sido consideradas eficazes no controle de insetos-pragas, sendo, inclusive, comercializadas (Santos 2014, Silva-Matos *et al.* 2014).

Pesquisas com óleos essenciais em insetos-praga, geralmente, têm sido voltadas para a ação tóxica e/ou deterrente dessas substâncias. Nos últimos anos, o perfil químico de muitos desses óleos vem sendo estudado, por apresentar uma gama de compostos que podem atuar como

inseticidas, muitas vezes, de forma sinérgica (Maragoni *et al.* 2012, Niculal *et al.* 2013, Tak *et al.* 2015).

Diversos óleos essenciais com propriedades inseticidas têm sido utilizados no manejo de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), inseto alvo do presente estudo, com resultados muito promissores (Nascimento *et al.* 2008, Correia 2008, Lima 2008, Maroneze Gallegos 2009, Viana & Prates 2009). Trata-se de um inseto polífago, extremamente voraz, atacando várias culturas, e considerado praga-chave da cultura do milho. Resultados de diversas pesquisas revelaram que muitos óleos afetam parâmetros biológicos e comportamentais dessa praga (Alves *et al.* 2013, Cruz *et al.* 2014, Trindade *et al.* 2015).

Mesmo com o aumento das pesquisas com óleos essenciais em *S. frugiperda*, poucos trabalhos respondem ao questionamento de qual, dentre as substâncias que compõem os óleos, atua precisamente como inseticida e se esta ação ocorre em associação ou de forma isolada. Visto que muitas pesquisas ainda apresentam como alvo preferencial apenas a ação tóxica e deterrente dos óleos, e que levam um organismo a morte, mesmo sendo o mais estudado, é apenas um dos alvos do controle (Harmatha & Nawrot 2002, Cestari *et al.* 2004, Lima *et al.* 2009, Pavela 2014, Tak *et al.* 2015). Efeitos subletais, como redução na aquisição e metabolização de nutrientes, alterações nas diversas fases do inseto, redução da capacidade reprodutiva, danos a nível celular e muitos outros, são importantes alvos de estudo, pois no decorrer das gerações mantêm os insetos em um nível de controle aceitável, evitando o estabelecimento de outras pragas nas culturas, reduzindo os custos de produção, trazendo benefícios ao ambiente e aos produtores. Sendo assim pesquisas que elucidem esses questionamentos trazem uma melhor compreensão dos efeitos dos óleos essenciais, possibilitando sua utilização de forma mais direcionada.

A cultura do milho

O milho é uma monocotiledônea da família Poaceae e da espécie *Zea mays* Autor. Acredita-se que seja uma planta originária das Américas, mais especificamente do México, América Central ou Sudoeste dos Estados Unidos. Sendo cultivada desde o período pré-colombiano e desconhecida pela maioria dos europeus até sua chegada à América. Seu primeiro registro é datado de 7000 A.C no vale de Tehuacán, na cidade do México. Com as grandes navegações do século XVI e o início do processo de colonização da América, a cultura do milho se expandiu para outras partes do mundo (Vilella *et al.* 2002, Lerayer 2006).

No decorrer da história, a domesticação desta cultura feita primariamente pelos povos da América Central, seguido pelos demais povos e foi evoluindo cada vez mais através da seleção visual no campo, destacando as principais características como produtividade, resistência a doenças e capacidade de adaptação. A partir daí tornou-se parte integrante da dieta dos mais variados povos, aumentando seu cultivo e cruzamento, originando as variedades hoje conhecidas. Vale ressaltar que o milho se tornou uma cultura altamente domesticada, sobrevivendo apenas, quando cultivada pelo homem, uma vez que perdeu a capacidade de sobreviver por si mesma na natureza (Paterniani *et al.* 2000, Lerayer 2006).

Atualmente apresenta-se como um dos principais cereais consumidos mundialmente que, juntamente com a soja contribui com aproximadamente 80% da produção de grãos, sendo considerada uma cultura de importância econômica e social (Duarte *et al.* 2006, Oliveira *et al.* 2006). O Brasil ocupa o 3º lugar no “ranking” mundial da produção de milho, seguido pelo México, França, Argentina e Índia, perdendo apenas para os Estados Unidos e China. Esses três principais países produtores de milho representam 65,2% da produção mundial. O Brasil destaca-se não apenas como produtor mais também como consumidor e exportador (Oda & Soares 2010).

Segundo dados da CONAB a área plantada de milho no Brasil em 2014/2015 alcançou a extensão de 15.743,7 milhões de hectares.

No Brasil, o milho é explorado na maioria das propriedades agrícolas, desde a pequena propriedade rural, onde é produzido com baixa tecnologia e como cultura de subsistência, tornando-se alimento básico para a população, até em grandes áreas, com o emprego de alta tecnologia e elevada produtividade, sendo matéria prima utilizada para a agroindústria. O seu cultivo é realizado em duas épocas: a primeira ocorre no fim de agosto na região Sul, outubro e novembro nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, e no início do ano na região Nordeste. A segunda época ou “safrinha” refere-se ao milho de sequeiro, cultivado entre fevereiro e março, na entressafra, geralmente depois da colheita da soja precoce (Yu *et al.* 2003). Esta cultura remove grandes quantidades de nitrogênio (N) e necessita de manejo adequado da adubação nitrogenada para obtenção de elevadas produtividades. Porém, mesmo em condições de clima desfavoráveis, o plantio do milho “safrinha” tem-se conduzido dentro dos sistemas de produção, sendo gradualmente adaptado, produzindo melhores rendimentos das lavouras desta época (Paterniani & Nass 2000, Duarte *et al.* 2006, Lima *et al.* 2006, Souza *et al.* 2011).

A fenologia da cultura do Milho é dividida em dois estádios: o vegetativo e o reprodutivo. O estágio vegetativo ocorre desde emergência (VE) até o pendoamento (VT). Este estágio é subdividido em V1, V2, V3, V4, VN, dependendo da quantidade de folhas na planta. Já o reprodutivo é dividido em R1 (florescimento), R2 (grãos leitosos), R3 (grãos pastosos), R4 (grãos farináceos), R5 (grãos farináceos duros) e R6 maturidade fisiológica (Carvalho *et al.* 2006).

Condições climáticas e nutritivas, tais como, temperatura, radiação solar, disponibilidade de água, adição de macro e micronutrientes, são fatores limitantes para o desenvolvimento desta cultura, e outro fator que contribui para a diminuição na produção é o ataque de pragas agrícolas. Este ataque ocasiona uma perda de aproximadamente um terço da produção durante os processos

de crescimento, colheita e estocagem (Sarmiento *et al.* 2002). Dentre os insetos que atacam a cultura do milho citam-se: a lagarta rosca, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae), lagarta da espiga, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae), gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais* (Mots.) (Coleoptera: Curculionidae) e a lagarta do cartucho, *S. frugiperda*, sendo esta considerada praga-chave (Duarte *et al.* 2006).

Lagarta do cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

A classificação deste inseto praga foi feita por Smith (1797) como pertencente ao Reino animal, Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Lepidoptera, Família Noctuidae, Gênero *Spodoptera* e Espécie *S. frugiperda*. As espécies do gênero *Spodoptera* são amplamente distribuídas no mundo e das 30 espécies descritas, metade é considerada praga de variadas culturas de importância econômica (Pogue 2002).

Esta espécie, também, também conhecida como lagarta militar, lagarta-do-cartucho, lagarta-dos-milharais, destaca-se como praga-chave (praga principal) do milho e apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde a região central dos Estados Unidos até a Argentina e em algumas ilhas da Índia (Schmidt 2002). No Brasil, foi identificada em quase todos os estados brasileiros. Ocorre durante todo o ano, causando danos nas fases de desenvolvimento vegetativo até a fase reprodutiva, tendo preferência pelo cartucho de plantas jovens. As perdas podem variar com a cultivar, local de semeadura e práticas agrônômicas (Matos Neto *et al.* 2004, Silva *et al.* 2008).

As lagartas possuem cinco instares e podem atingir um comprimento de 25 mm com duração de aproximadamente 15 a 20 dias. Atacam a cultura do milho durante todo o estágio de crescimento, ocasionando redução na produtividade superior a 30%. Nos primeiros instares alimentam-se dos tecidos verdes, começando pelas áreas mais suculentas, deixando apenas a

epiderme membranosa, provocando a injúria denominada de folha raspada. Em seguida provocam orifícios nas folhas, ocasionando um aumento na transpiração foliar e diminuição da fotossíntese. Atacam também a base da espiga ou diretamente os grãos leitosos, onde permanecem até a fase de pupa, podendo também, empupar no solo. As lagartas também podem penetrar no colmo, através do cartucho, e realizar galerias descendentes, ocasionando a injúria conhecida como “coração morto” (Cruz *et al.* 1995, Nakano *et al.* 2002).

As plantas atacadas podem ser facilmente identificadas devido à grande quantidade de fezes no local da injúria (Oliveira *et al.* 2006). Mesmo podendo atacar a planta durante todo o seu desenvolvimento, a lagarta apresenta como nicho preferencial o cartucho, apresentando neste local, uma baixa densidade populacional, devido ao seu hábito canibal. Entretanto, essa preferência alimentar varia de acordo com o hospedeiro, a exemplo da soja e do algodão, onde prefere os botões florais e maçãs em formação; folhas e vagens na fase inicial, respectivamente (Barros *et al.* 2010).

As pupas possuem um comprimento de aproximadamente 19 mm com a duração de 7 a 10 dias em média. Os adultos apresentam dimorfismo sexual: as fêmeas possuem as asas manchadas enquanto que os machos, asas acinzentadas. Os ovos são depositados, preferencialmente, na face inferior das folhas durante o período noturno. São depositados em camadas, cobertos por “escamas” e o período de incubação é de três dias. Cada fêmea pode depositar entre 100 a 200 ovos por postura. Uma única fêmea pode ovipositar de 1.500 a 2.000 ovos durante sua vida reprodutiva, que dura em média sete dias. Após a eclosão as lagartas neonatas iniciam sua alimentação, começando um novo ciclo. Esta praga possui um ciclo biológico de aproximadamente 30 dias em condições de umidade relativa, luminosidade e temperatura controladas, sendo este último o mais importante, afetando todas as fases do ciclo (Gallo *et al.* 2002, Sarmiento *et al.* 2002).

Apesar de apresentar preferência por plantas da família Poaceae, o seu hábito alimentar diversificado, provoca, também, injúrias em algumas culturas, tais como; alfafa (*Medicago sativa* L.), soja (*Glycine max* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), batata doce (*Ipomoea batatas* L.), repolho (*Brassica oleracea* V.), espinafre (*Spinacia oleracea* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), abóbora (*Cucurbita pepo* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.), capim papuã (*Brachiaria plantaginea*), capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum), grama-seda (*Cynodon dactylon* L.), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) aveia (*Avena sativa* L.) e alface (*Lactuca sativa* L.); ao todo, mais de 80 espécies de plantas distribuídas em mais de 20 famílias botânicas. Esta gama de hospedeiros possibilita uma disponibilidade contínua de alimento, sendo um dos fatores que contribuem para o estabelecimento desta praga (Lima *et al.* 2009, Sá *et al.* 2009, Barros *et al.* 2010).

O manejo integrado utilizado para manter esta praga abaixo do nível de dano econômico inclui diversas táticas: culturais (evitar plantar o milho próximo a hospedeiros alternativos, realizar plantios em sentidos contrários à direção do vento, destruição de restos culturais etc); controle biológico, com a utilização de parasitoides, dentre os quais se incluem *Apanteles marginiventris* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae), *Hexacola websteri* (Crawford) (Hymenoptera: Eucilinae), *Trichogramma koehleri* (Blanchard) (Hymenoptera: Trichogrammatidae), *Pseudokea* sp. (Macquart) (Diptera: Tachinidae) e predadores tais como, *Labidura riparia* (Pallas) (Dermaptera: Labiduridae), *Alcaeorrhynchus grandis* (Pallas) (Hemiptera: Pentatomidae), *Castrida retusa* (Lapouge) (Coleoptera: Carabidae) entre outros (Salles 1955, Sarmiento *et al.* 2002).

O controle químico é realizado através de inseticidas sintéticos como Cipermetrina 200 CE, Ciflutrina, Esfenvalerato 250 CE, Fenvalerato 200 CE, Fenitrotiom 500 CE Malathion metil 600 CE, Lambdacialotrina 50 CE, Permetrina 384 CE e Triclorfon 500 CE, sendo utilizado como

tática preferencial no controle desta praga. Em razão de diversos fatores, como: persistência e toxicidade no meio ambiente, alto custo de produção das culturas chegando a 15% do custo operacional efetivo, populações resistentes, entre outros, tem se verificado uma crescente procura por medidas de controle que promovam controle efetivo da praga e que ocasionem menor impacto ao meio ambiente, dentre as quais incluem o estudo e utilização de óleos essenciais (Sarmiento *et al.* 2002, Lima *et al.* 2008, Lima *et al.* 2009).

Óleos essenciais

A busca por compostos bioativos oriundos de plantas vem crescendo nos últimos anos. A literatura relata nos últimos 25 anos à descrição de centenas de metabólitos secundários de plantas provenientes de espécies pertencentes às mais diversas famílias botânicas (Regnault-Roger *et al.* 2012). Esses metabólitos secundários dão origem a uma série de substâncias conhecidas como alcalóides, flavonoides, cumarinas, saponinas, taninos, entre outros. Com isso, as plantas têm sido uma importante fonte de compostos secundários, conhecidas como óleos essenciais, com diferentes estruturas químicas e com diversas atividades contra insetos (Carvalho 2004).

Atualmente, os óleos essenciais obtidos de plantas, são vistos como um modelo para a síntese de agrotóxicos mais eficientes, menos tóxicos e menos persistentes no meio ambiente bem como um auxílio na compreensão da complexa interação entre os seres vivos no ecossistema, fato este que torna de fundamental importância o estudo mais apurado da atividade inseticida desses óleos (Duke *et al.* 2000, Isman 2000, Lima *et al.* 2003).

O Brasil ocupa uma posição de destaque no que se refere à biodiversidade de plantas, com mais de 55.000 espécies catalogadas, de um total de 350.000 a 550.000, e isso tem sido um incentivo à pesquisa de novas técnicas e métodos alternativos para o controle de pragas. Através

de pesquisas, atualmente, são conhecidos cerca de 3.000 óleos essenciais, dos quais, 300 são comercialmente importantes (Bakkali *et al.* 2008).

A composição química dos óleos essenciais é determinada basicamente por dois fatores: o método de extração e a biossíntese das moléculas constituintes das plantas. Esses óleos são misturas complexas, que podem conter 100 ou mais compostos orgânicos. Seus constituintes podem pertencer às mais diversas classes de compostos, porém os terpenos e os fenilpropenos são as classes de compostos mais comumente encontradas. Os terpenos são compostos através da justaposição sucessiva de unidades de cinco carbonos, denominadas isopentenilpirofosfato (IPP) (Taiz & Zeiger 1998, Winkel-Shirley 2001).

O IPP é derivado do ácido mevalônico ou mevalonato e dá origem a todos os outros terpenos. Os encontrados com maior frequência nos óleos essenciais são os monoterpenos e sesquiterpenos, bem como os diterpenos, constituintes minoritários. Um exemplo de terpeno comumente encontrado é o limoneno, presente em muitas plantas e com atividade já comprovada em diversos insetos. Os monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, entre outros, que podem ocasionar alterações nas funções bioquímicas e fisiológicas dos insetos (Bouvier *et al.* 2003).

Outros compostos encontrados nos óleos essenciais são os compostos fenólicos, formados por via do ácido chiquímico e mevalônico, sendo este último menos importante. Quimicamente falando os compostos fenólicos são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Um típico exemplo de composto fenólico é o tanino que possui ação deterrente, na maioria dos casos. Outro composto encontrado são os alcaloides. Estes são compostos orgânicos cíclicos, formados por via do ácido chiquímico, que possuem pelo menos um átomo de nitrogênio no seu anel. Estes compostos atuam no sistema nervoso de diversos organismos, sendo muitas vezes utilizado como veneno e alucinógenos, a exemplo da tubocurarina, utilizada por índios na bacia amazônica (Vandar-Unlu *et al.* 2003, Mello *et al.* 2014).

Na maioria dos casos a atividade biológica e inseticida dos óleos essenciais deve-se a interação do conjunto de substâncias que os compõem. E esta composição química depende de diversos fatores ambientais, período de colheita, técnica de extração, sazonalidade, fatores genéticos entre outros, portanto devem ser levados em consideração quando se trabalha com óleos essenciais (Castro *et al.* 2006, Cruz *et al.* 2014).

A maioria dos trabalhos não informam os componentes majoritários e minoritários presentes nos óleos essenciais, deixando uma lacuna quanto à propriedade de cada composto. Para a identificação dessas substâncias, a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas é um dos métodos mais indicado. Basicamente é uma técnica para separação e análise de misturas de substâncias voláteis. Este processo permite a identificação desses compostos, bem como sua utilização de forma isolada (Okunade 2002).

Muitos óleos essenciais não possuem apenas atividade inseticida, mais também microbiana. Esta atividade deve-se principalmente a presença de terpenos, presente em grande parte dos óleos. Ainda, segundo Lima & Cardoso (2007), os terpenos não restringem sua atividade apenas contra bactérias, mais também contra fungos e protozoários, agindo possivelmente na desorganização da estrutura de sua membrana. Já Velluti *et al.* (2003) sugeriram que a atividade antimicrobiana desses óleos pode estar relacionada com as ligações de hidrogênio que estes podem realizar, caso possua em sua estrutura um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas, possivelmente interagindo com os sítios ativos das enzimas microbianas.

Uma das vantagens da utilização dos óleos essenciais no controle de pragas, quando comparado à utilização de inseticidas sintéticos é que sua obtenção advém de recursos renováveis. Sabe-se que o desenvolvimento destes compostos requer tempo e também um estudo sistematizado que preencha requisitos tais como, seletividade contra inimigos naturais, baixa toxicidade em mamíferos, biodegradabilidade e ausência de fitotoxicidade, fácil obtenção,

manipulação e aplicação, rentabilidade, além dos requisitos econômicos para que sua produção em alta escala seja viável (Vieira *et al.* 2004).

Vale a ressalva que a toxicidade dos óleos essenciais em insetos não está necessariamente associada à sua morte, pois outros fatores podem estar relacionados, como a repelência, deterrência e antibiose. Esta diversidade de atuação deve à gama de substâncias químicas encontradas em sua composição. A administração dessas substâncias pode ser feita por fumigação, como ocorre em muitos insetos de grãos armazenados, por ingestão e absorção pelo tegumento, a exemplo de lepidópteros, coleópteros entre outros insetos-praga (Lima & Cardoso 2007, Colpo *et al.* 2014, Mello *et al.* 2014).

Diversos estudos têm evidenciado o efeito de alguns óleos essenciais sobre parâmetros biológicos e comportamentais de *S. frugiperda*, demonstrando o potencial dessas substâncias no controle da praga. A identificação dos compostos presentes nos óleos essenciais é feita através do uso de cromatografia acoplada a um espectrofotometro de massa (Nascimento *et al.* 2008, Correia 2008, Lima *et al.* 2008, Maroneze & Gallegos 2009, Cruz *et al.* 2014). Castro *et al.* (2006) estudaram a não preferencia de *S. frugiperda* pelo óleo de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L., conhecida como mil-folhas e tomilho, respectivamente, demonstrando a preferência, no teste com chance de escolha, pelo óleo de mil-folhas. Essa preferência é atribuída ao composto majoritário germacreno-D. Lima *et al.* (2009) estudaram a ação inseticida do óleo de pimenta longa em lagartas de 1º e 3º instar de *S. frugiperda* por contato tópico e ingestão. Os autores atribuíram a ação do óleo ao safrol, seu majoritário.

A atuação dessas substâncias não está restrita apenas aos parâmetros biológicos e comportamentais, aspectos imunológicos celulares também norteiam esta interação entre insetos e óleos essenciais. Podendo, inclusive, afetar parâmetros nutricionais, seja por deterrência ou pela ação direta desses compostos, ocasionando, conseqüentemente, alterações na quantidade de

lipídeos, proteínas, carboidratos e açúcares, e redução no desempenho metabólico. Muitos compostos com ação inseticida ocasionam alterações nos níveis enzimáticos, bioquímicos e histológicos desses organismos (Lill & Marquis 2001, Buyukguzel & Kalender 2009, Ferreira 2010, Aslanturk *et al.* 2011, Gregorc *et al.* 2011). Entretanto há uma escassez de trabalhos que foquem possíveis alterações nesses níveis ocasionadas pela ação dos óleos essenciais.

Efeito dos inseticidas sobre apoptose celular

Os insetos são frequentemente expostos a uma gama de produtos químicos. Em muitos casos, estes produtos são inseticidas que compreendem um conjunto de compostos destinados a repelir ou matar insetos e outros organismos considerados pragas, contudo, esta ação não está restrita apenas a morte ou repelência. Efeitos subletais diversos ocorrem pela ação desses produtos, incluindo, a apoptose celular (Turens 2003).

A apoptose é um tipo de morte celular geneticamente programada e muito conservada nos organismos multicelulares, na qual células desnecessárias, danificadas ou potencialmente perigosas são eliminadas durante o desenvolvimento e homeostase tecidual ou sob alguma condição atípica do organismo, como doenças (Ashe & Berry 2003). Em insetos, a apoptose está relacionada com a reorganização tecidual que ocorre durante a metamorfose ou com a involução natural de algum órgão na fase adulta (Gregorc *et al.* 2004). Sendo associada também à agentes estressores ambientais, como os inseticidas (Malaspina & Silva-Zacarin 2006, Buyukguzel & Kalender 2009, James & Xu 2012).

Diferentemente da necrose, a apoptose celular pode ser definida como a morte programada da célula. Sintomas como encolhimento celular, marginalização da cromatina, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos são etapas desse processo, que pode ser induzido por fatores genéticos e não genéticos. A apoptose celular pode ocorrer em duas vias: intrínseca

(mitocondrial) ou via extrínseca (citoplasmática). Esses processos são mediados por proteínas pro-apoptóticas, antiapoptóticas, e pelas caspases (Lockshin & Zakeri 2001).

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana, que é capaz de ativar a cascata das caspases. Na via intrínseca os sinais que são transduzidos convergem principalmente para a mitocôndria. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes (Arends & Wyllie 1991).

Quando os sinais de morte alcançam a mitocôndria, levam ao colapso do potencial da membrana mitocondrial interna, bem como a uma transição da permeabilidade mitocondrial. Os diferentes sinais indutores de apoptose são detectados pela mitocôndria, fazendo com que ocorra um desacoplamento da cadeia respiratória e consequente liberação de citocromo *c* e proteínas ativadoras da apoptose para o citosol. Quando no citosol, o citocromo *c* forma um complexo com a APAF-1 e a caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9, ativa. Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que vai ocasionar a apoptose celular (Lockshin & Zakeri 2001, Grivicich *et al.* 2007, Gregorc & Ellis 2011).

Muitas pesquisas mostram essas alterações provocadas pelos inseticidas sintéticos (Dubovskii *et al.* 2005, Buyukguzel & Kalender 2009, Aslanturk *et al.* 2011, Gregorc & Ellis 2011). Soares (2012) estudou os efeitos do inseticida imidacloprido em abelhas *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae). Este inseticida é agonista da acetilcolina e age nos receptores nicotínicos de acetilcolina dos insetos provocando, deficiência na aprendizagem e na formação de memória. Após aplicação tópica e ingestão de doses letais e subletais foi observado seus efeitos citotóxicos sobre os corpos pedunculados, o ventrículo e os túbulos de Malpighi. Dilatação dos espaços intercelulares, marcação significativa de caspase-3 e alterações celulares

como condensação da cromatina, degeneração mitocondrial, presença de corpos picnóticos, rompimento celular, foram detectados, indicando o processo de apoptose. É interessante ressaltar que essas alterações foram encontradas em órgãos ligados a metabolização e excreção indicando uma tentativa de inativação desse composto tóxico.

Estudos realizados por Stuchi (2009) observaram que *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz) (Hymenoptera: Apidae) e *Tetragonisca angustula* (Holmberg) (Hymenoptera: Apidae), tratados por ingestão com o inseticida malation, apresentaram condensação cromatínica nas células nervosas indicando apoptose. Gregorc & Ellis (2011) detectaram a partir da técnica de TUNEL, que identifica fragmentação do DNA, que as células do intestino médio de larvas de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) que tiveram a dieta contaminada com imidacloprido apresentaram cerca de 61% a mais de morte do que as do grupo controle. Resultados semelhantes foram obtidos por Gregorc *et al.* (2004), que tratou larvas de *A. mellifera* com ácido oxálico ou fórmico.

Apesar do crescente interesse pelo estudo da apoptose como resultante da utilização de inseticidas sintéticos, não existe relato de pesquisas que demonstrem esse efeito nos insetos, através da utilização de óleos essenciais. Estudos que correlacionam óleos essenciais e apoptose estão voltados para ação desses compostos em células tumorais em vertebrados, evidenciando a participação de vias apoptóticas nos efeitos tóxicos contra essas células produzidos por alguns óleos como, por exemplo, o óleo de *Cymbopogon flexuosus* (Cyperales: Poaceae) em células cancerígenas do tipo HL60, apresentando uma ação antineoplásica (Marques *et al.* 2009, Sharma *et al.* 2009).

Efeito de inseticidas sobre a nutrição

Alterações no metabolismo dos insetos é outro efeito ocasionado por inseticidas, sintéticos ou naturais. Essas alterações ocasionam efeitos adversos na fisiologia desses organismos, pela

interferência na aquisição e/ou metabolização de nutrientes como proteínas, lipídeos e carboidratos. Como consequência da redução no quantitativo nutricional, vários parâmetros biológicos são afetados. Esses parâmetros variam desde redução no peso, alterações nos tempos dos instares, até um decréscimo da capacidade reprodutiva (Jervis & Ferns 2004, Milano *et al.* 2010, Cruz *et al.* 2016).

Estudos realizados por Alves *et al.* (2013) com lagartas de 3º instar de *Spodoptera frugiperda* submetidas ao óleo de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) nas concentrações 30 e 50 mg/mL, demonstraram que a ingestão dessa substância ocasionou uma redução no quantitativo de lipídeos, proteínas e carboidratos neutros nas gônadas dos insetos, afetando, por consequência, a reprodução. Silva *et al.* (2016) submeteram esta mesma praga ao óleo de citronela (*Cymbopogon winterianus*) e resultados semelhantes foram encontrados, onde o decréscimo no quantitativo de nutrientes foi diretamente proporcional a uma redução no potencial reprodutivo. Este efeito, deve-se ao fato de que o sucesso reprodutivo está diretamente relacionado a aquisição dos nutrientes na fase imatura, principalmente em lepidópteros (Milano *et al.* 2010). Segundo Yazdani *et al.* (2013) um dos efeitos ocasionados pelos inseticidas botânicos é sua interferência em parâmetros nutricionais.

A escassez de trabalhos que elucidem a atuação dos óleos essenciais e de seus compostos majoritários na resposta celular e em diversos outros parâmetros indispensáveis à sobrevivência de insetos pragas, foi o que levou ao desenvolvimento da presente pesquisa, tendo os seguintes objetivos:

1. Selecionar óleos essenciais com ação inseticida sobre *S. frugiperda* através do estabelecimento de doses letais (DLs) por contato tópico;
2. Realizar a análise cromatográfica desses óleos, e em seguida estabelecer as doses letais, por contato tópico, dos seus compostos majoritários;

3. Estudar possíveis alterações dos óleos selecionados, em doses subletais, nos parâmetros biológicos e reprodutivos, como: idade e período larval, peso e período pupal, razão sexual, longevidade dos adultos, fecundidade e fertilidade;
4. Analisar as alterações ocasionadas pelos compostos majoritários associados ou não sobre o teor de proteína, lipídeo, açúcar total e glicogênio e seu reflexo na reprodução, longevidade dos adultos e apoptose celular.

Literatura citada

- Alves, T.J.S., G.S. Cruz, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, J.V. Oliveira, A.A. Correia, C.A.G. Câmara & F.M. Cunha. 2013.** Effects of *Piper hispidinervum* on spermatogenesis and histochemistry of ovarioles of *Spodoptera frugiperda*. *Biotech Histochem.* 11: 1-11.
- Arends, M.J. & A.H. Wyllie. 1991.** Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 32: 223–254.
- Ashe, P.C. & M.D. Berry. 2003.** Apoptotic signaling cascades. *Prog. Neurop. Biol. Psych.* 27: 199-214.
- Aslanturk, A., S. kalender, M. Uzunhisarcikli & Y. kalender. 2011.** Effects of methidathion on antioxidant enzyme activities and malondialdehyde level in midgut tissues of *Lymantria dispar* (Lepidoptera) larvae. *J. Entomol. Res. Soc.* 13: 27-38.
- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck & M. Idaomar. 2008.** Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46: 446-475.
- Barros, E.M., J.B. Torres, J.R. Ruberson & M.D. Oliveira. 2010.** Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. *Entomol. Exp. Appl.* 137: 237-245.
- Benzidane, Y., B. Lapied & S.H. Thany. 2011.** Neonicotinoid insecticides imidacloprid and clothianidin affect differently neural Kenyon cell death in the cockroach *Periplaneta americana*. *Pest. Biochem. Physiol.* 101: 191
- Botton, M., D. Bernardi, C.F.S. Efrom & C.A. Baronio. 2013.** Eficiência de inseticidas no controle de *Eurhizococcus brasiliensis* (Hemiptera: Margarodidae) na cultura da videira. *BioAssay* 8:1-5.
- Bouvier, F., O. Dogbo & B. Camara. 2003.** Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (Annatto). *Science* 300: 2089-2091.

- Buyukguzel, E. & Y. Kalender. 2009.** Exposure streptomycin alters oxidative and antioxidative response in larval midgut tissues of *Galleria mellonella*. *Pestic. Biochem.* 94: 112-118.
- Carvalho, F.T., R.F. Novais, V.H. Alvarez, N.F. Barros, R.B. Cantarutti & A.F.C. Filho. 2006.** Sistema de interpretação de análise de solo para recomendação de NPK para a cultura do milho. *Rev. Ceres* 53: 211-223.
- Carvalho, J.C.T. 2004.** Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, Tecmedd, 480p.
- Castro, D.P., M.G. Cardoso, J.C. Moraes, N.M. Santos & D.P Baliza. 2006.** Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. *Rev. Bras. Pl. Med.* 8: 27–32.
- Cestari, I.M., S.J. Sarti, C.M. Waib & A.C. Branco Jr. 2004.** Evaluation of the potential insecticide activity of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil against the head lice *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). *Neotrop. Entomol.* 33: 805-807.
- Colpo, J.F., S. M. Jahnke & T. Füller. 2014.** Potencial inseticida de óleos de origem vegetal sobre *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). *Rev. Bras. Pl. Med.* 16: 182-188.
- Correia, A.A. 2008.** Histofisiologia do canal alimentar e hemócitos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepdoptera: Noctuidae) tratadas com Nim (*Azadirachta indica* A). Dissertação de Mestrado, UFRPE, Recife, 45p.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, A.A. Correia, M.O. Breda, T.J.S. Alves, F.M. Cunha, A.A.C. Teixeira, K.A. Dutra & D.M.A.F. Navarro. 2014.** Bioactivity of *Piper hispidinervum* (Piperales: Piperaceae) and *Syzygium aromaticum* (Myrtales: Myrtaceae) oils, with or without formulated Bta on the biology and immunology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 107: 144-153.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, F.S.C. Lopes, D.R.S. Barbosa, M. O. Breda, K.A. Dutra, C.A. Guedes, D.M.A. F. Navarro & A.A.C. Teixeira. 2016.** Sublethal effects of essential oils from *Eucalyptus staigeriana* (Myrtales: Myrtaceae), *Ocimum gratissimum* (Lamiales: Laminaceae), and *Foeniculum vulgare* (Apiales: Apiaceae) on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 109: 660-666.
- Cruz, I. 1995.** A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete lagoas, Embrapa, 45p. (Circular Técnico 21).
- Duarte, J.O., J.C. Cruz, J.C. Garcia, M.J. Cardoso. 2006.** Embrapa Sistemas de Produção. Disponível em: www.embrapa.br. Acessado em 23/11/2014
- Dubovskii, I. M., O. A. Olifrenko and V. V. Glupov. 2005.** Level and activities of antioxidants in intestine of larvae *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) at peroral infestation by bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *galleriae*, *J. Evol. Biochem. Physiol.* 41: 20-25.

- Duke, S.O., F.E. Dayan & A.M. Rimando. 2000.** Natural products and herbicide discovery, p. 105-133. In A.H. Cobb. & R.C. Kirkwood (eds.), *Herbicides and their mechanisms of Action*. Sheffield, Sheffield Academic Press, 345p.
- Ferreira, R.A.C. 2010.** Análise morfológica e histoquímica do corpo gorduroso e dos túbulos de malpighi de operárias adultas de *Scaptotrigona postica* (latreille, 1807) (Hymenoptera: Apidae) tratadas com fipronil e ácido bórico. Dissertação de Mestrado, UNESP, São Paulo, 83p.
- Gallo, D., O. Nakano, S. S. Neto, R. P. L. Carvalho, G. C. Baptista, E. B. Filho, J. R. P. Parra, R. A. Zucchi, S. B. Alves, J. D. Vendramim, L. C. Marchini, J. R. S. Lopes and C. Omoto. 2002.** *Entomologia agrícola*. Piracicaba, FEALQ, 920p.
- Gregorc, A. & J.D. Ellis. 2011.** Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 99: 200-207.
- Gregorc, A., A. Pogacnik & I.D. Bowen. 2004.** Cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae treated with oxalic or formic acid. *Apidologie* 35: 453–460.
- Grivicich I., A. Regner & A. B. Rocha. 2007.** Apoptosis: programmed cell death. *Rev. Bras. Cancerol.* 53: 335-343.
- Harmatha, J. & J. Nawrot. 2002.** Insect feeding deterrent activity of lignans and related phenylpropanoids with a methylenedioxyphenyl (piperonyl) structure moiety. *Entomol. Exp. Appl.* 104:51-60.
- Hotta, M. & R. Nakata. 2010.** Carvocrol: a component of thyme oil, activates PPAR and suppresses COX-2 expression. *J. Lipid Res.* 51: 132–139.
- Hummelbrunner, L.A. & M. B. Isman. 2001.** Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the *Tobacco Cutworm, Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *J. Agric. Food Chem.* 49: 715-720.
- Isman, M. B. 2000.** Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 19: 603-608.
- James, R.R. & J. Xu. 2012.** Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *J. Invertbr. Pathol.* 109: 175-182.
- Jervis, M.A. & P.N. Ferns. 2004.** The timing of egg maturation in insects: ovigeny index and initial egg load as measures of fitness and of resource allocation. *Oikos* 107: 499-460.
- Lerayer, A. 2006.** Guia do milho – tecnologia do campo a mesa. Conselho de Informações sobre Biotecnologia, 15p.
- Lill, J. & T. Marquis. 2001.** The effects of leaf quality on herbivore performance and attack from natural enemies. *Ecology* 126: 418-428.

- Lima, F.W.N., O.S. Ohashi, F.R.S. Souza & F.S. Gomes. 2006.** Avaliação de acessos de milho para resistência a *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em laboratório. *Acta Amaz.* 36: 147-150.
- Lima, H.R. P., M.A.C. Kaplan & A.V.M. Cruz. 2003.** Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. *Flor. Amb.* 10: 71-77.
- Lima, M.P. J.V. Oliveira & E.J. Marques. 2009.** Manejo da lagarta-do-cartucho em milho com formulações de nim e *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai*. *Ciên. Rural* 39: 1227-1230.
- Lima, R.K. & M.G. Cardoso. 2007.** Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. *Rev. Fitos* 3: 14-24.
- Lima, R.K., M. G. Cardoso, J.C. Moraes, S.S. Vieira, B.A. Melo & C.C. Filgueiras. 2008.** Composition of the essential oils from the Japanese star *Illicium verum* L. and lemon grass *Cymbopogon citrates* (DC. Stapaf): evaluation of their repellent effects on *Brevicornye brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae). *BioAssay* 3: 8-10.
- Ling, S. & R. Zang. 2011.** Effect of fipronil on brain and muscle ultrastructure of *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74: 1348-1354.
- Lockshin, R.A. & Z.Zakeri. 2001.** Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 545-550.
- Malaspina, O. & E.C.M. Silva-Zacarin. 2006.** Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. *J. Morphol. Sci.* 23: 303-309.
- Marangoni, C., F.N. Moura & F.R.M. Garcia. 2012.** Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. *Quím. Nova* 36: 1391-1394.
- Maroneze, D.M. & D.M.N. Gallegos. 2009.** Efeito do extrato aquoso de *Melia azedarch* no desenvolvimento das fases imaturas e reprodutivas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciênc. Agrar.* 30: 537 – 550.
- Marques, C.A., G.G. Leitão, H.R. Bizzo, A.L. Peixoto & R.C. Vieira. 2009.** Anatomia e análise de óleo essencial das folhas de *Hennecartia omphalandra* J. Poisson (Monimiaceae). *Braz. J. Pharmacog.* 19: 95-105.
- Matos Neto, F.C., I. Cruz, J.C. Zanuncio, C.H.O. Silva & M.C. Picanço. 2004.** Parasitism by *Campoletis flavicincta* on *Spodoptera frugiperda* in corn. *Pesqu. Agropecu. Bras.* 39: 1077-1081.
- Mello, M.B., P.P. Botrel, I.R.V. Teixeira, F.C. Figueiredo, J.E.B.P. Pinto & S.K.V. Bertolucci. 2014.** Atividade inseticida do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* no controle de *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae). *Rev. Agroambiental* 6:79-86.

- Milano, P., E. Berti-Filho, J.R.P. Parra, M.L. Oda & F.L. CÔnsoli. 2010.** Efeito da alimentação da fase adulta na reprodução e longevidade de espécies de Noctuidae, Crambidae, Tortricidae e Elasmobranchidae. *Neotrop. Entomol.* 39: 172-180.
- Nakano, O., N.S. Silveira, R.P.L. Carvalho, G.C. Baptista, J.R.S. Lopes & C. Omoto. 2002.** Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* L., sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). *Entomol. Agríc.* 10: 920-925.
- Nascimento, F.J., E.T. Diniz Filho, L.X. Mesquita, A.M. Oliveira & T.F.C. Pereira. 2008.** Extractos vegetales en el control de plagas. *Rev. Verde* 3:1-5.
- Niculau, E.S., P.B. Alves, P.C.L. Nogueira, V.R.S. Moraes, A.P. Matos, A.R. Bernardo, A.C. Volante, J.B. Fernandes, M.F.G.F. Silva, A.G. Corrêa, A.F. Blank, A.C. Silva & L.P. Ribeiro. 2013.** Atividade inseticida de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Herit E *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Quim. Nova* 36: 1391-1394.
- Oda, L.M. & B.E.C. Soares. 2010.** Biotecnologia no Brasil. Aceitabilidade pública e desenvolvimento econômico. *Parc. Estrateg.* 10: 162-173.
- Okunade, A.D. 2002.** *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *Fitoterapia* 73: 1-16.
- Oliveira, M.S.S., A.R. Roel, E.J. Arruda & A.S. Marques. 2006.** Efficiency of extracts of plants in control of fall armyworm in corn *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciênc. Agrotec.* 31: 326-331.
- Paterniani, E., L. L. Nass & M. X. Santos. 2000.** O valor dos recursos genéticos do milho para o Brasil - uma abordagem histórica da utilização do germoplasma, p.11-14. In C.V. Udry & W. Duarte (Eds.). *Uma história brasileira do milho: o valor dos recursos genéticos*. Brasília, Ed. Paralelo, 41p.
- Pavela, R. 2014.** Insecticidal properties of *Pimpinella anisum* essential oils against the *Culex quinquefasciatus* and the non-target organism *Daphnia magna*. *J. Asia Pac. Entomol.* 17: 287-293.
- Pogue, G. M. 2002.** A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). *Am. Entomol. Soc.* 43: 1-202.
- Regnault-Roger, C., C. Vincent & J.T. Arnason. 2012.** Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes World. *Annu. Rev. Entomol.* 57: 405-424.
- Sá, V.G.M., B.V.C. Fonseca, K.G.B. Boregas & J.M. Waquil. 2009.** Sobrevivência e desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. *Neotrop. Entomol.* 38: 108-115.
- Santos, C.M. 2014.** Toxicidade dos agrotóxicos usados na lavoura de soja na cidade de Catalão-GO, e seus impactos no ambiente – um estudo de caso. *Novos Direitos – RAICJ* 1: 58-76.

- Sarmaneto, R.A., R.W.S. Aguiar, R.A.S.S. Aguiar, S.M.J. Vieria, H.G. Oliveira & A.M. Holtz. 2002.** Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), em milho no Brasil. Biosci. J. 18: 41-48.
- Sawicka, D., H. Car, M.H. Borawska & J. Niklinski. 2012.** The anticancer activity of propolis. Folia Histochem. Cytol. 50: 25-37.
- Schmidt, F.B. 2002.** Linha básica de suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a lufenuron na cultura do milho. Dissertação de Mestrado, ESALQ/USP, São Paulo, 63p.
- Sharma, C.S., R.K. Nema & V.K. Sharma. 2009.** Synthesis, anticonvulsant activity and insilico study of some novel amino acids incorporated bicyclo compounds. S. J. Pharm. Sci. 2: 42-47
- Silva, A.B., E.B. Beserra & J.P. Dantas. 2008.** Utilização de *Metarhizium anisopliae* e extratos vegetais para o controle de *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa zea* (Lepdoptera: Noctuidae) em milho. Eng. Ambient. 5: 77-85.
- Silva-Matos, R.R.S, P.C. Lopes, G.M.M. Souza, I.V.M. Oliveira & J.E.M. Oliveira. 2014.** Rationalization of pesticides by in integrated production in mango submedium valley of San Francisco. Biosci. J. 30: 372-379.
- Silva-Matos, R.R.S., P.R.C. Lopes, G.M.M. Souza, I.V.M. Oliveira & J.E.M. Oliveira. 2014.** Rationalization of pesticides by in integrated production in mango submedium valley of San Francisco. Biosci. J. 30:372-379.
- Soares, H.M. 2012.** Avaliação dos efeitos do inseticida Imidacloprido para abelhas sem ferrão *Scapitotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Dissertação de Mestrado, UNESP, Rio Claro, 88p.
- Stuchi, A.L.P.B. 2009.** Toxicidade e expressão gênica em abelhas do gênero *Tetragonisca* após a contaminação com agrotóxicos. 2009. 102p. Tese de Doutorado, UEM, Maringá, 120p.
- Taiz, L. & E. Zeiger. 1998.** Plant physiology. California, Publishing Co, 559 p.
- Tak, J.H., E. Jovel & M.B. Isman. 2015.** Comparative and synergistic activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil constituents against the larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). Pest. Manag. Sci. 71: 329-336.
- Trindade, R.C.P., E.S. Ferreira, I.B. Gomes, L. Silva, A.E.G. Santana, S.M.F. Broglio & M.S. Silva. 2015.** Extratos aquosos de inhame (*Dioscorea rotundata* Poirr.) e de mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.) no desenvolvimento da lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797). Rev. Bras. Pl. Med.17: 291-296.
- Turrens, J.F. 2003.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J. Physiol. 55: 335–344.

- Vardar-Ünlü, G., F. Candan, A. Sökmen, D. Daferera, M. Polissiou, M. Sökmen, E. Dönmez & B. Tepe. 2003.** Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and metanol extract of *Tymus pectinatus* Fish. et Mey. var. *pectinatus* (Lamiaceae). J. Agr. Food Chem. 51: 63-67.
- Viana, P.A. & H.T. Prates. 2009.** Desenvolvimento e mortalidade larval de *Spodoptera frugiperda* em folhas de milho tratadas com extratos aquosos de folhas de *Azadirachta indica*. Bragantia 62: 69-74.
- Vieira, P.C., J.B. Fernandes & C.C. Andrei. 2004.** Plantas inseticidas, p. 120. In C.M.O Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick (eds.), Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre, UFSC, 1102 p.
- Vilella, F.M.F., J.M. Waquil, E.F. Vilela, B.D. Siegfried & J.E. Foster. 2002.** Selection of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) for survival on Cry 1A (b) *Bt* toxin. RBMS 3: 12-17.
- Watanabe, M.A.E., M.K. Amarante, B.J. Conti & J.M. Sforcin. 2011.** Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. J. Pharm. Pharmacol. 63: 1378-1386.
- Winkel-Shirley, B. 2001.** Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. Pl. Physiol. 126: 485-493.
- Yu, S.J., S.N. Nguyen & G.E. Abo-Elghar. 2003.** Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Pest. Biochem. Physiol. 77: 1-11.

CAPÍTULO 2

EFEITOS SUBLETAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE EUCALIPTO (*Eucalyptus staigeriana*),
ALFAVACA BRANCA (*Ocimum gratissimum*) E ERVA DOCE (*Foeniculum vulgare*) NA
BIOLOGIA E REPRODUÇÃO DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE)¹

GLAUCILANE S. CRUZ², VALÉRIA W. TEIXEIRA³, JOSÉ V. OLIVEIRA¹, DANIELA M.A.F. NAVARRO⁴ E
ÁLVARO A.C. TEIXEIRA²

²Departamento de Agronomia-Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av.
Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

³Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

⁴Departamento de Química Fundamental. Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor
Morais Rego 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE.

¹Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, D.M.A.F. Navarro & A.A.C. Teixeira. Efeitos subletais dos óleos essenciais de eucalipto (*Eucalyptus staigeriana*), alfavaca branca (*Ocimum gratissimum*) e erva doce (*Foeniculum vulgare*) na biologia e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Aceito pelo Journal Economic Entomology.

RESUMO - A lagarta *Spodoptera frugiperda* é praga chave da cultura do milho e seu controle é realizado pelo uso contínuo de inseticidas, ocasionando, conseqüentemente efeitos adversos no ecossistema. Com isso, vem crescendo o estudo por métodos alternativos de menor impacto ambiental, dos quais se destacam a utilização de óleos essenciais. Esses óleos são oriundos do metabolismo secundário das plantas e têm ação inseticida comprovada em diversos insetos praga. Com isso, essa pesquisa objetivou testar a ação dos óleos essenciais de eucalipto, alfavaca branca e erva doce em *Spodoptera frugiperda*; realizar a análise cromatográfica pelo método de GC-MS; estabelecer as DL's 10, 20 e 40, por contato tópico; e avaliar as possíveis alterações dos óleos nos parâmetros biológicos e reprodutivos de lagartas tratadas com as respectivas DL's. Os resultados desmontaram que os óleos de eucalipto e erva doce nas DL₂₀ e DL₄₀ interferiram na biologia de *S. frugiperda*. Contudo, o óleo de alfavaca branca apresentou um melhor resultado por alterar diversos parâmetros biológicos e reprodutivos, em todas as DL's. Sendo assim, esses óleos apresentaram resultados promissores para o controle de *S. frugiperda*.

PALAVRAS-CHAVE: Lagarta do cartucho, inseticidas botânicos, parâmetros biológicos

SUBLETHAL EFFECTS OF *EUCALYPTUS STAIGERIANA*, *OCIMUM GRATISSIMUM* AND
FOENICULUM VULGARE ESSENTIAL OILS ON THE BIOLOGY AND REPRODUCTION
OF *Spodoptera frugiperda* (JE SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

ABSTRACT- The caterpillar *Spodoptera frugiperda* is a key pest of corn crops and its control is often achieved by continuous insecticide use, leading to adverse effects on the ecosystem. Thus, the study for alternative methods with less environmental impact has grown, among which are the use of essential oils. These oils origin from plants secondary metabolism and their insecticidal activity has been widely demonstrated in many insect pests. This way, this research aimed to verify the activity of *Eucalyptus staigeriana*, *Ocimum gratissimum* and *Foeniculum vulgare* essential oils on *S. frugiperda*; perform the oils chromatography by GC-MS method; establish the LD's 10, 20 and 40 for topic contact; and to evaluate possible changes on biological and reproductive parameters of larvae treated with the respective oils LD's. The results showed that the *E. staigeriana* and *F. vulgare* oils in LD 20 and LD40 interfered on *Spodoptera frugiperda* biology. However, the *O. gratissimum* oil presented a better result by changing many biological and reproductive parameters in all established LD's. This way, the three tested oils showed promising results in the control of *S. frugiperda*.

KEY WORDS: Fall armyworm, botanical insecticides, biological parameters

Introdução

O Brasil ocupa o 3^o lugar na produção mundial de milho, sendo cultivado na safra de 2013/2014 em uma área de aproximadamente de 15.904,6 milhões de hectares e com produção estimada de 81.344,3 toneladas de grãos (CONAB 2013). O milho é utilizado na alimentação humana e animal, constituindo também matéria prima de expressiva importância para a utilização industrial. Contudo, vários fatores podem comprometer a produtividade e rendimento da cultura, destacando-se o ataque de pragas agrícolas (Silva *et al.* 2011, Michelotto *et al.* 2013).

A lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada praga-chave desta cultura e devido ao seu hábito polífago, pode ocasionar prejuízos em diversas plantas cultivadas, principalmente em poáceas, proporcionando redução significativa no rendimento da cultura e aumentando, conseqüentemente, os custos de produção. Esse inseto é oriundo das zonas tropicais, e encontra, nas regiões produtoras de milho brasileiras, condições climáticas favoráveis ao seu estabelecimento e desenvolvimento (Sarmiento *et al.* 2002, Campos & Junior 2012).

O controle desta praga é realizado principalmente pela utilização de inseticidas sintéticos, que devido ao seu uso contínuo tem selecionado populações resistentes aos principais grupos químicos utilizados. Em algumas regiões brasileiras são utilizadas até dez aplicações de inseticidas para o seu controle (Storch *et al.* 2008, Fonseca *et al.* 2012). Outros feitos adversos devido ao uso indiscriminado destes produtos, em inimigos naturais e persistência no meio ambiente, também têm sido registrados. Assim, os óleos essenciais têm sido muito estudados, como técnicas alternativas aos inseticidas sintéticos (Nério *et al.* 2010, Niculau *et al.* 2013).

Os inseticidas botânicos têm baixa persistência, degradando-se com maior velocidade que os inseticidas sintéticos, não deixando resíduos nos alimentos ou no meio-ambiente, sendo, portanto, ecologicamente corretos (Azevedo *et al.* 2013). Outro aspecto positivo com relação ao

uso de óleos essenciais, é que esses compostos são mais facilmente registrados, quando comparados aos inseticidas sintéticos (Vieira *et al.* 2012). A atividade inseticida dos óleos deve-se, geralmente, às substâncias químicas, encontradas em maior quantidade na sua composição. Essas substâncias são conhecidas como compostos majoritários, e pertencem às classes dos terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (Ootani *et al.* 2013).

Dentre as plantas, cujos óleos possuem atividade inseticida conhecidas inclui-se o Eucalipto (*Eucalyptus staigeriana* F.), pertencente à família Myrtaceae, nativo da Austrália, utilizado principalmente pela indústria de cosméticos e farmacêutica; erva doce (*Foeniculum vulgare* Mill.) da família Apiaceae, nativa das áreas do mediterrâneo, é uma planta herbácea que se caracteriza por produzir uma quantidade significativa de óleo essencial; e a alfavaca branca (*Ocimum gratissimum* L.) da família Lamiaceae, planta de origem asiática, perene, de base lenhosa e aromática (Ribeiro *et al.* 2013, Rawson *et al.* 2013, Amoabeng *et al.* 2013).

Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi realizar a análise cromatográfica pelo método de GC-MS (GasChromatography–Mass Spectrometry) acoplado a espectrometria de massas dos óleos essenciais destas espécies mencionadas, estimar as doses letais por contato tópico e avaliar possíveis alterações nos parâmetros biológicos e reprodutivos de *S. frugiperda*, tratadas com doses subletais.

Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Entomologia Agrícola do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e no Laboratório de Ecologia Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), localizados em Recife, PE.

Criação de *Spodoptera frugiperda*. As lagartas foram obtidas da criação estoque do laboratório de Entomologia Agrícola da UFRPE, mantidas à temperatura de $25,2 \pm 1,4$ °C, umidade relativa de $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h, sendo alimentadas com folhas de milho híbrido duplo AG 1051. As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação, com duas plantas/vaso de 5L, contendo solo + húmus de minhoca na proporção de 2:1 + 12,13 g de N-P-K (formulação 4-14-8).

Obtenção dos Óleos Essenciais. O óleo de *E. staigeriana* foi obtido do Departamento de Ciência Florestal, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil. *O. gratissimum* e *F. vulgare* foram provenientes da Universidade Federal da Paraíba, Campus III, Bananeiras, PB. O material vegetal (folhas) foi triturado em um liquidificador e hidrodestilado com 3 L de água destilada, durante 3 horas, em um aparelho do tipo Clevenger. A camada de óleo essencial foi separada, seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e acondicionada em um frasco de vidro âmbar a 5 °C até ser utilizada (Santos *et al.* 2012).

Cromatografia Gasosa-Análise Espectrometria de Massa (GC-MS). As análises da composição química dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Ecologia Química da Universidade Federal de Pernambuco. Utilizou-se cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas em um sistema quadrupolo Agilent 5975C Series GC/EM (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), equipado com uma coluna apolar DB-5 (Agilent J&W; 60 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm espessura da película). A solução de 1,0 µL de concentração conhecida, contendo o óleo essencial diluído em hexano foi injetada em split 1:20, assim como a solução da mistura de padrões de hidrocarbonetos: C9-C34, sendo esta solução hexânica composta por padrões comerciais da Sigma-Aldrich®. A temperatura do GC foi ajustada em 60 °C por 3 min, sendo então aumentada em $2,5$ °C min⁻¹ até alcançar 240 °C e mantida nesta temperatura por 10 min. O fluxo de hélio foi mantido em pressão constante de 100 kPa. A interface do EM foi

definida em 200 °C e os espectros de massa registrados em 70 eV (em modo EI) com uma velocidade de escaneamento de 0,5 scan-s de m/z 20-350. A partir da obtenção dos tempos de retenção dos compostos na amostra do óleo essencial, no padrão de hidrocarboneto e na combinação do óleo essencial com a mistura deste padrão foi calculado o índice de retenção para cada componente do óleo, segundo a equação de Van den Dool & Kratz (1963). Os componentes dos óleos essenciais foram previamente identificados por similaridade dos valores dos índices de retenção e posteriormente confirmados por comparação dos respectivos espectros de massa com aqueles disponíveis na biblioteca do GC/EM: MassFinder 4, NIST08 e Wiley Registry™ 9th Edition e com os descritos por Adams (2009) e por fim, as áreas dos picos nos cromatogramas foram integradas para a obtenção do sinal iônico total e seus valores utilizados para determinar as proporções relativas respectivas a cada composto.

Teste por Contato Tópico. O teste por contato tópico foi realizado com lagartas com 10 dias de idade com peso médio de aproximadamente 78 mg (terceiro instar). Os tratamentos consistiram na diluição do óleo essencial em acetona, obtendo as concentrações 1, 2, 3, 5, 6 e 9 mg/g de inseto para o óleo de eucalipto (*Eucalyptus staigeriana*), 0,1, 0,5, 1, 2, 3 e 5 mg/g de inseto para alfavaca branca (*Ocimum gratissimum*), 2, 3, 5, 6, 9 e 12 mg/g de inseto para erva doce (*Foeniculum vulgare*) e a testemunha (acetona). Essas doses foram obtidas através de testes preliminares objetivando obter mortalidade em torno de 5% e 95% para o estabelecimento das doses definitivas. O bioensaio consistiu na aplicação 1,0 µL de cada concentração na região protorácica do inseto, empregando uma seringa Hamilton™ (50 µL). As lagartas foram individualizadas em tubos de vidro de fundo chato e alimentadas com folhas de milho cultivadas para a manutenção da criação. Foram realizadas três repetições para cada tratamento, com 10 lagartas por repetição. Avaliou-se a toxicidade aguda do óleo essencial pela contagem de lagartas mortas 48 horas após a instalação do experimento.

Bioensaios. Lagartas de *S. frugiperda* de terceiro instar foram submetidas às doses letais (DLs) 10, 20 e 40 mg/g dos óleos de eucalipto (*E. staigeriana*), alfavaca branca (*O. gratissimum*) e erva doce (*F. vulgare*). Em cada tratamento as lagartas receberam 1,0 µL da solução (óleo + acetona) e a testemunha (acetona) na região protorácica com o auxílio de uma seringa de HamiltonTM (50 µL). Para cada concentração foram utilizadas cinco repetições com 10 lagartas por repetição, contabilizando 50 lagartas por tratamento. Após a aplicação tópica as lagartas foram individualizadas em tubos de fundo chato (25 x 85 mm) e vedados com plástico filme. As lagartas foram alimentadas com folhas de milho, substituídas diariamente, até a fase de pupa. No quinto dia após a instalação do experimento as lagartas foram pesadas e as pupas 24 horas após a formação, as quais foram sexadas e mantidas em tubos de vidro até a emergência de adultos. Foram avaliados os seguintes parâmetros biológicos: peso e período larval, peso e período pupal, razão sexual e longevidade. Para avaliação dos parâmetros reprodutivos, aproximadamente 70 lagartas/tratamento foram submetidas nas mesmas condições descritas anteriormente e após a emergência dos adultos, foram formados casais, sendo dois por gaiola com cinco repetições por tratamento. Os casais foram acondicionados em gaiola de PVC com dimensões de 10 cm x 15 cm (diâmetro e altura) revestida internamente com papel contínuo, como substrato para oviposição. As mariposas foram alimentadas com solução de mel a 10% e mantidas em câmara climatizada. Todos os experimentos foram realizados nas seguintes condições: temperatura de $25,2 \pm 1,4$ °C, $67 \pm 0,7\%$ de UR e fotofase de 12 h. As posturas foram coletadas diariamente, contabilizadas e acondicionadas em placas de Petri com dimensões de 10 cm de diâmetro e mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. Por fim, foi avaliado o período de pré-oviposição, número total de ovos e pós-oviposição.

Análise Estatística. Os dados de mortalidade do bioensaio contabilizados às 48 horas após a instalação do experimento foram submetidos à análise de probit através do programa SAS PROC

PROBIT (SAS Institute. 2002) para a determinação das DL_{10} , DL_{20} e DL_{40} . Para avaliação do período larval, peso larval, período pupal, peso pupal e razão sexual os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey HSD a 5% de significância, usando o programa SAS Institute. Os dados de peso larval foram transformados em arcoseno da raiz quadrada de x dividido por 100 ($\arcsin\sqrt{x/100}$) para assumir a normalidade. Os dados de pré-oviposição, número total de ovos e pós-oviposição não assumiram normalidade, sendo submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis através do programa SAS (SAS Institute, 2002).

Através dos dados de mortalidade confirmada determinou-se a taxa média de sobrevivência, sendo os mesmos submetidos ao teste de Long-rank de Kaplan-Meyer pelo método de tratamento de pares utilizando o SAS ProcLifetest (SAS Institute. 2002).

Resultados

Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas (GC-MS). A análise cromatográfica (GC-MS) do óleo de eucalipto (*E. staigeriana*) revelou a presença de 40 compostos, dos quais o limoneno 23,73%, geranial 15,20% e o neral 12,16 apresentam-se com os principais compostos majoritários. O óleo de alfavaca branca (*O. gratissimum*) apresentou 53 compostos, sendo o (E)-anethole 34,95%, limoneno 15,63% e eugenol 9,07% os mais abundantes. Por fim, o óleo de erva doce (*F. vulgare*) apresentou 20 compostos, com uma percentagem de 41,82% de limoneno, seguido do (E)-anethole 17,91% e α -pineno com 11,13%, totalizando mais de 70% dos constituintes do óleo (Tabela 1).

Teste por Contato Tópico. A avaliação realizada em *S. frugiperda* para contabilizar a mortalidade das lagartas de terceiro ínstar demonstrou que o óleo de alfavaca branca apresentou uma maior toxicidade apresentando uma DL_{10} de 0,79 (0,59-0,95), DL_{20} 0,99 (0,79-1,14) e DL_{40}

1,34 (1,17-1,47) mg/g de inseto, seguido pelo óleo de eucalipto com uma DL₁₀ de 1,40 (0,66-1,96), DL₂₀ 1,81 (1,01-2,41) e DL₄₀ 2,62 (1,91-3,32) mg/g de inseto e o de erva doce com uma DL₁₀ de 1,95 (1,23-2,59), DL₂₀ 2,70 (1,89-3,40) e DL₄₀ 4,18 (3,29-4,99) mg/g de inseto. As razões de toxicidade para os óleos de erva doce e eucalipto, em relação ao de alfavaca branca foram, respectivamente, 2,7 e 1,12 para a DL₁₀; 2,36 e 1,33 para a DL₂₀; e 2,81 e 1,63 para a DL₄₀ (Tabela 2).

Bioensaios. Todos os óleos reduziram a sobrevivência larval de *S.frugiperda*. O óleo de alfavaca branca nas DL₂₀ e DL₄₀ apresentaram o pico de mortalidade no 7º dia diferindo da DL₁₀, cujo pico foi no 8º dia ($\chi^2 = 5,56$; GL =1, P=0,0183), seguido do controle no 13º dia. As DL₂₀ e DL₄₀ do óleo de eucalipto exibiram comportamento semelhante, apresentando o pico de mortalidade no 9º dia, seguido da DL₁₀ no 12º dia, contudo não diferiram entre si ($\chi^2 = 1,13$ GL =1, P=0,2871). O óleo de erva doce nas DL₂₀ e DL₄₀ apresentaram pico de mortalidade no 8º dia, não diferindo entre si ($\chi^2 = 3,16$, GL =1, P=0,0752) seguido pela DL₁₀ no 9º dia, que proporcionou, conseqüentemente, uma maior sobrevivência ($\chi^2 = 19,77$, df=1, P<0,0001) (Figs. 1, 2 e 3). Todos os tratamentos reduziram significativamente o peso larval, quando comparados ao controle. As lagartas tratadas com as DL₂₀ e DL₄₀ do óleo de alfavaca branca apresentaram uma redução semelhante, o mesmo ocorreu para as DL₂₀ e DL₄₀ do óleo de erva doce. No tratamento com eucalipto as DL₁₀ e DL₂₀ exibiram igual comportamento, diferindo apenas da DL₄₀ ($\chi^2 = 22,31$, P= 0,0080) (Tabela 3). Apenas as DL₁₀ e DL₄₀ do óleo de eucalipto não diferiram do controle, em relação do ao período larval. Todas as DL's do óleo de alfavaca branca ocasionaram uma redução significativa neste período. O mesmo não ocorreu para as DL's do óleo de erva doce que propiciaram um alongamento da fase larval ($\chi^2 = 25,06$, GL =9, P= 0,0029) (Tabela 3). No bioensaio para o peso pupal todos os tratamentos ocasionaram uma redução, quando comparados ao controle, exceto a DL₁₀ do óleo de eucalipto. As DL₂₀ e DL₄₀ dos óleos de alfavaca branca e eucalipto apresentaram

uma maior redução do peso pupal quando comparada aos demais tratamentos, contudo as mesmas não diferiram entre si ($\chi^2 = 15,67$, GL =9, P= 0,0740) (Tabela 3). Para o parâmetro de período pupal todos os tratamentos apresentaram um comportamento semelhante ao controle, exceto as DL₂₀ DL₄₀ do óleo de eucalipto que ocasionaram um alongamento e a DL₂₀ do óleo de erva doce que reduziu significativamente este período. A razão sexual não diferiu entre os tratamentos ($\chi^2 = 24,91$, GL =9, P= 0,0031) (Tabela 3). No bioensaio para avaliar os parâmetros reprodutivos as DL₁₀ e DL₂₀ do óleo de erva doce e as DL₄₀ dos óleos de alfavaca branca e eucalipto ocasionaram uma redução no período de pré-oviposição, e os demais tratamento não diferiram do controle (H = 31,52, P=0,0002). Todos os tratamentos causaram uma redução significativa na oviposição, contudo o óleo de alfavaca branca nas DL₂₀ e DL₄₀ e a DL₄₀ do óleo de Eucalipto apresentaram as menores médias (H= 44,29, P<0,0001) Todos os tratamentos reduziram o período de pós-oviposição exceto o óleo de eucalipto nas DL₁₀ e DL₂₀ que não diferiram do controle (H=37,24, P<0,0001) (Tabela 4). Todos os óleos testados reduziram significativamente a sobrevivência dos adultos, oriundos de lagartas tratadas, quando comparados ao controle, contudo os óleos de alfavaca branca na DL₄₀ e erva doce nas DL₂₀ e DL₄₀ apresentaram uma redução mais significativa (Tabela3).

Discussão

Os óleos essenciais são produtos resultantes do metabolismo secundário das plantas e o fator mais relevante no seu estudo é a sua constituição química, devido a grande variação, até em uma mesma planta, devido aos fatores, como constituição genética, local da coleta, idade da planta, condições climáticas do solo, entre outros. Dependendo das espécies, os óleos podem ser produzidos e armazenados em diferentes órgãos da planta, tais como flores, folhas, frutas, raízes, caules, rizomas, etc (Reganult-Roger *et al.* 2012).

Dentro do perfil químico dos óleos essenciais, existem substâncias majoritárias, encontradas em maior quantidade, e minoritárias, que somadas, representam uma pequena parcela dos compostos presentes. Dentre essas substâncias, as que apresentam atividade inseticida estão geralmente classificadas como alcalóides, compostos fenólicos e terpenos, sendo estes últimos, os mais frequentes. Compostos como (E)-anethole, eugenol, α -pineno, geranial são terpenos, que possuem atividade inseticida comprovada para diversos insetos (Soares *et al.* 2011, Marangoni *et al.* 2012, Soares *et al.* 2012, Ootani *et al.* 2013).

O limoneno é também um monoterpeneo comumente encontrado na constituição de muitos óleos essenciais. Sua atividade inseticida foi estudada por Niculau *et al.* (2013) através de bioensaios de mortalidade com lagartas de *S. frugiperda* por meio da utilização do bioinseticida Azamax[®] e seus compostos majoritários, por meio da aplicação tópica. A atividade inseticida deste produto foi atribuída ao limoneno, por obter aproximadamente 90% de mortalidade. Esses resultados corroboram com os da presente pesquisa, uma vez que, os óleos testados ocasionaram efeitos adversos em *S. frugiperda*, e apresentaram como característica química em comum a presença do limoneno entre seus compostos majoritários.

Muitos óleos essenciais não possuem sua ação restrita apenas a toxicidade, podendo atuar como inibidor alimentar, além de exercer influência no desenvolvimento de diversos organismos, como os insetos. Esta atividade biológica exercida nos insetos é atribuída a substâncias da classe dos terpenos. Dentre os monoterpeneos mais comuns encontrados na maioria dos óleos, destacam-se o linalool, limoneno, geranial, entre outros, sendo estes dois últimos presentes nos óleos de eucalipto, alfavaca branca e erva doce (Knaar & Fiusa 2010). Outros terpenos também encontrados nos óleos estudados foram (E)-anethole, eugenol, α -pineno, geranial, fato que pode justificar sua ação em *S. frugiperda*.

A ação inseticida de muitos óleos essenciais normalmente ocorre por sinergismo entre os seus compostos, aumentando assim o seu desempenho (Tak *et al.* 2015). Isto foi observado por Pavella (2014), que estudou a toxicidade de 30 compostos e suas combinações em larvas de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). Os resultados mostraram que as combinações realizadas entre estes compostos, apresentaram ação sinérgica. Estes resultados corroboram com os experimentos realizados na presente pesquisa, uma vez que os óleos que tiveram um efeito satisfatório foram os que apresentaram o limoneno e trans-anetole como os principais compostos em sua constituição, sugerindo, um efeito sinérgico.

Estudos realizados por Cruz *et al.* (2014) com os óleos essenciais de pimenta longa e cravo da Índia demonstraram a ação dessas substâncias em diversos parâmetros biológicos de *S. frugiperda*, tais como, redução da sobrevivência, alterações nos períodos e peso larvais e pupais, diminuição da longevidade, fecundidade e fertilidade. Os autores atribuíram a ação inseticida desses compostos ao safrol e eugenol, terpenos encontrados em maior quantidade na análise cromatográfica.

De acordo com Kim *et al.* (2003) existe uma importância na relação entre a estrutura química e a atividade biológica dos compostos presentes nos óleos essenciais, pois quanto maior a lipofilicidade, maior a penetração no tegumento do inseto. Outro elemento importante é a suscetibilidade do inseto alvo aos constituintes desses óleos. Esses fatores podem ter influenciado na variação da mortalidade de *S. frugiperda*, e conseqüentemente na diferença nos valores das DL's dos óleos estudados. Ainda segundo Prates & Santos (2002), a lipofilicidade confere a esses compostos um alto potencial de interferência tóxica, por interagir em diversos processos bioquímicos básicos, afetando, conseqüentemente, parâmetros fisiológicos, biológicos e comportamentais.

Repelência, alterações no peso, retardo ou aceleração nos estágios de desenvolvimento, deformidades, redução na capacidade reprodutiva através da esterilização, redução na fecundidade e fertilidade, redução na sobrevivência dos adultos, são outros exemplos da atuação dos óleos essenciais em insetos. Esta ampla ação deve-se à interferência de muitos de seus compostos na fisiologia desses organismos, principalmente nos parâmetros reprodutivos, uma vez que estes parâmetros são uma das principais estratégias de sobrevivência e estabelecimento dos insetos na cultura (Isman 2000, Maroneze & Gallegos 2009, Restelho *et al.* 2009, Lima *et al.* 2010, Knaar & Fiusa 2010, Godoy & Nakano 2011, Haas *et al.* 2012, Cruz *et al.* 2014).

Segundo Silva *et al.* (2013) a mortalidade de insetos-praga não deve ser a principal finalidade da utilização dos óleos essenciais, uma vez que a mortalidade requer uma alta concentração e conseqüentemente uma elevada quantidade de matéria prima, com isso alterações como redução na alimentação, oviposição e reprodução são outros efeitos desejáveis no manejo desses organismos dentro da cultura, por mantê-lo em níveis aceitáveis, sem ocasionar efeitos indesejáveis ao ambiente, adequando-se assim aos conceitos do manejo integrado de pragas – MIP. Sendo assim, os óleos essenciais podem ser utilizados como um método de controle eficaz, tornando-se uma prática adequada ao manejo de pragas, por atender aos requisitos de eficiência e segurança (Viegas-Júnior 2003, Maragoni *et al.* 2012, Cruz *et al.* 2014).

De modo geral, a análise cromatográfica dos óleos demonstrou a presença de três componentes majoritários representando mais de 50% de sua constituição, contudo algumas substâncias como (E)-anethole e limoneno foram comuns aos óleos estudados, sendo esta última comum aos três. Todos os óleos ocasionaram alterações significativas no ciclo biológico de *S. frugiperda*, contudo o óleo de alfavaca branca (*Ocimum gratissimum*) nas três DL's apresentou uma melhor resposta, por ocasionar uma redução significativa no peso larval, período larval, peso

pupal, número total de ovos, sobrevivência dos adultos, além de ocasionar alterações no período de pré-oviposição (DL₄₀) e pós-oviposição em todas as DL's.

Agradecimentos

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor, possibilitando a realização desta pesquisa.

Literatura Citada

- Amoabeng, B.W., G.M. Gurr, C.M. Gitau, H.L. Nicol, L. Munyakazi & P.C. Stevenson. 2013.** Tri-trophic insecticidal effects of African plants against cabbage pests. *PlosOne* 8: 10-13.
- Azevedo, F.R., C.A.M. Santos, D.R. Nere, E. S. Moura & L.S. Gurgel. 2013.** Inseticidas vegetais no controle de *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) em pomar de goiaba. *Holos* 4: 77-86.
- Campos, A.P. & A.L.B. Junior. 2012.** Lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) submetidas a diferentes concentrações de óleo de nim. *RBMS* 2: 137-144.
- Conab. 2013.** (Companhia Nacional de Abastecimento). Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2013/2014 - segundo levantamento - novembro/2013. Brasília, CONAB, 71p.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, A.A. Correia, M.O. Breda, T.J.S. Alves, F.M. Cunha, A.A.C. Teixeira, K.A. Dutra & D.M.A.F. Navarro. 2014.** Bioactivity of *Piper hispidinervum* (Piperales: Piperaceae) and *Syzygium aromaticum* (Myrtales: Myrtaceae) oils, with or without formulated Bt on the biology and immunology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 107: 144-153.
- Fonseca, P.R.B., T.A. Mota, S.O. Kassab & M.G. Fernandes. 2012.** Seletividade de inseticidas utilizados no controle da *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) nos inimigos naturais epigêicos na cultura do milho. *Rev. Caatinga* 25: 14-19.
- Godoy, M.S. & O. Nakano. 2011.** Efeitos de inseticidas sobre a reprodução e sobrevivência do bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* boh. (Coleoptera: Curculionidae) em condições de laboratório. *Rev. Verde* 6: 12-22.
- Haas, H.K., K.S. Piresa, E. Garcia, B.C. Garcia & F.A. Alves. 2012.** Evaluation of aqueous plant extracts on *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae). *BioAssay* 7: 1-4.

- Isman, M. B. 2000.** Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 19: 603-608.
- Kim, E.H., H.K. Kim, D.H. Choih & Y.J. Ahn. 2003.** A acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). *Appl. Entomol. Zool.* 38: 261-266.
- Knaak, N. & L.M. Fiuza. 2010.** Potential of essential plant oils to control insects and microorganisms. *Neotrop. Biol. Conserv.* 5: 120-132.
- Lima, K.R., M.G. Cardoso, J.C. Moraes, M.A. Andrade, B.A. Melo & V.G. Rodrigues. 2010.** Chemical characterization and insecticidal activity of the essential oil leaves of *ageratum conyzoides* on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Bioscience J.* 26: 1-5.
- Marangoni, C., F.N. Moura & F.R.M. Garcia. 2012.** Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. *Quím. Nova* 36: 1391-1394.
- Maroneze, D.M. & D.M.N. Gallegos. 2009.** Efeito de extrato aquoso de *Melia azedarach* no desenvolvimento das fases imatura e reprodutiva de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Semina* 30: 537-550.
- Michelotto, M.D., J.C. Netto, R.S. Freitas, A.P. Duarte & A.C. Busoli. 2013.** Milho transgênico (Bt): efeito sobre pragas alvo e não alvo. *Rev. Nucleus* 10: 29-35.
- Nério, L.S., J. Olivero-Verbel & E. Stashenko. 2010.** Repellent activity of essential oils: a review. *Biores. Technol.* 101: 372-378.
- Niculau, E.S., P.B. Alves, P.C.L. Nogueira, V.R. Moraes, A.P. Matos, A.R. Bernardo, A.C. Volante, J.B. Fernandes, M.F.G.F. Silva, A.G. Correia, A.F. Blank, A.C. Silva, & L.P. Ribeiro. 2013.** Atividade inseticida de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Herit E *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Quím. Nova* 36: 1391-1394.
- Ootani, M.A., R.W. Aguiar, A.C.C. Ramos, D.R. Brito, J.B. Silva & J.P. Cajazeira. 2013.** Use of essential oils in agriculture. *J. Biotechnol. Biodivers.* 4: 162-174.
- Pavela R. 2014.** Synergistic and antagonistic effects of some aromatic compounds on the *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lep., Noctuidae) larvae. *Ind. Crop. Prod.* 60: 247-258.
- Prates, H.T. & J.P. Santos. 2002.** Óleos essenciais no controle de pragas de grãos armazenados. p. 443-461. In I. Lorini, L.H. Miike & V.M. Senssel (eds.), *Armazenagem de grãos*. Campinas: Instituto Bio Geneziz, 1000p.
- Rawson, A., M.B. Hossaing, A. Patras, M. Tuohy & N. Brunton. 2013.** Effect of boiling and roasting on the polyacetylene and polyphenol content of fennel (*Foeniculum vulgare*) Bulb. *Food Res. Int.* 40: 513-518.

- Reganult-Roger, C., C. Vicent & J.T. Arnason, 2012.** Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annu. Rev. Entomol.* 57: 405-424.
- Restello, R.M., C. Menegatt & A.J. Mossi. 2009.** Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) *Rev. Bras. Entomol.* 53: 304–307.
- Ribeiro, W.L.C., I.T.F. Macedo, J.M.L. Santos, E.F. Oliveira, A.L.F. Vasconcelos-Camurca, H.C.B. Paula & C.M.L. Bevilaqua. 2013.** Activity of chitosan-encapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil on *Haemonchus contortus*. *Exp. Parasitol.* 135: 24–29.
- Santos, G.K.N., K. A. Dutra, R. S. Barros, C.A.G. Câmara, D. D. Lira, N. B. Gusmão & M.A.F. Navarro. 2012.** Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae): chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity. *Ind. Crop. Prod.* 40: 254-260.
- Sarmiento, R.A., R.W.S. Aguiar, R.A.S.S. Aguiar, S.M.J. Vieira, H.G. Oliveira & A.M. Holtz. 2002.** Biology review, occurrence and control of *Spodoptera frugiperda* (Lepdoptera, Noctuidae) in corn in Brazil. *J. Biosci.* 18: 41-48.
- SAS Institute. 2002.** User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute INC., Cary, NC.
- Silva, M.G.O., F.C.L. Freitas, H.C. Mesquita, P.G.M.L. Nascimento, A.P.M.S. Rodrigues & F.A.O. Santana. 2011.** Grain yield of corn cultivars in consortium with *Brachiaria brizantha*. *Agropecu. Cient. Semiárido.* 7: 23-29.
- Silva, J.F., B.A. Melo, E.B. Pessoa, A.F. Neto & D.T. Leite. 2013.** Plant extracts for the control the bean weevil *Zabrotes subfasciatus* (Boheman 1833) (Coleoptera: Bruchidae). *Rev. Verde* 8: 1-5.
- Soares, C.S.A., M. Silva, M.B. Costa & E.S. Bezerra. 2011.** Inseticida de óleos essenciais sobre a lagarta desfolhadora *Thyrinteina arnobia* (stoll) (Lepidoptera: Geometridae). *Rev. Verde.* 6: 154-157.
- Soares, C.S.A., M. Silva, M.B. Costa, C.E.S. Bezerra, L.M. Carvalho & A.H.V. Soares. 2012.** Atividade inseticida de óleos essenciais sobre *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Hemiptera: Aphididae) em roseira. *Rev. Bras. Agroecol.* 7: 169-175.
- Storch, G., A.E. Loeck, M.S. Gracia, D.A. Magano & M.R. Lorenzetti. 2008.** Baseline susceptibility of contact insecticides on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) used in corn crops. *Rev. Bras. Agroecol.* 14: 291-297.
- Tak, J.H., E. Jovel & M.B. Isman. 2015.** Comparative and synergistic activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil constituents against the larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag. Sci.* 71: 329-336.

Van Den Doll, H. & P.D.J.A. Kratz. 1963. Generalization of the retention index system include linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* 11: 464:471.

Vieira, G.H.C., W.P. Andrade & D.M. Nascimento. 2012. Uso de óleos essenciais no controle do ácaro *Varroa destructor* em *Apis mellífera*. *Agric. Res. Topics.* 42: 317-322.

Viegas-Júnior, C. 2013. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quím. Nova* 26: 390-400.

Tabela 1. Composição química dos óleos essenciais de erva doce (*Foeniculum vulgare*), Alfavaca branca (*Ocimum gratissimum*) e eucalipto (*Eucaliptus staigeriana*) com as porcentagens relativas dos componentes.

Composto ^b	<i>Foeniculum Vulgarae</i>			<i>Ocimum gratissimum</i>		<i>Eucaliptus staigeriana</i>	
	IR ^a Literatura ^c	IR ^b Determinado ^d	(%)	IR ^b Determinado ^d	(%)	IR ^b Determinado ^d	(%)
α -Tujene	924	926	0,07	926	0,47	925	0,36
α -Pinene	932	932	11,13	932	3,47	931	3,50
Camphene	946	946	0,13	946	0,09	-	-
Sabinene	969	-	-	972	0,21	971	0,09
β -Pinene	974	974	1,08	974	0,63	973	2,52
Hepten-2-one<6-methyl- 5>	981	-	-	-	-	987	0,22
Myrcene	988	991	1,51	991	0,89	990	0,62
α -Phellandrene	1,002	1,003	9,54	1,003	3,41	1,002	2,00
δ -3-Carene	1,008	-	-	1,009	0,04	-	-
α -Terpinene	1,014	-	-	1,016	0,39	1,014	0,14
O-Cymene	1,022	1,024	1,09	1,024	2,24	1,023	1,38
Limonene	1,024	1,029	41,82	1,028	15,63	1,029	28,73

Tabela1. Continuação

1,8-Cineole	1,026	-	-	1,030	3,36	-	-
(Z)- β -Ocimene	1,032	-	-	1,038	2,62	1,037	0,16
(E)- β -Ocimene	1,044	1,039	3,84	1,049	0,15	1,047	0,30
γ -Terpinene	1,054	1,059	1,65	1,058	2,68	1,057	1,81
(Z)-Linalool oxide	1,067	-	-	-	-	1,071	0,04
Fenchone	1,083	1,086	1,16	1,088	0,86	-	-
Terpinolene	1,086	-	-	-	-	1,087	8,45
Linalool	1,095	-	-	1,099	0,12	1,099	1,35
(E)-Thujene	1,112	-	-	1,117	0,03	-	-
(allo) Ocimene	1,128	-	-	1,129	0,03	-	-
(E)-Miroxide	1,140	-	-	-	-	1,144	0,15
(neo) Isopulegol	1,144	-	-	1,145	0,04	-	-
Citronelal	1,148	1,159	0,36	1,154	0,09	1,152	0,36
(Z)-Isocitral	1,160	-	-	-	-	1,164	0,03
δ -Terpineol	1,162	-	-	1,167	0,06	-	-
P-Mentha-1,5-dien-8-ol	1,166	-	-	-	-	1,169	0,14

Tabela1. Continuação

Terpinen-4-ol	1,174	-	-	1,177	0,16	1,177	1,13
(E)-Isocitral	1,177	-	-	-	-	1,182	0,08
P- Cymen-8-ol	1,179	-	-	-	-	1,188	0,23
α -Terpineol	1,186	-	-	1,190	0,11	1,192	0,55
Methyl Chavicol	1,195	1,201	6,84	1,198	7,78	-	-
endo-Fenchyl acetate	1,218	1,220	0,42	1,221	0,10	-	-
Citronelol	1,223	-	-	1,229	0,17	-	-
exo-Fenchyl acetate	1,229	1,234	1,17	1,234	0,17	-	-
Neral	1,235	-	-	-	-	1,242	12,16
Piperitone	1,249	-	-	-	-	1,253	0,07
(Z)- Anethole	1,249	1,262	0,07	1,253	0,17	-	-
Geraniol	1,249	-	-	1,255	0,27	-	-
Methyl Citronellato	1,257	-	-	-	-	1,260	0,11
Geranial	1,264	-	-	-	-	1,272	15,20
Neryl formate	1,280	-	-	-	-	1,280	0,10

Tabela1. Continuação

Isobornil acetate	1,283	1,286	0,07	-	-	-	-
(E)-Anethole	1,282	1,290	17,91	1,286	34,95	-	-
(E)-Linalool oxide acetato	1,287	-	-	-	-	1,286	0,17
Thymol	1,289	-	-	1,292	4,47	-	-
Geranil formate	1,298	-	-	-	-	1,301	0,39
Carvacrol	1,298	-	-	1,301	0,04	-	-
Methyl geranato	1,322	-	-	-	-	1,324	5,93
Citronelil acetate	1,350	-	-	1,354	0,03	1,353	0,53
Eugenol	1,356	-	-	1,358	9,07	-	-
Neryl acetate	1,359	-	-	-	-	1,364	2,43
α -Copaeno	1,374	-	-	1,377	0,10	-	-
Geranil acetate	1,379	-	-	-	-	1,353	7,92
β - Bourbonene	1,387	-	-	1,387	0,05	-	-
β - Elemene	1,389	-	-	1,393	0,12	-	-
(E)- Caryophyllene	1,417	1,421	0,08	1,422	0,65	1,420	0,22
Aromadendrene	1,439	-	-	1,442	0,02	1,440	0,22
α -Humulene	1,452	-	-	1,457	0,09	1,453	0,03

Tabela1. Continuação.

(E)- β -Farniseno	1,454	-	-	-	1,461	0,03
Caryophyllene (9-epi-E)	1,464	-	-	1,465	0,05	-
D- Germacrene	1,484	1,485	0,01	1,486	0,29	-
β - Selinene	1,489	-	-	1,491	0,02	-
α -Selinene	1,498	-	-	1,500	0,38	-
Bicyclogermacrene	1,500	-	-	-	1,495	0,28
Farneseno (E,E) - α	1,505	-	-	1,512	1,16	-
Selinene (7-epi- α)	1,520	-	-	1,522	0,06	-
δ -Cadinene	1,522	-	-	1,528	0,12	-
Elemol	1,548	-	-	1,553	0,11	-
Spathulenol	1,577	-	-	1,580	0,10	-
Caryophyllene oxide	1,582	-	-	1,586	0,11	-
γ -Eudesmol	1,632	-	-	1,634	0,03	-
α -Muurulol	1,644	-	-	1,644	0,04	-
α -Cadinol	1,652	-	-	1,657	0,07	-
Total			99,9		98,5	99,9

^aÍndice de retenção;

^bConstituintes listados em ordem de eluição numa coluna apolar DB-5;

^cValores listados por Adams (2009).

^dÍndice de retenção (RI) calculus através dos tempos de retenção em relação aos da série de n-alcanos (C₉-C₁₉)

Tabela 2. Toxicidade dos óleos essenciais de Alfavaca branca (*Ocimum gratissimum*), Eucalipto (*Eucaliptus staigeriana*) e erva doce (*Foeniculum vulgare*) em lagartas de 3º instar de *Spodoptera. frugiperda* por contato tóxico. Temperature: 25,2 ± 1,4 °C. RH: 67 ± 0,7% and photophase of 12 h.

Tratamentos	N ¹	GL ²	Inclinação da reta (±EP)	DL ₁₀ (IC 95%) ³	RT ⁴ ₁₀	DL ₂₀ (IC 95%) ³	RT ⁴ ₂₀	DL ₄₀ (IC 95%) ³	RT ⁴ ₄₀	χ ²
Erva doce <i>Foeniculum Vulgare</i>	30	5	3,1 ± 0,41	1,95 (1,23-2,59)	2,7	2,70 (1,89-3,40)	2,36	4,18 (3,29-4,99)	2,81	5,0
Eucalipto <i>Eucaliptus staigeriana</i>	30	5	3,8 ± 0,89	1,40 (0,66-1,96)	1,12	1,81 (1,01-2,41)	1,33	2,62 (1,91-3,32)	1,63	7,4
Alfavaca branca <i>Ocimum gratissimum</i>	30	5	4,5 ± 0,64	0,79 (0,59-0,95)	-	0,99 (0,79-1,14)	-	1,34 (1,17-1,47)	-	4,8

¹Número de insetos por tratamento. ²Grau de liberdade. ³Dose letal 10/20/40 (mg/g de inseto) ⁴ razão de toxicidade

Tabela 3. Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* cujas larvas foram tratadas com os óleos essenciais de Alfavaca branca (*Ocimum gratissimum*), Eucalipto (*Eucaliptus staigeriana*) e erva doce (*Foeniculum vulgare*) nas doses subletais de 10, 20 e 40 mg/g de inseto. Temperatura: $25,2 \pm 1,4$ °C. Umidade: $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h.

Tratamentos ¹	Parametros Biológicos				
	Larva peso (g)	Larva Periodo (dias)	Pupa peso (g)	Pupa Periodo (dias)	Razão Sexual
Controle	0,406 ± 0,002 a	8,1 ± 0,67 a	0,202 ± 0,007 a	8,7 ± 0,27 ad	0,54 ± 0,10 a
Alfavaca branca DL ₁₀	0,242 ± 0,008 cde	6,2 ± 0,14 e	0,128 ± 0,05 de	9,1 ± 0,26 abc	0,58 ± 0,10 a
Alfavaca branca DL ₂₀	0,212 ± 0,002 efg	6,2 ± 0,04 e	0,127 ± 0,003 e	9,4 ± 0,44 abc	0,60 ± 0,06 a
Alfavaca branca DL ₄₀	0,179 ± 0,004 g	6,7 ± 0,11 e	0,126 ± 0,001 e	9,2 ± 0,27 abc	0,50 ± 0,20 a
Eucalipto DL ₁₀	0,290 ± 0,01 b	8,7 ± 0,40 ac	0,196 ± 0,01 ab	9,8 ± 0,52 abc	0,50 ± 0,11 a
Eucalipto DL ₂₀	0,256 ± 0,004 bcd	10,0 ± 0,31 bd	0,121 ± 0,007 e	11,0 ± 0,39 c	0,76 ± 0,15 a
Eucalipto DL ₄₀	0,211 ± 0,006 efg	8,2 ± 0,16 a	0,105 ± 0,006 e	10,4 ± 0,35cb	0,84 ± 0,11 a
Erva doce DL ₁₀	0,279 ± 0,008 bc	10,3 ± 0,17 bd	0,170 ± 0,004 bc	8,8 ± 0,05 ad	0,48 ± 0,07 a
Erva doce DL ₂₀	0,222 ± 0,014 def	10,7 ± 0,14 bd	0,155 ± 0,02 cd	6,4 ± 0,11 e	0,56 ± 0,06 a
Erva doce DL ₄₀	0,200 ± 0,003 fg	9,5 ± 0,10 bc	0,162 ± 0,005 c	8,1 ± 0,08 d	0,36 ± 0,09 a
	F=59,77; df=9, P=<,0001	F=62,60; df=9; P=<,0001	F=30,90; df=9; P=<,0001	F=3,12; df=9 P=0,0062	F=1,38;df=9; P=2287

¹Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey HSD a 5% de probabilidade.

Tabela 4. Período de pre-oviposição, número total de ovos, período de pós-oviposição e longevidade de adultos de *Spodoptera frugiperda* cujas larvas foram tratadas com os óleos essenciais de Alfavaca branca (*Ocimum gratissimum*), Eucalipto (*Eucaliptus staigeriana*) e erva doce (*Foeniculum vulgare*) nas doses subletais de 10, 20 e 40 mg/g de inseto. Temperatura: $25,2 \pm 1,4$ °C. Umidade: $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h.

Tratamentos	Pré - oviposição (dias \pm EP) ¹	Número médio de ovos (\pm S.E) ¹	Pós - oviposição (dias \pm EP) ¹	Longevidade Adultos
Control	2,40 \pm 0,24 a	2950,80 \pm 71,32 a	2,60 \pm 0,24 a	15.20 \pm 0.24 a
Alfavaca branca DL ₁₀	2,00 \pm 0,00 a	906,00 \pm 19,01 d	1,40 \pm 0,24 b	14.20 \pm 0.20 b
Alfavaca branca DL ₂₀	1,60 \pm 0,24 ac	564,20 \pm 35,84 f	1,00 \pm 0,00 b	13.30 \pm 0.30 c
Alfavaca branca DL ₄₀	1,40 \pm 0,24 c	522,60 \pm 80,41 f	1,00 \pm 0,00 b	9.50 \pm 0.26 e
Erva doce DL ₁₀	1,40 \pm 0,24 c	1218,20 \pm 23,58 c	1,00 \pm 0,00 b	13.20 \pm 0.24 c
Erva doce DL ₂₀	1,40 \pm 0,24 c	818,80 \pm 20,39 e	1,00 \pm 0,00 b	10.40 \pm 0.33 e
Erva doce DL ₄₀	2,00 \pm 0,00 a	766,20 \pm 44,64 e	1,20 \pm 0,20 b	10.10 \pm 0.37 e
Eucalipto DL ₁₀	2,40 \pm 0,24 a	1781,40 \pm 127,38 b	3,80 \pm 0,73 a	14.10 \pm 0.17 b
Eucalipto DL ₂₀	2,00 \pm 0,00 a	965,60 \pm 33,71 d	2,20 \pm 0,20 a	12.40 \pm 0.22 d
Eucalipto DL ₄₀	3,40 \pm 0,24 b	686,60 \pm 72,77ef	1,00 \pm 0,00 b	12.30 \pm 0.30 d
H ^{Valor de P}	H = 31,52 ^{0,0002}	H = 44,29 ^{<0,0001}	H = 37,24 ^{<0,0001}	

¹Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0.05).

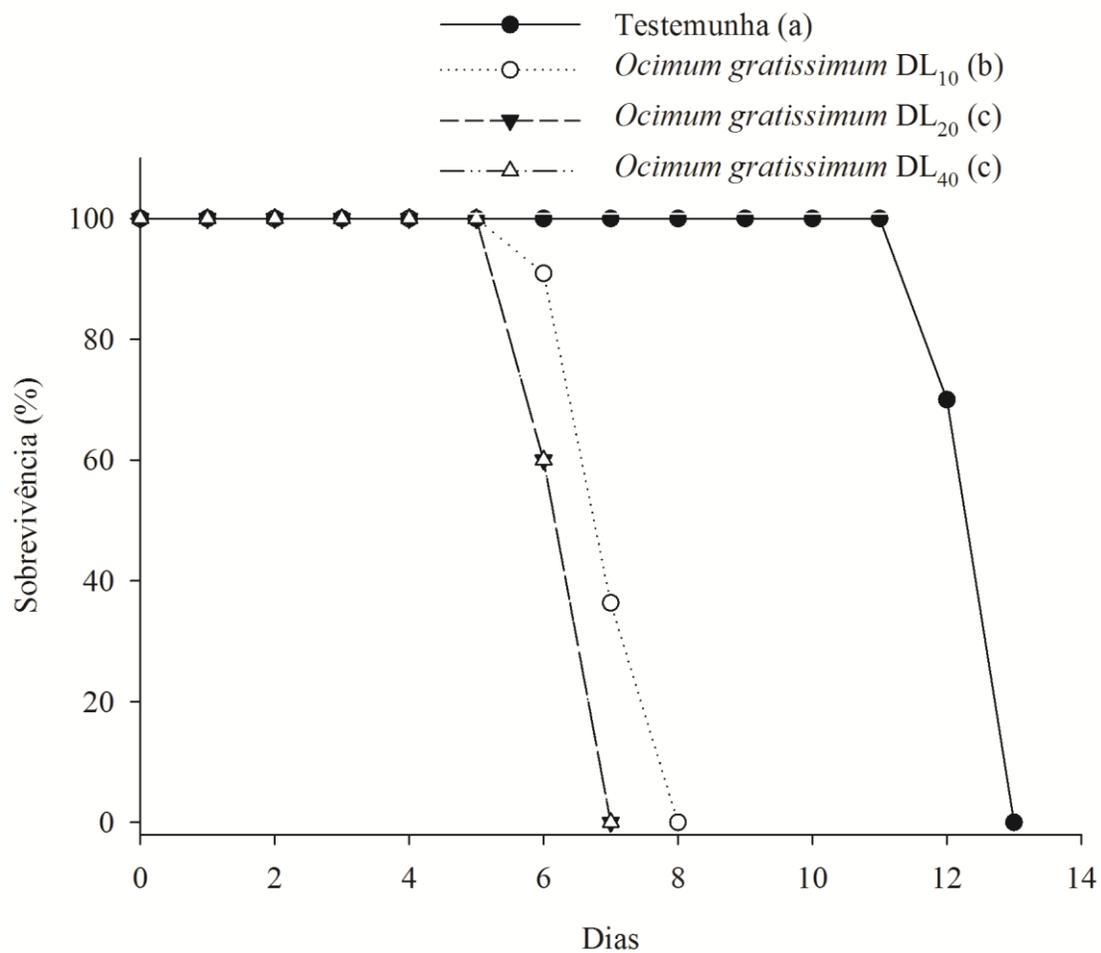


Figura 1. Sobrevivência diária de larvas de *Spodoptera frugiperda* a partir do 3º ínstar de tratadas com os óleos de Alfavaca branca (*Ocimum gratissimum*) nas doses letais de 10, 20 e 40 mg/g de inseto. Temperatura: $25,2 \pm 1,4$ °C. Umidade: $67 \pm 0,7\%$ e photofase de 12 h. ($\chi^2_{GL=3} = 44,38$; $P < 0,0001$).

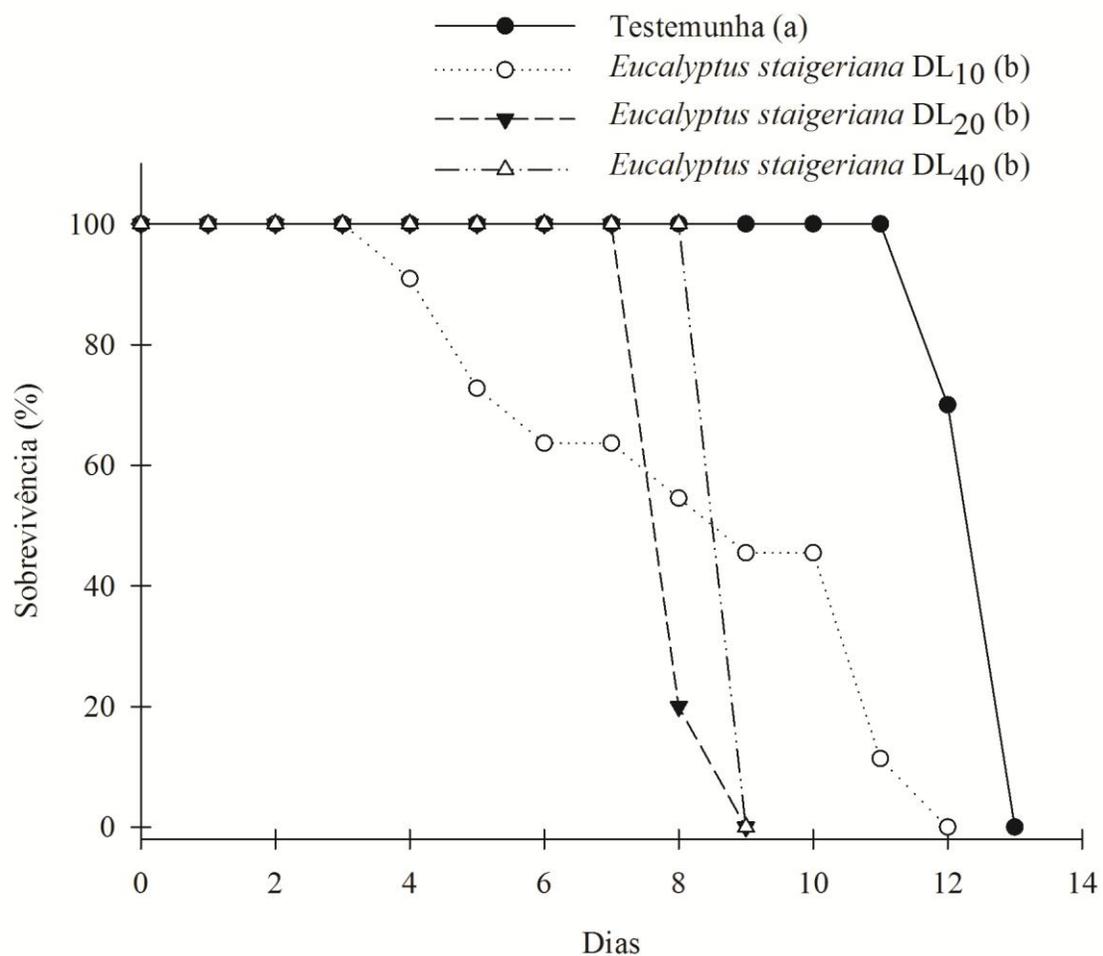


Figura 2. Sobrevivência diária de larvas a partir do 3º ínstar de *Spodoptera frugiperda* tratadas com os óleos de Eucalipto (*Eucalyptus staigeriana*) nas doses letais de 10, 20 e 40 mg/g de inseto. Temperatura: $25,2 \pm 1,4$ °C. Umidade: $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h. ($\chi^2_{GL=3} = 34,76$; $P < 0,0001$).

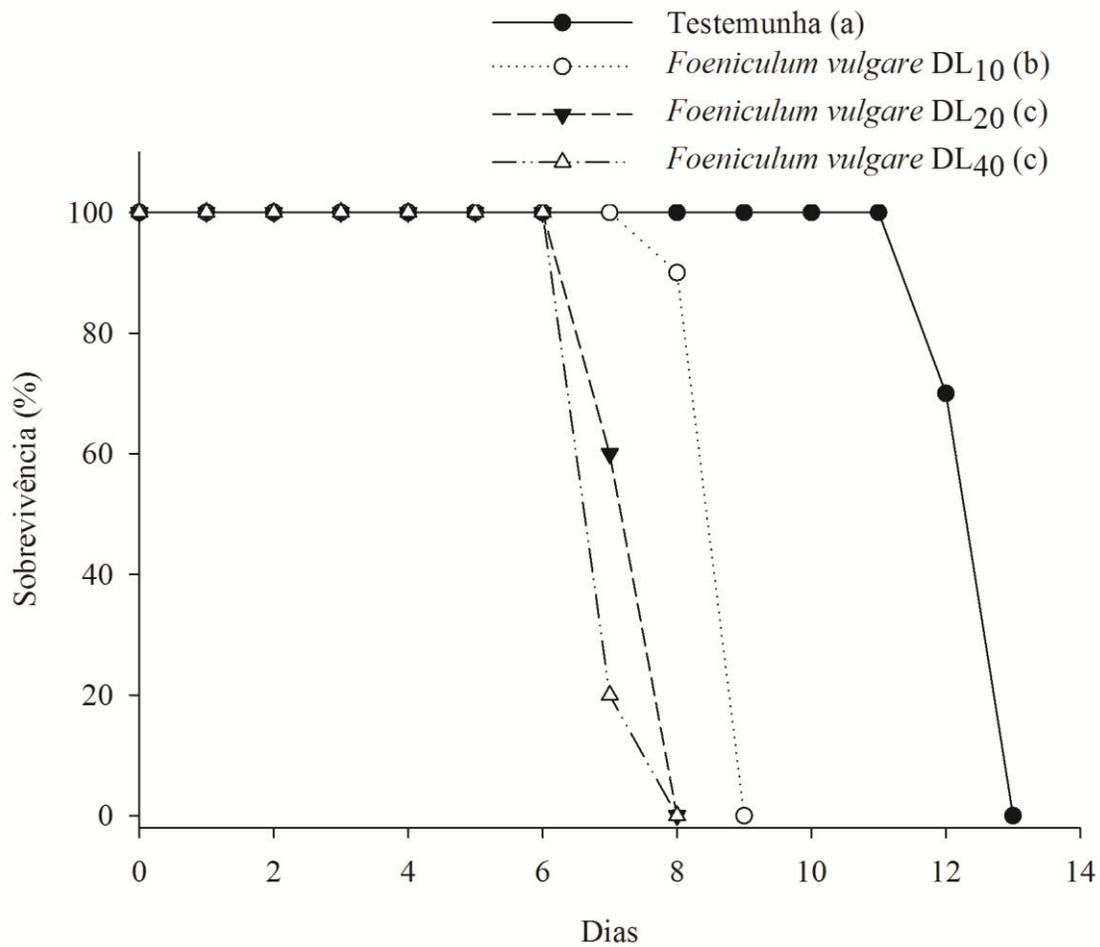


Figura 3. Sobrevivência diária de larvas de *Spodoptera frugiperda* a partir do 3º ínstar tratadas com óleo de Erva doce (*Foeniculum vulgare*) nas doses letais de 10, 20 e 40 mg/g de inseto. Temperatura: $25,2 \pm 1,4$ °C. Umidade: $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h. ($\chi^2_{GL=3} = 56,40$; $P < 0,0001$)

CAPÍTULO 3

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE INSETICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS EM *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)¹

GLAUCILANE S. CRUZ², VALÉRIA W. TEIXEIRA³, JOSÉ V. OLIVEIRA², DANIELA M.A.F. NAVARRO⁴ E

ÁLVARO A.C. TEIXEIRA³

²Departamento de Agronomia-Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av.

Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

³Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco,

Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

⁴Departamento de Química Fundamental. Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor

Morais Rego 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE

¹Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, D.M.A.F. Navarro & A.A.C. Teixeira. Composição química e atividade inseticida de óleos essenciais e seus compostos majoritários em *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Submetido ao Journal of Natural Products.

RESUMO- Devido a crescente resistência a inseticidas sintéticos, a utilização de substâncias alternativas para o controle de *Spodoptera frugiperda* vem crescendo. Assim, avaliou-se a composição química e atividade inseticida dos óleos essenciais de *Foeniculum vulgare* Mill., *Ocimum basilicum* L., *Eucalyptus staigeriana* F., *Eucalyptus citriodora* F., *Ocimum gratissimum* L. e dos seus compostos majoritários limoneno, trans- anetole, citronelal e linalool e seu efeito na mortalidade de *Spodoptera frugiperda*. Os óleos essenciais foram obtidos pela técnica de hidrodestilação, e posteriormente submetidos, à análise por GC-MS. Os compostos majoritários foram obtidos da Sigma-Aldrich®. Foram realizados testes de contato tópico em lagartas de 3º instar, e cada lagarta recebeu um 1µ da solução (óleo essencial ou composto majoritário + acetona). Para o teste de contato tópico com os óleos essenciais e os compostos majoritários, foram utilizados testes preliminares para o estabelecimento das doses definitivas. Os compostos foram diluídos em acetona e para o controle foi utilizado apenas a acetona. Os resultados da análise cromatográfica dos óleos demonstraram que houve uma diversidade quanta a sua constituição, embora os compostos mais comumente encontrados foram o limoneno, trans-anethole e o methil chavicol. Todos os óleos demonstraram uma atividade inseticida, porém a maior performance foi obtida com trans-anethole, com DL₅₀ de 0,027 mg/g de inseto, e razão de toxicidade de 1194.07, seguido dos óleos que apresentavam essa substância na sua constituição, demonstrando ser uma alternativa eficiente e promissora para o manejo de *S. frugiperda*.

PALAVRAS-CHAVE: Óleos essenciais, toxicidade, compostos majoritários, lagarta do cartucho

CHEMICAL COMPOSITION AND INSECTICIDAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AND THEIR MAIN COMPONENTS ON *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

ABSTRACT- Due to Increasing resistance to synthetic insecticides the use of substitutes of control of *S. frugiperda* Has Been growing. The aim of this research was to evaluate the chemical composition and insecticidal activity of essential oils of *Foeniculum vulgare* Mill., *Ocimum basilicum* L., *Eucalyptus staigeriana* F., *Eucalyptus citriodora* F., *Ocimum gratissimum* L. and its major compounds limonene, trans-anethole, citronellal and linalool and its effect on mortality of corn armyworm *Spodoptera frugiperda*. The essential oils were obtained by hydrodistillation, and then subjected to analysis by GC-MS. The major compounds were obtained from Sigma-Aldrich®. Topical patch tests were conducted in 3 instar larvae, and each track received hum 1 μ Solution (essential oil or majority composite + acetone) on the dorsal region. For topical patch test with the essential oils and the major compounds preliminary tests to establish the doses were used. The oils and major compounds were diluted in acetone and control was done only with acetone. The results of chromatographic analysis of oils demonstrated that there was a diversity about the constitution of oil, but the most commonly found compounds were limonene, trans-anethole and the Methil chavicol. All oils showed an insecticidal activity, but the highest activity was obtained from trans-anethole with a LD₅₀ of 0,027 mg/g of insect, obtaining a ratio of toxicity 1194.07, followed by oils presenting the substance in its formation, demonstrating to be an effective and promising alternative in the management of *S. frugiperda*.

KEY WORDS: Essential oils, toxicity, major compounds, armyworm

Introdução

A espécie *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) destaca-se como a principal praga do milho, principalmente na região Nordeste do Brasil ocasionando uma redução na produção de até 34% (Haas *et al.* 2012). Diante da severidade dos danos ocasionados o seu controle é realizado através da utilização de inseticidas de diferentes grupos químicos, sendo, na maioria das vezes, usados de forma indiscriminada, ocasionando diversos prejuízos ao ecossistema (Lima *et al.* 2010, Fonseca *et al.* 2012).

De acordo com Guimarães *et al.* (2014) a necessidade do desenvolvimento de inseticidas menos tóxicos e mais seletivos tem sempre colocado como alternativa, a investigação de substâncias bioativas, obtidas de plantas. O emprego exacerbado de inseticidas sintéticos tem selecionado com frequência o desenvolvimento de populações resistentes, e provocado outros efeitos colaterais, tais como persistência, baixa seletividade, intoxicação entre outros. Métodos alternativos de controle, como o uso de extratos vegetais e óleos essenciais, com atividade inseticida, tem-se revelado promissor no controle de diversos insetos-praga.

Os óleos essenciais são substâncias naturais de variável poder aromatizante, de composição mais ou menos complexa que podem ser encontrados em diversas espécies vegetais, das quais são extraídos, segundo processamento específico. Geralmente são misturas de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas. No seu perfil químico pode-se encontrar diversos componentes. Estes, quando ocorrem em maior quantidade são classificados como majoritários, sendo muitas vezes responsáveis pela atividade inseticida. Os de menor quantidade são denominados minoritários, que em alguns casos, quando associados aos majoritários também podem conferir a atividade inseticida aos óleos (Lima-Mendonça *et al.* 2014, Pereira *et al.* 2014).

Devido a sua ação inseticida, bactericida e fungicida os óleos essenciais vêm sendo objeto de estudos para o desenvolvimento de novos produtos, e esta ação deve-se à presença de monoterpenos e sesquiterpenos presentes em grande quantidade, sendo possível a identificação dessas substâncias através da análise cromatográfica (Ootani *et al.* 2013).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a composição química e a atividade inseticida dos óleos essenciais de erva-doce (*Foeniculum vulgare* Mill.), manjerição (*Ocimum basilicum* L.), eucalipto (*Eucalyptus staigeriana* F.), eucalipto-limão (*Eucalyptus citriodora* F.), alfavaca e alfavaca branca (*Ocimum gratissimum* L.) e seus compostos majoritários limoneno, trans- anetole, citronelal e linaol, em lagartas de *S. frugiperda* através do contato tópico, visando uma melhor compreensão da ação desses óleos sobre essa praga.

Material e Métodos

A pesquisa foi conduzida nos laboratórios de Entomologia Agrícola, Departamento de Agronomia (UFRPE) e no Laboratório de Ecologia Química, Departamento de Química fundamental (UFPE), localizados em Recife, PE, Brasil.

Criação de *Spodoptera frugiperda*. As lagartas foram obtidas da criação estoque do laboratório de Entomologia Agrícola, matidas à temperatura de $25,2 \pm 1,4$ °C, umidade relativa de $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h, sendo alimentadas em folhas de milho híbrido duplo AG 1051. As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação, com duas plantas/vaso de 5L, contendo solo + húmus de minhoca na proporção de 2:1 + 12,13g de N-P-K (formulação 4-14-8).

Obtenção dos Óleos Essenciais e de seus Compostos Majoritários. Os óleos de *E. staigeriana* e *E. citriodora* foram obtidos do Departamento de Ciência Florestal, ESALQ-USP; *O. gratissimum*, *O. basilicum* e *F. vulgare* da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus III, Bananeiras, PB. O material vegetal (folhas) foi triturado em um liquidificador e hidrodestilado

com 3L de água destilada, durante três horas, em um aparelho do tipo Clevenger. A camada de óleo essencial foi separada, seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e acondicionada em um frasco de vidro âmbar a 5 °C até ser utilizada (Santos *et al.* 2012). Os compostos majoritários foram obtidos da Sigma-Aldrich® com pureza de 99%.

Cromatografia Gasosa-Análise Espectrometria de Massa (GC-MS). A análise da composição química dos óleos de *E. staigeriana*, *E. citriodora*, *O. gratissimum*, *O. basilicum* e *F. vulgare*, foram realizadas no Laboratório de Ecologia Química da Universidade Federal De Pernambuco. Os óleos essenciais foram analisados por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas em um sistema quadrupolo Agilent 5975C Series GC/EM (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), equipado com uma coluna apolar DB-5 (Agilent J&W; 60 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm espessura da película). A solução de 1,0 µL de concentração conhecida, contendo o óleo essencial diluído em hexano foi injetada em split 1:20, assim como a solução da mistura de padrões de hidrocarbonetos: C9-C34, sendo esta solução hexânica composta por padrões comerciais da Sigma-Aldrich®. A temperatura do GC foi ajustada em 60 °C por 3 min, sendo então aumentada em 2,5 °C min⁻¹ até alcançar 240 °C e mantida nesta temperatura por 10 min. O fluxo de hélio foi mantido em pressão constante de 100 kPa. A interface do EM foi definida em 200 °C e os espectros de massa registrados em 70 eV (em modo EI) com uma velocidade de escaneamento de 0,5 scan-s de m/z 20-350. A partir da obtenção dos tempos de retenção dos compostos na amostra do óleo essencial, no padrão de hidrocarboneto e na combinação do óleo essencial com a mistura deste padrão foi calculado o índice de retenção para cada componente do óleo, segundo a equação de Van den Dool & Kratz (1963). Os componentes dos óleos essenciais foram previamente identificados por similaridade dos valores dos índices de retenção e posteriormente confirmados por comparação dos respectivos espectros de massa com aqueles disponíveis na biblioteca do GC/EM: MassFinder 4, NIST08 e Wiley Registry™ 9th Edition e com os descritos por Adams

(2009) e por fim, as áreas dos picos nos cromatogramas foram integradas para a obtenção do sinal iônico total e seus valores utilizados para determinar as proporções relativas respectivas a cada composto.

Teste por Contato Tópico. O teste por contato tópico foi realizado com lagartas com 10 dias de idade com peso médio de aproximadamente 78 mg (terceiro instar). Os tratamentos consistiram na diluição do óleo essencial em acetona, obtendo as concentrações 1, 2, 3, 5, 6 e 9 mg/g de inseto para o óleo de eucalipto (*Eucalyptus staigeriana*); 3, 4, 5, 6, and 7 mg/g de inseto para o óleo de eucalipto-limão (*Eucalyptus citriodora*); 0,1, 0,5, 1, 2, 3 e 5 mg/g de inseto para o óleo de alfavaca branca (*Ocimum gratissimum*), 1, 2, 3, 4, 5 e 6 mg/g de inseto para o óleo de Alfavaca (*O. gratissimum*); 2, 3, 5, 6, 9 e 12 mg/g de inseto para o óleo de erva doce (*Foeniculum vulgare*); 1, 2, 2,5, 3, 5, 8 e 9 mg/g de inseto para o óleo de manjeriço (*Ocimum basilicum*) 0,015, 0,022, 0,033, 0,066, 0,095 mg/g de inseto para o composto majoritário trans-anethole; 17,11, 28,38, 41,01 55,00 mg/g de inseto para o composto majoritário limoneno; 2, 5, 7, 9, 11 e 13 mg/g de inseto para o composto majoritário citronelal; 2, 4, 6, 8, 10 e 12 mg/g de inseto para o composto majoritário linalool e o controle com acetona. Essas concentrações foram obtidas através de testes preliminares objetivando obter mortalidades em torno de 5% e 95%, para o estabelecimento das concentrações definitivas. O bioensaio consistiu na aplicação 1,0 µL de cada tratamento na região protorácica do inseto, empregando uma seringa HamiltonTM (50 µL). As lagartas foram individualizadas em tubos de vidro de fundo chato e alimentadas com folhas de milho cultivadas para a manutenção da criação de *S. frugiperda* (hybrid AG 1051). Foram utilizadas três repetições para cada tratamento, sendo dez lagartas por repetição. Avaliou-se a toxicidade aguda dos óleos essenciais pela contagem de lagartas mortas 48 horas após a instalação do experimento, utilizando a análise de probit pelo programa SAS PROC PROBIT (SAS Institute. 2002).

Resultados

Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas (GC-MS). De acordo com a análise cromatográfica, verificou-se que o óleo essencial de erva-doce (*Foeniculum vulgare*) apresentou 20 compostos e como majoritários o limoneno com 41,82%, seguido do trans-anetole com 17,91% e o alfa-pineno 11,13%. Os óleos essenciais de alfavaca e alfavaca branca (*Ocimum gratissimum*) apresentaram a mesma constituição química com 53 compostos tendo o trans-anetole com 34,95%, Limoneno 15,63%, eugenol 9,07% e methyl chavicol com 7,78% como majoritários. No óleo de eucalipto (*Eucalyptus staigeriana*) foi identificado 40 compostos e como majoritários o limoneno com 28,73% seguido do geranial com 15,20% e neral 12,16. O óleo de eucalipto-limão (*Eucalyptus citriodora*) apresentou 28 compostos e o citronelal como único componente majoritário sendo responsável por 89,59% da constituição. O óleo de manjeriço (*Ocimum basilicum*) apresentou 20 compostos e como majoritário o linalool com 62,47% seguido pelo methyl chavicol com 30,94%. (Tabela 1).

Teste por Contato Tópico. Dentre os óleos essenciais testados em lagartas de *S. frugiperda* de terceiro instar, os que apresentaram maior toxicidade foram os de alfavaca branca e alfavaca (*Ocimum gratissimum*) com as DL₅₀ de 1,52 (1,36-1,67) e 2,84 (2,34-3,38) mg/g inseto, e DL₉₀ de 3,47 (2,90-4,68) e 11,77 (8,26-22,46), respectivamente, seguido pelo óleo de eucalipto (*Eucalyptus staigeriana*) com uma DL₅₀ de 3,20 (2,41-4,07) e DL₉₀ de 6,08 (5,91- 26,09) mg/g inseto, eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) com DL₅₀ de 4,58 (4,09-5,08) e DL₉₀ de 9,78 (7,96-14,77), o óleo manjeriço (*Ocimum basilicum*) com DL₅₀ de 4,86 (4,02-6,13) e DL₉₀ de 17,11 (13,26-25,52) e por fim o óleo de erva doce (*Foeniculum vulgare*) com a DL₅₀ de 5,05 (4,13-5,96) e DL₉₀ 25,41 (16,14-56,20). Contudo, o componente majoritário mais tóxico foi o trans-anethole apresentando uma DL₅₀ de 0,027 (0,021- 0,032) e DL₉₀ de 0,078 (0,059-0,12), seguido pelo citronelal com a DL₅₀ de 0,07 (0,06-0,08) e DL₉₀ de 0,14 (0,11-0,18), o linalool com a DL₅₀ de

5,20 (4,21-5,27) e DL₉₀ de 15,10 (11,38- 24,78) e o menos tóxico representado pelo limoneno com uma DL₅₀ de 32,24 (27,73-36,55) e DL₉₀ de 65,02 (54,68-86-48) (Tabela 2). Quanto à razão de toxicidade na DL₅₀ o trans-anethole foi 1194,07 vezes mais tóxico do que o limoneno, seguido do citronelal 464,42, óleo de alfavaca branca e alfavaca (*Ocimum gratissimum*) sendo 21,21 e 11,35 vezes mais tóxico do que o limoneno, respectivamente. O óleo de eucalipto (*Eucalyptus staigeriana*) e eucalipto-limão (*Eucalyptus citriodora*) apresentaram razões de toxicidade de 10,07 e 6,88, respectivamente, quando comparados ao limoneno, seguidos pelo óleo de manjeriço (*Ocimum basilicum*) com uma razão de 6,63 e o óleo de erva doce (*Foeniculum vulgare*) com 5,05, quando comparadas ao limoneno. A razão de toxicidade na DL₉₀ seguiu o mesmo padrão descrito na DL₅₀ (Tabela 2).

Discussão

Dentre as plantas com atividade inseticida já comprovada tem-se as da família Lamiaceae, Myrtaceae e Apiaceae, tendo como espécies representantes a erva doce, manjeriço, eucalipto, alfavaca e alfavaca branca. Essas espécies já demonstraram eficiência em diversos insetos-praga, como de grãos armazenados, pragas agrícolas, mosquitos, entre outros, contudo relatos sobre a atividade inseticida desses óleos sobre *S. frugiperda* são escassos, uma vez que o controle químico é a tática preferencial mais usada no controle deste inseto (Correia *et al.* 2011, Torres *et al.* 2013, Azevedo *et al.* 2014, Carvalho *et al.* 2014, Mello *et al.* 2014).

Óleos essenciais do gênero *Ocimum* sp. podem ser compostos por fenilpropanoides como o trans-anethole, metil chavicol, ou outros terpenos como linalol, limoneno, cânfora, entre outros, e sua ação inseticida tem sido estudada nos últimos anos demonstrando potencial para o controle de diferentes ordens de pragas agrícolas. Fato comprovado por Elumalai *et al.* (2010) que estudo a toxicidade do óleo essenciais de *Ocimum basilicum*. As doses de 200, 250 e 300 ppm

ocasionaram 100% de mortalidade em lagartas do gênero *Spodoptera*. Já Cruz *et al.* (2016) estudaram o efeito do óleo de *Ocimum gratissimum* por contato tópico em lagartas de 3º instar de *S. frugiperda* e os resultados demonstraram que o efeito deste óleo não foi restrito apenas a toxicidade, parâmetros biológicos e reprodutivos também foram alterados. Essas duas espécies de *Ocimum* também se apresentaram tóxicas para lagartas de *S. frugiperda* na presente pesquisa. Vale ressaltar que o óleo de *Ocimum basilicum* apresentou as DIs 50 e 90 semelhantes ao linalool, composto majoritário responsável por 62,47% da constituição deste óleo. Este fato sugere que sua ação inseticida deve-se provavelmente a este composto.

Souza *et al.* (2010) observaram o potencial inseticida do óleo essencial de três variedades de eucalipto: *Corymbia citriodora* Hook, *Eucalyptus urograndis* e *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake (Myrtales: Myrtaceae), para o controle de *S. frugiperda*. Esses óleos foram aplicados topicamente nos insetos e pulverizados nas plantações de milho e apresentaram-se tóxicos para esta praga, resultados semelhantes aos encontrados em nossos experimentos, uma vez que as duas variedades de eucalipto (*Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus staigeriana*) apresentaram toxicidade quando aplicados topicamente em *S. frugiperda*.

O óleo de erva doce (*Foeniculum vulgare*) também demonstrou atividade inseticida para *S. frugiperda*. Esses resultados corroboram com Cruz *et al.* (2016) que após estudar a ação deste óleo através do contato tópico, observou não apenas a toxicidade para *S. frugiperda*, mais alterações em parâmetros indispensáveis ao seu sucesso no estabelecimento da cultura.

As espécies de plantas utilizadas no experimento de toxicidade demonstraram pela análise cromatográfica a presença do trans-anethole e limoneno, como compostos majoritários mais comumente encontrados. O trans-anethole foi bastante tóxico não apenas quando utilizado de forma isolada, mais todos os óleos testados, quando continham em sua constituição química este

composto, também apresentaram alta toxicidade para *S. frugiperda*, fato observado pelas comparações das DLs₅₀ e ₉₀ e suas respectivas razões de toxicidade.

O trans-anethole é um fenilpropanoide, aromático, formado pela via do ácido chiquimico, amplamente usado como substância aromatizante (Knaar & Fiusa 2010). Sua atividade inseticida foi comprovada através de estudos realizados por López & Villa Lobos (2014) com *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) e *Cryptolestes pusillus* (Schoenherr) (Coleoptera: Cucujidae), que demonstraram que a sua atividade inseticida está relacionada com a inibição da acetilcolinesterase. Como resultado ocorre um acúmulo de acetilcolina no sistema nervoso, levando o inseto a um estado de hiperexcitação e posterior morte. Este mesmo modo de ação é encontrado em inseticidas da classe dos organofosforados e carbamatos. Entretanto, até a presente pesquisa não havia relato da ação do trans-anethole em *S. frugiperda*, nem de sua ação neurosistêmica nesta praga, fato que foi observado, nos experimentos, em concentrações mais elevadas. Os insetos apresentaram-se hiperexcitados nos primeiros segundos após o contato tópico com o trans-anethole, seguidos de um estado de paralisia e posterior morte.

Pavela (2014) avaliou o efeito inseticida do óleo de aniz (*Pimpinella anisum* L.) (Apiales: Apiaceae) em *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae). Os resultados demonstraram eficiência deste óleo tanto em larvas como em adultos. No teste por contato o tempo de mortalidade após a aplicação da DL₉₉ variou entre 15 e 235 minutos, quando larvas e 9 a 180 minutos quando adultos. O autor atribuiu a atividade inseticida deste óleo ao composto majoritário trans-anethole.

Pesquisas realizadas por Sousa *et al.* (2015) com os óleos essenciais de *Nethum graveolens* L., *Cuminum cyminum* L., *Foeniculum vulgare* Mill., *Petroselinum crispum* Mill. e de 11 compostos voláteis, dentre os quais incluem-se o trans-anethole, em lagartas de *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera: Noctuidae) demonstraram um efeito letal pelo aumento na

mortalidade larval e subletal afetando a nutrição deste inseto-praga, indicado pela diminuição da taxa de consumo e redução do peso larval. Ainda, segundo os autores, o trans-anethole usado de forma isolada e encontrado na maioria desses óleos, teve influencia significativa sobre a taxa metabólica desses organismos, afetando a taxa de conversão do alimento em biomassa.

O segundo composto que apresentou maior toxicidade para *S. frugiperda* foi o monoterpeno citronelal. Estudos realizados por Labinas & Crocomo (2002) com o óleo de citronela (*Cymbopogon winterianus* J.) demonstraram sua atividade inseticida neste inseto praga. Ainda segundo os autores as larvas de *S. frugiperda* obtiveram mortalidade superior a 80% quando submetidas a concentrações de 1% do óleo de citronela. Os autores atribuíram à atividade deste óleo a grande quantidade dos majoritários citronelal e citronelol.

Por outro lado, o limoneno, foi o menos toxico a *S. frugiperda*, apresentando atividade inseticida apenas em concentrações mais elevadas. Este fato pode esta relacionado a insensibilidade desta praga ao limoneno. Esses resultados corroboram com os obtidos por Neves *et al.* (2014), que avaliaram a atividade inseticida deste composto em larvas de 3º e 4º instares de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), e constataram que a dose letal para matar 50% da população (DL₅₀) foi obtida, a partir de 95,8 mg/mL.

Como conclusão, todos os óleos e componentes majoritários testados no presente estudo apresentaram atividade inseticida para *S. frugiperda*. Porém, os óleos que apresentaram em sua constituição o trans-anethole e limoneno dentro do seu perfil químico foram os mais tóxicos. O fato foi comprovado pela elevada toxicidade do trans-anethole, quando utilizado de forma isolada, em detrimento do limoneno cuja toxicidade foi comprovada apenas em concentrações elevadas. Assim, o trans-anethole e os óleos que contém em sua constituição a associação do trans-anethole e o limoneno apresentam-se promissores no controle deste inseto praga, bem como para sua

utilização no desenvolvimento de inseticidas ecologicamente seguros e economicamente viáveis, resultando em um controle mais efetivo e na diminuição dos custos de produção.

Agradecimentos

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor, possibilitando a realização desta pesquisa.

Literatura Citada

- Adams, R.P. 2009.** Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th ed. Allured Publishing Co., Carol Stream, IL, 469p.
- Azevedo, C.F., R.L.A. Bruno & Z.G.M. Quirino. 2014.** Anatomia de plântulas de erva doce (*Foeniculum vulgare* Mill.) sob o efeito de inseticida. Rev. Biociênc. 20: 63-71.
- Carvalho, GS., L.S. Silva, L.B. Silva, M.L.S.A. Bruno, P. Ettore & T.L.P. Peres. 2014.** Mortalidade e comprometimento do desenvolvimento de *Zabrotes subfasciatus* Boh. (Coleoptera: Chrysomelidae), induzido pelo extrato de sangra d'água *Croton urucurana* Baill (Euphorbiaceae). Comun. Sci. 5: 331-338.
- Correia, J.C.R. & H.R.N. Salgado. 2011.** Atividade inseticida de plantas e suas aplicações. Rev. Bras. Pl. Med. 4: 500-506.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, F.S.C. Lopes, D.R.S. Barbosa, M. O. Breda, K.A. Dutra, C.A. Guedes, D.M.A. F. Navarro & A.A.C. Teixeira. 2016.** Sublethal effects of essential oils from *Eucalyptus staigeriana* (Myrtales: Myrtaceae), *Ocimum gratissimum* (Lamiales: Lamiaceae), and *Foeniculum vulgare* (Apiales:Apiaceae) on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econo. Entomol. 109:660-666.
- Elumalai, K., K. Krishnappa, A. Anandan, M. Govindaranjan & T. Mathivanan. 2010.** Larvicidal and ovicidal activity of seven essential oil against lepidopteran pest *S.litura* (Lepidoptera: Noctuidae). Int. J. Rece. Sci. Res. 1: 008-014.
- Fonseca, P.R.B., T.A. Mota, S.O. Kassab & M.G. Fernandes. 2012.** Seletividade de inseticidas utilizados no controle da *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) nos inimigos naturais epigéicos na cultura do milho. Rev. Caatinga 25: 14-19.
- Guimarães, R.M., P. Bueno, Q. Apgáua, G. Lima, E.M. Moreira & M.J. Luvizotto. 2014.** The impact of agricultural pesticide use on the prevalence of perinatal outcomes in Brazil. Bol. Malariol. Salud. Amb. 1: 88-94

- Haas, H.K., K.S. Piresa, E. Garcia, B.C. Garcia & F.A. Alves. 2012.** Evaluation of aqueous plant extracts on *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae). *BioAssay* 7: 1-4.
- Knaak, N. & L.M. Fiuza. 2010.** Potential of essential plant oils to control insects and microorganisms. *Neotrop. Biol. Conserv.* 5: 120-132.
- Labinas, A. M. & W. B. Crocomo. 2002.** Effect of java grass (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) essential oil on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae). *Acta Scient.* 24: 1401-1405.
- Lima, K.R., M.G. Cardoso, J.C. Moraes, M.A. Andrade, B.A. Melo & V.G. Rodrigues. 2010.** Chemical characterization and insecticidal activity of the essential oil leaves of *Ageratum conyzoides* on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biosci. J.* 26: 1-5.
- Lima-mendonça, A., A.L. Mendonça, A.E. Goulart, A.A. Nascimento & R. Nascimento. 2014.** Semioquímicos de moscas das frutas do gênero *Anastrepha*. *Quim. Nova* 37: 293-301.
- López, M.D. & M.J. Pascual-Villalobos. 2014.** Are monoterpenoids and phenylpropanoids efficient inhibitors of acetylcholinesterase from stored product insect strains?. *Flavour Fragr. J.* 1: 1-5.
- Mello, M.B., P.P. Botrel, I.R.V. Teixeira, F.C. Figueiredo, J.E.B.P. Pinto & S.K.V. Bertolucci. 2014.** Atividade inseticida do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* no controle de *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae). *Rev. Agrogeoambiental* 6: 79-86.
- Neves, R.T., J.N. Rondon, L.I.M. Silva, R.D. Peruca, L.C.V. Ítavo, C.M.E. Carvalho, A.P. Souza & J.R. Fabri. 2014.** Efeito larvicida de *Ricinus communis* L. *Reget* 18: 127-131.
- Ootani, M.A., R.W. Aguiar, A.C.C. Ramos, D.R. Brito, J.B. Silva & J.P. Cajazeira. 2013.** Use of essential oils in agriculture. *J. Biotec. Biodivers.* 4: 162-174.
- Pavela, R. 2014.** Insecticidal properties of *Pimpinella anisum* essential oils against the *Culex quinquefasciatus* and the non-target organism *Daphnia magna*. *J. Asia Pac. Entomol.* 17: 287-293.
- Pereira, A.B., P.R.H. Piccoli, N.N. Batista, N.G. Camargo & M.M.M. Oliveira. 2014.** Thermochemical inactivation of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* enteritidis by essential oils. *Ciênc. Rural* 44: 2022-2028.
- SAS Institute. 2002.** User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute INC., Cary, NC.

- Santos, G.K.N., K.A. Dutra, R.S. Barros, C.A.G. Câmara, D.D. Lira, N.B. Gusmão & M.A.F. Navarro. 2012.** Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae): chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity. *Ind. Crop. Prod.* 40: 254-260.
- Sousa, R.M., J.S. Rosa, L. Oliveirac, A. Cunha & M. Fernandes-Ferreira. 2015.** Activities of Apiaceae essential oils and volatile compounds on hatchability, development, reproduction and nutrition of *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ind. Crop. Prod.* 63: 226–237.
- Souza, T.F., Favero, S. & C.O Conte. 2010.** Bioatividade de óleos essenciais de espécies de eucalipto para o controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Bras. Agroecol.* 5: 157-164.
- Torres, A.F., O. Lasmar, G.A. Carvalho, L.V.C. Santa-Cecília, R. Zanetti & D. Oliveira. 2013.** Insecticidal activity of extracts of plants in the control of leaf cutting ant in coffee. *Coffee Sci.* 8: 371-378.
- Van Den Doll, H. & P.D.J.A. Kratz. 1963.** Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* 11: 463-471.

Tabela 1. Composição química dos óleos essenciais de *Foeniculum vulgare*, *Ocimum gratissimum*, *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus citriodora* e *Ocimum basilicum* com as porcentagens relativas dos componentes.

Composto	<i>F. vulgare</i>			<i>O. Gratissimum</i>		<i>E. Staigeriana</i>		<i>E. citriodora</i>		<i>O. basilicum</i>	
	IR ^{1,a,c}	IR ^{2,b,d}	(%)	IR ^{2,b,d}	(%)	IR ^{2,b,d}	(%)	IR ^{2,b,d}	(%)	IR ^{2,b,d}	(%)
α -Tujene	924	926	0.07	926	0.47	925	0.36	-	-	-	-
α -Pinene	932	932	11.13	932	3.47	931	3.50	931	0.58	931	0.23
Camphene	946	946	0.13	946	0.09	-	-	-	-	945	0.04
Sabinene	969	-	-	972	0.21	971	0.09	971	0.04	971	0.06
β -Pinene	974	974	1.08	974	0.63	973	2.52	973	0.94	973	0.18
Hepten-2-one<6-methyl-5>	981	-	-	-	-	987	0.22	-	-	-	-
Myrcene	988	991	1.51	991	0.89	990	0.62	992	0.20	991	0.06
α -Phellandrene	1.002	1.003	9.54	1.003	3.41	1.002	2.00	-	-	-	-
δ -3-Carene	1.008	-	-	1.009	0.04	-	-	-	-	-	-
α -Terpinene	1.014	-	-	1.016	0.39	1.014	0.14	-	-	-	-
O-Cymene	1.022	1.024	1.09	1.024	2.24	1.023	1.38	-	-	1.023	0.08
Limonene	1.024	1.029	41.82	1.028	15.63	1.029	28.73	-	-	-	-

Tabela1. Continuação.

1.8-Cineole	1.026	-	-	1.030	3.36	-	-	1.028	2.87	1.028	3.74
(Z)- β - Ocimene	1.032	-	-	1.038	2.62	1.037	0.16	-	-	-	-
(E)- β - Ocimene	1.044	1.039	3,84	1,049	0,15	1,047	0,30	1,039	0,07	1,049	0,12
Bergamal	1,051	-	-	-	-	-	-	1,053	0,21	-	-
γ -Terpinene	1,054	1,059	1,65	1,058	2,68	1,057	1,81	1,058	0,15	-	-
(Z)-Linalool oxide	1.067	-	-	-	-	1.071	0.04	-	-	1.073	0.23
Fenchone	1.083	1.086	1.16	1.088	0.86	-	-	-	-	1.087	0.04
(E)-Linalool oxide	1.084	-	-	-	-	-	-	-	-	1.089	0.16
Terpinolene	1.086	-	-	-	-	1.087	8.45	1.087	0.07	-	-
Linalool	1.095	-	-	1,099	0,12	1,099	1,35	1,101	0,30	1,107	62,47
(Z)-Roseoxide	1,106	-	-	-	-	-	-	1,110	0,27	-	-
(E)-Thujene	1,112	-	-	1,117	0,03	-	-	-	-	-	-
(E)- Roseoxide	1,122	-	-	-	-	-	-	1,126	0,13	-	-
(allo)Ocimene	1,128	-	-	1,129	0,03	-	-	-	-	-	-
(E)-Miroxide	1,140	-	-	-	-	1,144	0,15	-	-	-	-

Tabela1. Continuação.

Camphor	1,141	-	-	-	-	-	-	-	-	1,145	0,21
(neo)	1,144	-	-	1,145	0,04	-	-	-	-	-	-
Isopulegol											
Citronelal	1,148	1,159	0,36	1,154	0,09	1,152	0,36	1,157	89,59	-	-
(Z)-Isocitral	1,160	-	-	-	-	1,164	0,03	-	-	-	-
δ-Terpineol	1.162	-	-	1.167	0.06	-	-	-	-	-	-
P-Mentha-1.5- dien-8-ol	1.166	-	-	-	-	1.169	0.14	-	-	-	-
Terpinen-4-ol	1.174	-	-	1.177	0.16	1.177	1.13	-	-	-	-
(E)-Isocitral	1.177	-	-	-	-	1.182	0.08	-	-	-	-
P- Cymen-8- ol	1.179	-	-	-	-	1,188	0,23	-	-	-	-
α –Terpineol	1,186	-	-	1,190	0,11	1,192	0,55	-	-	1,198	0,06
Methyl	1,195	1,201	6,84	1,198	7,78	-	-	-	-	1,204	30,94
Chavicol											
endo-Fenchyl acetate	1,218	1,220	0,42	1,221	0,10	-	-	-	-	1,222	0,11
Citronelol	1,223	-	-	1,229	0,17	-	-	-	-	-	-
exo-Fenchyl acetate	1,229	1,234	1,17	1,234	0,17	-	-	-	-	-	-

Tabela1. Continuação.

Neral	1,235	-	-	-	-	1,242	12,16	-	-	-	-
Piperitone	1,249	-	-	-	-	1,253	0,07	-	-	-	-
(Z)- Anethole	1,249	1,262	0,07	1,253	0,17	-	-	-	-	-	-
Geraniol	1,249	-	-	1,255	0,27	-	-	-	-	-	-
Methyl	1,257	-	-	-	-	1,260	0,11	1,261	0,10	-	-
Citronellato											
Geranial	1,264	-	-	-	-	1,272	15,20	-	-	-	-
Neryl formate	1,280	-	-	-	-	1,280	0,10	-	-	-	-
Isobornil	1,283	1,286	0,07	-	-	-	-	-	-	-	-
acetate											
(E)-Anethole	1,282	1,290	17,91	1,286	34,95	-	-	-	-	-	-
(E)-Linalool	1,287	-	-	-	-	1,286	0,17	-	-	-	-
oxide acetato											
Thymol	1,289	-	-	1,292	4,47	-	-	-	-	-	-
Geranil	1,298	-	-	-	-	1,301	0,39	-	-	-	-
formate											
Carvacrol	1,298	-	-	1,301	0,04	-	-	-	-	-	-
Methyl	1,322	-	-	-	-	1,324	5,93	-	-	-	-
geranato											
Citronelil	1,350	-	-	1,354	0,03	1,353	0,53	1,354	3,24	-	-
acetate											

Tabela1. Continuação.

Eugenol	1,356	-	-	1,358	9,07	-	-	-	-	-	-
Neryl acetate	1,359	-	-	-	-	1,364	2,43	-	-	-	-
α -Copaeno	1,374	-	-	1,377	0,10	-	-	-	-	-	-
Geranil acetate	1,379	-	-	-	-	1,353	7,92	-	-	-	-
β - Bourbonene	1,387	-	-	1,387	0,05	-	-	-	-	-	-
β - Elemene	1,389	-	-	1,393	0,12	-	-	-	-	-	-
α -Cedrene	1,410	-	-	-	-	-	-	-	-	1,414	0,08
(E)- Caryophyllen e	1,417	1,421	0,08	1,422	0,65	1,420	0,22	1,423	0,87	-	-
(Z)- Thujopsene	1,429	-	-	-	-	-	-	-	-	1,433	0,10
(E)- α - Bergamato	1,432	-	-	-	-	-	-	-	-	1,438	0,70
Aromadendrene	1,439	-	-	1,442	0,02	1,440	0,22	-	-	-	-
α -Humulene	1,452	-	-	1,457	0,09	1,453	0,03	-	-	-	-
(E)- β - Farniseno	1,454	-	-	-	-	1,461	0,03	-	-	-	-

Tabela1. Continuação.

Caryophyllen e (9-epi-E)	1,464	-	-	1,465	0,05	-	-	-	-	-	-
D-Germacrene	1,484	1,485	0,01	1,486	0,29	-	-	-	-	-	-
β - Selinene	1,489	-	-	1,491	0,02	-	-	-	-	-	-
α -Selinene	1,498	-	-	1,500	0,38	-	-	-	-	-	-
Bicyclogeracrene	1,500	-	-	-	-	1,495	0,28	-	-	-	-
Farneseno (E,E) - α	1,505	-	-	1,512	1,16	-	-	-	-	-	-
Selinene (7-epi- α)	1,520	-	-	1,522	0,06	-	-	-	-	-	-
γ -Cadineno	1,513	-	-	-	-	-	-	-	-	1,519	0,11
δ -Cadinene	1,522	-	-	1,528	0,12	-	-	-	-	-	-
Hedycaryol	1,546	-	-	-	-	-	-	1,561	0,09	-	-
Elemol (E)- Nerolidol	1,548	-	-	1,553	0,11	-	-	-	-	-	-
Spathulenol	1,561	-	-	-	-	-	-	1,580	0,12	-	-
Caryophyllen e oxide	1,577	-	-	1,580	0,10	-	-	-	-	-	-
γ -Eudesmol	1,582	-	-	1,586	0,11	-	-	-	-	-	-
γ -Eudesmol	1,632	-	-	1,634	0,03	-	-	-	,-	-	-

Tabela1. Continuação.

α -Muurolol	1,644	-	-	1,644	0,04	-	-	1,655	0,07	-	-
α -Cadinol	1,652	-	-	1,657	0,07	-	-	-	-	-	-
Total			99,95		98,57		99,93		99,91		99,72

^aÍndice de retenção;

^bConstituintes listados em ordem de eluição numa coluna apolar DB-5;

^cValores listados por Adams (2009).

^dÍndice de retenção (IR) calculos através dos tempos de retenção em relação aos da série de n-alcenos (C₉-C₁₉)

Tabela 2. Dose letal (DL) em mg/g de inseto e razão de toxicidade de óleos essenciais e seus compostos majoritários em lagartas de 3º instar de *Spodoptera frugiperda*. Temperatura: 25,2 ± 1,4 °C. Umidade: 67 ± 0,7% e fotofase of 12 h.

Tratamento	N	GL	Inclinação (± EP)	DL ₅₀ (IC95%)	RT ₅₀	DL ₉₀ (IC95%)	RT ₉₀	χ ²
Erva doce- <i>Foeniculum vulgare</i>	180	4	3,10 ± 0,41	5,05 (4,13 – 5,96)	6,38	25,41 (16,14 -,56,20)	2,55	0,28
Majerição- <i>Ocimum basilicum</i>	210	2	2,29 ± 0,34	4,86 (4,02 – 6,13)	6,63	17,11 (13,26 – 25,52)	3,80	0,44
Eucalipto- <i>Eucalyptus citriodora</i>	150	3	4,99 ± 0,90	4,58 (4,09 – 5,08)	6,88	9,78 (7,96 - 14,77)	6,64	0,42
Eucalipto- <i>Eucalyptus staigeriana</i>	120	3	4,86 ± 1,56	3,20 (2,41 – 4,07)	10,07	6,98 (5,01 - 26,09)	9,31	0,64
Alfavaca- <i>Ocimum gratissimum</i>	180	4	2,66 ± 0,42	2,84 (2,34 – 3,38)	11,35	11,77 (8,26 - 22,46)	5,52	0,20
Alfavaca branca- <i>gratissimum</i>	210	5	4,58 ± 0,64	1,52 (1,36 – 1,67)	21,21	3,47 (2,90 – 4,68)	18,73	0,43
Limoneno	150	3	4,20 ± 0,64	32,24 (27,73-36,55)	—	65,02 (54,68-86,48)	—	20,81
Trans-Anethole	150	3	2,76 ± 0,43	0,027 (0,021-0,032)	1194,07	0,078 (0,059-0,12)	833,58	39,82
Citronelal	150	3	5,39 ± 0,93	0,07 (0,06 -0,08)	460,57	0,14 (0,11 – 0,18)	464,42	2,90
Linalool	150	3	2,76 ± 0,44	5,20 (4,21-6,27)	6,2	15,10 (11,38-24,78)	4,30	0,75

N = número de insetos utilizados no teste, GL= grau de liberdade, EP=erro padrão da média, IC = Intervalo de confiança; RT= razão de toxicidade, χ² = Qui-Quadrado.

CAPITULO 4

EFEITO DO TRANS-ANETHOLE E DO LIMONENO ASSOCIADOS OU NÃO SOBRE COMPONENTES NUTRICIONAIS E SEU REFLEXO EM PARÂMETROS REPRODUTIVOS E APOPTOSE TESTICULAR EM *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)¹

GLAUCILANE S. CRUZ², VALÉRIA W. TEIXEIRA³, JOSÉ V. OLIVEIRA², CAROLLINE G. DASSUNÇÃO³,
FRANKLIN M. CUNHA² E ÁLVARO A.C. TEIXEIRA³

²Departamento de Agronomia-Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av.
Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

³Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

¹Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, F.M. Cunha, D.M.A.F. Navarro & A.A.C. Teixeira. Efeito do trans-anethole e do limoneno associados ou não sobre componentes nutricionais e seu reflexo em parâmetros reprodutivos e apoptose testicular em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). A ser submetido.

RESUMO- Estudos sobre a utilização de óleos essenciais no controle de *S. frugiperda* vêm crescendo ao longo dos anos, apresentando-se como uma alternativa promissora e de menor impacto ambiental. Avaliação do perfil químico dos óleos leva ao conhecimento e utilização de seus compostos majoritários, objetivando obter melhor compreensão da ação desses na história de vida dos insetos. Assim, a pesquisa avaliou os efeitos dos compostos majoritários limoneno, trans-anethole e limoneno+trans-anethole na nutrição, reprodução e apoptose testicular em *Spodoptera frugiperda*. Lagartas foram submetidas às DL₅₀ desses compostos, por contato tópico e 48h após, foi avaliado o quantitativo total de lipídeos, proteínas, açúcar total e glicogênio. A apoptose foi avaliada nos testículos das lagartas tratadas, após 48h e após emergência avaliou-se os parâmetros reprodutivos. Todos os tratamentos reduziram a quantidade de lipídeos, proteína, açúcares totais e glicogênio quando comparados à testemunha. Os resultados mais expressivos foram obtidos com a associação, exceto o de glicogênio que não apresentou diferença entre os tratamentos. Todos os tratamentos reduziram a quantidade de ovos, dias de oviposição e longevidade dos adultos, quando comparados à testemunha. Não houve alteração nos parâmetros de pré-oviposição e pós-oviposição. Os testículos das lagartas tratadas com a associação do trans-anethole+limoneno e com o limoneno isolado apresentaram apoptose. Conclui-se que o limoneno e trans-anethole, principalmente quando associados, ocasionam efeitos adversos na nutrição e reprodução de *Spodoptera frugiperda*, alterando parâmetros indispensáveis a sua sobrevivência e seu sucesso no estabelecimento na cultura.

PALAVRAS-CHAVE: Lagarta do cartucho; compostos majoritários; nutrição; apoptose, reprodução

EFFECT OF TRANS-ANETHOLE AND LIMONENE ASSOCIATED OR NOT ON
NUTRITIONAL COMPONENTS AND THEIR REFLECTION ON REPRODUCTIVE
PARAMETERS AND TESTICULAR APOPTOSIS ON *Spodoptera frugiperda*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).

ABSTRACT - Studies on the use of essential oils in the control of *S. frugiperda* been growing over the years, being a promising alternative with less environmental impact. Evaluation of the chemical profile of the oils leads to knowledge and use of their major compounds, aiming to gain a better understanding of the action of these compounds in the life history of the insects. Thus, the study evaluated the effects of the major compounds limonene, trans-anethole and limonene + trans-anethole on nutrition, reproduction and testicular apoptosis on *Spodoptera frugiperda*. Larvae were submitted to LD50 of these compounds for topical contact and 48 hours after the experiment was evaluated the total quantity of lipids, proteins, total sugar and glycogen. Apoptosis was evaluated in the testicles of treated larvae, after 48 h and after emergence were evaluated the reproductive parameters. All treatments reduced the amount of lipids, protein, total sugars and glycogen when compared to the control. The most significant results were obtained with the association, except glycogen that did not differ between treatments. All treatments reduced the amount of eggs, day of oviposition and adult longevity, when compared to the control. There was no change in the pre-oviposition and post-oviposition parameters. The testicles of the treated larvae with the combination of trans-anethole + limonene and isolated limonene showed apoptosis. The conclusion is that limonene and trans-anethole mainly associated, cause adverse effects on nutrition and reproduction of *Spodoptera frugiperda*, changing essential parameters for survival and success on its crop establishment.

KEY-WORDS: Fall armyworm, major compounds, nutrition, apoptosis, reproduction

Introdução

O controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é feito preferencialmente pelo uso de inseticidas químicos da classe dos carbamatos, organofosforados, piretróides, entre outros. O modo de ação desses químicos ocorre de forma variada, funcionando como inibidores da acetilcolinesterase, moduladores dos canais de sódio e muitos outros. Contudo, a ação tóxica não se restringe apenas à mortalidade. Muitos desses inseticidas ocasionam reações celulares em insetos, como a apoptose (Gregorc & Ellis 2011).

Este processo de apoptose ocorre naturalmente sendo de fundamental importância para a manutenção da homeostase celular, organização tecidual e outros processos. Entretanto, agentes estressantes, como inseticidas são indutores deste processo, em resposta a um dano celular (James & Xu 2012).

Benzidane *et al.* (2011), estudando culturas de células de Kenyon, neurônios localizados nos corpos pendunculados da barata-americana (*Periplaneta americana*) (L.) (Blattaria: Blattidae) concluíram que o imidacloprido, inseticida neurotóxico, inviabiliza as células de forma dependente da concentração e tempo, contribuindo para ocorrência de morte celular.

Pesquisas realizadas por Ling & Zhang (2011) com a espécie *Nilaparvata lugens* (Stal) (Hemiptera: Delphacidae) e o inseticida fipronil, observaram nas células de indivíduos tratados, a presença de vacúolos e de autofagossomos no citoplasma, além de modificações celulares como dilatações atípicas nas vesículas do complexo de Golgi e ausência de cristas, inchaço, distorção e ruptura de membranas das mitocôndrias, indicando o processo de apoptose.

O estudo sobre o efeito da apoptose em insetos, como resposta a um estresse externo, são direcionadas apenas ao uso de inseticidas sintéticos. Porém, métodos de controle alternativo aos químicos, também são utilizados para o controle de insetos-praga. Dentre os métodos, a utilização de óleos essenciais e seus compostos majoritários, muitos deles, sendo, inclusive, já utilizados

comercialmente, a exemplo do limoneno, citronelal, piretrina, linalool, entre outros. A ação inseticida desses compostos pode ocorrer de forma isolada e/ou sinérgica, potencializando a ação dos óleos. As pesquisas realizadas com essas substâncias focam na toxicidade e repelência desses compostos (Olivo *et al.* 2008, Senra *et al.* 2013, Tak *et al.* 2015). Um estudo mais apurado dos compostos presentes nos óleos essenciais, abordando seus possíveis efeitos a nível celular, como apoptose, pode trazer uma explicação mais direcionada dos danos ocasionados por essas substâncias. Já que muitos compostos presentes nos óleos essenciais têm modo de ação semelhante a inseticidas sintéticos como o limoneno e trans-anethole cuja ação neurotóxica, semelhante aos organofosforados e carbamatos, ocorre pela inibição da acetilcolinesterase (López & VillaLobos 2014).

Pesquisas direcionadas a possíveis alterações na nutrição e reprodução dos insetos também são de fundamental importância para uma melhor elucidação do modo de ação desses compostos, possibilitando uma utilização mais direcionada dessas substâncias. Uma vez que esses parâmetros podem estar diretamente relacionados, pois muitos compostos ocasionam por deterrência ou ação direta no metabolismo, uma redução na absorção ou dificuldade de metabolização de nutrientes como lipídeos, carboidratos, glicogênio e açúcar total, ocasionando, por consequência, efeitos negativos no ciclo biológico e reprodutivo dos insetos-praga, uma vez que o sucesso biológico e reprodutivo está atrelado a uma aquisição nutritiva nos estágios imaturos (Gulla & Cranston 2007, Alves *et al.* 2013). Sendo assim, a presente pesquisa objetivou estudar o efeito dos compostos limoneno e trans-anethole, atuando de forma isolada ou associada, nos parâmetros nutricionais (lipídeos, proteínas, açúcar total e glicogênio) e seu reflexo na reprodução e apoptose testicular em *S. frugiperda*.

Material e Métodos

A pesquisa foi conduzida nos laboratórios de Entomologia Agrícola, Departamento de Agronomia (UFRPE) e no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (UFRPE).

Criação de *Spodoptera frugiperda*. As lagartas foram obtidas da criação estoque do laboratório de Entomologia Agrícola, matidas à temperatura de $25,2 \pm 1,4$ °C, umidade relativa de $67 \pm 0,7\%$ e fotofase de 12 h, sendo alimentadas em folhas de milho híbrido duplo AG 1051. As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação, com duas plantas/vaso de 5L, contendo solo + húmus de minhoca na proporção de 2:1 + 12,13g de N-P-K (formulação 4-14-8).

Obtenção dos Compostos. Os compostos limoneno e trans-anethole foram obtidos da Sigma-Aldrich® com pureza de 99%.

Teste por Contato Tópico. O teste por contato tópico foi realizado com lagartas com 10 dias de idade com peso médio de aproximadamente 78 mg (terceiro instar). Para o composto trans-anethole foram utilizadas as seguintes concentrações: 17,11; 28,38; 41,01 e 55,00 mg/g de inseto, para o composto limoneno 2, 5, 7, 9, 11 e 13 mg/g de inseto, para a associação do limoneno+trans-anethole 0,015; 0,03; 0,05; 0,07 e 0,085 mg/g de inseto, e testemunha acetona pura. Essas concentrações foram obtidas através de testes preliminares objetivando obter mortalidade em torno de 5% e 95% para o estabelecimento das doses definitivas. O bioensaio consistiu na aplicação 1,0 µL de cada tratamento na região protorácica do inseto, empregando uma seringa Hamilton™ (50 µL). As lagartas foram individualizadas em tubos de vidro de fundo chato e alimentadas com folhas de milho cultivado para a manutenção da criação de *S. frugiperda* (hybrid AG 1051). Foram realizadas três repetições para cada tratamento, sendo dez lagartas por repetição. Avaliou-se a toxicidade aguda dos compostos pela contagem de lagartas mortas 48 horas após a instalação do experimento, utilizando a análise de probit pelo programa SAS PROC

PROBIT (SAS Institute. 2002). A concentração utilizada para os experimentos subsequentes foi a DL_{50} .

Extração e Quantificação de Proteínas Solúveis Totais. Foram utilizadas lagartas de terceiro instar (10 dias), sendo cada amostra composta de quatro lagartas, e para cada tratamento foram obtidas 10 amostras, totalizando 40 lagartas/tratamento. Para determinação das proteínas solúveis utilizou-se o método de Bradford (1976). As lagartas foram alimentadas com folhas de milho híbrido duplo AG 1051, diariamente. No décimo dia do estado larval, as lagartas foram submetidas às DLs dos compostos limoneno, trans-anethole e limoneno+trans-anethole por contato tópico. Em seguida, foram individualizadas em tubos de vidro de fundo chato e processadas 48 h após a instalação do experimento. Foram imobilizadas a temperatura de 4 °C e, posteriormente maceradas em tampão fosfato de sódio (pH 7,4 e 0,1 M) na proporção de quatro lagartas/5 mL do tampão. Retirou-se com uma pipeta 1,0 mL da mistura (lagartas+tampão) e armazenado em um microtúbulo devidamente etiquetado. O procedimento foi efetuado em baixa temperatura para evitar a oxidação da amostra. Essas foram centrifugadas por 3 min. a 3.000 rpm. Após a centrifugação foram retirados 100 µL de cada amostra e colocados em tubos de vidro para centrifugação e adicionado o corante Bradford (0,01% de Comissie Blue G-250; 8,5% de ácido fosfórico e 4,7% de etanol) acrescentando o volume até 5 mL. Os tubos foram então agitados em um vortex e em seguida ficaram em repouso por 2 min. (tempo necessário para as amostras interagirem com o corante). Em seguida fez-se a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm. A unidade utilizada foi micrograma/mL. Os resultados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o Proc GLM do SAS (SAS Institute 2001).

Análises de Lipídeo, Açúcar Total e Glicogênio. Lagartas de terceiro instar (10dias) foram maceradas em tampão fosfato de sódio (pH 7,4 e 0,1M) em uma proporção de 4 lagartas/5 mL do

tampão. Cada amostra constou de quatro lagartas e para cada tratamento foram obtidas 10 amostras, totalizando 40 lagartas/tratamento. O conteúdo do lipídeo, açúcar total e glicogênio foram avaliados utilizando o método de Van Handel (1985a, b). Onde 200µL do homogeneizado foi acrescido de 200µL de sulfato de sódio mais 800 µL de metanol e clorofórmio (1:1), e centrifugado a 2000rpm durante 2 min. O precipitado foi usado para a análise de glicogênio, e o sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio onde foram separados o lipídeo e o açúcar. O lipídeo foi analisado espectrofotometricamente usando o método de ácido fosfórico-vanilina enquanto que o açúcar total e o glicogênio usando o método de ácido sulfúrico-antrona. A absorbância foi lida a 625nm. Os resultados dos teores de lipídeos, açúcares e glicogênio foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o Proc GLM do SAS (SAS Institute 2001).

Efeito dos Compostos na Reprodução e Longevidade de *S. frugiperda*. Para avaliação dos parâmetros reprodutivos, aproximadamente 100 lagartas de terceiro instar (10 dias) foram submetidas a DL₅₀ dos compostos limoneno, trans-anethole e limoneno+ trans-anethole através do contato tópico. Em seguida foram individualizadas em tubos de vidro de fundo chato, alimentadas diariamente com folhas de milho híbrido duplo AG 1051 até a formação de pupas. Essas foram sexadas e após a emergência dos adultos, foram formados casais, sendo dois por gaiola com cinco repetições por tratamento. Os casais foram acondicionados em gaiola de PVC com dimensões de 10 cm x 15 cm (diâmetro e altura) revestida internamente com papel contínuo, como substrato para oviposição. As mariposas foram alimentadas com solução de mel a 10% e mantidas em câmara climatizada. Todos os experimentos foram realizados à temperatura de $25,2 \pm 1,4$ °C, $67 \pm 0,7$ % de UR e fotofase de 12 h. As posturas foram coletadas diariamente, contabilizadas e acondicionadas em placas de Petri com dimensões de 10 cm de diâmetro e mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. Por fim, foi avaliado o período de pré-oviposição, número total

de ovos, pós-oviposição e sobrevivência dos adultos. As análises de pré-oviposição, número total de ovos e pós- oviposição foram submetidas ao teste de tukey a 5% de probabilidade pelo SAS (SAS Institute, 2002). Para assumir normalidade os dados foram transformados em $(x+1)^{1/2}$.

Através dos dados de mortalidade confirmada determinou-se a taxa média de sobrevivência, sendo os dados submetidos ao teste de Long-rank de Kaplan-Meyer pelo método de tratamento de pares utilizando o SAS Proc Lifetest (SAS Institute 2001).

Apoptose por Imunofluorescência nos Testículos de Lagartas de 3^o Instar de *Spodoptera frugiperda*. Lagartas com 10 dias de idade foram submetidas a DL₅₀, por contato tópico, dos compostos limoneno, trans-anethole e limoneno+trans-anethole e acondicionadas em tubos de vidro de fundo chato contendo folhas de milho híbrido duplo AG 1051. Após 48h as lagartas foram imobilizadas à temperatura de 4 °C e retirados os testículos. Utilizou-se o método TUNEL como indicador de apoptose, usando-se kit comercial (ApopTag® Red In Situ Apoptosis Detection Kit – S7165 – Millipore Corporation). O material coletado foi colocado em formol tamponado a 10% por 24 h. Posteriormente, foi desidratado em banhos crescentes de álcool etílico (70, 80, 90 e 100%), cada banho com duração de 20 min. Em seguida os testículos foram impregnados e incluídos em parafina. Os blocos foram então cortados em um micrótomo tipo Minot (LEICA RM 2035), colocados em banho-maria e coletados com lâminas silanizadas. Os cortes foram inicialmente desparafinados e hidratados e, logo em seguida, incubados em Tampão fosfato-salino – PBS (pH 7,4 e 0,2M) à temperatura ambiente. Posteriormente foi realizada a recuperação antigênica utilizando-se a Proteinase K (20 mg/mL). Os cortes foram então lavados em PBS (pH 7,4 e 0,2M) e receberam o tampão de equilíbrio para posterior incubação com a enzima TdT a 37 °C por 1 hora em câmara úmida. As lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com a anti-digoxigenina conjugada à Rodamina por 30 min. em câmara úmida. Posteriormente, foram enxaguadas em PBS (pH 7,4 e 0,2M) e montadas utilizando o meio de montagem

antifading associado ao corante azul fluorescente diamidino-2-fenilindole (DAPI), para marcação dos núcleos das células. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência com varredura a laser (Modelo LSM 700 Carl Zeiss), com câmera acoplada e Software Zen integrado. Todas as fotos foram tiradas com a resolução de 1.048 x 1.048, com o filtro de 415 (azul) nm e de 735 (vermelho) nm.

Resultados

Teste por Contato Tópico. A avaliação realizada para contabilizar a mortalidade das lagartas de terceiro instar demonstrou que o trans-anethole obteve maior toxicidade apresentando uma DL_{50} de 0,027 (0,29-0,36) mg/g de inseto, seguido pela associação do limoneno+transanethole com uma DL_{50} de 0,28 (0,22-0,33 mg/g de inseto e o limoneno com uma DL_{50} de 31,53 (20,98-39,25) mg/g de inseto. A razão de toxicidade para o composto limoneno e limoneno+trans-anethole em relação ao trans-anethole para a DL_{50} foi, respectivamente, de 1126,07 e 1,03 vezes (Tabela 1).

Extração e Quantificação de Proteínas Totais Solúveis. As lagartas de terceiro instar tratadas com a DL_{50} dos compostos limoneno 10,31 $\mu\text{g/mL}$, trans-anethone 9,23 $\mu\text{g/mL}$ e limoneno+trans-anethole 8,22 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram uma redução na quantidade de proteínas quando comparadas com a testemunha 13,38 $\mu\text{g/mL}$, todavia as tratadas com trans-anethole+limoneno apresentaram reduções mais significativas (Fig. 1).

Análise de Lipídeo, Açúcar Total e glicogênio As lagartas tratadas com a DL_{50} dos compostos limoneno 35,31 $\mu\text{g/mL}$, trans-anethole 25,63 $\mu\text{g/mL}$ e limoneno+trans-anethole 30,34 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram redução na quantidade de lipídeos, em comparação à testemunha 44,34 $\mu\text{g/mL}$, sendo as tratadas com o trans-anethole as que apresentaram reduções mais significativas (Fig. 2). Houve uma redução significativa de açúcar total nas lagartas tratadas com o limoneno 165,63 $\mu\text{g/mL}$, trans-anethole 198,55 $\mu\text{g/mL}$ e limoneno+trans-anethole 135,86 $\mu\text{g/mL}$, em relação à

testemunha 277,44 µg/mL, sendo as tratadas com o limoneno+trans-anethole as que apresentaram reduções mais significativas (Fig. 3). As lagartas tratadas com o composto limoneno 108,82 µg/mL, trans-anethole 91,65 µg/mL e limoneno+trans-anethole 90,07 µg/mL apresentaram redução de glicogênio, em relação à testemunha 168,08 µg/mL, contudo os tratamentos não diferiram entre si (Fig. 4).

Efeito dos Compostos Majoritários na Reprodução e Longevidade de *Spodoptera frugiperda*.

Os adultos oriundos de lagartas de terceiro instar tratadas, por contato tópico, com as DL₅₀ dos compostos limoneno, trans-anethole e limoneno+trans-anethole apresentaram uma redução significativa na quantidade de ovos e no período de oviposição (Tabela 2). Contudo, não houve alteração no período de pré- oviposição e pós-oviposição. Todos os tratamentos ocasionaram uma redução na longevidade dos adultos, em relação à testemunha (Fig. 5).

Apoptose Celular por Imunofluorescência de Testículos de lagartas de terceiro instar de *S. frugiperda*. Os testículos de lagartas tratadas com a DL₅₀ do composto trans-anethole não induziu apoptose. Entretanto, as lagartas tratadas com a DL₅₀ da associação do trans-anethole+limoneno e limoneno isolado apresentaram apoptose testicular.

Discussão

O limoneno é um monoterpeno que pode apresentar atividade por penetração via cutícula do inseto (efeito de contato), através do sistema respiratório (efeito repelente) e/ou através do sistema digestivo (efeito de ingestão). Contudo, a penetração por contato tópico mostra-se mais eficiente pela afinidade entre esse composto e a cutícula dos insetos, devido à característica lipofílica de ambos (Ibrahim *et al.* 2001, Kim *et al.* 2003). Já o trans-anethole é fenilpropanóide, que possui atividade em diversos insetos praga, dentre seus efeitos adversos podemos incluir alterações em parâmetros biológicos importantes (López & VillaLobos 2014).

Lagartas de *S. frugiperda*, quando tratadas com o limoneno, trans-anethole e sua associação, em doses elevadas, apresentaram um estado de hiperexcitação, seguido de uma paralisia e posterior morte. De acordo com Maragoni *et al.* (2012), a ação do limoneno em insetos ocorre por meio da inibição da acetilcolinesterase, levando o inseto a uma hiperexcitação, pelo acúmulo de acetilcolina, e posterior morte. Assim, como o limoneno, o trans-anethole provocam a inibição da acetilcolinesterase, fato que explica o efeito knock down nas lagartas (López & VillaLobos 2014). Sendo assim, a suscetibilidade de *S. frugiperda* a esses compostos deve-se provavelmente ao seu modo de ação, que é semelhante aos inseticidas organofosforados e carbamatos, comumente utilizados no seu controle.

Souza *et al.* (2015) estudaram a ação de alguns óleos essenciais e compostos voláteis em lagartas de *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera: Noctuidae). Os resultados demonstraram um aumento na mortalidade larval e redução na nutrição deste inseto-praga. Os autores afirmaram que o trans-anethole usado de forma isolada, teve influência significativa sobre o metabolismo, afetando a taxa de conversão do alimento em biomassa. Esses resultados corroboram com os encontrados nesta pesquisa, pois todas as lagartas tratadas com o trans-anethole de forma isolada ou associada apresentaram uma dificuldade na metabolização dos nutrientes. Fato este observado pela redução na quantidade de lipídeos, glicogênio, proteínas e açúcar total.

Estes distúrbios alimentares, seja por interrupção da alimentação ou por dificuldade na metabolização e/ou absorção de nutrientes, acarretam efeitos negativos na reprodução. Uma vez que o sucesso reprodutivo está diretamente relacionado aos nutrientes adquiridos na fase imatura (Milano *et al.* 2010). Esta interferência na capacidade reprodutiva se dá de forma indireta, pela carência nutricional, diminuindo o “*fitness*” do inseto, ou de forma direta atuando na reprodução, segundo Birah *et al.* (2010), que observaram uma redução destes parâmetros em *Spodoptera litura*

(Lepidoptera: Noctuidae), sendo esta ação atribuída ao safrol, componente majoritário do óleo de pimenta longa. Os autores sugerem que o safrol teve uma ação semelhante ao hormônio juvenil. De forma direta ou indireta, muitos compostos presentes nos óleos essenciais interferem na reprodução, reduzindo a fertilidade e fecundidade dos insetos, afetando seu estabelecimento na cultura. Esta redução na capacidade reprodutiva foi evidenciada em nossa pesquisa onde os adultos oriundos dos tratamentos com limoneno, trans-anethole e sua associação apresentaram uma redução significativa nos dias de oviposição e na quantidade de ovos.

Estudos relacionados à alteração em parâmetros nutritivos também foram realizados por Senthilkumar *et al.* (2009) com os extratos de *Eucalyptus globulus* Labill., *Cymbopogon citratus* D.C., *Artemisia annua* L., *Justicia gendarussa* L., *Myristica fragrans* Houtt., *Annona squamosa* L., e *Centella asiática* L. em larvas e adultos de *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae), os resultados demonstram que essas substâncias ocasionam uma redução significativa nas taxas de proteína, carboidrato, lipídeo e alguns aminoácidos. Silva *et al.* (2016) estudaram os efeitos do óleo essencial de citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) em lagartas de *S. frugiperda*, e os resultados demonstraram que este óleo ocasionou uma redução significativa nos mesmos parâmetros nutricionais. Resultados semelhantes aos encontrados na presente pesquisa, onde as lagartas de *S. frugiperda* quando submetidas ao limoneno, trans-anethole e a associação de ambos, apresentaram uma redução significativa no quantitativo de lipídeos, carboidratos, glicogênio e açúcar total. Segundo Yazdani *et al.* (2013) um dos efeitos ocasionados pelos inseticidas botânicos é sua interferência em parâmetros nutricionais.

A redução proteica afeta diretamente a vitelogênese, já que proteínas como vitelogenina, carboxipeptidase vitelogênica, catepsina B e lipoforina são produzidas e secretadas pelo corpo gorduroso e incorporadas aos ovócitos em desenvolvimento, e sua redução acarreta efeitos negativos na reprodução (Guizzo *et al.* 2012). De acordo com Senthilkumar *et al.* (2009) a

redução de proteínas deve-se provavelmente a interferência ocasionada pelos inseticidas botânicos nos hormônios que regulam a síntese proteica.

Alterações nos níveis de lipídeos também podem afetar a reprodução dos insetos, não apenas por serem grande fontes de energia para esses organismos, mais por atuar diretamente na ovôgenese. A exemplo, da lipoforina, uma lipoproteína que está em maior quantidade na hemolinfa, cuja função, entre outras, está no transporte do hormônio juvenil e produção de ovos pela fêmea. (Lima-Mendonça *et al.* 2014). Segundo Sharma *et al.* (2011) essas alterações decorrem do estresse ocasionado por inseticidas botânicos, através da mudança de metabolismo para catabolismo dos lipídeos.

Os carboidratos são de fundamental importância para o desenvolvimento cuticular, nas estruturas reprodutivas e no processo previtelogênico, onde são acumuladas proteínas, carboidratos e outros nutrientes importantes para o desenvolvimento dos ovos (Arrese *et al.* 2010). Além de serem também importantes fontes de energia, por serem convertidos em lipídeos e participarem da síntese de aminoácidos (Chapman 2013).

Os açúcares são importantes fontes de reserva energética. Nos insetos a trealose é o principal açúcar de reserva, e quando há necessidade de utilização, é quebrada pela trealase, atuando como fonte energética nos tecidos banhados pela hemolinfa, além de ser de fundamental importância no metabolismo dos carboidratos (Rosas-Mejía *et al.* 2015). Ainda segundo Thompson (2003) condições ambientais, estado fisiológico e nutricional afetam diretamente a aquisição e degradação da trealose nos insetos.

Portanto, qualquer interferência na aquisição destes nutrientes na fase imatura, ocasionam efeitos adversos nos insetos, resultando inclusive, no decréscimo reprodutivo, a exemplo do ocorrido nos experimentos com *S. frugiperda*, que apresentou uma redução na aquisição de lipídeos, carboidratos, glicogênio e açúcar total, quando tratadas com os compostos limoneno,

trans-anethole e sua associação, tendo sua capacidade reprodutiva afetada, pela carência nutricional.

Tak *et al.* (2015) estudaram a ação de alguns óleos e as possíveis combinações dos seus constituintes em *Trichoplusia ni* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). Os resultados demonstraram que as combinações feitas entre os principais compostos apresentaram um efeito mais significativo neste inseto, indicando uma ação sinérgica. Estes resultados corroboram com os encontrados na presente pesquisa, pois além de alterarem os parâmetros nutricionais e reprodutivos de *S. frugiperda* a associação entre os compostos limoneno+trans-anethole ocasionaram a apoptose. Este dano celular observado nos testículos das lagartas decorrente da ação sinérgica entre os compostos e do limoneno interfere na sobrevivência desta praga por atuar também na reprodução.

A apoptose representa uma via de morte celular minuciosamente programada, que envolve a interação de diversos fatores. São identificadas em alterações morfológicas, como células defeituosas ou danificadas, e como resultado ocorre uma série de reações moleculares e bioquímicas. Essas reações são desencadeadas por uma família de proteases, conhecidas como caspases (Grivicich *et al.* 2007). Muitos inseticidas ocasionam lesões celulares em insetos, com consequência, desencadeando a apoptose.

Gregorc & Ellis (2011) estudaram a ação dos inseticidas clorpirifos, imidacloprid, amitraz, fluvalinato, miclobutanil, clorotalonil, glifosato e simazina no intestino médio, glândulas salivares e ovários de abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Os resultados demonstraram que todos os inseticidas desencadearam o aumento da apoptose, quando comparadas ao controle. Estudo sobre os efeitos apoptóticos de óleos e seus compostos isolados em insetos é escasso, contudo esse efeito evidenciado nas lagartas de *S. frugiperda* tratadas com o limoneno e com a associação do limoneno+ trans-anethole deve-se provavelmente ao fato dos compostos atuarem

diretamente na reprodução, causando efeitos adversos nas gônadas. Esses resultados mostram-se promissores por demonstrar que o limoneno e o trans-anethole não apenas provocam a morte dos insetos, mas também, ocasionam uma cascata de eventos que leva à redução populacional. As lagartas tratadas com esses compostos apresentaram uma redução nutritiva, acarretando consequências reprodutivas negativas que variaram desde a redução na fecundidade até a morte celular nos testículos. O somatório desses efeitos provoca redução populacional destes organismos.

Conclui-se então que os compostos limoneno e trans-anethole, principalmente associados, na DL₅₀ ocasionam efeitos adversos na nutrição, por interferir na aquisição de lipídeos, proteínas, carboidratos e açúcar total, além de ocasionar a apoptose nas gônadas, conseqüentemente afetando a reprodução de *S. frugiperda*, influenciando assim, parâmetros indispensáveis a sua sobrevivência e sucesso no estabelecimento na cultura.

Agradecimentos

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor, possibilitando a realização desta pesquisa.

Literatura Citada

- Alves, T.J.S., G.S. Cruz, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, J.V. Oliveira, A.A. Correia, C.A.G. Câmara & F.M. Cunha. 2013.** Effects of *Piper hispidinervum* on spermatogenesis and histochemistry of ovarioles of *Spodoptera frugiperda*. *Biotech. Histochem.* 11: 1-11.
- Arrese, E.L., A.D. Howard, R.T. Patel, O.J. Rimoldi & J.L. Soulages. 2010.** Mobilization of lipid stores in *Manduca sexta*: cDNA cloning and developmental expression of fat body triglyceride lipase, TGL. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40: 91-99.
- Benzidane, Y., B. Lapied & S.H. Thany. 2011.** Neonicotinoid insecticides imidacloprid and clothianidin affect differently neural Kenyon cell death in the cockroach *Periplaneta Americana*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 101: 191-197.

- Birah, A., T.V.R.S. Sharma, S. Singh & R.C. Srivastava. 2010.** Effect of aqueous leaf extract of cloves (*Syzygium aromaticum*) on growth and development of tobacco caterpillar (*Spodoptera litura*). Indian J. Agr. Sci. 80: 534-537.
- Chapman, R.F. 2013.** The insects : structures and function. Cambridge, Cambridge University Press, 929p.
- Gregorc A. & J. Ellis. 2011.** Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. Pestic. Biochem. Physiol. 99: 200–207.
- Grivicich I., A. Regner & A.B. Rocha. 2007.** Apoptosis: programmed cell death. Rev. Bras. Cancerol. 53: 335-343.
- Guizzo, M.G., L. Abreu, A. Masuda, C. Logullo & I.S.V. Junior. 2012.** Metabolism of biomolecules in the embryogenesis of the tick *Rhipicephalus microplus* (Boophilus). Acta Sci. Vet. 40: 1010-1022.
- Gullan, P.J. & P.S. Cranston. 2007.** Os insetos: um resumo de entomologia. São Paulo, Roca, 440 p.
- Ibrahim, M.A. 2001.** Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: With special reference to limonene and its suitability for control of insect pest. Agric. Fod Sci. 10: 243-259.
- Ibrahim, M.A., K. Pirjo, A. Aflatuni & J.K. Holopainen. 2001.** Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pest. J. Agr. Sci. Finland 10:243-259.
- James, R.R. & J. Xu. 2012.** Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. J. Invertbr. Pathol. 109: 175-182.
- Kim, E.H., H.K. Kim, D.H. Choih & Y.J. Ahn. 2003.** A acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). Appl. Entomol. Zool. 38: 261-266.
- Lima-Mendonça, A., A.L. Mendonça, A.E.G. Sant'Ana & R.R. Nascimento. 2014.** Semioquímicos de moscas das frutas do gênero *Anastrepha*. Quim. Nova 37: 293-301.
- Ling, S. & R. Zang. 2011.** Effect of fipronil on brain and muscle ultrastructure of *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae). Ecotoxicol. Environ. Saf. 74: 1348-1354.
- López, M. D. & M. J. Pascual-Villalobos. 2014.** Are monoterpenoids and phenylpropanoids efficient inhibitors of acetylcholinesterase from stored product insect strains?. Flavour Fragr. J. 1: 1-5.

- Marangoni, C., F.N. Moura & F.R.M. Garcia. 2012.** Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. *Quím. Nova* 36: 1391-1394.
- Milano, P., E.B. Filho, J.R.P. Parra, M.L. Oda & F.L. Cônsoli. 2010.** Efeito da alimentação da fase adulta na reprodução e longevidade nas espécies de Noctuidae, Crambidae, Tortricidae e Elachistidae. *Neotrop. Entomol.* 39: 172-180.
- Olivo, C.J., N.M. Carvalho, J.H.S. Silva, F.F. Vogel, P. Massariol, G. Meinerzy, C. Agnolin, A.F. Morel & L.V. Viau. 2008.** Citronella oil on the control of catle ticks. *Cienc. Rural* 38: 406-410.
- Rosas-Mejía, M., A. Correa-Sandoval, C.S. Venegas-Barrera & J.V. Horta-Veja. 2015.** Preferencias entre cinco carbohidratos en *Pheidole bilimeki* (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Zool. Mex.* 31: 291-297.
- SAS Institute. 2001.** User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute INC., Cary, NC.
- Senra, T.O.S., V. Zeringóta, C.M.O. Monteiro, F. Calmon, R. Maturano, G.A. Gomes, A. Faza, M.G. Carvalho & E. Dacmon. 2013.** Assessment of the acaricidal activity of carvacrol, (E)- cinnamaldehyde, trans-anethole, and linalool on larva of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 112: 1461-1466.
- Senthilkumar, N., P. Varma & G. Gurusubramanian. 2009.** Larvicidal and adulticidal activities of some medicinal plants against the Malarial Vector, *Anopheles stephensi* (Liston) *Parasitol. Res.* 104:237-244.
- Sharma, P., L. Mohan, K.K. Dua & C.N. Srivastava. 2011.** Status of carbohydrate, protein and lipid profile in the mosquito larvae treated with certain phytoextracts. *Asina. Pac. J. Trop. Med.* 4: 301-304.
- Silva, C.T.S., V. Wanderley-Teixeira, F.M. Cunha, J.V. Oliveira, K.A. Dutra, D.M.A.F. Navarro & A.A.C. Teixeira. 2016.** Biochemical parameters of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) treated with citronella oil (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) and its influence on reproduction. *Acta Histochem.* 118:347-352.
- Soares, C.S.A., M. Silva, M.B. Costa & E.S. Bezerra. 2011.** Inseticida de óleos essenciais sobre a lagarta desfolhadora *Thyrinteina arnobia* (Stoll) (Lepidoptera: Geometridae). *Rev. Verde* 6: 154-157.
- Souza, R.M., J.S. Rosa, L. Oliveira, A. Cunha & M. Fernandes-Ferreira. 2015.** Activities of Apiaceae essential oils and volatile compounds on hatchability, development, reproduction and nutrition of *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ind. Crop. Prod.* 63: 226-237.
- Tak, J.H., E. Jovel & M.B. Isman. 2015.** Comparative and synergistic activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil constituents against the larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag. Sci.* 71: 329-336.

Thompson, S.N. 2003. Trehalose – the insect ‘blood’ sugar. *Adv. Insect Physiol.* 31: 205:235.

Van Handel, E. 1985a. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1: 302-304.

Van Handel, E. 1985b. Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1: 299-301.

Yazdani, E., J.J. Sendi, A. Aliakbar & S. Senthil-Nathan. 2013. Effect of *lavandula angustifolia* essential oil against lesser mulberry pyralid *Glyphodes pyloalis* Walker (Lep: Pyralidae) and identification of its major derivatives. *Pestic. Biochem. Physiol.* 107: 250-257.

Tabela 1. Toxicidade dos compostos limoneno, trans-anethole e limoneno+trans-anethole em lagartas de 3º instar de *Spodoptera frugiperda* submetidas ao contato topico. Temperatura: 25,2 ± 1,4 °C, Umidade: 67 ± 0.7%, e fotoperiodo de 12h.

Tratamentos	N ¹	GL ²	Inclinação (±EP)	DL ₅₀	(IC 95%) ³	RT	P	χ ²
Limoneno	30	5	5,68±1,32	31,53	20,98-39,25	1126,07	0,06	10,68
Trans-anethole	30	5	3.81±0.89	0,027	0,021-0,32	-	0,52	2,22
Limoneno+trans-anethole	30	3	5,11±0,71	0,028	0,022-0,033	1,03	0,12	5,73

Numero de insetos por tratamento. ²Grau de liberdade. ³dose letal 50 (mg/g de inseto) ⁴ razão de toxicidade. χ² qui-quadrado

Tabela 2. Período de pre-oviposição, número total de ovos, período de pós-oviposição de fêmeas de *Spodoptera frugiperda* cujas larvas foram tratadas com a DL₅₀ dos compostos limoneno, trans-anethole e limoneno+trans-anethole. Temperatura: 25,2 ± 1,4 °C. Umidade: 67 ± 0,7% e fotofase de 12h.

Tratamentos	Pré-oviposição (dias) ¹	Oviposição (dias) ¹	Pós-oviposição (dias) ¹	Número de ovos por gaiola ¹
Controle	2,4 ± 0,24a	7,6 ± 0,24a	2,6 ± 0,24a	2170,8 ± 197,02a
Limoneno	3,4 ± 0,40a	4,4 ± 0,40b	3,0 ± 0,54a	1108,4 ± 97,27b
Trans anethole	2,4 ± 0,60a	3,8 ± 0,48b	2,8 ± 0,80a	692,2 ± 126,09b
Limoneno +trans-anethole	2,4 ± 0,24a	4,2 ± 0,58b	3,8 ± 0,48a	767,4 ± 90,92b

¹Dados originais, para análise foram transformados em raiz (x+1).

¹Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P>0,05).

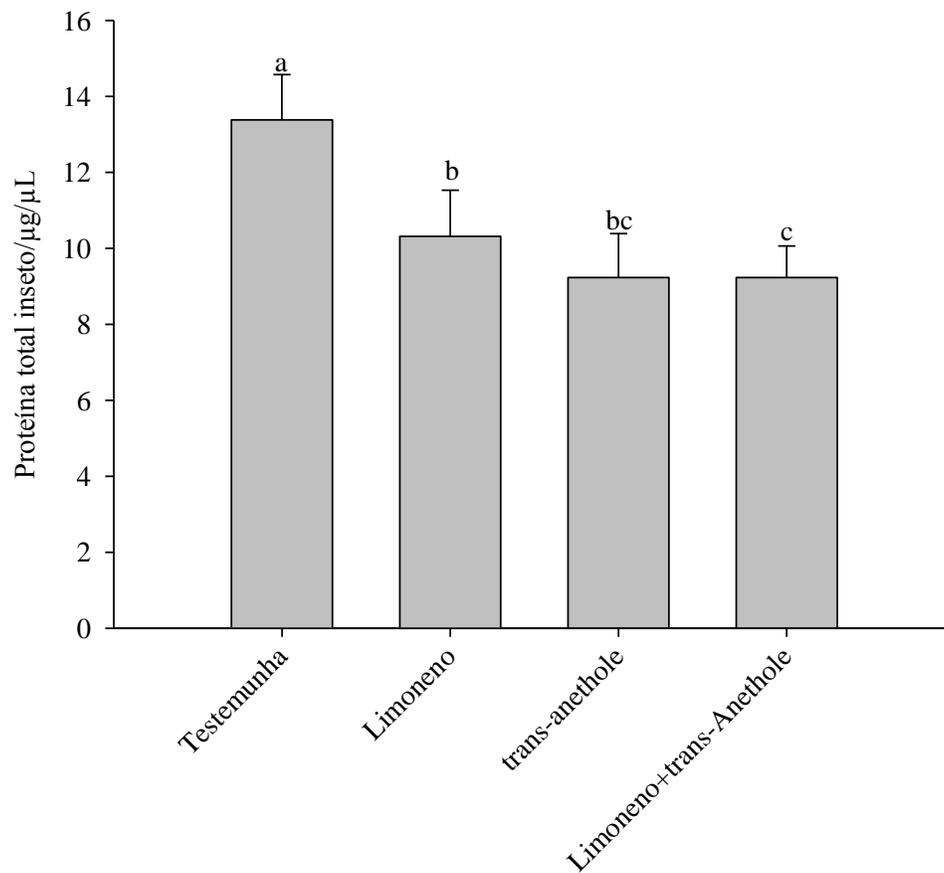


Figura 1. Quantidade de proteínas totais oriundas de lagartas de 3º instar de *Spodoptera frugiperda* submetidas a DL₅₀, por contato tópico, dos compostos limoneno, trans-anethole e limoneno+trans-anethole.

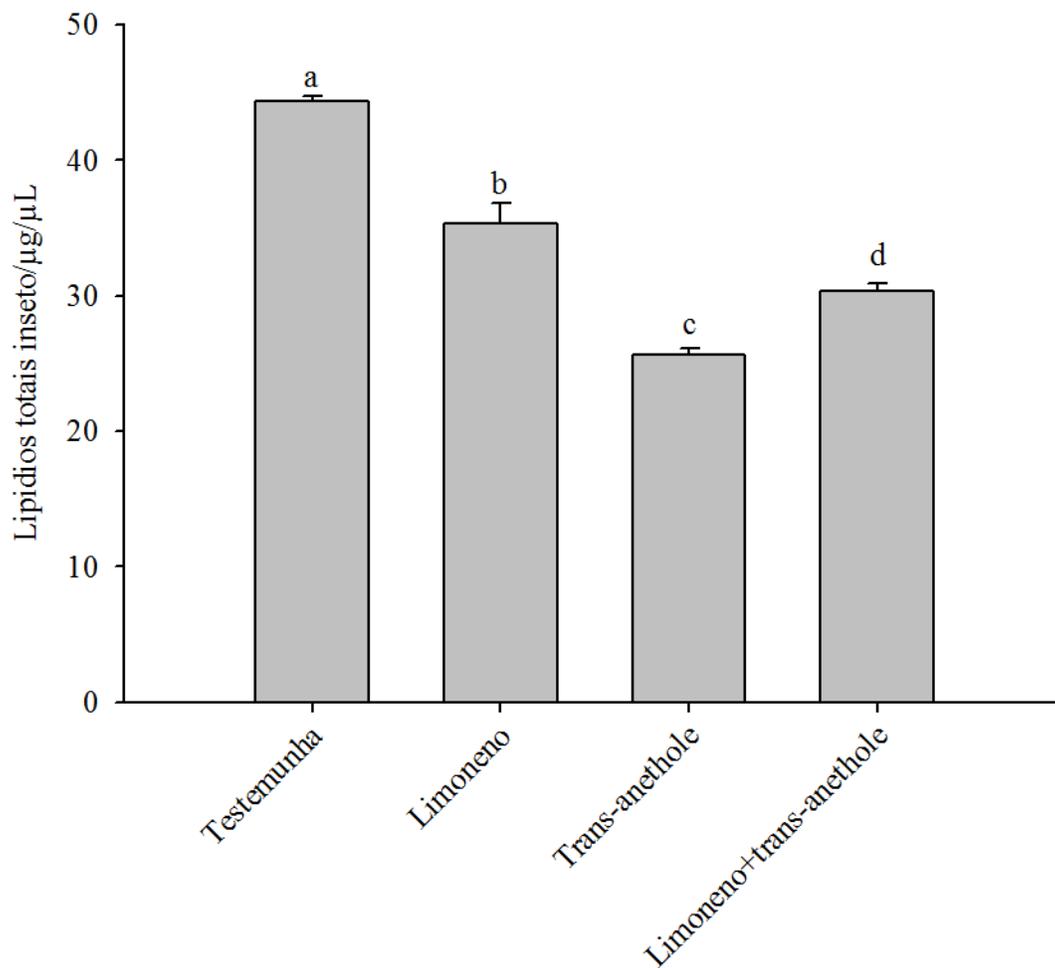


Figura 2. Quantidade de lipídios oriundos de lagartas de 3º instar de *Spodoptera frugiperda* submetidas a DL_{50} , por contato tópico, dos compostos limoneno, trans-anethole e limoneno+trans-anethole.

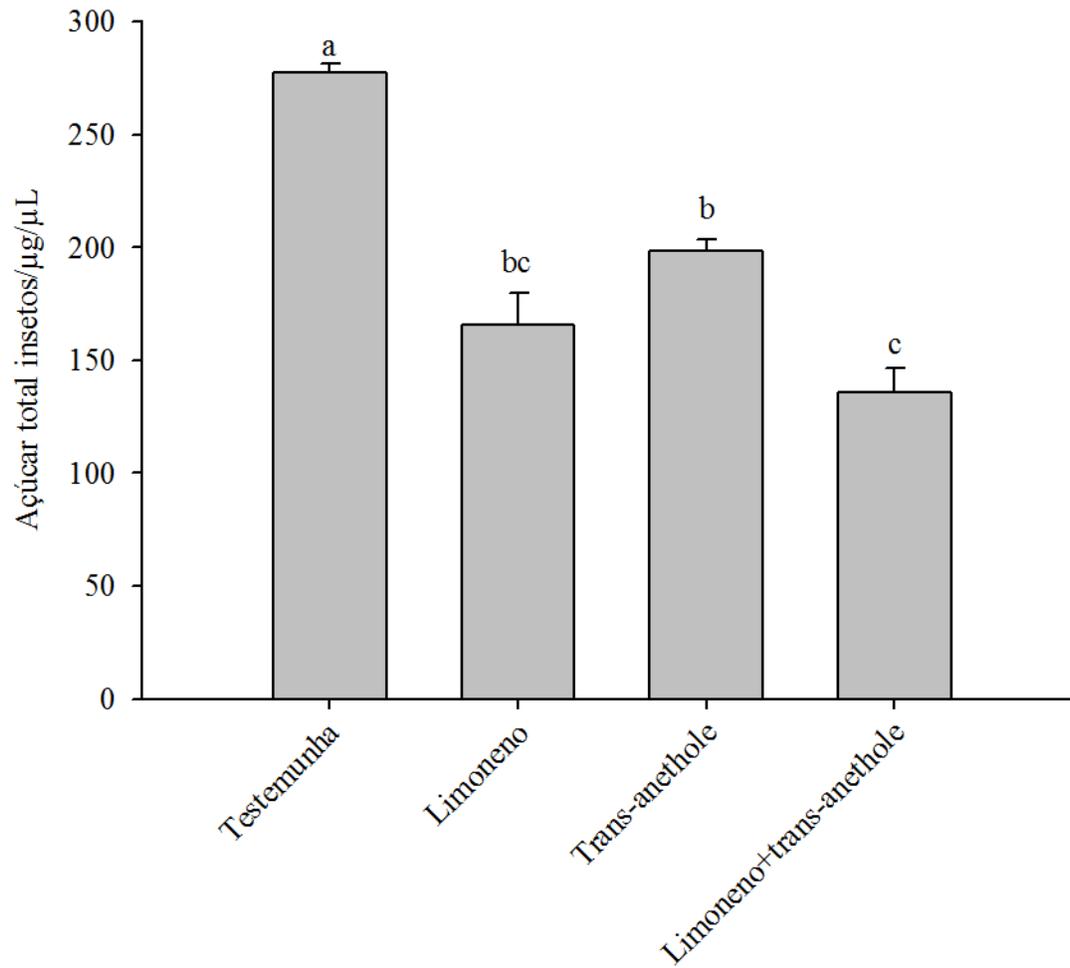


Figura 3. Quantidade de açúcar total oriundos de lagartas de 3º instar de *Spodoptera frugiperda* submetidas a DL_{50} , por contato tópico, dos compostos limoneno, trans-anethole e limoneno+trans-anethole.

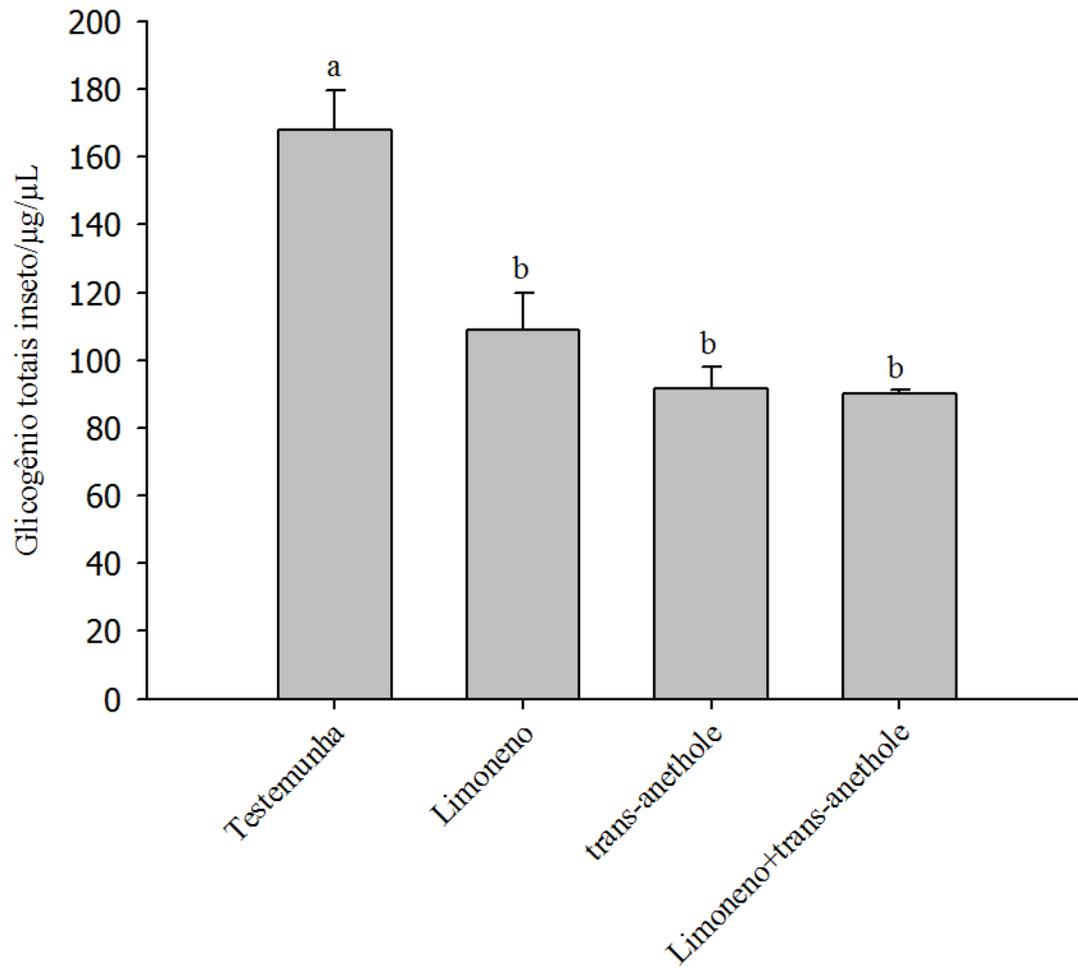


Figura 4. Quantidade de glicogênio oriundo de lagartas de 3° instar de *Spodoptera frugiperda* submetidas a DL₅₀, por contato tópico, dos compostos limoneno, trans-anethole e limoneno+trans-anethole.

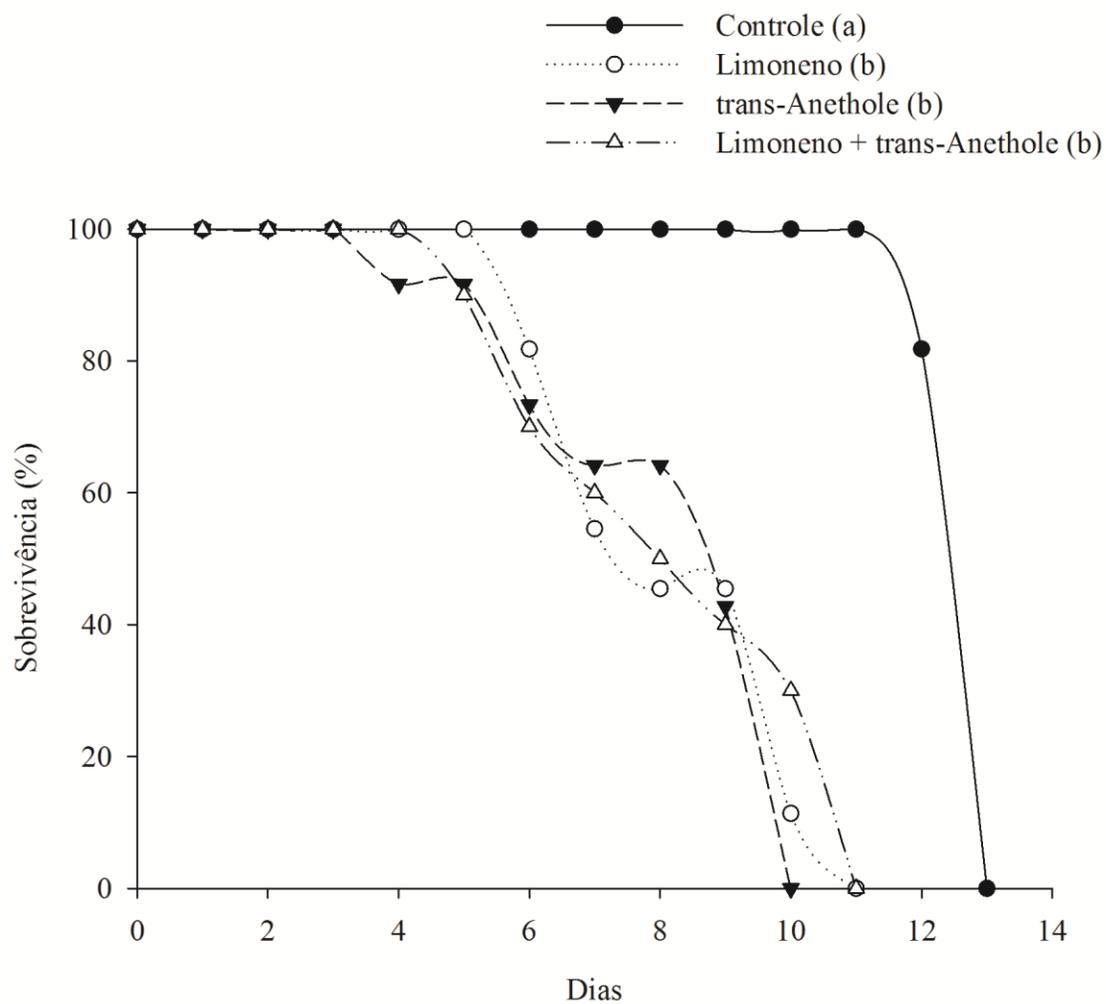


Figura 5. Sobrevivência diária de adultos oriundos de lagartas de *Spodoptera frugiperda* tratadas com a DL₅₀ dos compostos limoneno, trans-anethole e limoneno+trans-anethole. Temperatura: 25,2 ± 1,4 °C. Umidade: 67 ± 0,7% e fotofase de 12 h. ($\chi^2_{GL=3} = 34,76$; P<0,0001).

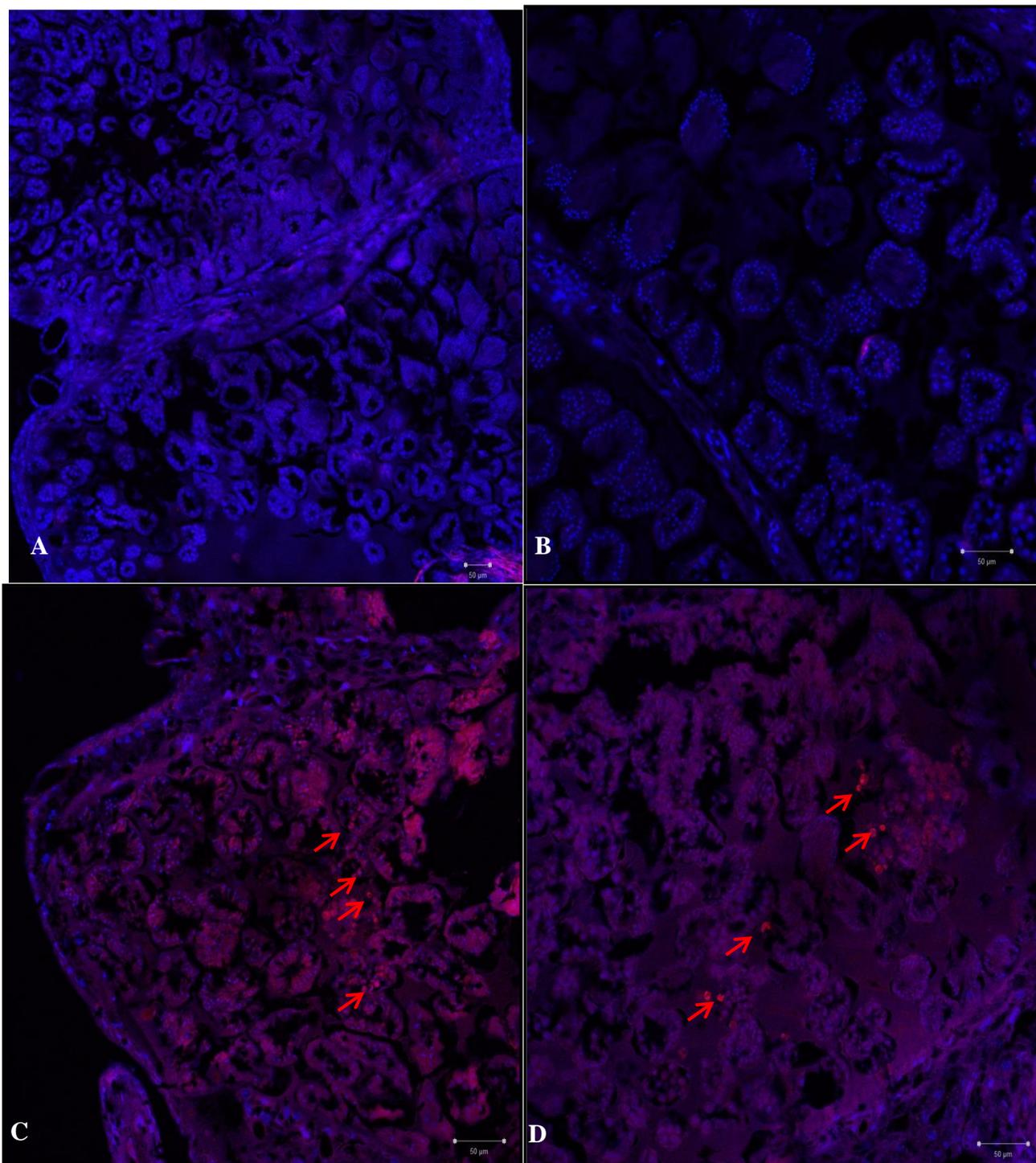


Figura 6. Corte longitudinal dos testículos de lagartas de *S. frugiperda* de 3º ínstar. A - Controle, barras= de 50 µm. B - testículo de lagartas tratadas com DL₅₀ do trans-anethole, barras= de 50 µm. C - testículo de lagartas tratadas com DL₅₀ do limoneno, barras= de 50 µm. D - testículo de lagartas tratadas com DL₅₀ do limoneno+ trans-anethole, barras= de 50 µm. Setas vermelhas - núcleos apoptóticos.

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os experimentos com os óleos essenciais e seus compostos majoritários em *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) ocasionaram não apenas a mortalidade larval, mas alterações na biologia, bioquímica e apoptose testicular desses organismos. Ainda que a tática preferencial de controle desta praga seja através da utilização de inseticidas químicos convencionais, uma melhor elucidação de substâncias naturais, como os óleos essenciais, pode auxiliar no controle eficiente e seguro deste organismo. Assim, estudos como esses são importantes por não restringir sua ação apenas a toxicidade dessas substâncias, mais elucidar seus efeitos subletais, ao longo do desenvolvimento de *S. frugiperda*, além de identificar dentro do perfil químico dos óleos quais substâncias são responsáveis por essa ação, podendo, após reconhecimento, serem sintetizadas e a partir disso, produzir inseticidas de menor impacto ambiental, adequando-se, portanto, as estratégias propostas pelos MIP (Manejo Integrado de Pragas).