

JÉSSICA EMILIANE RODRIGUES GORRI

DERIVADOS DE ANONÁCEAS NEOTROPICAIS: AÇÃO SOBRE *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville e Perrottet) (LEPIDOPTERA: LYONETIIDAE), PERFIL METABOLÔMICO e MISTURA COM INSETICIDAS SINTÉTICOS

Botucatu

2022

JÉSSICA EMILIANE RODRIGUES GORRI

**DERIVADOS DE ANONÁCEAS NEOTROPICAIS: AÇÃO SOBRE *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville e Perrottet) (LEPIDOPTERA: LYONETIIDAE),
PERFIL METABOLÔMICO e MISTURA COM INSETICIDAS SINTÉTICOS**

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutora em Agronomia
(Proteção de Plantas).**

**Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz
Lopes Baldin**

**Botucatu
2022**

G673d

Gorri, Jéssica Emiliane Rodrigues

Derivados de anonáceas neotropicais: ação sobre *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville e Perrottet) (Lepidoptera:Lyonetiidae), perfil metabólico e mistura com inseticidas sintéticos / Jéssica Emiliane Rodrigues Gorri. -- Botucatu, 2022

104 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu

Orientador: Edson Luiz Lopes Baldin

1. Bicho-mineiro-do-cafeeiro. 2. *Annona* spp. 3. Extrato etanólico. 4. Plantas inseticidas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

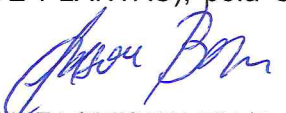
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

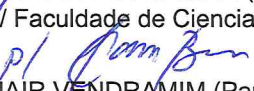
TÍTULO DA TESE: DERIVADOS DE ANONÁCEAS NEOTROPICAIS: AÇÃO SOBRE *Leucoptera coffeella*,
PERFIL METABOLÔMICO E SINERGISMO COM INSETICIDAS SINTÉTICOS

AUTORA: JESSICA EMILIANE RODRIGUES GORRI

ORIENTADOR: EDSON LUIZ LOPES BALDIN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA
(PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. EDSON LUIZ LOPES BALDIN (Participação Virtual)
Protecao Vegetal / Faculdade de Ciencias Agronomicas de Botucatu UNESP


Prof. Dr. JOSÉ DJAIR VENDRAMIM (Participação Virtual)
Entomologia e Acarologia / Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz


Profa. Dra. SIMONE POSSELENTE DE LIRA (Participação Virtual)
Universidade de São Paulo, ESALQ


Pesquisador Dr. LEANDRO DO PRADO RIBEIRO (Participação Virtual)
. / Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina


Prof. Dr. GERALDO ANDRADE DE CARVALHO (Participação Virtual)
Depto. Entomologia - Universidade Federal de Lavras

Botucatu, 16 de fevereiro de 2022

Aos meus pais, Cida Gorri e Ermelindo Gorri.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus. Obrigada Senhor por acompanhar os meus passos nesta caminhada e permitir exercer o que amo.

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Lopes Baldin, pela oportunidade em ser sua aluna. Agradeço por todos os ensinamentos e apoio. Com toda a certeza, sua orientação foi a minha melhor escolha e guardo no coração todos os aprendizados.

À Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Proteção de Plantas, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional;

Aos Professores da FCA, em especial aos do Departamento de Proteção Vegetal da FCA/UNESP, pela amizade, apoio e ensinamentos transmitidos ao longo da minha graduação e pós-graduação;

Ao Dr. Leandro do Prado Ribeiro, pelo fornecimento dos extratos vegetais e por toda orientação nos métodos empregados no estudo;

Aos amigos do Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas (LARESPI), pelo apoio e auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho. Vocês tornaram minha caminhada cheia de alegria, de incentivo e de uma amizade que eu vou levar para o resto da vida. **Quanto orgulho em ser LARESPI!**

A Professora Simone Possedente de Lira e a aluna de pós-graduação Naydja Maimone por todo auxílio e ensinamentos.

Ao time FMC estação de pesquisa de Paulínia-SP. Muito obrigada pelo apoio na reta final e compreensão.

Aos meus amigos e familiares de Rio Paranaíba-MG. Muito obrigada pelo amor e vibrações positivas mesmo de longe!

Ao CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudos concedida.

A todos que contribuíram para realização deste sonho, muito obrigada!

RESUMO

Com a expansão do mercado de café *Coffea arabica* L. em nível global, se faz necessário minimizar os impasses da produção, tais como os problemas fitossanitários relacionados ao ataque de insetos-praga. Dentre as espécies comuns na lavoura, destaca-se o bicho-mineiro-do-cafeeiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville e Perrottet) (Lepidoptera: Lyonetiidae), praga-chave para a cultura. Seu controle é realizado por aplicações de inseticidas sintéticos, sendo indispensável o estudo de alternativas que auxiliam o controle atual. Derivados botânicos são altamente estudados no controle de insetos-praga, porém, tais derivados possuem características que dificultam sua utilização a campo. Visando contornar características limitantes no emprego de inseticidas sintéticos, bem como de derivados botânicos, o uso associado das duas práticas vem sendo alvo de pesquisas focando a possibilidade de sinergismo. De tal forma, este estudo avaliou, inicialmente, a ação de extratos etanólicos provenientes de sementes de cinco espécies de *Annona* spp. (Annonaceae) sobre *L. coffeella*, para selecionar um extrato promissor. Na sequência, o extrato selecionado foi avaliado em mistura com inseticidas sintéticos em três populações da praga (Rio Paranaíba-MG, Franca-SP e Botucatu-SP) em casa de vegetação e a campo (Botucatu-SP). Extratos etanólicos de sementes de *Annona mucosa* (ESAM) foi o derivado que demonstrou maior eficiência (80% de mortalidade para lagartas de 2° - 3° instares). Em seguida, as cinco espécies foram divididas em partições hexânicas e metanólicas e novamente avaliadas quanto à bioatividade sobre *L. coffeella*. A partir dos resultados, a espécie *A. mucosa* foi selecionada para as análises metabolômicas por apresentar maior mortalidade média de lagartas e menor área foliar consumida. As frações metanólicas indicaram seis glicerofosfolipídeos, incluindo lisolecitina, os alcaloides isoquinolínicos roemerina e reticulina e o alcaloide derivado do ácido cinâmico moupinamida. Em adição, observou-se acetogeninas, divididas em duas famílias moleculares. As frações hexânicas indicaram três classes principais: ácidos graxos, ésteres e fitosteróis. Os efeitos da CL₅₀ do extrato botânico foram avaliados quanto a aspectos biológicos do inseto, revelando ação ovicida, redução de viabilidade das lagartas e redução da área foliar consumida pelo inseto. Nas três populações da praga foi possível observar ação inseticida do ESAM (na CL₅₀ previamente estimada) em mistura com os inseticidas sintéticos, sendo mais evidente nas populações de Franca e Rio Paranaíba com maior número de tratamentos,

principalmente com o inseticida Benevia 100 OD® em mistura com ESAM na CL₅₀. Em condição de campo, os tratamentos isolados e/ou em mistura com ESAM (na CL₅₀) resultaram em eficácia acima de 90% após 7 dias da aplicação (DAA) e 65% após 14 DAA sobre a formação de minas iniciais, no qual o inseticida Altacor® demonstrou elevada eficiência independentemente da combinação com ESAM (CL₅₀). Dessa forma, ESAM é uma fonte promissora de compostos com ação sobre *L. coffeella* e potente composto para uma possível mistura.

Palavras-chave: Bicho-mineiro-do-cafeeiro; *Annona* spp.; extrato etanólico; plantas inseticidas.

ABSTRACT

With the expansion of the coffee *Coffea arabica* L. market at a global level, it is necessary to minimize production impasses, such as phytosanitary problems related to the attack of insect pests. Among the common species in the field, the coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville and Perrottet) (Lepidoptera: Lyonetiidae), is a key pest for the crop. Its control is carried out by applications of synthetic insecticides, being indispensable the study of alternatives that help the current control. Botanical derivatives are highly studied in the control of insect pests, however, such derivatives have characteristics that make their use in the field difficult. In order to circumvent limiting characteristics in the use of synthetic insecticides, as well as botanical derivatives, the associated use of both practices has been the subject of research focusing on the possibility of synergism. Thus, this study initially evaluated the action of ethanol extracts from seeds of five species of *Annona* spp. (Annonaceae) on *L. coffeella*, to select a promising extract. Subsequently, the selected extract was evaluated in a mixture with synthetic insecticides in three populations of the pest (Rio Paranaíba-MG, Franca-SP and Botucatu-SP) in a greenhouse and in the field (Botucatu-SP). Ethanol extracts from seeds of *Annona mucosa* (ESAM) was the derivative that showed the highest efficiency (80% mortality for 2nd - 3rd instar caterpillars). Then, the five species were divided into hexane and methanolic partitions and again evaluated for bioactivity on *L. coffeella*. Based on the results, the species *A. mucosa* was selected for the metabolomic analysis because it presented higher average mortality of caterpillars and lower leaf area consumed. The methanolic fractions indicated six glycerophospholipids, including lysolecithin, the isoquinoline alkaloids roemerine and reticulín, and the cinnamic acid-derived alkaloid moupinamide. In addition, acetogenins were observed, divided into two molecular families. The hexane fractions indicated three main classes: fatty acids, esters and phytosterols. The effects of the LC₅₀ of the botanical extract were evaluated in terms of biological aspects of the insect, revealing ovicidal action, reduction of caterpillar viability and reduction of leaf area consumed by the insect. In the three populations of the pest, it was possible to observe the insecticidal action of ESAM (in the LC₅₀ previously estimated) in mixture with synthetic insecticides, being more evident in the populations of Franca and Rio Paranaíba with the highest number of treatments, mainly with the insecticide Benevia 100 OD® in mix with ESAM in LC₅₀. In field conditions, the treatments alone and/or in

mixture with ESAM (in LC₅₀) resulted in effectiveness above 90% after 7 days of application (DAA) and 65% after 14 DAA on the formation of initial mines, in which the Altacor® insecticide showed high efficiency regardless of the combination with ESAM (LC₅₀). Thus, ESAM is a promising source of compounds with action on *L. coffeella* and a potent compound for a possible mixture.

Keywords: Coffee leaf miner; *Annona* spp.; ethanol extract; insecticidal plants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1 - Metabolômica de extratos de Annonaceae e bioatividade sobre *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville e Perrottet) (Lepidoptera: Lyonetiidae)

- Figura 1** - Rede molecular construída a partir de dados obtidos das frações metanólicas de *Annona mucosa*41
- Figura 2** - Famílias moleculares correspondentes a acetogeninas.....42

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - Metabolômica de extratos de Annonaceae e bioatividade sobre *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville e Perrottet) (Lepidoptera: Lyonetiidae)

Tabela 1- Relação de espécies de Annonaceae avaliadas e respectivos dados de coleta.....	30
Tabela 2- Mortalidade média (\pm EP) de lagartas de 2 ^o -3 ^o instar de <i>Leucoptera coffeella</i> em folhas minadas de café após sete dias da aplicação com extratos de <i>Annona spp.</i>	38
Tabela 3- Mortalidade média (\pm EP) de lagartas de 2 ^o -3 ^o instar de <i>Leucoptera coffeella</i> em folhas minadas de café após sete dias da aplicação de extratos etanólicos de sementes de <i>Annona spp.</i> nas frações metanólicas e hexânicas.	39
Tabela 4- Área foliar média consumida (\pm EP) por lagartas de 2 ^o -3 ^o instar de <i>Leucoptera coffeella</i> em minas de folhas de café após sete dias da aplicação de extratos etanólicos de sementes de <i>Annona spp.</i> nas frações metanólicas e hexânicas.	40
Tabela 5- Identificação putativa dos picos mais intensos observados na análise de GC-MS das frações hexânicas de <i>Annona mucosa</i>	44
Tabela 6- Concentrações letais do extrato etanólico de sementes de <i>Annona mucosa</i> (ESAM) e de Anosom 1 EC [®] sobre lagartas de 2 ^o -3 ^o instar de <i>Leucoptera coffeella</i> em folhas de café.	45
Tabela 7- Médias (\pm EP) de oviposição, minas formadas e viabilidade larval de <i>Leucoptera coffeella</i> em mudas de café após aplicação de diferentes tratamentos em laboratório.....	46
Tabela 8- Médias (\pm EP) de oviposição, eclosão de ovos, área foliar consumida e emergência de <i>Leucoptera coffeella</i> em mudas de café após aplicação de diferentes tratamentos em casa de vegetação.	46

CAPÍTULO 2 - Sinergismo entre extrato etanólico de *Annona mucosa* Jacq. e inseticidas sintéticos sobre *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville e Perrottet) (Lepidoptera: Lyonetiidae)

Tabela 1 - Tratamentos utilizados nos ensaios realizados em casa de vegetação...63	
Tabela 2 - Médias de área foliar consumida (\pm EP) por lagartas de 2 ^o -3 ^o instar, instar de <i>Leucoptera coffeella</i> provenientes de Botucatu, SP após sete dias da aplicação dos tratamentos.....	68
Tabela 3 - Médias de área foliar consumida (\pm EP) por lagartas de 2 ^o -3 ^o instar, instar de <i>Leucoptera coffeella</i> provenientes de Franca, SP após sete dias da aplicação dos tratamentos.....	69
Tabela 4 - Médias de área foliar consumida (\pm EP) por lagartas de 2 ^o -3 ^o instar de <i>Leucoptera coffeella</i> provenientes de Rio Paranaíba, MG após sete dias da aplicação dos tratamentos.....	70
Tabela 5 - Médias de área foliar consumida (\pm EP) por lagartas de 2 ^o instar de <i>Leucoptera coffeella</i> provenientes de três regiões após sete dias da aplicação dos tratamentos envolvendo Altacor [®]	71

Tabela 6 - Médias de área foliar consumida (\pm EP) por lagartas de 2º instar de <i>Leucoptera coffeella</i> provenientes de três regiões após sete dias da aplicação dos tratamentos envolvendo Benevia 100 OD®.....	72
Tabela 7 - Médias de área foliar consumida (\pm EP) por lagartas de 2º instar de <i>Leucoptera coffeella</i> provenientes de três regiões após sete dias da aplicação dos tratamentos envolvendo Cartarys®.....	73
Tabela 8 - Médias de área foliar consumida (\pm EP) por lagartas de 2º - 3º instar de <i>Leucoptera coffeella</i> após sete dias da aplicação dos tratamentos em ensaio de campo em Botucatu, SP.....	76
Tabela 9 - Médias de mortalidade (\pm EP) de lagartas de <i>Leucoptera coffeella</i> após sete dias da aplicação dos tratamentos em ensaio de campo em Botucatu, SP.....	77
Tabela 10 - Médias de minas iniciais (\pm EP) de <i>Leucoptera coffeella</i> sete dias após a aplicação dos tratamentos em ensaio de campo em Botucatu, SP.....	78
Tabela 11 - Médias de minas iniciais (\pm EP) de <i>Leucoptera coffeella</i> 14 dias após a aplicação dos tratamentos em ensaio de campo em Botucatu, SP.....	79
Tabela 12 - Médias de minas (\pm EP) iniciais de <i>Leucoptera coffeella</i> aos sete e 14 dias após a aplicação dos tratamentos envolvendo Altacor® em ensaio decampo em Botucatu, SP.....	80
Tabela 13 - Médias de minas (\pm EP) iniciais de <i>Leucoptera coffeella</i> aos sete e 14 dias após a aplicação dos tratamentos envolvendo Benevia 100 OD® em ensaio decampo em Botucatu, SP.....	81
Tabela 14 - Médias de minas (\pm EP) iniciais de <i>Leucoptera coffeella</i> aos sete e 14 dias após a aplicação dos tratamentos envolvendo Cartarys® em ensaio decampo em Botucatu, SP.....	82

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	19
CAPÍTULO 1 - METABOLÔMICA DE EXTRATOS DE ANNONACEAE E BIOATIVIDADE SOBRE <i>Leucoptera coffeella</i> (Guérin-Mèneville e Perrottet) (Lepidoptera: Lyonetiidae)	24
RESUMO	24
1.1 INTRODUÇÃO.....	27
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
1.2.1 Criação-estoque de <i>Leucoptera coffeella</i>	29
1.2.2 Obtenção e manutenção de mudas de café.....	29
1.2.3 Coleta e extração do material vegetal.....	30
1.2.4 Seleção do extrato mais bioativo.....	32
1.2.5 Seleção de frações.....	32
1.2.6 Análise das frações metanólicas de <i>Annona mucosa</i>	33
1.2.7 Processamento dos dados.....	33
1.2.8 Análise das frações hexânicas <i>Annona mucosa</i> em CG-EM-MS.....	35
1.2.9 Estimativas de CL ₅₀ e CL ₉₀ do extrato etanólico de sementes de <i>Annona mucosa</i> (ESAM) sobre lagartas de <i>Leucoptera coffeella</i>	35
1.2.10 Bioatividade do ESAM sobre <i>Leucoptera coffeella</i>	36
1.2.11 Efeitos subletais do ESAM sobre <i>Leucoptera coffeella</i>	36
1.2.12 Análises estatísticas.....	37
1.3 RESULTADOS.....	37
1.3.1 Seleção do extrato mais bioativo e frações.....	37
1.3.2 Análise das frações metanólicas e hexânicas de <i>Annona mucosa</i>	41
1.3.3 Estimativas de CL ₅₀ e CL ₉₀ do extrato etanólico de sementes de <i>Annona mucosa</i> (ESAM) sobre lagartas de <i>Leucoptera coffeella</i>	46
1.3.4 Bioatividade de ESAM sobre <i>Leucoptera coffeella</i>	46
1.3.5 Efeitos subletais de ESAM sobre <i>Leucoptera coffeella</i>	47
1.4 DISCUSSÃO.....	48
REFERÊNCIAS	52
CAPÍTULO 2 - MISTURA ENTRE EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Annona mucosa</i> JACQ. E INSETICIDAS SINTÉTICOS SOBRE <i>Leucoptera coffeella</i> (Guérin-Mèneville e Perrottet) (Lepidoptera: Lyonetiidae)	58
RESUMO.....	58
2.1 INTRODUÇÃO.....	58
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	62
2.2.1 Preparo do extrato etanólico de sementes de <i>A. mucosa</i> (ESAM).....	62
2.2.2 Obtenção e manutenção de populações de <i>Leucoptera coffeella</i>	63
2.2.3 Ensaios em casa de vegetação.....	64
2.2.4 Ensaio a campo.....	65
2.2.5 Análise estatística.....	66
2.3 RESULTADOS.....	67
2.3.1 Ensaios em casa de vegetação.....	67
2.3.2 Ensaio a campo.....	76
2.4 DISCUSSÃO.....	82
REFERÊNCIAS	86

CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 97

REFERÊNCIAS.....99

INTRODUÇÃO GERAL

O café (*Coffea arabica* L.) começou a ser cultivado no século XV na Etiópia, difundindo-se posteriormente para outras regiões da África, Europa, América Central e Guiana Francesa. No Brasil, o cultivo de café foi iniciado em 1727, sendo atualmente o país maior produtor e exportador da cultura (OIC, 2021). Além de possuir elevada participação no mercado nacional, o café está diretamente envolvido com a história do Brasil, apresentando, portanto, grande importância sociocultural. A cafeicultura também possui grande expressividade no mercado internacional. Na safra 2019/20, o volume estimado dos principais países produtores localizados na América do Sul, Ásia, Oceania, México, América Central e África somaram mais de 150 milhões de sacas. Esses dados do setor cafeeiro indicam expansão de mercado em nível global, tanto na oferta quanto na sua demanda (OIC, 2021).

Diante deste grande potencial produtivo e da expressiva participação do café no agronegócio de vários países, existe a necessidade de minimizar os fatores responsáveis por perdas nas lavouras, com destaque para os problemas relacionados ao ataque de insetos-praga. No Brasil, o bicho-mineiro-do-cafeeiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville E Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) e a broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), são considerados pragas-chave para a cultura (MAGALHÃES et al., 2010; INFANTE et al., 2014; PANTOJA-GOMEZ et al., 2019), sendo responsáveis por investimentos significativos em ações de controle e monitoramento (EPA, 2012; REIS et al., 2015; CONAB, 2019).

O bicho-mineiro-do-cafeeiro acompanhou a evolução cafeeira durante sua expansão no Brasil. Áreas plantadas em regiões mais quentes cresceram, como é o caso do bioma do cerrado mineiro, onde existem fatores abióticos favoráveis a um maior número de ciclos de *L. coffeella*. Dessa maneira, o bicho-mineiro-do-cafeeiro é considerado a principal praga, cujos danos indiretos podem reduzir até 50% da produção, sendo as perdas mais acentuadas em países neotropicais como Brasil, Colômbia, México e Porto Rico (SOUZA et al., 2006; CONSTANTINO et al., 2013; NEVES et al., 2016; GIRALDO et al., 2017; PANTOJA-GOMEZ et al. 2019).

Leucoptera coffeella é um microlepidóptero monófago, com alto grau de especialização em se alimentar das folhas do cafeeiro. As fêmeas ovipositam sobre a superfície adaxial das folhas e, após a eclosão, as larvas se alimentam do parênquima

paliçádico. Ao se alimentarem, as lagartas confeccionam minas evidentes, justificando o nome comum da praga. Posteriormente, as lagartas deixam o interior das folhas para iniciar seu estágio pupal. Nessa fase, as lagartas se fixam à face abaxial das folhas, onde tornam-se crisálidas (MICHEREFF et al., 2007).

Quando as lagartas abandonam as folhas de origem para tornarem-se crisálidas, as minas se transformam em áreas necróticas, reduzindo a capacidade fotossintética das folhas (NANTES e PARRA; 1977). Segundo Souza et al. (1998), os danos relacionados ao bicho-mineiro-do-cafeeiro prejudicam a produção, o rendimento do café e, provavelmente, a longevidade do cafeeiro, não apenas pela redução da área fotossintética, mas também pela queda das folhas, fato provocado pelo aumento do nível de etileno.

Embora o conceito de Manejo Integrado de Pragas (MIP) sugira o uso associado e harmônico de métodos capazes de reduzir as populações da praga em patamares inferiores ao nível de controle estabelecido, na prática, o controle do bicho-mineiro-do-cafeeiro é realizado de forma intensiva por meio de pulverizações frequentes de inseticidas sintéticos (MENDONÇA et al, 2006). Como principal consequência do uso indiscriminado do controle químico, há vários relatos de resistência aos inseticidas, como aqueles de ação neurotóxica. Adicionalmente, essa elevada quantidade de inseticidas empregada pode provocar severos danos à saúde humana, além da contaminação de águas superficiais e subterrâneas, bem como a poluição do ar e impactos sobre organismos não-alvo (BATISTA FILHO et al., 2003; PIGNATI et al., 2014).

Dessa maneira, torna-se fundamental a disponibilização de alternativas de manejo que possibilitem um controle eficiente e mais sustentável nas lavouras de café, dada a relevância da cultura e a vasta área que ocupa mundialmente. Nesse sentido, o interesse por produtos de origem botânica para o controle de pragas vem crescendo constantemente. Assim, substâncias de menor risco ao ambiente e à saúde humana vêm sendo pesquisadas, visando à produção de alimentos mais saudáveis e livres de resíduos de pesticidas.

Os efeitos inseticidas e/ou insetistáticos provenientes de derivados botânicos decorrem da ação de metabólitos secundários, tais como alcaloides, flavonoides, saponinas e terpenoides, os quais são produzidos pelas plantas como estratégia de defesa contra herbívoros (ISMAN, 2006). Esses compostos, denominados aleloquímicos, são capazes de afetar negativamente o desenvolvimento dos insetos

(CHARIANDY et al., 1999), agir como barreiras fagodeterrentes na alimentação (BRUCE e PICKETT, 2011), além de poderem atuar como repelentes a artrópodes-praga (AKHTAR et al., 2012; ANSANTE et al., 2015).

Dentre os derivados botânicos, os extratos aquosos e, principalmente, os orgânicos tem se apresentado como uma opção mais ecológica na comparação com os inseticidas sintéticos, uma vez que são mais facilmente degradáveis (TUREK E STINTZING, 2013; FERNANDEZ-PEREZ et al., 2015); contêm vários metabólitos secundários ou ingredientes ativos diversos (reduzindo a pressão de seleção e, conseqüentemente, o surgimento de populações de pragas resistentes); possuem baixa a moderada toxicidade a mamíferos (ISMAN, 2006; ISMAN e MIRESMALLI, 2011), sendo potencialmente compatíveis aos programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (PRAKASH E RAO, 1996; GUEDES E OLIVEIRA, 2002; ZAHID et al., 2016). Diversas espécies de Asteraceae, Annonaceae, Canellaceae, Lamiaceae, Meliaceae, Piperaceae e Rutaceae têm sido apontadas como promissoras fontes de compostos com propriedades inseticidas (ZABEL et al., 2002; CESPEDES et al., 2004; TAMM, 2004), com destaque para Annonaceae, que possui ampla dispersão em nosso país (KRINSKI et al., 2014).

No Brasil, já foram registradas mais de 300 espécies de anonáceas em 29 gêneros (MAAS et al., 2013), sendo *Annona cherimola* Mill. (cherimoia), *Annona squamosa* L. (pinha ou fruta-do-conde), *A. squamosa* x *Annona cherimola* Mill. (atemoia) e *Annona muricata* L. (graviola) as de maior interesse econômico (NOGUEIRA et al., 2005; PEREIRA et al., 2011; LEMOS, 2014; SÃO JOSÉ et al., 2014). Levantamentos indicam que existem mais de 40 espécies de anonáceas com atividade inseticida, distribuídas em 14 gêneros (*Annona*, *Artabotrys*, *Asimina*, *Cardiopetalum*, *Dennettia*, *Duguetia*, *Guatteria*, *Monodora*, *Mkilua*, *Oxandra*, *Polyathia*, *Rollinia*, *Unonopsis* e *Xylopia*) (KRINSKI et al., 2014).

Os estudos com anonáceas foram intensificados a partir da descoberta de alcaloides benzilisoquinolínicos e das acetogeninas (ACG's), com grande potencial para a medicina e potentes propriedades pesticidas (RATNAYAKE et al., 1993; MCLAUGHLIN et al., 1997; BERMEJO et al., 2005; RAINER, 2007; MATSUMOTO et al., 2010; FERREIRA et al., 2013). Segundo dados da literatura, mais de 400 acetogeninas estruturalmente diversificadas já foram identificadas a partir de derivados do gênero *Annona* (BERMEJO et al., 2005). Em geral, as ACG's atuam inibindo o complexo I (NADH - ubiquinona oxidoreductase) na cadeia transportadora

de elétrons mitocondrial, levando à redução das taxas respiratórias e cardíaca e à morte celular programada ou apoptose (DEGLI ESPOSTI et al., 1994; GALLARDO et al., 2000).

Entre as espécies do gênero *Annona*, *Annona mucosa* Jacq. demonstrou significativa bioatividade sobre importantes artrópodes-praga, como *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae), *Sitophilus zeamais* Motsch (Coleoptera: Curculionidae), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (RIBEIRO et al. 2013, 2014a, 2014b; TOLOSA et al., 2014; ANSANTE et al., 2015; RIBEIRO et al., 2015, 2016; SOUZA et al., 2017, 2019). Relatos de bioatividade de *A. squamosa* e de *A. muricata* também foram documentados sobre *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) (LAETAMIA; ISMAN, 2004a; TRINDADE et al., 2011).

Embora os estudos anteriormente descritos tenham demonstrado o potencial inseticida/insetistático de derivados de anonáceas sobre importantes pragas da agricultura, ainda não existem estudos demonstrando a ação de extratos de *Annona* spp. para o manejo de *L. coffeella* em cafeeiro, motivando a realização deste estudo. Contudo, questões envolvendo período residual, estabilidade de formulações e padronizações diversas, ainda podem limitar a adoção desta prática de manejo.

Na busca de minimizar características indesejáveis envolvendo tanto o emprego de inseticidas sintéticos como de derivados botânicos, o uso associado das duas práticas tem sido crescentemente avaliado (GUEDES E OLIVEIRA, 2002; VISETSON et al., 2003; BAKI et al., 2005; ABBASSY et al., 2009; WAR et al., 2011; ZAHID et al., 2016; ALMEIDA, 2017). O manejo de pragas por meio da combinação entre moléculas sintéticas com ação inseticida já é adotado em diversos sistemas agrícolas e, nesse sentido, a associação com inseticidas/acaricidas botânicos poderia potencializar o efeito dos produtos sintéticos utilizados. Essa combinação pode também permitir a redução do uso de vários ingredientes ativos sintéticos, uma vez que diversos compostos ativos estariam envolvidos, resultando em menor pressão de seleção sobre as espécies-alvo, além da redução dos impactos ambientais provenientes da aplicação de compostos xenobióticos e custos de controle relacionados (CURTIS, 1985; SAHAYARAJ e AMALRAJ, 2005; MORALES-RODRIGUEZ E PECK, 2009)

Diante da atividade biológica promissora dos extratos de anonáceas e da atual necessidade de métodos de controle mais sustentáveis e de menor impacto ao meio ambiente e à saúde humana, os objetivos deste estudo foram: a) avaliar a bioatividade de extratos etanólicos provenientes de sementes de *Annona muricata*, *A. mucosa*, *A. reticulata* L., *A. sylvatica* A. St.-H. e *A. montana* Macf. sobre *L. coffeella*, visando selecionar o derivado botânico mais promissor e realizar seu estudo metabolômico e b) avaliar a ação inseticida a partir da combinação de inseticidas sintéticos comerciais e o extrato promissor, visando a disponibilização de uma tática auxiliar para o controle do bicho-mineiro-do-cafeeiro.

CAPÍTULO 1

Metabolômica de extratos de Annonaceae e bioatividade sobre *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville e Perrottet) (Lepidoptera: Lyonetiidae)

RESUMO

Extratos de Annonaceae vêm se destacando nas últimas décadas como uma alternativa promissora para o manejo integrado de pragas (MIP) em sistemas de produção agrícola. Derivados botânicos desta família são ricos em acetogeninas, que constituem nos compostos majoritários e, geralmente, estão relacionados aos efeitos inseticidas/insetistáticos. Visando selecionar extratos etanólicos de espécies de *Annona* com potencial para o manejo do bicho-mineiro-do-cafeeiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville e Perrottet) (Lepidoptera: Lyonetiidae), bem como aprofundar o conhecimento sobre os componentes químicos presentes em seus derivados, este estudo avaliou a bioatividade de extratos etanólicos de sementes de *Annona muricata* L., *Annona mucosa* Jacq., *Annona reticulata* L., *Annona sylvatica* A. St.-H. e *Annona montana* Macf. sobre *Leucoptera coffeella*. Na sequência também foi realizada a análise metabolômica dos derivados, visando identificar os possíveis componentes químicos envolvidos nas respostas do inseto. Com base nos ensaios preliminares, o extrato etanólico de *A. mucosa* foi o mais eficiente (80% de mortalidade para lagartas de 2-3º ínstar), embora as demais espécies tenham revelado algum potencial. Em seguida, as cinco espécies foram divididas em partições hexânicas e metabólicas e novamente avaliadas quanto à bioatividade sobre *L. coffeella*. A partir dos resultados, a espécie *A. mucosa* foi selecionada para as análises metabolômicas. As frações metanólicas indicaram seis glicerofosfolipídeos, incluindo lisolecitina, os alcaloides isoquinolínicos roemerina e reticulina e o alcaloide derivado do ácido cinâmico moupinamida. Em adição, observou-se acetogeninas, divididas em duas famílias moleculares. As frações hexânicas indicaram três classes principais: ácidos graxos, ésteres e fitosteróis, respectivamente. Os valores de CL₅₀ e CL₉₀ do extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* (ESAM) foram inferiores ao do inseticida Anosom 1 EC®, indicando maior toxicidade sobre as lagartas de 2 - 3º ínstar de bicho-mineiro-do-cafeeiro. Os efeitos da CL₅₀ foram avaliados quanto a aspectos biológicos do inseto, revelando ação ovicida, redução de viabilidade das lagartas e redução da área

foliar consumida pelo inseto. De forma inédita, ESAM apresentou significativa bioatividade para *L. coffeella*, indicando potencial para o manejo de artrópodes-praga minadores em culturas perenes, contribuindo de maneira valiosa para o manejo integrado de pragas nas culturas, especialmente para produtores orgânicos ou aqueles que procuram a redução de resíduos de inseticidas sintéticos na cultura cafeeira.

Palavras-chave: Bicho-mineiro-do-cafeeiro; *Annona* spp.; extrato etanólico; plantas inseticidas.

ABSTRACT

Annonaceae extracts have been highlighted in recent decades as a promising alternative for integrated pest management (IPM) in agricultural production systems. Botanical derivatives of this family are rich in acetogenins, which constitute the major compounds and are generally related to insecticidal/insecticidal effects. Aiming to select ethanolic extracts of *Annona* species with potential for the management of the coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville and Perrottet) (Lepidoptera: Lyonetiidae), as well as to deepen the knowledge about the chemical components present in its derivatives, this study evaluated the bioactivity of ethanolic extracts from seeds of *Annona muricata* L., *Annona mucosa* Jacq., *Annona reticulata* L., *Annona sylvatica* A. St.-H. and *Annona montana* Macf. on *Leucoptera coffeella*. Subsequently, the metabolomic analysis of the derivatives was also performed, aiming to identify the possible chemical components involved in the insect's responses. Based on preliminary tests, the ethanolic extract of *A. mucosa* was the most efficient (80% mortality for 2-3rd instar caterpillars), although the other species showed some potential. Then, the five species were divided into hexane and metabolic partitions and again evaluated for bioactivity on *L. coffeella*. From the results, the species *A. mucosa* was selected for the metabolomic analyses. The methanolic fractions indicated six glycerophospholipids, including lysolecithin, the isoquinoline alkaloids roemerine and reticuline, and the cinnamic acid-derived alkaloid moupinamide. In addition, acetogenins, divided into two molecular families, were observed. The hexane fractions indicated three main classes: fatty acids, esters and phytosterols, respectively. The LC50 and LC90 values of the ethanolic extract of *A. mucosa* seeds (ESAM) were lower than those of the insecticide Anosom 1 EC®, indicating greater toxicity on the 2 - 3rd instar caterpillars of the coffee leaf miner. The effects of LC50 were evaluated in terms of biological aspects of the insect, revealing ovicidal action, reduction of caterpillar viability and reduction of leaf area consumed by the insect. In an unprecedented way, ESAM showed significant bioactivity for *L. coffeella*, indicating potential for the management of arthropod-pest miners in perennial crops, contributing in a valuable way to the integrated management of pests in crops, especially for organic producers or those seeking to reduce of synthetic insecticide residues in coffee crops.

Keywords: Coffee leaf miner; *Annona* spp.; ethanolic extract; insecticidal plants.

1.1 INTRODUÇÃO

Diante da importância socioeconômica do setor cafeeiro (ICO, 2021), é crescente a necessidade de minimizar os fatores responsáveis por perdas na produção, com destaque para os problemas relacionados ao ataque de insetos-praga. Na região Neotropical, onde estão os principais países produtores do grão, a incidência do bicho-mineiro-do-cafeeiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville e Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) tem acompanhado a expansão das áreas de cultivo, sendo considerada praga-chave para a maioria das regiões produtoras (NEVES et al., 2006; RIGHI et al., 2013; GIRALDO et al., 2017; DANTAS et al., 2020).

Os danos provocados por *L. coffeella* podem reduzir em até 50% a produção da cultura (RIGHI et al., 2013). Trata-se de um microlepidóptero monófago com alto grau de especialização em se alimentar das folhas do cafeeiro. As fêmeas ovipositam na superfície adaxial das folhas e, após a eclosão, as larvas se alimentam do parênquima paliçádico. Ao se alimentar, as lagartas confeccionam minas evidentes, justificando o nome comum da praga. Posteriormente, as lagartas deixam o interior das folhas para iniciar seu estágio pupal. Nessa fase, as lagartas se fixam à face abaxial das folhas onde tornam-se crisálidas (PARRA, 1985; RIGHI et al., 2013).

Quando as lagartas abandonam a folha de origem para formar as crisálidas, as minas se transformam em áreas necróticas, reduzindo a capacidade fotossintética das mesmas (NANTES e PARRA, 1977). Segundo Souza et al. (1998), os danos relacionados ao bicho-mineiro-do-cafeeiro prejudicam a produção, o rendimento do café e, provavelmente, a longevidade do cafeeiro, não apenas pela redução da área fotossintética, mas também pela queda das folhas, fato provocado pelo aumento do nível de etileno.

O manejo do bicho-mineiro-do-cafeeiro é realizado principalmente com aplicações de inseticidas sintéticos (MENDONÇA et al., 2006) e, em raras ocasiões, por meio de agentes de controle biológico (OLIVEIRA et al., 2003). Entretanto, anualmente, é perceptível a perda de eficiência proporcionada pelos principais inseticidas disponíveis no mercado, além dos crescentes relatos do surgimento de populações resistentes do inseto aos ingredientes ativos mais utilizados (FRAGOSO et al., 2002, 2003; JARAMILLO et al., 2006; COSTA et al., 2016 e GONRING et al., 2019). Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de novos produtos que sejam eficientes e, ao mesmo tempo, apresentem baixa toxicidade a organismos não alvo,

menor impacto ambiental, ou mesmo que possam potencializar o controle de *L. coffeella*, por meio de associações.

Nesse sentido, os efeitos inseticidas e/ou insetistáticos de metabólitos secundários (aleloquímicos) provenientes de derivados de plantas podem representar uma alternativa valiosa a ser implementada no manejo de artrópodes-praga (ISMAN, 2006). Entre o vasto número de plantas estudadas com potencial para o controle de insetos-praga, a família Annonaceae destaca-se pela ação inseticida de algumas espécies, o que é geralmente associada à presença de alcaloides e constituintes não alcaloides (LEBOEUF et al., 1980; ZAFRA-POLO et al., 1996; CAVÉ et al., 1997; SANTOS E SALATINO, 2000; CALOPRISCO et al., 2002; GONZÁLEZ-ESQUINCA et al., 2014; LIAW et al., 2016).

A mistura complexa de compostos químicos provenientes de Annonaceae pode apresentar diferentes modos de ação, como interferência na atividade hormonal de lepidópteros (BLESSING et al., 2010), inibição da produção de ATP por meio da interferência no complexo I mitocondrial (NADH ubiquinona oxidoreductase) e, conseqüentemente, apoptose celular (ALALI et al., 1999). Com base nesse potencial, alguns estudos demonstraram alterações morfológicas em *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (RIBEIRO et al., 2016; BRITO et al., 2020), indução de autofagia em espécies de Diptera (COSTA et al., 2016), redução na taxa de crescimento e, conseqüentemente, na eficiência de conversão do alimento ingerido por *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (SOUZA et al., 2017, 2019), além de mortalidade de ninfas e adultos de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) (SOARES et al., 2021).

Embora os derivados de anonáceas tenham demonstrado promissora atividade inseticida sobre diversos artrópodes-praga de importância para agricultura, até o presente momento não existem estudos que avaliaram o potencial de derivados de Annonaceae sobre *L. coffeella*, estimulando a realização de novas pesquisas. Assim, este estudo avaliou a bioatividade de extratos etanólicos provenientes de sementes de *Annona muricata* L., *Annona mucosa* Jacq., *Annona reticulata* L., *Annona sylvatica* A. St.-H. e *Annona montana* Macf. sobre o inseto. Para tanto, foram realizados ensaios para seleção da espécie mais promissora, bem como estimadas as concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀), além da avaliação de efeitos subletais. Adicionalmente, também foi estudado de forma inédita a metabolômica dos derivados, relacionando-a com a bioatividade observada sobre o bicho-mineiro-do-cafeeiro. Nossos resultados podem

servir de base para futuros estudos, prospecção de novas moléculas inseticidas, bem como oferecer alternativas mais sustentáveis para o manejo alternativo de *L. coffeella*.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados nos Laboratórios de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas - LARESPI, pertencentes ao Departamento de Proteção Vegetal, da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Campus de Botucatu, SP. Os ensaios laboratoriais foram conduzidos sob condições controladas ($T = 26 \pm 2^\circ\text{C}$, $UR = 65 \pm 10\%$ e fotofase = 14h), enquanto os testes realizados em casa de vegetação foram conduzidos sob condições de temperatura e umidade parcialmente controladas (temperatura média de $31,5^\circ\text{C}$, com máxima de $39,5^\circ\text{C}$ e mínima de $19,3^\circ\text{C}$; U.R. média de 68%, com máxima de 81% e mínima de 20%; luz natural). O ensaio a campo foi instalado na Fazenda Experimental da FCA/UNESP ($22^\circ 50' 04''\text{S}$ e $48^\circ 25' 33''\text{O}$), Campus de Botucatu, SP.

1.2.1 Criação-estoque de *Leucoptera coffeella*

Uma criação-estoque de bicho-mineiro-do-cafeeiro foi mantida com a finalidade de disponibilizar uma quantidade suficiente de insetos para os ensaios que foram realizados. Folhas de café com crisálidas de *L. coffeella* foram coletadas em área experimental da FCA/UNESP e alocadas no interior de gaiolas metálicas (0,5 x 0,45 x 0,45 m) revestidas por tela antiáfideo (qual malha? 1 mm?). Após a emergência dos adultos, foram oferecidas porções de algodão embebidas em solução com mel a 10% (v/v?), além mudas novas de café (sem tratamento químico) para oviposição (Figura 1). As folhas contendo ovos eram retiradas e realocadas em outras gaiolas (mesmas especificações), destinadas às lagartas. Após o completo desenvolvimento larval, as folhas contendo crisálidas eram transferidas de volta à gaiola de adultos. Essa criação-estoque (desenvolvida pelo LARESPI e adaptada de PARRA, 1985) permitiu o fornecimento de insetos durante todo o estudo.

1.2.2 Obtenção e manutenção de mudas de café

Mudas de café, variedade Catuaí Vermelho IAC 144, foram mantidas em vasos de 1,7L contendo solo esterilizado (latossolo vermelho escuro), areia e matéria orgânica em uma proporção de 1:1:1 (v:v:v), e substrato (Plantmax[®]) na proporção de 3:1 (v:v) para realização dos ensaios. As mudas foram acondicionadas em casa de

vegetação e utilizadas nos ensaios quando apresentavam aproximadamente 10 pares de folhas. Nenhum controle fitossanitário foi realizado antes dos ensaios, a fim de evitar interferências nas avaliações.

1.2.3 Coleta e extração do material vegetal

As espécies de Annonaceae estudadas no presente trabalho foram *A. muricata* L., *A. mucosa* Jacq., *A. reticulata* L., *A. sylvatica* A. St.-H. e *A. montana* Macf. (Tabela 1). Vouchers das plantas foram previamente identificados pelo Dr. Renato Mello-Silva [Departamento de Botânica, Instituto de Biociências/Universidade de São Paulo (IB/USP)].

As sementes dos frutos maduros das espécies coletadas foram secas em estufa com circulação de ar forçada a 40°C por 72h. Em sequência, foram moídas em moinho de facas para a obtenção do pó fino, sendo então armazenadas em frascos de vidro hermeticamente fechados e mantidos sob refrigeração (-10°C) até a sua utilização. Os pós foram macerados em etanol (na proporção 1:5 m v⁻¹) e mantidos em frascos hermeticamente fechados por três dias; então foram filtrados por meio de papel filtro, sendo este processo repetido por três vezes. O solvente remanescente na solução filtrada foi eliminado em rotaevaporador à temperatura de 50°C e à pressão de -600mmHg.

Tabela 1 - Relação de espécies de Annonaceae avaliadas e respectivos dados de coleta

Espécies	Parte utilizada	Origem	Data de coleta	Nº de voucher
<i>Annona muricata</i> L.	Sementes	Campus da ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil (22°42'25,4"S; 47°37'43,9"W; altitude 576m)	16/03/2017	121892
<i>Annona mucosa</i> Jacq.	Sementes	Campus da ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil (22°42'28,5"S; 47°37'59,6"W; altitude 534m)	16/03/2017	120985
<i>Annona sylvatica</i> A. St.-H.	Sementes	Pomar doméstico, Erval Seco, RS, Brasil (27°25'41,8"S; 53°34'11,2"W; altitude 466m)	16/03/2017	121205
<i>Annona reticulata</i> L.	Sementes	Campus da ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil (22°42'51,4" S; 47°37'38,8" W; altitude 548m)	01/03/2011	Ribeiro 11
<i>Annona montana</i> Macf.	Sementes	Campus da ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil (22°42'28,2" S; 47°37'59,4" W; altitude 537m)	21/03/2011	Ribeiro 13

1.2.4 Seleção do extrato mais promissor

Visando a seleção do extrato mais promissor, foi realizado um ensaio preliminar com as espécies vegetais em laboratório. Para tanto, foram utilizadas mudas de café (*Coffea arabica* L.) mantidas em vasos de 1,7 L com solo e substrato Plantmax® na proporção 3:1(v/v?) e sob iluminação com lâmpadas dos tipos fluorescente “super luz do dia” (20 W) e fluorescente “plant-light” (Grolux F 20 W T12). Os extratos etanólicos das cinco espécies de Annonaceae foram solubilizados em uma solução de solvente [acetona: metanol (1:1, v.v⁻¹)] com uma concentração de 1,2% m.v⁻¹. A solução obtida foi aplicada, de maneira tópica com microatomizador acoplado à uma bomba pneumática, sob pressão de 0,5 Kgf.cm⁻² sobre folhas recém-minadas (≈ 0,5 cm de diâmetro) com lagartas entre o 2º e 3º instar, em um volume pré-estabelecido para cobrir a área foliar total.

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com nove tratamentos, sendo cinco extratos etanólicos de *Annona* spp. (*A. muricata*, *A. mucosa*, *A. reticulata*, *A. sylvatica* e *A. montana*.); dois controles positivos constituídos pelos inseticidas comerciais Benevia 100 OD® (ciantraniliprole) na dose recomendada de bula e Anosom 1 EC® (inseticida comercial à base de extrato de sementes de *Annona squamosa* L., sendo seu componente majoritário a acetogenina anonina utilizado a 1,2% m.v⁻¹) e duas testemunhas negativas constituídas pelo solvente [acetona: metanol (1:1)] e água. Cada tratamento foi repetido 15 vezes e cada repetição foi representada por uma muda de café com 10 minas iniciais de bicho-mineiro-do-cafeeiro. A avaliação quanto ao efeito larvicida dos tratamentos foi feita aos sete dias após a aplicação (DAA), por meio da abertura das minas e observação das lagartas vivas ou mortas.

1.2.5 Seleção de frações

Os extratos etanólicos das sementes de *Annona* spp. foram fracionados em partições hexânicas e metanólicas. Com os extratos obtidos foram realizados bioensaios para verificar a ação inseticida sobre *L. coffeella*, seguindo o mesmo método de bioensaio descrito anteriormente; entretanto, neste caso, adotou-se um arranjo fatorial simples (2 x 5) + 2, sendo constituído por duas partições (extratos hexânicos e metanólicos), cinco espécies de *Annona* spp. e dois fatores extras: controle com água e solução de solventes. O ensaio seguiu um delineamento inteiramente casualizado e cada tratamento foi composto por cinco repetições. Cada

repetição foi constituída por dez folhas de café com minas iniciais contendo larvas de 2 a 3º ínstaes de *L. coffeella*. Para as análises de perfil químico via cromatografia líquida e gasosa, foram utilizadas triplicatas das frações metanólicas e hexânicas.

1.2.6 Análise das frações metanólicas de *Annona mucosa*

Para análise do perfil metabólico das frações metanólicas de *A. mucosa* via cromatografia líquida de ultra eficiência e espectrometria de massas in tandem, estas foram ressuspendidas em acetonitrila (ACN) na concentração de 1 mg mL⁻¹ e injetadas no equipamento Acquity UPLC H Class - Xevo G2-XS qTOF (Waters). A fase estacionária utilizada foi uma coluna Acquity UPLC BEH C18 (1,7 µm, 2,1 x 100 mm) e a fase móvel foi um gradiente de 10 a 100% ACN + 0,1% ácido fórmico (FA) em H₂O + 0.1% FA (por 12 min), seguido de 100% ACN + 0.1% FA em modo isocrático (3 min), e 5% ACN + 0.1% FA (3 min), com vazão de 400 µL min⁻¹. Dados a nível MS1 foram adquiridos na faixa de m/z entre 100 e 1500, com tempo de scan de 150 ms. A aquisição de dados a nível MS2 foi realizada em modo DDA (data dependent acquisition), com cinco scans MS2 adquiridos por ciclo a partir dos cinco íons MS1 mais abundantes. A energia de ionização foi 1,2 Kv, os valores de m/z foram gravados em modo centróide e as detecções foram performadas em modo positivo. Brancos referentes aos solventes utilizados foram analisados nas mesmas condições acima citadas.

1.2.7 Processamento dos dados

Os arquivos com os dados de MS2 foram convertidos para o formato aberto. mzXML através do software MSConvert (CHAMBERS et al., 2012) e processados com o software Mzmine 2 (v. 2.53) (PLUSKAL et al., 2010). A detecção de massas foi realizada com os níveis de ruído atribuídos como 1.0E4 para MS1 e 1.0E1 para MS2. Os cromatogramas foram construídos considerando-se o tempo mínimo de duração dos picos como 0,1 minuto, a altura mínima dos picos como 1.0E4 e a tolerância para m/z como 20 ppm. A deconvolução dos cromatogramas foi realizada com o algoritmo baseline cut-off, considerando-se a altura mínima dos picos como 1.0E4, o nível de base como 1.0E3 e a duração dos picos entre 0,01 e 1 min. Para agrupar isótopos, consideramos a tolerância para m/z como 20 ppm, a tolerância para o tempo de retenção como 0,1 min, a carga máxima como 2 e o isótopo mais intenso como

representativo. Os arquivos processados foram exportados em formato. mgf e utilizados nas análises subsequentes.

A análise de redes moleculares (molecular network) foi realizada a partir da plataforma GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking, <http://gnps.ucsd.edu>). Os dados foram filtrados removendo-se todos os íons fragmentos dentro do intervalo de +/- 17 Da dos m/z precursores e mantendo-se somente os 6 fragmentos mais intensos dentro de uma janela de +/- 50 Da nos espectros. As tolerâncias para os íons precursores e íons fragmento foram ambas estabelecida como 0,02 Da. A rede foi criada considerando-se ligações entre os íons com valores de cosseno acima de 0,7 e mais de 6 picos em comum. Os espectros relativos aos íons da rede foram confrontados com aqueles presentes na biblioteca de compostos do GNPS para anotação (atribuição de uma possível identificação) de moléculas a nível 2 de acordo com a *Metabolomics Standards Initiative* (MSI) (SUMNER et al., 2007). Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados dos extratos e foram consideradas anotações com cosseno superior a 0,7 e pelo menos 5 picos em comum. Os resultados desta análise podem ser acessados no link: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=414ee14cd82a4c74893c5ece6cabfd03>.

As redes moleculares foram submetidas ao protocolo *Network Annotation Propagation* (NAP) (DA SILVA et al., 2018), também na plataforma GNPS, para anotações a nível 3 de acordo com a MSI. Para tanto, os espectros experimentais foram confrontados com a biblioteca *in silico* gerada a partir dos bancos de dados Super Natural II (BANERJEE et al., 2015), que contém informações sobre diversos compostos obtidos a partir de plantas. Consideramos 20 ppm de tolerância para as buscas e os possíveis adutos como [M+H]⁺, [M+Na]⁺ e [M+K]⁺. Os resultados desta análise podem ser acessados a partir do link: <https://proteomics2.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=ad9d0c9044f44763a97210dd819f32dc>. Por fim, para aprimorar as informações químicas dentro da rede molecular, as informações das anotações obtidas a partir da biblioteca espectral do GNPS e da ferramenta NAP foram incorporadas à rede utilizando-se o protocolo MolNetEnhancer (ERNST et al., 2019). A ontologia ClassyFire (DJOUMBOU FEUNANG et al., 2016) foi utilizada para a nomenclatura de classes químicas.

1.2.8 Análise das frações hexânicas de *Annona mucosa* em CG-EM-MS

As frações hexânicas de *A. mucosa* foram derivatizadas com a finalidade de volatilizar compostos não voláteis. Para isso, misturou-se 100 µL de cada amostra com 300 µL de N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA). As amostras foram mantidas a 80°C por 10 min e então o MSTFA foi removido sob fluxo de N₂. Feito isso, foram então adicionados 600 µL de hexano as amostras e transferidas aos vials para análise via cromatografia gasosa e espectrometria de massas a partir do equipamento GC-2010 - QP 2010 Plus (Shimadzu). A separação foi realizada na coluna capilar Rtx-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm). As temperaturas do injetor (modo splitless) e do ionizador foram, respectivamente, 280°C e 250°C. O programa de temperatura do forno foi: 80°C por 1 min, até 200°C aumentando-se 5°C por min, até 250°C aumentando-se 5°C por e mantida por 8 min, até 300°C aumentando-se 10°C por min e mantida por 5 min, e até 320°C aumentando-se 10°C por min e mantida por 10 min. Os valores de m/z foram adquiridos dentro do intervalo entre 40 e 800. O gás de arraste foi Hélio em um fluxo de 1 mL min⁻¹. Os picos foram tentativamente identificados tanto através dos espectros de massa por comparação com dados da biblioteca Wiley (v. 8) quanto pelo cálculo do índice de retenção linear (linear retention index, LRI). Os LRI foram calculados em relação a uma série padrão de n-alcenos injetada sob as mesmas condições analíticas (Babushok, Linstrom, & Zenkevich, 2011) e comparados com dados da literatura, considerando 1% de diferença como valor de corte.

1.2.9 Estimativas de CL₅₀ e CL₉₀ do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* (ESAM) sobre lagartas de *Leucoptera coffeella*

A análise dos resultados do screening permitiu selecionar ESAM entre as espécies de *Annona* spp. O extrato foi então submetido a novos bioensaios com a finalidade de estimar as concentrações letais para 50 e 90% das lagartas de *L. coffeella*, representado a CL₅₀ e a CL₉₀, respectivamente. O ensaio para obtenção das CL's foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em que ESAM e o inseticida à base de acetogeninas (Anosom 1 EC[®]) foram aplicados em cinco concentrações diferentes variando entre 1 e 2% m.v⁻¹ (0,50; 1,00; 5,71; 11,42 e 20,00 g.L⁻¹), definidas por meio da fórmula de Finney (1971). O ensaio foi realizado com seis repetições, sendo cada repetição representada por dez folhas contendo uma mina (60 minas por tratamento). Os tratamentos foram aplicados por meio de um

microatomizador acoplado a uma bomba pneumática, sob pressão de 0,5 Kgf.cm⁻² sobre folhas recém-minadas (\approx 0,5 cm de diâmetro) em um volume pré-estabelecido para cobrir toda a folha de café. A avaliação quanto ao efeito larvicida foi realizada aos 7 DAA, a partir da abertura das minas e observação das lagartas vivas e mortas.

1.2.10 Bioatividade do ESAM sobre *Leucoptera coffeella*

Para avaliar a bioatividade por contato de ESAM sobre *L. coffeella*, foram realizadas pulverizações (na CL₅₀ previamente estimada) sobre mudas de café em um volume previamente estabelecido. O experimento foi conduzido em laboratório sob delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos: CL₅₀ do extrato de *A. mucosa* (2,62 g.L⁻¹), duas testemunhas positivas representadas pela CL₅₀ do inseticida comercial à base de acetogeninas (Anosom 1 EC[®]) (3,03 g.L⁻¹) e 50% da dose bula do inseticida Benevia 100 OD[®] (ciantraniliprole) (50 a 70 g i.a./ha), além de duas testemunhas negativas compostas pelo solvente [acetona:metanol (1:1)] e pela água.

Após a secagem das folhas, as plantas que receberam seus respectivos tratamentos foram acondicionadas em gaiolas metálicas (0,5 x 0,45 x 0,45 m) revestidas com tela antiafídeo. Cada tratamento foi repetido quatro vezes e as repetições foram constituídas por uma muda de café, infestada com cinco casais de *L. coffeella*. Após a constatação do início da oviposição, os adultos foram mantidos por mais cinco dias e, ao final deste período, retirados para a quantificação do número de ovos. A possível formação de minas foi avaliada diariamente nos tratamentos até 20 dias após a retirada dos adultos.

1.2.11 Efeitos subletais do ESAM sobre *Leucoptera coffeella*

Visando caracterizar os efeitos subletais dos extratos sobre o bicho-mineiro, foram realizados ensaios com cinco tratamentos constituídos por: ESAM (CL₅₀ = 2,62 g.L⁻¹), ESAM (50% da CL₅₀ = 1,3 g.L⁻¹), controle positivo (Anosom[®] 1 EC CL₅₀ = 3,03 g.L⁻¹) e duas testemunhas negativas [acetona: metanol (1:1) e água]. Este ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições, sendo cada repetição constituída por dez minas. As plantas com folhas minadas foram mantidas em casa de vegetação, sob condições parcialmente controladas. Os tratamentos

foram aplicados sobre folhas minadas ($\approx 0,5$ cm de diâmetro) em um volume capaz de cobrir toda a folha de café.

Para avaliar o efeito sobre as lagartas, após um período suficiente para completarem a fase imatura, as minas tiveram sua área quantificada (porcentagem em função da área total da folha). Posteriormente, as folhas contendo as crisálidas foram removidas das plantas e acondicionadas em gaiolas para dar sequência ao estudo com adultos. Cada gaiola recebeu um determinado número de mudas de café, conforme o número de insetos proveniente de cada tratamento, estabelecendo-se um padrão de uma planta para cada quatro crisálidas formadas. Foram avaliados os seguintes parâmetros: área consumida, número de adultos emergidos, número de ovos depositados e eclodidos.

1.2.12 Análises estatísticas

Os pressupostos estatísticos foram verificados por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para aferir normalidade e homogeneidade, respectivamente. Para os testes de média, foram utilizados os testes de Tukey e Scott-Knott ($p \leq 0,05$), por meio do programa computacional Speed Stat 2.4 (CARVALHO et al., 2020). Os dados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos a transformações por postos (rank), logarítmica, raiz quadrada, raiz cúbica, por meio da função arcsen da raiz ($x/100$) ou Box-Cox ($x+1$), $\lambda = 0,2$. Para as estimativas das concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}), foi utilizado um modelo binomial com função de ligação complemento log-log (modelo gompit), utilizando-se o pacote Probit do software estatístico “R”, versão 3.6.3 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2020).

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Seleção do extrato mais bioativo e frações

O extrato etanólico das sementes de *A. mucosa* (ESAM) provocou a maior mortalidade de lagartas de 2^o-3^o ínstar de *L. coffeella* (80,0%), diferindo dos demais extratos, inseticidas comerciais e controles negativos, sendo considerado o tratamento mais promissor (Tabela 2). Os extratos à base de *A. muricata*, *A. reticulata*, *A. sylvatica*, *A. montana* e controles positivos (Anosom 1 EC[®] e Benevia 100 OD[®]) não diferiram entre si, contudo provocaram mortalidades entre 40,0 e 60,0%, diferindo

dos controles negativos acetona: metanol (1:1) e água (3,4 e 0,0%, respectivamente). A maior eficiência foi também verificada no tratamento à base de ESAM (79,30%).

As frações hexânica e metanólica de *A. mucosa* provocaram os maiores índices de mortalidade (Tabela 3); entretanto, a fração metanólica de *A. mucosa* não diferiu da mesma fração de *A. reticulata*. Independentemente da fração, verificou-se maior mortalidade dos extratos em relação aos controles negativos. Com exceção para *A. reticulata* e *A. sylvatica*, a fração hexânica elevou o potencial de controle dos extratos avaliados sobre lagartas de *L. coffeella*.

Em geral, os derivados botânicos das cinco espécies reduziram a área foliar consumida por lagartas de *L. coffeella* em comparação com os controles negativos (Tabela 4). Folhas de café tratadas com a fração hexânica dos extratos de *A. musosa*, *A. sylvatica* e de *A. montana* foram as menos danificadas. Na fração metanólica de *A. musosa*, de *A. reticulata* e de *A. sylvatica* foram as mais eficientes na redução da área minada pelo bicho-mineiro.

Tabela 2 - Mortalidade média (\pm EP) de lagartas de 2^o-3^o ínstar de *Leucoptera coffeella* em folhas minadas de café após sete dias da aplicação com extratos de *Annona* spp.

Tratamentos	Mortalidade (%)¹	EC (%)²
<i>Annona muricata</i>	46,6 \pm 0,42 b	44,72
<i>Annona mucosa</i>	80,0 \pm 0,37 a	79,30
<i>Annona reticulata</i>	46,0 \pm 0,49 b	44,10
<i>Annona sylvatica</i>	56,6 \pm 0,60 b	55,07
<i>Annona montana</i>	50,0 \pm 0,34 b	48,24
Anosom 1 EC [®]	40,0 \pm 0,37 b	37,89
Benevia 100 OD [®]	60,0 \pm 0,45 b	58,59
Acetona: metanol (1:1)	3,4 \pm 0,17 c	0,00
Água	0,0 \pm 0,00 c	0,00
<i>P</i>	< 0,001	-

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (teste de Scott- Knott, $p < 0,05$). ²EC = Eficiência de controle dos tratamentos calculada no último período de avaliação, por meio da fórmula proposta por Schneider-Orelli (1947): $MC (\%) = [(Mort. (\%) \text{ em T} - Mort. (\%) \text{ em C}) / (100 - Mort. (\%) \text{ em C})] * 100$; onde: MC (%) = mortalidade corrigida no controle e T = mortalidade no tratamento.

Tabela 3 - Mortalidade média (\pm EP) de lagartas de 2^o-3^o ínstar de *Leucoptera coffeella* em folhas minadas de café após sete dias da aplicação de extratos etanólicos de sementes de *Annona* spp. nas frações metanólicas e hexânicas

Tratamentos	Mortalidade	
	Frações metanólicas	Frações hexânicas
<i>Annona muricata</i>	4,4 \pm 0,80 Bb	7,2 \pm 0,49 Ab
<i>Annona mucosa</i>	6,8 \pm 0,80 Ba	9,2 \pm 0,49 Aa
<i>Annona reticulata</i>	6,8 \pm 0,75 Aa	6,4 \pm 0,75 Ab
<i>Annona sylvatica</i>	4,4 \pm 0,80 Ab	7,2 \pm 1,17 Ab
<i>Annona montana</i>	4,8 \pm 0,80 Bb	6,4 \pm 0,75 Ab
Acetona: metanol (1:1)	1,20 \pm 0,75 ** 1	
Água	0,20 \pm 0,40 ** 1	
P frações	< 0,001	
P <i>Annona</i> spp.	\leq 0,008	
P frações x <i>Annona</i> spp.	\leq 0,204	

Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (teste de Scott- Knott, $p < 0,05$).¹Tratamento diferencia-se dos demais de acordo com contrastes ortogonais pelo teste t (** $\alpha = 0,01$).

Tabela 4 - Área foliar média consumida (\pm EP) por lagartas de 2^o-3^o ínstar de *Leucoptera coffeella* em folhas de café após sete dias da aplicação de extratos etanólicos de sementes de *Annona* spp. nas frações metanólicas e hexânicas

Tratamentos	Área foliar consumida (cm ²)	
	Frações metanólicas	Frações hexânicas
<i>Annona muricata</i>	0,29 \pm 0,15 Aa	0,20 \pm 0,04 Ba
<i>Annona mucosa</i>	0,20 \pm 0,06 Ac	0,15 \pm 0,00 Bb
<i>Annona reticulata</i>	0,22 \pm 0,05 Ac	0,23 \pm 0,09 Aa
<i>Annona sylvatica</i>	0,21 \pm 0,12 Ac	0,18 \pm 0,03 Ab
<i>Annona montana</i>	0,25 \pm 0,32 Ab	0,16 \pm 0,02 Bb
Acetona: metanol (1:1)	1,30 \pm 0,10 ** ¹	
Água	2,38 \pm 0,52 ** ¹	
² P	< 0,001	

Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (teste de Scott- Knott, $p < 0,05$). Médias submetidas a transformação Box-Cox ($x+1$) = -3. ¹Tratamento diferencia-se dos demais de acordo com contrastes ortogonais pelo teste t (** $\alpha=0,01$). ² Valores de P para frações, *Annona* spp. e frações x *Annona* spp.

1.3.2 Análise das frações metanólicas e hexânicas de *Annona mucosa*

A rede molecular construída a partir dos dados obtidos das frações metanólicas de *A. mucosa* por UPLC-MS/MS é constituída por 730 nodos, sendo 508 destes agrupados em 44 famílias moleculares com pelo menos dois componentes (Figura 1). A comparação de nossos dados experimentais com a biblioteca espectral do GNPS permitiu a anotação (nível 2) de seis glicerofosfolídeos incluindo a lisolecitina (**5**), os alcaloides isoquinolínicos roemerina (**7**) e reticulina (**9**) e o alcaloide derivado do ácido cinâmico moupinamida (**8**). Além destas anotações e da análise de similaridade espectral da rede molecular, a integração destes resultados aos obtidos pela ferramenta *in silico* NAP permitiram a anotação putativa das classes químicas as quais pertencem a maior parte dos íons reunidos em famílias moleculares (Figura 1), o que possibilitou uma melhor compreensão do perfil químico destas frações. A ferramenta NAP ainda possibilitou a anotação (nível 3) de acetogeninas, divididas em duas famílias moleculares (Figura 2). Entre as anotações putativas obtidas estão a

guanacona (14), a annojahnin (17), a coriaciclodienina (18), a annotemoyin-1 (19) e a montecristina (21).

Figura 1 - Rede molecular construída a partir de dados obtidos das frações metanólicas de *Annona mucosa*

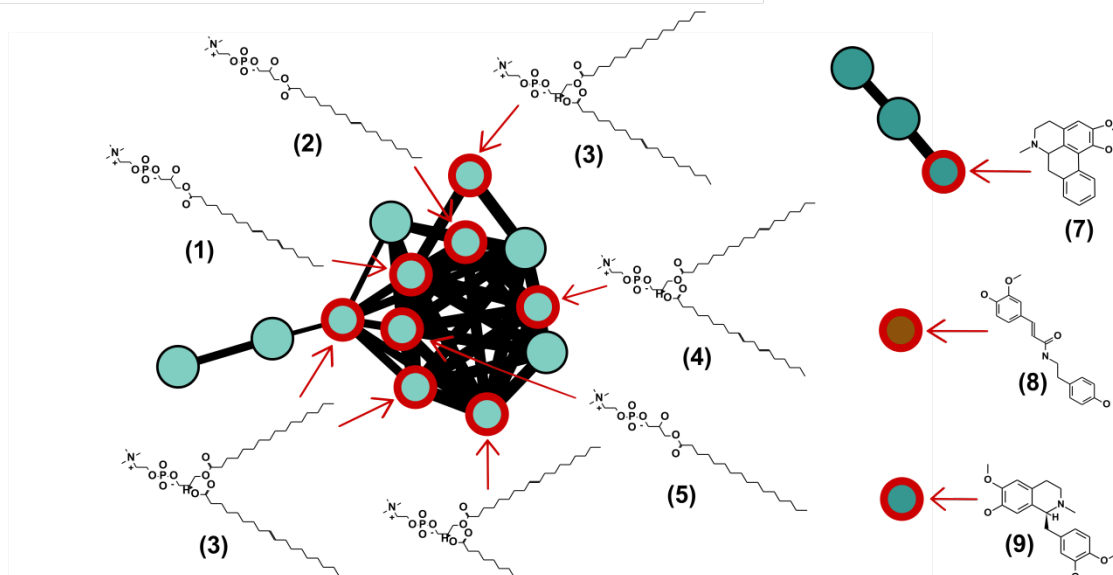
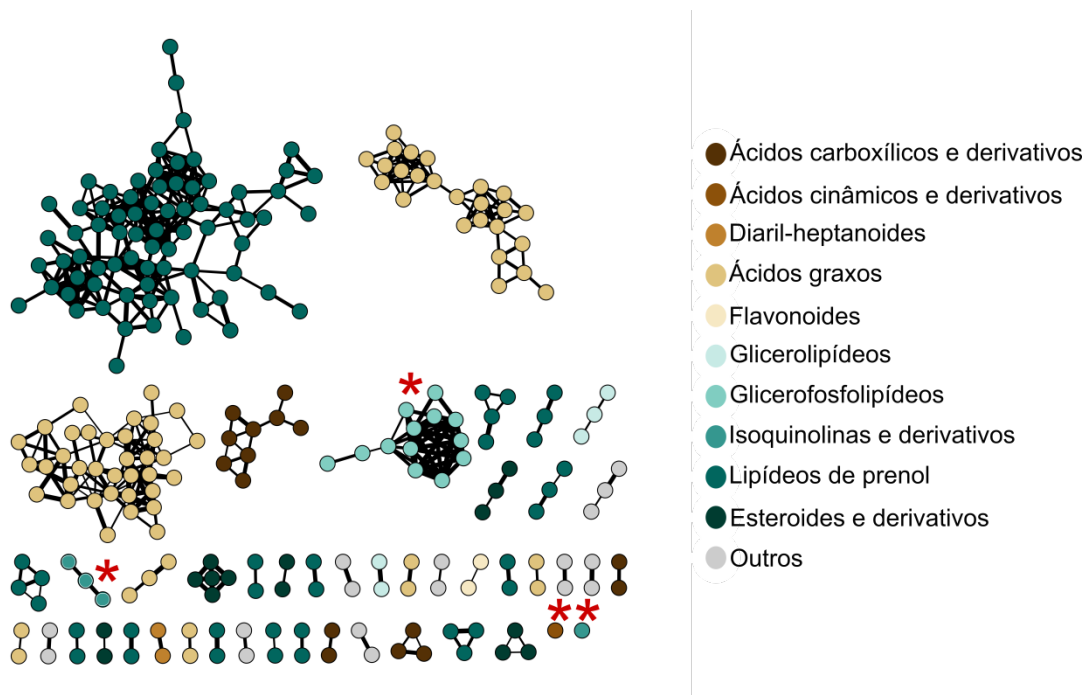
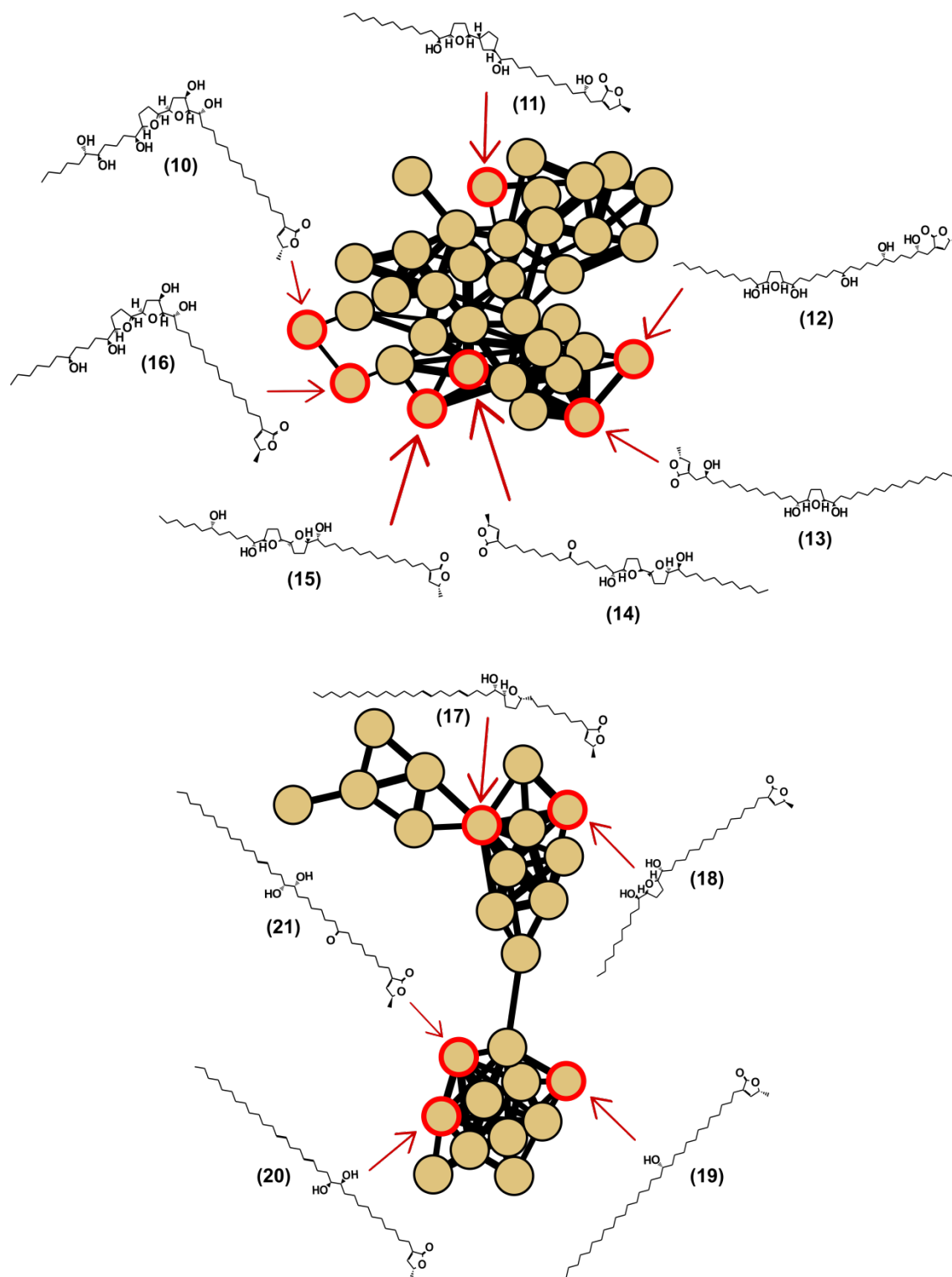


Figura 2 - Famílias moleculares correspondentes a acetogeninas. Compostos anotados através da ferramenta NAP para alguns dos nodos estão em destaque



Através dos dados de GC-MS, pudemos anotar putativamente um aldeído, cinco ésteres, quatro ácidos graxos, três fitosteróis, um diterpenoide, um monoacilglicerol e um diacilglicerol como os compostos tentativamente identificados nas frações hexânicas de *A. mucosa* (Tabela 5). Para compostos que não foram derivatizados, os valores de LRI calculados foram comparados com valores relatados na literatura. Para os compostos 2,4-decadienal, palmitato de etila, e linoleato de etila, a comparação foi realizada com dados obtidos por Babushock et al. (2011), sendo os valores obtidos com nossos dados 1317.23, 1989.44 e 2159.75, respectivamente, e os valores da literatura 1317.60, 1991.50 e 2158.80, respectivamente. Para o decanoato de etila e o oleato de etila, os dados foram comparados com os obtidos por El Cadi et al. (2010) (sendo o valor obtido com nossos dados 1392.90 e o valor da literatura de 1395.00) e Mekni et al. (2013) (sendo o valor obtido com nossos dados 2166.87 e o valor da literatura de 2142.00), respectivamente. A classe química mais abundante foi a dos ácidos graxos, cuja soma de áreas no cromatograma de íons totais (CIT) correspondeu a 34,2%. Esses compostos, por apresentarem um grupo hidroxila, foram derivatizados, ou seja, reagiram com o MSTFA, e por isso não foi possível comparar os LRI dos seus produtos com valores da literatura. O mesmo ocorreu com os fitosteróis, terceira classe química mais abundante, cuja soma de áreas no CIT correspondeu a 14,2%, e com o mono-e-diacilglicerol. A segunda classe química mais abundante foi a dos ésteres, cuja soma de áreas no CIT correspondeu a 23,7%.

Tabela 5 - Identificação putativa dos picos mais intensos observados na análise de GC-MS das frações hexânicas de *Annona mucosa*

No.	Identificação putativa	Classe	Tempo de retenção (min)	Fórmula molecular	Área média do pico no CIT	% no CIT
1	(E,E)-2,4-Decadienal	Aldeído	12.79	C ₁₀ H ₁₆ O	11889569.50	2,5
2	Ethyl decanoate	Éster	14.71	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	13412700.00	2,5
3	Ethyl palmitate	Éster	27.88	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	18719381.33	4,0
4	Palmitic acid	Ácido graxo	28.97	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	38918759.67	8,3
5	Ethyl linoleate	Éster	31.01	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	26872714.00	5,7
6	Ethyl oleate	Éster	31.14	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	30052468.33	6,4
7	Linoleic acid	Ácido graxo	31.98	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	43418701.33	9,3
8	Oleic acid	Ácido graxo	32.13	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	50692571.00	10,8
9	Stearic acid	Ácido graxo	32.45	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	26880487.33	5,7
10	8,11-Octadecadienoic acid methyl ester	Éster	35.30	C ₁₉ H ₃₄ O	21712606.00	4,6
11	Phytol	Diterpenoide	35.38	C ₂₀ H ₄₀ O	25591674.33	5,5
12	1,3-Dipalmitin or Glycerol 1-palmitate 3-oleate or 1,2-Dipalmitin or 1,3-Dioleoylglycerol	Diacilglicerol	49.40		13877392.00	3,0
13	Cholestane-3,5-diol, (3. beta.,5. alpha.)-	Fitoestero I	51.66	C ₂₇ H ₄₈ O ₂	14523733.00	3,1
14	Stigmasterol	Fitoestero I	52.13	C ₂₉ H ₄₈ O	19271944.67	4,1
15	Sitosterol	Fitoestero I	53.17	C ₂₉ H ₅₀ O	32619505.00	7,0
16	1-Monooleoylglycerol	Monoacilglicerol	57.07	C ₂₁ H ₄₀ O ₄	15726548.00	3,4

CIT: cromatograma de íons totais.

1.3.3 Estimativas de CL₅₀ e CL₉₀ do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* (ESAM) sobre lagartas de *Leucopoptera coffeella*

Os valores de CL₅₀ e CL₉₀ estimados para ESAM (2,62 g.L⁻¹ e 20,11 g.L⁻¹, respectivamente) são inferiores aos obtidos com o inseticida comercial Anosom[®] 1 EC (3,03 g.L⁻¹ e 90,53 g.L⁻¹, respectivamente), indicando maior toxicidade de ESAM sobre as lagartas de *L. coffeella*.

Tabela 6 - Concentrações letais do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* (ESAM) e de Anosom 1 EC[®] sobre lagartas de 2^o-3^o instar de *Leucopoptera coffeella* em folhas de café.

Tratamentos	N	X ²	Inclinação (EP)	CL (IC ₉₅) g.L ⁻¹ *	
				CL ₅₀	CL ₉₀
ESAM	60	5,53	1,44 ± 0,41	2,62 (1,61 ± 4,01)	20,11 (11,36 ± 52,72)
Anosom 1 EC [®]	60	18,52	0,85 ± 0,31	3,03 (1,36 ± 6,08)	90,53 (20,94 ± 100,90)
<i>P</i>	0,999				

N: Número de insetos utilizados; IC: Intervalo de confiança; X²: Chi-quadrado; (*): Diferença significativa com base nos intervalos de confiança a 95% de probabilidade.

1.3.4 Bioatividade de ESAM sobre *Leucopoptera coffeella*

Foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos quanto ao número de ovos depositados, número de minas formadas e viabilidade da fase larval (Tabela 7). Os tratamentos à base de ESAM (CL₅₀) e Anosom[®] 1 EC[®] (CL₅₀) apresentaram menores índices de oviposição, diferindo significativamente dos controles negativos e do inseticida comercial Benevia 100 OD[®] (50% da dose de bula). ESAM CL₅₀ foi menos efetivo quanto à formação de minas em relação os controles positivos (Anosom 1 EC[®] CL₅₀ e Benevia 100 OD[®] - 50% da dose de bula), porém também diferiu dos controles negativos, diminuindo o nível de dano sobre as folhas. Todos os tratamentos reduziram a viabilidade de lagartas (0,50-1,25%) em comparação com os controles negativos.

Tabela 7 - Médias (\pm EP) de oviposição, minas formadas e viabilidade larval de *Leucoptera coffeella* em mudas de café após aplicação de diferentes tratamentos em laboratório

Tratamentos	Nº de ovos¹	Minas formadas	Viabilidade²
ESAM CL ₅₀	15,30 \pm 6,07 b	2,30 \pm 0,75 b	1,30 \pm 0,48 b
CL ₅₀ Anosom 1 EC [®]	7,80 \pm 0,63 b	0,30 \pm 0,25 c	1,00 \pm 1,00 b
Benevia 100 OD [®] 50	27,30 \pm 14,53 a	0,30 \pm 0,25 c	0,50 \pm 0,50 b
Acetona: metanol (1:1)	31,50 \pm 5,78 a	11,00 \pm 0,91 a	24,30 \pm 5,79 a
Água	38,50 \pm 3,57 a	11,00 \pm 0,41 a	21,30 \pm 5,01 a
<i>P</i>	0,0099	< 0,001	< 0,001

Médias seguidas de letras distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos (teste de Tukey, $p < 0,05$). ¹ Dados transformados em raiz cúbica (x). ² Dados transformados por Box-Cox ($x+1$), $\lambda = 0,2$.

1.3.5 Efeitos subletais de ESAM sobre *Leucoptera coffeella*

Os tratamentos à base de ESAM CL₅₀, ESAM 50% da CL₅₀ e Anosom 1 EC[®] (24,11-27,71%) reduziram significativamente a área foliar danificada pelo inseto em relação aos controles negativos (64,8-82,33%) (Tabela 8). Os mesmos tratamentos também reduziram o número de adultos emergidos (1,67-2,83) e a oviposição (8,50-12,17 ovos) do inseto. ESAM CL₅₀ e Anosom 1[®] EC apresentaram os menores índices de eclosão de ovos (3,95-4,80), diferindo dos controles negativos.

Tabela 8 - Médias (\pm EP) de oviposição, eclosão de ovos, área foliar consumida e emergência de adultos de *Leucoptera coffeella* em mudas de café após aplicação de diferentes tratamentos em casa de vegetação

Tratamentos	Área foliar (%)	Nº de adultos	Nº de ovos ¹	Nº ovos eclodidos ¹
ESAM (CL ₅₀)	24,63 \pm 1,61 c	1,67 \pm 0,33 bc	9,67 \pm 0,21 bc	4,27 \pm 0,13 c
ESAM 50% (CL ₅₀)	24,11 \pm 1,52 c	2,83 \pm 0,31 b	12,17 \pm 0,60 b	4,80 \pm 0,30 bc
Anosom [®] 1 EC	27,71 \pm 2,28 c	2,33 \pm 0,33 b	8,50 \pm 0,81 c	3,95 \pm 0,30 c
Acetona: Metanol	64,77 \pm 7,07 b	7,17 \pm 0,48 a	20,17 \pm 0,87 a	6,95 \pm 0,76 ab
Água	82,33 \pm 3,30 a	7,33 \pm 0,21 a	27,00 \pm 3,34 a	7,27 \pm 0,37 a
P	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Médias seguidas de letras distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos (teste de Tukey, $p < 0,05$). ¹ Dados transformados por Box-Cox ($x + 1$) = -0,26.

1.4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstram a promissora atividade de derivados de Annonaceae para o manejo de *L. coffeella* em cafeeiro. A maior mortalidade verificada neste estudo a partir do uso do extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* (ESAM) está provavelmente relacionada à maior toxicidade de seus compostos em relação aos demais extratos, promovendo assim uma maior mortalidade de lagartas.

Em geral, constatou-se eficiência superior ou similar de ESAM em relação a inseticidas comerciais recomendados para o controle de insetos-praga da cafeicultura e de outros cultivos. Os resultados demonstraram que ESAM apresentou eficiência de 79,30% sobre lagartas de 2^o-3^o instar de *L. coffeella*, superando os demais tratamentos, inclusive os inseticidas comerciais Anosom 1[®] EC (37,89%) e Benevia 100 OD[®] (58,59%). Soares et al. (2021) avaliaram o efeito de diferentes extratos de Annonaceae sobre a mosca-branca *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em tomateiro e constataram melhor eficiência de ESAM em comparação com os inseticidas Anosom[®] 1 EC e Actara[®] 250 WG (neonicotinoide). Efeitos superiores desse extrato em comparação com inseticidas convencionais também já foram documentados para importantes noctuídeos, como *Helicoverpa armigera* (Hübner) (SOUZA et al., 2017, 2019).

Devido à grande complexidade de composição dos extratos botânicos, tem-se utilizado a metabolômica para auxiliar na anotação e caracterização de possíveis compostos químicos presentes nestas amostras biológicas. O termo 'metabolômica' é

empregado às análises compreensivas, abrangentes e de alto rendimento de misturas metabólicas complexas a partir de técnicas espectroscópicas como a espectrometria de massas (HALL et al., 2002). Ao longo dos últimos anos, o aumento da resolução e sensibilidade dos equipamentos analíticos e o desenvolvimento de diversas ferramentas de bioinformática tem contribuído para promover e popularizar a aplicação da metabolômica nas pesquisas em produtos naturais (HUBERT; NUZILLARD; RENAULT, 2017). Neste trabalho, promovemos o particionamento dos extratos etanólicos de *A. mucosa* em frações metanólicas, analisadas por UPLC-MS/MS, e frações hexânicas, analisadas por GC-MS. As frações metanólicas indicaram seis glicerofosfolípídeos e duas famílias moleculares de acetogenina, já as frações hexânicas indicaram três classes principais: ácidos graxos, ésteres e fitosteróis, respectivamente.

Entre os compostos secundários de Annonaceae citados na literatura e descrito neste estudo, merecem destaque as acetogeninas, as quais possuem diversidade estrutural e ampla variedade de atividades biológicas, como efeitos inseticidas e acaricidas (CAVÉ et al., 1997; COLOM et al., 2008; BLESSING et al., 2010), relacionadas com a inibição do complexo I (NADH - ubiquinona oxidoreductase) na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, levando à redução das taxas respiratórias e cardíaca e à morte celular (DEGLI ESPOSTI et al., 1994; GALLARDO et al., 2000).

Os valores de CL₅₀ e CL₉₀ de ESAM estimados para *L. coffeella* (2,62 g.L⁻¹ e 20,11 g.L⁻¹, respectivamente) diferem de alguns resultados registrados na literatura com outros artrópodes-praga. Por exemplo, Soares et al. (2020) obtiveram CL₅₀ igual a 10,83 mg. L⁻¹ e CL₉₀ de 200,24 mg. L⁻¹ para *B. tabaci* com o mesmo extrato, enquanto Ansante et al. (2015) relataram CL₅₀ igual 842,97 mg. L⁻¹ e CL₉₀ de 1.882 mg. L⁻¹ para *S. frugiperda*. Contudo, vale esclarecer que no presente estudo, adotou-se uma metodologia que não interferisse no desenvolvimento de *L. coffeella*, de tal forma que as aplicações dos tratamentos foram realizadas sobre minas ativas iniciais e não diretamente sobre as larvas (GONRING et al., 2019). Nesse sentido, pressupõe-se que a praga em questão sofreu menor exposição aos tratamentos em comparação com outras espécies que receberam aplicação tópica, em função de adaptações metodológicas e distintos hábitos do inseto estudado. Com base no exposto, a diferença entre os valores de doses encontrados na literatura pode estar relacionada ao comportamento endofítico das larvas do bicho-mineiro-do-cafeeiro, que

permanecem entre os parênquimas, sendo expostas ao ESAM apenas de maneira indireta (MESQUITA et al., 2016; GONRING et al., 2019).

Analisando os dados da bioatividade do ESAM observou-se maior redução na oviposição e formação de minas quando comparado ao inseticida comercial Benevia 100 OD® (50% da dose de bula). Ao observar os efeitos subletais utilizando ESAM (50% da CL₅₀), constatou-se que os parâmetros oviposição, área foliar consumida e número de adultos emergidos também foram reduzidos pelo derivado botânico em comparação com os controles negativos.

Em trabalho com videira, Stupp et al. (2020) reportaram que a utilização de ESAM promoveu redução na oviposição dos adultos de *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) em relação aos controles negativos (água e solventes). A diminuição no número de ovos de *C. capitata* e *L. coffeella*, quando submetidos ao ESAM, pode ser consequência da presença de acetogeninas em sua composição, os quais apresentam reconhecida ação sobre o comportamento de insetos-praga, afetando sua oviposição (ISMAN & SEFFRIN, 2014; RIBEIRO et al., 2015; BERNARDI et al., 2017). A redução no número de ovos depositados (deterência) é um componente importante para a contenção de populações de pragas em áreas de produção de café, diminuindo o número de folhas minadas e resultando na manutenção das taxas fotossintéticas e dos índices de produtividade (NANTES & PARRA, 1977; SOUZA et al., 1998; MACHOTA JÚNIOR et al., 2013).

O reduzido número de minas formadas também se deve à baixa eclosão de ovos de *L. coffeella*, conforme mostrado para alguns tratamentos neste estudo. Segundo Bastos et al. (2018), a pulverização do extrato de sementes de *A. mucosa* em plantas de tomate também inviabilizou 91,0% dos ovos depositados, reduzindo consideravelmente a pressão de larvas de *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae), quando comparado com os controles negativos água e metanol. Os autores sugeriram que compostos encontrados no extrato atuaram no desenvolvimento embrionário dos ovos dos insetos.

De acordo com Ribeiro et al. (2016), ESAM interferiu no desenvolvimento pós-embrionário de *S. frugiperda*, gerando redução na viabilidade final da fase larval para 27,92% e pupal para 29,59%, quando comparado ao controle, que permitiu viabilidades de 71,25% e de 70,00% para as respectivas fases. Essa menor viabilidade de fases de *S. frugiperda* e menor emergência de adultos em *L. coffeella* estão provavelmente associadas aos efeitos das acetogeninas sobre a atividade

enzimática dos insetos, apresentando implicações na fisiologia do trato digestivo e do ganho de biomassa corpórea (MARTINEZ & VAN ENDEM, 1999; LUNTZ & NISBET, 2000). Bastos et al. (2018), relataram que aplicações de extrato de *A. mucosa* reduziram consideravelmente a eclosão de ovos em *T. absoluta*, inviabilizando 91,00% dos ovos tratados, diferindo das testemunhas negativas água e metanol. A baixa taxa de eclosão de ovos de *T. absoluta* e de *L. coffeella* pode estar relacionada ao acúmulo de compostos do extrato etanólico em camadas internas dos ovos, promovendo uma ação tóxica e paralisando o desenvolvimento embrionário dos insetos (SALKELD e POTTER, 1953).

Os dados obtidos no presente estudo demonstraram o potencial do extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* (ESAM) também para o manejo de *L. coffeella* em cafeeiro. As análises metabolômicas confirmaram a presença de glicerofosfolipídeos, acetogenina, ácidos graxos, ésteres e fitosteróis como principais grupos de compostos bioativos, os quais podem apresentar diferentes modos de ação sobre as fases do ciclo do inseto. Além de serem inéditos, os resultados ampliam o potencial de uso deste derivado botânico para a manutenção das populações de insetos minadores em culturas perenes. Essas informações são importantes para produtores que buscam a redução do uso de inseticidas sintéticos e respectivos resíduos nas lavouras, e podem também ser úteis para sistemas de produção de alimentos com base orgânica ou ecológica, além de direcionarem a prospecção de novas moléculas com propriedades inseticidas e/ou insetistáticas.

REFERÊNCIAS

- ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 504-540, 1999.
- ANSANTE, T. F. RIBEIRO, L. P.; BICALHO, K. U.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. da.; VIEIRA, P. C.; VENDRAMIM, J. D. Secondary metabolites from Neotropical Annonaceae: Screening, bioguided fractionation, and toxicity to *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 969-976, 2015.
- ARON, A. T. et al. Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. **Nature Protocols**, v. 15, p. 1954–1991, 2020.
- BABUSHOK, V. I., LINSTROM, P. J., & ZENKEVICH, I. G. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. **Journal of Physical and Chemical Reference**, v. 40, 04310, 2011.
- BASTOS, J. S.; PEREIRA, M. J.; COSTA, M. B.; TURCHEN, L. M.; PINHEIRO, D. O.; CREMONEZ, P. S. Effect toxic and behavioral of *Annona mucosa* (Annonaceae) on the tomato leaf miner. **Journal of Agricultural Science**, 10, 362-371, 2018.
- BEALE, David J. et al. Review of recent developments in GC–MS approaches to metabolomics-based research. **Metabolomics**, v. 14, n. 11, p. 1-31, 2018.
- BLESSING, L.T.; BUDEGUER, F.; RAMOS, J.; BARDÓN, A.; DIAZ, S.; BROVETTO, M.; SEOANE, G.; NESKE, A. Structural factors of annonaceous acetogenins and their semisynthetic analogues related with the toxicity on *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Agricultural Chemistry and Environment**, v. 4: p. 56-61, 2015.
- BLESSING, L. T.; COLOM, O. A.; POPICH, S.; NESKE, A.; BARDÓN, A. Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Pest Science**, v. 83, p. 307-310, 2010.
- BERNARDI, D., RIBEIRO, L., ANDREAZZA, F., NEITZKE, C., OLIVEIRA, E. E., BOTTON, M., VENDRAMIM, J. D. Potential use of *Annona* by products to control *Drosophila suzukii* and toxicity to its parasitoid *Trichopria anastrephae*. **Industrial Crops and Products**, v.110, p. 30-35, 2017.
- CAVÉ, A.; FIGADÉRE, B.; LAURENS, A.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, v.70, p. 81-288, 1997.
- CALOPRISCO, E., FOURNERON, J. D., FAURE, R., & DEMARNE, F. E. Unusual lactones from *Cananga odorata* (Annonaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 78-80, 2002.

CARVALHO, A. M. X.; MENDES, F. Q.; MENDES, F. Q.; TAVARES, L. F. SPEED Stat: a free, intuitive, and minimalist spreadsheet program for statistical analyses of experiments. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 20, p. 1-6, 2020.

COLOM, O. A.; BARRACHIMA, I.; MINGOL, I. A.; MAS, M. C. G.; SANZ, P. M.; NESKE, A.; BARDON, A. Toxic effects of annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. **Journal of Pest Science**, v.81, p. 85-89, 2008.

CONSTANTINO L., M., J. C. FLOREZ, P. BENAVIDES.; T. BACCA. Minador de las hojas del cafeto. Una plaga potencial por efectos del cambio climático. **Aconteceres Técnicos Cenicafé**, v. 2, p.1-12, 2011.

COSTA, M.S.; ANTÔNIO, E.G.; SANTANA, A.E.G.; OLIVEIRA, L.L.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E. Toxicity of squamocin on *Aedes aegypti* larvae, its predators and human cells. **Pest Management Science**, v. 73, p. 636–640, 2017.

COSTA, S.M.; PAULA, S.O.; MARTINS, G.F.; ZANUNCIO, J.C.; SANTANA, A.E.G. Multiple modes of action of the squamocin in the midgut cells of *Aedes aegypti* larvae. **PLoS One**, v.11, e0160928, 2016.

COSTA, D. P.; F. L. FERNANDES; F. M. ALVES; E. M. SILVA; L. E. VISÔTTO. 2016. Resistance to neurotoxic insecticides in populations of the coffee leafminer. In Trdan, S. (Ed.), **Insecticide resistance**. IntechOpen, London, United Kingdom, pp. 3–17.

DANTAS, J.; MOTTA, I.; VIDAL, L.; BÍLIO, J.; PUPE, J.M.; VEIGA, A.; CARVALHO, C.H.S.; LOPES, R.B.; ROCHA, T.L.; SILVA, L.P.; PUJOL-LUZ, J.R.; Albuquerque, É.V. A comprehensive review of the coffee leaf miner *Leucoptera Coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae), with special regard to Neotropical impacts, **Pest Management and Control**. Preprints 2020, 2020100629 (doi: 10.20944/preprints202010.0629.v1).

DE BRITO, E. F.; BALDIN, E. L. L.; GONÇALVES, G. L. P.; GIMENES, L.; FERNANDES, J. B.; RIBEIRO, P. L. Growth inhibition, residual contact and translaminar toxicity of Annona-based bioinsecticides on tomato leafminer: laboratory and greenhouse assessments. **Gesunde Pflanzen**, v.72, p.139-154, 2020.

DJOUMBOU FEUNANG, Y. et al. ClassyFire: automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. *Journal of Cheminformatics*, v. 8, n. 1, p. 1–20, 2016.

ERNST, M. et al. Molnetenhancer: Enhanced molecular networks by integrating metabolome mining and annotation tools. *Metabolites*, v. 9, 2019.

FINNEY, D.J. **Probit analysis**. Cambridge University Press, Cambridge, 1971.

FRAGOSO, D. B.; R. N. GUEDES; R. N. GUEDES; M. C. PICANÇO; L. ZAMBOLIM. Insecticide use and organophosphate resistance in the coffee leaf miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 92, p. 203–212, 2002.

FRAGOSO, D. B.; R. N. C. GUEDES; J. A. Ladeira. Seleção na evolução de resistência a organofosfatos em *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 329–334, 2003.

GIRALDO, M.; POSTALI, J. R. Aspectos biológicos de *Leucoptera coffeella* Guérin Mèneville 1842 Lepidoptera: Lyonetiidae en coffea arabica en condiciones de laboratorio. **Aconteceres Técnicos Cenicafé**, v. 2, p. 20-27, 2017.

GONRING, A. H. R.; DE ANDRADE SILVA; F. M.; PLATA-RUEDA, R. A.; GORRI, J. E. R.; FERNANDES, F. L. Comparative bioassay methods to determine diamide susceptibility for two coffee pests. **Crop Protection**, v. 121, p. 34-38, 2019.

GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I.; CASTRO-MORENO, M.; OROZCO-CASTILLO, J. A.; RILEY-SALDAÑA, C. A. Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 01-16, 2014.

HALL, R. et al. Plant metabolomics: The missing link in functional genomics strategies. **Plant Cell**, v. 14, p. 1437–1440, 2002.

HILL, Camilla B.; ROESSNER, Ute. Metabolic profiling of plants by GC–MS. **The handbook of plant metabolomics**, p. 1-23, 2013.

HUBERT, J.; NUZILLARD, J. M.; RENAULT, J. H. Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? **Phytochemistry Reviews**, v. 16, p. 55–95, 2017.

ICO. **International Coffee Organization**. Total production by all exporting countries. 2021. (OIC, 2021) International Coffee Organization - Daily Coffee Prices (ico.org). Trade Statistics Tables. Disponível em: <https://www.ico.org/new_historical.asp>. Acesso em: 18 jun. 2021.

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

ISMAN, M. B.; SEFFRIN, R. Natural insecticides from the Annonaceae: A unique example for developing biopesticides, advances in plant biopesticides. In: Singh D. (Eds) **Advances in Plant Biopesticides**. Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2006-0_2p., pp. 21- 33, 2014.

KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 225-242, 2014.

LEBOEUF, M., CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 2, p. 2783-2813, 1980.

LIAW, C.C.; LIOU, J.R.; WU, T.Y.; CHANG, F.R.; WU, Y.C. Acetogenins from Annonaceae. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products.**, v.101, p. 113–230, 2016. 10.1007/978-3-319-22692-7

MACHOTA JÚNIOR, R.; BORTOLI, L.C., BOTTON, M.; GRÜTZMACHER, A. D. Fungi that cause rot in bunches of grape identified in adult fruit flies *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 73, p. 196–201, 2013.

MARTINEZ, S. S.; VAN EMDEN, H. F. Sublethal concentrations of azadirachtin affect food intake, conversion efficiency and feeding behaviour of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 89, n. 1, p. 65-71, 1999.

MENDONÇA, J. M. A.; CARVALHO, G. A.; GUIMARÃES, R. J.; REIS, P. R.; LUIZ CARLOS DIAS ROCHA, L. C. D. Produtos naturais e sintéticos no controle de *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville & Perrottet, 1842) (Lepdoptera: Lyonetiidae) e seus efeitos sobre a predação por vespas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, p. 892-899, 2006.

MESQUITA, C. M. D.; REZENDE, J. D.; CARVALHO, J. S.; FABRI JUNIOR, M. A.; MORAES, N. C.; DIAS, P. T.; ARAÚJO, W. G. Manual do café: distúrbios fisiológicos, pragas e doenças do cafeeiro. Belo Horizonte: EMATER, v. 62 p. 22-44, 2016.

MORDUE, A.J.M.; NISBET, A.J. 2000. Azadirachtin from de neem tree *Azadirachta indica*: its actions against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 29: 615-632.

NANTES, J. F. D.; PARRA, J. R. P. Biologia de *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Méneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae), em três variedades de café (*Coffea* ssp). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.6, p. 156-163, 1977.

PARRA, J. R. P. Biologia comparada de *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Méneville, 1842) (Lepidoptera - Lyonetiidae) visando ao seu zoneamento ecológico no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.29, p. 45-76, 1985.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R **Foundation for statistical computing**, Vienna, Austria, 2020.

RIBEIRO, L.P.; VENDRAMIM, J.D.; BICALHO, K.U.; ANDRADE, M.S.; FERNANDES, J.B.; MORAL, R.A.; DEMÉTRIO, C.G.B. *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): a promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 55, 6-14, 2013.

RIBEIRO, L.P.; VENDRAMIM, J.D.; GONÇALVES, G.L.P.; ANSANTE, T.F.; GLORIA, E.M.; LOPES, J.C.; MELLO-SILVA, R.; FERNANDES, J.B. Searching for promising sources of grain protectors in extracts from Neotropical Annonaceae. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas**, v.15, p. 215-232, 2016.

RIGHI, C. A., CAMPOE, O. C., BERNARDES, M. S., LUNZ, A. M. P., PIEDADE, S. M. S.; PEREIRA, C. R. Influence of rubber trees on leaf miner damage to coffee plants in an agroforestry system. **Agroforestry System**, v. 87, p. 1351-1362, 2013.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, p. 567-573, 2000.

SALKELD, E. H.; POTTER, C. The effect of the age and stage of development of insect eggs on their resistance to insecticides. **Bulletin of Entomological Research**, v. 44, p. 527-580, 1953.

SOARES, M. C. E., BALDIN, E. L. L., DO PRADO RIBEIRO, L., DOS SANTOS, M. C., BATISTA, Y., & VENDRAMIM, J. D. Lethal and sublethal effects of *Annona* spp. derivatives on *Bemisia tabaci* MEAM 1 (Hemiptera: Aleyrodidae) in tomato. **Neotropical Entomology**, v.1, p.1-10, 2021.

SOARES, M. C. E.; BALDIN, E. L. L.; DOS SANTOS, T. L. B.; DE CARVALHO, S. S.; VENDRAMIM, J. D.; DO PRADO RIBEIRO, L. Comparative bioactivity of annonaceous derivatives and neonicotinoid-based insecticides against the silverleaf whitefly. **Crop Protection**, v.140, 105430, 2021.

SOUZA, C.M.; BALDIN, E.L.L.; RIBEIRO, L.P.; SANTOS, T.L.B.; SILVA, I.F.; MORANDO, R.; VENDRAMIM, J.D. Antifeedant and growth inhibitory effects of Annonaceae derivatives on *Helicoverpa armigera* (Hübner). **Crop Protection**, v.121, p. 45-50, 2019.

SOUZA, C.M.; BALDIN, E.L.L.; RIBEIRO, L.P.; SILVA, I.F.; MORANDO, R.; BICALHO, K.U.; VENDRAMIM, J.D.; FERNANDES, J.B. Lethal and growth inhibitory activities of Neotropical Annonaceae-derived extracts, commercial formulation, and an isolated acetogenin against *Helicoverpa armigera*. **Journal of Pest Science**, v. 90, p. 701-709, 2017.

SOUZA, J. C.; REIS, P. R.; RIGITANO, R. L. O bicho mineiro do cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado. **Boletim Técnico - EPAMIG**, 48p. 1998.

STUPP, P.; RAKES, M.; MARTINS, L. N.; PIOVESAN, B.; OLIVEIRA, D. D. C.; CONTRERAS MIRANDA, J. A.; BERNARDI, D. Lethal and sublethal toxicities of acetogenin-based bioinsecticides on *Ceratitis capitata* and the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata*. **Embrapa Clima Temperado**, 2020.

SUMNER, L. W. et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis
Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI).
Metabolomics, v. 3, p. 211–221, 2007.

ZAFRA-POLO, M. C.; GONZÁLEZ, M. C.; ESTORNELL, E.; SAHPAZ, S.; CORTES, D.; Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. **Phytochemistry**, v. 42, p. 253-271, 1996.

CAPÍTULO 2

Mistura entre extrato etanólico de *Annona mucosa* Jacq. e inseticidas sintéticos sobre *Leucoptera coffeella*

RESUMO

Em cafeeiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville e Perrottet) (Lepidoptera: Lyonetiidae), é considerado uma praga-chave, exigindo frequentes aplicações de inseticidas sintéticos. Este estudo avaliou o possível efeito sinérgico do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* em mistura com inseticidas sintéticos diamidas e cloridrato de cartape sobre *L. coffeella*, em doses recomendadas e subdoses. Para isso, ensaios foram conduzidos em condições semi-controladas (casa-de-vegetação) utilizando três populações (Botucatu, SP; Franca, SP e Rio Paranaíba, MG) de *L. coffeella*. Em casa-de-vegetação, os tratamentos isolados e em mistura reduziram a área foliar consumida, demonstrando eficiência sobre lagartas de 2°-3° ínstar de *L. coffeella*. Constatou-se ação inseticida elevada nas misturas de inseticidas com ESAM (CL₅₀) sobre as três populações estudadas, sendo mais evidente nas populações de Franca e Rio Paranaíba. Em aspectos gerais, os tratamentos à base de Benevia 100 OD® em mistura com ESAM (CL₅₀) destacaram-se na comparação com os demais em ensaios de casa de vegetação. Em condições de campo (Botucatu, SP), os tratamentos isolados e/ou em mistura com ESAM (CL₅₀) apresentaram eficiência superior a 90% sobre a formação de minas após sete dias da aplicação, sendo o inseticida Altacor® evidenciado por sua eficiência de controle isolado ou em combinação com a CL₅₀ ESAM na CL₅₀ previamente estimada; contudo, os índices de eficiência foram reduzidos após 14 dias da aplicação (≈ 65%). ESAM (CL₅₀) apresentou resultados satisfatórios em mistura com inseticidas do grupo das antranilamidas (Altacor® e Benevia 100 OD®) e bis(tiocarbamato) (Cartarys®), incrementando a eficácia de controle de *L. coffeella*.

Palavras-chave: Bicho-mineiro-do-cafeeiro; plantas inseticidas; acetogeninas; antranilamidas; bis(tiocarbamato).

ABSTRACT

In coffee, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville and Perrottet) (Lepidoptera: Lyonetiidae), is considered a key pest, requiring frequent applications of synthetic insecticides. This study evaluated the possible synergistic effect of the ethanolic extract of *Annona mucosa* seeds in mixture with synthetic insecticides diamides and cartape hydrochloride on *L. coffeella*, in recommended doses and sub-doses. For this, trials were carried out under semi-controlled conditions (greenhouse) using three populations (Botucatu, SP; Franca, SP and Rio Paranaíba, MG) of *L. coffeella*. In a greenhouse, the isolated and mixed treatments reduced the leaf area consumed, demonstrating efficiency on 2°-3° instar caterpillars of *L. coffeella*. High insecticidal action was observed in the mixtures of insecticides with ESAM (CL50) on the three populations studied, being more evident in the populations of Franca and Rio Paranaíba. In general aspects, treatments based on Benevia 100 OD® mixed with ESAM (CL50) stood out in comparison with the others in greenhouse trials. Under field conditions (Botucatu, SP), the treatments alone and/or in mixture with ESAM (CL50) showed efficiency greater than 90% on mine formation after seven days of application, with the Altacor® insecticide being evidenced by its efficiency of control alone or in combination with the LC50 ESAM at the previously estimated LC50; however, efficiency rates were reduced after 14 days of application (≈ 65%). ESAM (CL50) showed satisfactory results when mixed with insecticides from the anthranilamides group (Altacor® and Benevia 100 OD®) and bis(thiocarbamate) (Cartarys®), increasing the effectiveness of controlling *L. coffeella*.

Keywords: Coffee leaf miner; insecticidal plants; acetogenins; anthranilamides; bis(thiocarbamate).

2.1 INTRODUÇÃO

O café é uma importante *commodity* para agricultura brasileira e de outros países sulamericanos. Na safra 2020/21, a produção global de café aumentou 1,9% em relação a safra anterior, com mais de 170 milhões de sacas de 60 kg, com crescimento de 5,2% no tipo Arábica (*Coffea arabica* L.), responsável por 101,88 milhões de sacas, que representa 60% da produção mundial (ICO, 2021a). Além da contínua oferta e demanda do produto, estes índices de produção ressaltam a importância socioeconômica do setor para os trabalhadores e países envolvidos (HEIN AND GATZWEILER, 2006; ICO, 2021a, b).

Diante da relevância do café no cenário agrícola mundial, é crescente a necessidade de minimizar os danos e prejuízos causados por pragas nos cafezais. No atual cenário, o manejo fitossanitário pode representar até 20% do custo total da produção anual (Conab, 2020), sendo uma parcela importante do montante destinada ao manejo das populações do bicho-mineiro-do-cafeeiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville e Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae). Essa espécie é considerada a principal praga de cultivos de café na região Neotropical, onde se encontram os maiores produtores de *C. arabica* (NEVES et al., 2006; SOUZA et al., 2006; CONSTANTINO et al., 2013; RIGHI et al., 2013; DAVID-RUEDA et al., 2016; GIRALDO et al., 2017).

O bicho-mineiro-do-cafeeiro é um microlepidóptero monófago, altamente especializado na colonização de folhas do cafeeiro, onde as lagartas se alimentam do parênquima paliçádico e confeccionam minas evidentes. Ao longo do tempo, as minas, inicialmente amareladas, se tornam áreas necróticas e quebradiças, resultando em queda acentuada de folhas, redução da capacidade fotossintética das plantas e, conseqüentemente, diminuição da qualidade e quantidade de grãos produzidos (NANTES E PARRA, 1977; SOUZA et al., 1998; REIS et al., 2000).

O controle de *L. coffeella* tem sido realizado, majoritariamente, por meio de pulverizações frequentes com inseticidas sintéticos (MENDONÇA et al, 2006) e, em alguns casos, por meio de controle biológico (OLIVEIRA et al., 2003). Dentre os inseticidas mais empregados, destacam-se aqueles do grupo das antranilâmidas (ex: clorantraniliprole, ciantraniliprole), piretroides (ex: gama-cialotrina), espinosinas (ex: espinetoram) e metilcarbamato de oxima (ex: metomil). Contudo, relatos de perda de eficiência a esses compostos são cada vez mais frequentes (ALVES et al., 1992;

FRAGOSO et al. 2002, 2003; LEITE et al., 2020), comprometendo a viabilidade técnica e econômica desses produtos nas lavouras à médio-longo prazo.

Com base no exposto, a busca por métodos alternativos de manejo torna-se cada vez mais urgente e necessária. Além de garantir o controle das populações do inseto-praga, essas práticas devem ser menos prejudiciais ao ambiente, aplicadores e consumidores, além de garantirem a possibilidade de utilização associada com outras táticas, como, por exemplo, o controle químico.

Nesse contexto, a associação entre inseticidas botânicos e inseticidas sintéticos têm demonstrado efeitos altamente promissores (GUEDES E OLIVEIRA, 2002; ZAHID et al., 2016, ALI et al., 2017). Levando em consideração a elevada gama de constituintes químicos existentes em plantas, derivados botânicos podem ser uma rica fonte de prospecção para novos agentes sinergistas. A combinação entre inseticidas sintéticos e derivados botânicos tende a incrementar a quantidade de compostos químicos envolvidos, os quais podem atuar em diferentes sítios-alvo no inseto, elevando os índices de eficiência e retardando o surgimento de populações resistentes (CURTIS, 1985; SAHAYARAJ E AMALRAJ, 2005; MORALES-RODRIGUEZ E PECK, 2009).

A família Annonaceae destaca-se pela elevada ação inseticida de algumas de suas espécies. Seus derivados podem interferir na atividade hormonal de lepidópteros (BLESSING et al., 2010), inibir a produção de ATP por meio do bloqueio do complexo mitocondrial I (NADH ubiquinona oxidoreductase) e, conseqüentemente, pela ocorrência de apoptose celular (ALALI et al., 1999). Estudos também demonstraram alterações morfológicas em *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, ???) (Lepidoptera: Noctuidae) (RIBEIRO et al., 2016; BRITO et al., 2020), indução de autofagia em espécies de *Aedes* (COSTA et al., 2016), redução na taxa de crescimento e na eficiência de conversão do alimento ingerido por *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) (SOUZA et al., 2017, 2019), além de mortalidade contra ninfas e adultos de *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae) (SOARES et al., 2021). O potencial inseticida desta família é geralmente associado à presença de metabólitos secundários (LEBOEUF et al., 1980; ZAFRA-POLO et al., 1996; CAVÉ et al., 1997; SANTOS E SALATINO, 2000; CALOPRISCO et al., 2002; GONZÁLEZ-ESQUINCA et al., 2014; LIAW et al., 2016).

Annona mucosa Jacq., vulgarmente conhecida como biribá, é uma anonácea nativa da Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica e cujo frutos são comercializados para

o consumo *in natura*. Estudos fitoquímicos e farmacológicos com derivados de *A. mucosa* identificaram acetogeninas (CHEN et al., 1996a; GUET al., 1997; CHÁVEZ et al., 1999), alcaloides (CAETANO E DADOUN, 1987; CHEN et al., 1996b), amidas (CHÁVEZ et al., 1999) e lignanas (CHEN et al., 1996b; FIGUEIREDO et al., 1999; ESTRADA-REYES et al., 2002), como principais classes de aleloquímicos sintetizados. Por exemplo, o extrato etanólico bruto preparado a partir de sementes de *A. mucosa* (ESAM) é composto por uma mistura de alcaloides, triglicerídeos e acetogeninas de estruturas químicas estruturalmente diversificadas (RIBEIRO et al., 2013). A toxicidade do ESAM está associada principalmente à presença majoritária da acetogenina bis-tetrahidrofurânica roliniastatina-1 (ANSANTE et al. 2015, SOUZA et al. 2017; RIBEIRO et al., 2020).

Considerando-se que derivados de Annonaceae são reconhecidos por sua ação inseticida e/ou insetistática e que a busca por ação sinérgica entre compostos seja uma importante estratégia dentro do manejo de pragas e manejo da resistência a inseticidas, este trabalho avaliou os efeitos da interação entre ESAM (CL₅₀) e inseticidas sintéticos, visando ao manejo de *L. coffeella*. Para isso, ensaios foram conduzidos em condições de semi-campo e campo.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados em casa de vegetação, pertencente ao Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas – LARESPI, e em campo, na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão – FEPE da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Campus de Botucatu, SP. Os testes laboratoriais foram conduzidos sob condições controladas (T= 26 ± 2°C, UR= 65 ± 10% e fotofase= 14h), enquanto os de casa de vegetação tiveram condições de temperatura e umidade parcialmente controlados (T= 31,5°C ± 8°C, UR= 68% ± 20% e luz natural).

2.2.1 Extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* (ESAM): origem e procedimento de preparação

Vouchers specimens de *A. mucosa* foram previamente identificadas pelo Dr. Renato Mello-Silva [Departamento de Botânica, Instituto de Biociências/Universidade de São Paulo (IB/USP)]. A parte utilizada para o preparo dos extratos foram sementes coletadas em 16 de março de 2017 correspondendo ao *voucher* de número 120985

com origem do Campus da ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil (22°42'28,5" S; 47°37'59,6" W; altitude 534m).

Para preparo dos extratos brutos, as sementes dos frutos maduros foram desidratadas em estufas com circulação de ar forçada a 40°C por 48-72h. Em sequência, as mesmas foram moídas em moinho de facas para a obtenção do pó fino, que foi armazenado em frascos de vidro hermeticamente fechados e mantidos sob refrigeração (-10°C) até a sua utilização. Os pós foram macerados em etanol grau análise (na proporção de 1:5, m v⁻¹) e mantidos em frascos hermeticamente fechados por três dias. Após este período, a solução foi filtrada por meio de papel filtro, repetindo este procedimento por três vezes. O solvente remanescente na solução filtrada foi eliminado em rotaevaporador à temperatura de 50°C e pressão de -600 mmHg.

2.2.2 Obtenção e manutenção de populações de *Leucoptera coffeella*

Foram utilizadas três populações de bicho-mineiro-do-cafeeiro, provenientes de Botucatu, SP (22°50'4.27"S; 48°25'38.08"O), Franca, SP (20°27'44.80"S; 47°25'2.66"O) e Rio Paranaíba, MG (19°12'49.45"S; 46°13'17.74"O). A população de *L. coffeella* de Botucatu foi considerada como padrão para a realização dos ensaios, visto que durante um ano antes da coleta das folhas não ocorreram aplicações de inseticidas sintéticos. O cafeeiro foi estabelecido há 15 anos, utilizando a variedade Tupi.

A criação-estoque de bicho-mineiro das três populações foi mantida sob condições controladas (T= 26 ± 2°C, UR= 65 ± 10% e fotofase= 14h) seguindo método de criação adaptado de Parra (1985). Para isso, folhas de cafeeiro com crisálidas de *L. coffeella* foram coletadas e alocadas em gaiolas metálicas (1,0 x 1,5 m) recobertas por tela antiáfideo (malha?). Após a emergência dos adultos, foi fornecida solução de mel a 10% (v/v), além de mudas de café (Catuaí 144 – seis a oito pares de folhas) sem tratamento químico como substrato de oviposição. As mudas contendo ovos eram retiradas e realocadas em outras gaiolas similares, destinadas à manutenção de lagartas. Após o completo desenvolvimento das mesmas, as folhas contendo crisálidas eram transferidas às gaiolas de adultos.

2.2.3 Ensaios em casa de vegetação

Os ensaios em casa de vegetação foram realizados para verificar o efeito de diferentes tratamentos (27) sobre minas iniciais ativas de *L. coffeella*. Os tratamentos foram compostos por ESAM na CL₅₀ previamente estimada (2,62 g.L⁻¹), quatro porcentagens da dose recomendada de inseticidas registrados para a praga na cultura do café, além das misturas destes com ESAM na CL₅₀ (Tabela 1). Inicialmente, as mudas de café (Catuaí IAC 144) apresentando 10 pares de folhas foram submetidas à oviposição por insetos provenientes das três populações separadamente. Para isso, as mudas foram acondicionadas em gaiolas metálicas cilíndricas (40 cm de altura × 15 cm de diâmetro), onde dez casais de adultos de *L. coffeella* foram liberados por um período de três dias. Com isso, foi possível padronizar o período de oviposição e, conseqüentemente, obter plantas com minas em idades similares por população para utilização nos ensaios.

Os tratamentos foram pulverizados até o ponto de escorrimento com o auxílio de uma pistola tipo gravidade (Modelo Arprex; Equipamentos para Pintura Majam Ltda., SP, Brasil), acoplada a um compressor de ar ajustado para propiciar uma pressão de 0,5 kgf cm⁻². O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 27 tratamentos, seis repetições e cinco subrepetições, onde cada repetição foi representada por uma planta e as subrepetições constituídas por cinco folhas minadas avaliadas por planta. Aos 7 DAA, avaliou-se a área foliar consumida e a eficácia deles.

Adicionalmente, com os resultados obtidos do ensaio anterior, avaliou-se o comportamento dos inseticidas com as três populações de *L. coffeella*, para isso adotou-se um arranjo fatorial simples (7 x 3), sendo constituído pelas três populações da praga (Rio Paranaíba, Franca e Botucatu) e sete tratamentos, sendo eles o inseticida na dose recomendada pelo fabricante, quatro combinações com ESAM na CL₅₀ (dose recomendada, 50, 25 e 10% da dose recomendada), solvente (acetona: metanol) e água.

Tabela 1 - Tratamentos utilizados nos ensaios realizados em casa de vegetação.

Inseticida/Derivado botânico principal	Adição	Concentração da dose de bula recomendada (DR*) (%)
CL ₅₀ ESAM	-	-
Altacor®	-	100
Benevia®	-	
Cartarys®	-	
Altacor®	-	50
Benevia®	-	
Cartarys®	-	
Altacor®	-	25
Benevia®	-	
Cartarys®	-	
Altacor®	-	10
Benevia®	-	
Cartarys®	-	
Altacor®		100
Benevia®		
Cartarys®		
Altacor®		50
Benevia®	ESAM	
Cartarys®	CL ₅₀	
Altacor®		25
Benevia®		
Cartarys®		
Altacor®		10
Benevia®		
Cartarys®		
Acetona: Metanol (1:1)	-	-
Água	-	-

* Concentração da dose de bula recomendada (DR).

2.2.4 Ensaio a campo

Este ensaio foi realizado em pomar de café (var. Tupi, aproximadamente 15 anos) na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão - FEPE, pertencente à FCA/UNESP de Botucatu (22°50'04"S e 48°25'33"O). O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados com treze tratamentos (Tabela 3): ESAM CL₅₀ (2,62 g.L⁻¹) e três inseticidas sintéticos comerciais nas doses recomendadas (Altacor®, Benevia 100 OD® e Cartarys®) isoladamente; misturas envolvendo ESAM na CL₅₀ e as doses recomendadas dos três produtos e misturas de ESAM (CL₅₀) com metade da dose recomendada para Altacor®, Benevia 100 OD® e Cartarys®; além de Anosom®

(inseticida botânico comercial à base de acetogeninas) e duas testemunhas negativas compostas pelo solvente [acetona:metanol (1:1)] e água.

O ensaio foi distribuído em cinco blocos e cada parcela foi constituída por seis plantas espaçadas em 0,7m, dispostas em fileira única. Dentro das parcelas, as plantas foram pulverizadas com os respectivos tratamentos por meio de pulverizador costal manual (Herbicat) calibrado para 200 L/ha. Foi mantida uma linha de plantas sem tratamento entre os blocos, a fim de evitar eventuais efeitos de deriva. Os tratamentos foram avaliados aos 14 DAA, por meio da contagem do número de ovos, número de minas ativas e área foliar consumida em dois ramos de cada terço de seis plantas/parcela (36 ramos no total/ tratamento).

Adicionalmente, com os resultados obtidos do ensaio anterior, avaliou-se o comportamento dos inseticidas com as duas datas (7 e 14 DAA), para isso adotou-se um o arranjo fatorial simples (6 x 2), sendo constituído pelas duas datas e seis tratamentos, sendo eles ESAM CL₅₀, o inseticida na dose recomendada pelo fabricante, duas combinações com ESAM CL₅₀ (dose recomendada e 50% da dose recomendada), solvente (acetona: metanol) e água.

2.2.5 Análise estatística

Os pressupostos estatísticos de todos os ensaios foram verificados por meio dos testes de homocedasticidade (Bartlett, Hartley e Levene), normalidade (Jarque-Bera) e aditividade (Índice paramétrico). Para os testes de médias, foram empregados os testes de Tukey e Scott-Knott, ($p \leq 0,05$), por meio do software Speed Stat 2.1. (CARVALHO et al., 2020). Os dados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos a transformações por postos (rank), logarítmica, raiz quadrada, Box-Cox ($y+1$), $\lambda = x$ ou por meio da função arcsen da raiz ($x/100$), de acordo com o parâmetro avaliado.

Para as estimativas de concentração letal para 50 % das lagartas (CL₅₀), foi utilizado um modelo binomial com função de ligação complemento log-log (modelo gompit), utilizando-se análise de Probit no software estatístico "R", versão 3.6.3 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2020). As áreas foliares consumidas foram determinadas através de conversão binária de pixels pelo Software ImageJ 1.8, na qual a quantificação da mina é feita através da leitura da área em cm². A eficiência de

controle dos tratamentos (EC) foi estabelecida por meio da fórmula proposta por Schneider-Orelli (1947).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Ensaios em casa de vegetação

Para a população de Botucatu, não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto à área foliar consumida por lagartas de *L. coffeella* (Tabela 2). Contudo, todos os tratamentos reduziram a área minada (0,10-0,53 cm²) em relação aos controles negativos [solução de solventes (1,62 cm²) e água (1,69 cm²)]. Os tratamentos com ESAM (na CL₅₀) em associação com Benevia® a 25% e 10% da dose de bula reduziram 86 e 79,60% a área foliar consumida, respectivamente, em relação ao tratamento com água. Também se verificou redução de 88,2% no consumo foliar pelas lagartas entre ESAM (CL₅₀) e o inseticida Altacor® a 10% da dose de bula.

Quanto ao consumo foliar de lagartas provenientes da população coletada em Franca, SP, todos os tratamentos (0,11-0,51 cm²) diferiram dos controles negativos, reduzindo a área minada pelo inseto (Tabela 3). As reduções de consumo de área foliar variaram entre 43,30 (Altacor® a 10% da dose recomendada) e 95,00% (ESAM CL₅₀ + Cartarys® a 50% da dose recomendada). Constatou-se melhores efeitos para a maioria das combinações empregadas, com destaque para as misturas envolvendo ESAM CL₅₀ e Benevia® a 50% e 25%, e Cartarys® a 50%. Não ocorreu resultados satisfatórios nas combinações envolvendo ESAM CL₅₀ com Benevia® na dose recomendada, Altacor® a 25% e Cartarys® na dose recomendada e a 10%.

Com exceção de Cartarys® na dose recomendada (2,11 cm²), todos os tratamentos reduziram significativamente (0,12-134 cm²) a área consumida por lagartas de *L. coffeella* provenientes da população de Rio Paranaíba em relação ao solvente (2,79 cm²) e a água (2,72 cm²) (Tabela 4). Entre os dados observados, houve variações de redução (%) de área consumida entre 24,38% (Cartarys® DR) e 95,7% (ESAM CL₅₀+ Benevia® 50%), similar ao que ocorreu com as duas populações anteriores. Similarmente ao verificado com a população de Franca, também se constatou elevado número de combinações em destaque para àquelas envolvendo ESAM CL₅₀ e Benevia® a 50% e 10%, e Cartarys® a 50%. Das misturas avaliadas,

apenas as combinações de ESAM CL₅₀ com Benevia[®] a 25%, Altacor[®] a 50% e Cartarys[®] a 10% não demonstraram serem eficientes mais juntas que isoladas.

Verificou-se variação significativa quanto ao efeito de Altacor[®] e ESAM CL₅₀ + Altacor[®] DR sobre as diferentes populações do bicho-mineiro-do-cafeeiro (Tabela 5). Para os insetos provenientes de Rio Paranaíba, os menores índices de consumo foliar foram verificados nas combinações entre ESAM CL₅₀ e o Altacor[®] a 50, 25 e 10% (0,37; 0,17 e 0,55 cm²) em comparação com os controles negativos. Todas as combinações reduziram significativamente o consumo foliar por lagartas de *L. coffeella* em relação aos controles negativos para as populações de Franca (0,12-0,33 cm²) e Botucatu (1,14-1,24 cm²). A interação entre inseticidas e regiões foi significativa para os tratamentos à base de Altacor[®] DR isoladamente e em sua combinação com ESAM CL₅₀, verificando-se menor consumo foliar nas regiões de Franca (0,12 e 0,23 cm²) e Botucatu (0,25 e 0,28 cm²) em relação a Rio Paranaíba (0,79 e 1,14 cm²).

O inseticida Benevia[®] DR teve variação significativa sobre as diferentes populações do bicho-mineiro-do-cafeeiro (Tabela 6). Para a população de Rio Paranaíba, os menores índices de consumo foliar de *L. coffeella* foram verificados nas combinações entre ESAM CL₅₀ e o produto comercial a 50, 25 e 10% (0,13; 0,29 e 0,20 cm², respectivamente) em comparação com os controles negativos. Todos os tratamentos reduziram significativamente o consumo foliar por lagartas de *L. coffeella* em relação aos controles negativos para as populações de Franca e Botucatu. A interação entre inseticidas e regiões foi significativa para os tratamentos à base de Benevia[®] DR isolado e em sua combinação com ESAM CL₅₀, verificando-se menor consumo foliar nas regiões de Franca (0,19 cm²) e Botucatu (0,20 cm²) em relação a Rio Paranaíba (0,57 cm²).

Também verificou-se variação significativa quanto ao efeito de Cartarys[®] e CL₅₀ + Cartarys[®] DR, 50 e 25% sobre as diferentes populações do bicho-mineiro-do-cafeeiro (Tabela 7). Plantas de Rio Paranaíba demonstraram menores índices de consumo foliar nas combinações entre ESAM CL₅₀ e o produto comercial na DR, a 50 e 25% (0,22; 0,83 e 0,91 cm², respectivamente) em comparação com os controles negativos água, solvente, Cartarys[®] e ESAM CL₅₀ com Cartarys[®] a 10%, que não diferiram entre si. Todas as combinações reduziram significativamente o consumo foliar por lagartas de *L. coffeella* em relação aos controles negativos para as populações de Franca (0,12-0,44 cm²) e Botucatu (0,24-0,53 cm²). A interação entre inseticidas e populações revelou menor consumo foliar nas regiões de Franca e

Botucatu a partir da mistura de ESAM CL₅₀ com Cartarys® 50 (0,12 e 0,24 cm²). Botucatu também apresentou resultado semelhante com ESAM CL₅₀ associado com Cartarys® a 10%. Plantas de Rio Paranaíba tiveram menor consumo foliar quando tratadas com ESAM CL₅₀ em mistura com Cartarys® DR (0,22 cm²).

Tabela 2 - Médias de área foliar consumida (\pm EP) por lagartas de 2^o-3^o instar de *Leucoptera coffeella* provenientes de Botucatu, SP após sete dias da aplicação dos tratamentos

Tratamentos	Área consumida (cm ²)
ESAM CL ₅₀	0,27 \pm 0,08 b
Benevia [®] DR	0,20 \pm 0,06 b
Altacor [®] DR	0,25 \pm 0,11 b
Cartarys [®] DR	0,24 \pm 0,03 b
CL ₅₀ + Benevia [®] DR	0,26 \pm 0,04 b
CL ₅₀ + Benevia [®] 50	0,28 \pm 0,15 b
CL ₅₀ + Benevia [®] 25	0,22 \pm 0,07 b
CL ₅₀ + Benevia [®] 10	0,33 \pm 0,18 b
CL ₅₀ + Altacor [®] DR	0,28 \pm 0,05 b
CL ₅₀ + Altacor [®] 50	0,17 \pm 0,06 b
CL ₅₀ + Altacor [®] 25	0,30 \pm 0,13 b
CL ₅₀ + Altacor [®] 10	0,18 \pm 0,04 b
CL ₅₀ + Cartarys [®] 50	0,26 \pm 0,04 b
CL ₅₀ + Cartarys [®] 25	0,36 \pm 0,16 b
CL ₅₀ + Cartarys [®] 10	0,53 \pm 0,21 b
CL ₅₀ + Cartarys [®] DR	0,32 \pm 0,17 b
Benevia [®] 50	0,26 \pm 0,07 b
Benevia [®] 25	0,25 \pm 0,06 b
Benevia [®] 10	0,43 \pm 0,17 b
Altacor [®] 50	0,14 \pm 0,06 b
Altacor [®] 25	0,17 \pm 0,09 b
Altacor [®] 10	0,21 \pm 0,13 b
Cartarys [®] 50	0,10 \pm 0,01 b
Cartarys [®] 25	0,17 \pm 0,08 b
Cartarys [®] 10	0,37 \pm 0,15 b
Acetona: Metanol (1:1)	1,69 \pm 0,20 a
Água	1,62 \pm 0,16 a
P	<0,001

Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (teste de Scott-Knott, $p < 0,05$). DR:dose recomendada.

Tabela 3 - Médias de área foliar consumida (\pm EP) por lagartas de 2^o-3^o instar de *Leucoptera coffeella* provenientes de Franca, SP após sete dias da aplicação dos tratamentos

Tratamentos	Área consumida (cm ²)
ESAM CL ₅₀	0,18 \pm 0,02 c
Benevia [®] DR	0,19 \pm 0,07 c
Altacor [®] DR	0,23 \pm 0,07 c
Cartarys [®] DR	0,15 \pm 0,03 c
CL ₅₀ + Benevia [®] DR	0,26 \pm 0,09 c
CL ₅₀ + Benevia [®] 50	0,19 \pm 0,08 c
CL ₅₀ + Benevia [®] 25	0,16 \pm 0,05 c
CL ₅₀ + Benevia [®] 10	0,20 \pm 0,05 c
CL ₅₀ + Altacor [®] DR	0,12 \pm 0,01 c
CL ₅₀ + Altacor [®] 50	0,33 \pm 0,10 c
CL ₅₀ + Altacor [®] 25	0,21 \pm 0,07 c
CL ₅₀ + Altacor [®] 10	0,28 \pm 0,10 c
CL ₅₀ + Cartarys [®] 50	0,11 \pm 0,01 c
CL ₅₀ + Cartarys [®] 25	0,19 \pm 0,06 c
CL ₅₀ + Cartarys [®] 10	0,49 \pm 0,20 c
CL ₅₀ + Cartarys [®] DR	0,24 \pm 0,04 c
Benevia [®] 50	0,42 \pm 0,26 c
Benevia [®] 25	0,42 \pm 0,01 b
Benevia [®] 10	0,24 \pm 0,12 c
Altacor [®] 50	0,51 \pm 0,10 b
Altacor [®] 25	0,13 \pm 0,04 c
Altacor [®] 10	1,21 \pm 0,70 b
Cartarys [®] 50	0,17 \pm 0,02 c
Cartarys [®] 25	0,32 \pm 0,09 c
Cartarys [®] 10	0,15 \pm 0,07 c
Acetona: Metanol (1:1)	2,19 \pm 0,19 a
Água	2,14 \pm 0,30 a
<i>P</i>	> 0,001

Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (teste de Scott-Knott, $p < 0,05$). DR:dose recomendada.

Tabela 4 - Médias de área foliar consumida (\pm EP) por lagartas de 2^o-3^o instar de *Leucoptera coffeella* provenientes de Rio Paranaíba, MG após sete dias da aplicação dos tratamentos

Tratamentos	Área consumida (cm ²)
ESAM CL ₅₀	0,24 \pm 0,05 c
Benevia [®] DR	0,57 \pm 0,12 c
Altacor [®] DR	1,14 \pm 0,17 b
Cartarys [®] DR	2,11 \pm 0,35 a
CL ₅₀ + Benevia [®] DR	0,48 \pm 0,16 c
CL ₅₀ + Benevia [®] 50	0,12 \pm 0,01 c
CL ₅₀ + Benevia [®] 25	0,29 \pm 0,06 c
CL ₅₀ + Benevia [®] 10	0,20 \pm 0,10 c
CL ₅₀ + Altacor [®] DR	0,79 \pm 0,27 b
CL ₅₀ + Altacor [®] 50	0,37 \pm 0,13 c
CL ₅₀ + Altacor [®] 25	0,17 \pm 0,04 c
CL ₅₀ + Altacor [®] 10	0,55 \pm 0,23 c
CL ₅₀ + Cartarys [®] 50	0,22 \pm 0,07 c
CL ₅₀ + Cartarys [®] 25	0,81 \pm 0,10 b
CL ₅₀ + Cartarys [®] 10	0,87 \pm 0,10 b
CL ₅₀ + Cartarys [®] DR	1,34 \pm 0,30 b
Benevia [®] 50	0,73 \pm 0,26 b
Benevia [®] 25	0,22 \pm 0,05 c
Benevia [®] 10	0,56 \pm 0,11 c
Altacor [®] 50	0,24 \pm 0,11 c
Altacor [®] 25	0,36 \pm 0,13 c
Altacor [®] 10	1,18 \pm 0,17 b
Cartarys [®] 50	0,95 \pm 0,18 b
Cartarys [®] 25	1,20 \pm 0,22 b
Cartarys [®] 10	0,82 \pm 0,10 b
Acetona: Metanol (1:1)	2,79 \pm 0,42 a
Água	2,72 \pm 0,39 a
P	<0,001

Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (teste de Scott-Knott, $p < 0,05$). FS = Fator de sinergismo (Wagner e Ulrich-Merzenich, 2009). DR:dose recomendada.

Tabela 5. Médias de área foliar consumida (\pm EP) por lagartas de 2º instar de *Leucoptera coffeella* provenientes de três regiões após sete dias da aplicação dos tratamentos envolvendo Altacor®

Tratamentos	Área foliar consumida (cm ²)			
	Rio Paranaíba - MG	Franca - SP	Botucatu - SP	mm
Altacor DR	1,14 \pm 0,18 Aa	0,23 \pm 0,07 Bb	0,25 \pm 0,12 Bb	0,55 b
CL ₅₀ + Altacor® DR	0,79 \pm 0,28 Aa	0,12 \pm 0,01 Bb	0,28 \pm 0,06 Bb	0,40 b
CL ₅₀ + Altacor® 50	0,37 \pm 0,14 Ab	0,33 \pm 0,11 Ab	0,17 \pm 0,06 Ab	0,30 b
CL ₅₀ + Altacor® 25	0,17 \pm 0,05 Ab	0,21 \pm 0,07 Ab	0,30 \pm 0,13 Ab	0,23 b
CL ₅₀ + Altacor® 10	0,55 \pm 0,24 Ab	0,28 \pm 0,10 Ab	0,18 \pm 0,04 Ab	0,34 b
Acetona: Metanol (1:1)	1,15 \pm 0,02 Aa	1,15 \pm 0,17 Aa	1,24 \pm 0,18 Aa	1,12 a
Água	1,26 \pm 0,02 Aa	1,14 \pm 0,20 Aa	1,14 \pm 0,18 Aa	1,06 a
mm	0,607 A	0,239 B	0,238 B	
P	Populações	0,002		
	Tratamentos	< 0,001		
	Interação	< 0,001		

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas e maiúsculas distintas nas linhas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro (P : p-valor (Box-Cox ($y+1$), $\lambda = -0,1$)). Mm: média marginal dos tratamentos.

Tabela 6 - Médias de área foliar consumida (\pm EP) por lagartas de 2º instar de *Leucoptera coffeella* provenientes de três regiões após sete dias da aplicação dos tratamentos envolvendo Benevia 100 OD®

Tratamentos	Área foliar consumida (cm ²)			
	Rio Paranaíba-MG	Franca-SP	Botucatu-SP	mm
Benevia DR	0,57 \pm 0,13 Ab	0,19 \pm 0,07 Bb	0,20 \pm 0,06 Bb	0,32 b
CL ₅₀ + Benevia® DR	0,48 \pm 0,16 Ab	0,27 \pm 0,09 Ab	0,27 \pm 0,05 Ab	0,33 b
CL ₅₀ + Benevia® 50	0,13 \pm 0,02 Ad	0,19 \pm 0,09 Ab	0,28 \pm 0,16 Ab	0,20 c
CL ₅₀ + Benevia® 25	0,29 \pm 0,06 Ac	0,17 \pm 0,05 Ab	0,22 \pm 0,07 Ab	0,22 c
CL ₅₀ + Benevia® 10	0,20 \pm 0,01 Ad	0,32 \pm 0,13 Ab	0,16 \pm 0,03 Ab	0,24 c
Acetona: Metanol (1:1)	0,83 \pm 0,03 Aa	0,81 \pm 0,03 Aa	0,81 \pm 0,03 Aa	0,32 a
Água	0,90 \pm 0,03 Aa	0,74 \pm 0,12 Aa	0,80 \pm 0,02 Aa	0,33 a
mm	0,47 A	0,38 A	0,39 A	
<i>P</i>	Populações	0,22		
	Tratamentos	< 0,001		
	Interação	0,098		

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas e maiúsculas distintas nas linhas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro (*P*: p-valor (Box-Cox ($y+1$), $\lambda= 0,15$)). Mm: média marginal dos tratamentos.

Tabela 7 - Médias de área foliar consumida (\pm EP) por lagartas de 2º instar de *Leucoptera coffeella* provenientes de três regiões após sete dias da aplicação dos tratamentos envolvendo Cartarys®

Tratamentos	Área foliar consumida (cm ²)			
	Rio Paranaíba-MG	Franca-SP	Botucatu-SP	mm
Cartarys® DR	1,51 \pm 0,15 Aa	0,16 \pm 0,03 Bc	0,25 \pm 0,04 Bc	0,64 b
CL ₅₀ + Cartarys® DR	0,22 \pm 0,08 Ac	0,25 \pm 0,05 Ac	0,27 \pm 0,05 Ac	0,25 c
CL ₅₀ + Cartarys® 50	0,83 \pm 0,05 Ab	0,12 \pm 0,01 Bc	0,24 \pm 0,09 Bc	0,39 c
CL ₅₀ + Cartarys® 25	0,91 \pm 0,07 Ab	0,19 \pm 0,07 Cc	0,53 \pm 0,21 Bb	0,55 b
CL ₅₀ + Cartarys® 10	1,35 \pm 0,31 Aa	0,44 \pm 0,09 Bb	0,24 \pm 0,08 Cc	0,68 b
Acetona: Metanol (1:1)	1,71 \pm 0,23 Aa	1,51 \pm 0,15 Aa	1,17 \pm 0,11 Aa	1,46 a
Água	1,89 \pm 0,17 Aa	1,45 \pm 0,06 Aa	1,19 \pm 0,10 Aa	1,51 a
mm	1,20 A	0,59 B	0,56 B	1,20
P	Populações	< 0,001		
	Tratamentos	< 0,001		
	Interação	< 0,001		

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas e maiúsculas distintas nas linhas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro (*P*: p-valor (raiz cúbica (1,50))).

2.3.2 Ensaio a campo

Todos os tratamentos reduziram o consumo foliar (0,38-1,07 cm²) em relação ao solvente (3,13 cm²) e a água (3,46 cm²) após sete dias da aplicação (7 DAA) sobre as minas iniciais do bicho-mineiro-do-cafeeiro (Tabela 8). Os tratamentos empregados isoladamente revelaram eficiências variando entre 53,96% (Altacor[®]) e 88,37% (Cartarys[®]). Quando combinados com ESAM CL₅₀, foram verificados índices de eficiência variando entre 82,15 e 88,27%; já com 50% da dose recomendada, os índices oscilaram entre 68,67 e 84,41%. O inseticida Anosom[®], considerado padrão de origem botânica, apresentou a maior eficiência (88,83%) no ensaio.

Quanto à mortalidade das lagartas de *L. coffeella* aos 7 DAA, todos os tratamentos diferiram dos controles e de Anosom[®], reduzindo o número de insetos no interior das minas (Tabela 9). Eficiências superiores a 75% foram verificadas em Altacor[®] na dose recomendada e uso isolado (79,31%), na combinação deste com ESAM CL₅₀ (82,75%) e com 50% da dose recomendada associado a ESAM CL₅₀ (79,31%).

Com relação à formação de minas iniciais aos 7 DAA, todos os tratamentos provocaram significativas reduções em relação ao solvente (104,20 minas), água (114,60 minas) e Anosom[®] (54,20 minas) (Tabela 10). As menores médias foram verificadas em Cartarys[®] (isolado e na dose recomendada), nas combinações envolvendo os inseticidas comerciais em dose recomendada com a ESAM CL₅₀ e em Altacor[®] a 50% combinado com ESAM CL₅₀. Todos os tratamentos apresentaram eficiência superior a 90% e a mistura dos produtos comerciais com ESAM CL₅₀ resultou em ação sinérgica para os três inseticidas (FS= 5,11; 2,25 e 5,75, respectivamente) demonstrando aumento de 6,5; 4,5 e 4,7% na eficiência do Altacor[®], Benevia[®] e Cartarys[®], respectivamente.

Aos 14 DAA, todos os tratamentos promoveram redução significativa na formação de minas em relação a Anosom[®] (50,0 minas), ao solvente (70,40 minas) e a água (79,40 minas) (Tabela 11). As menores médias de minas foram verificadas em Cartarys[®], na dose recomendada e isolado (5,80) e nas combinações de ESAM CL₅₀ com Altacor[®] a 50% (3,40) e Cartarys[®] a 50% (7,60). Esses mesmos tratamentos também apresentaram as maiores eficiências, com índices superiores a 90,00%.

Quanto à formação de minas iniciais sete e 14 DAA, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. As misturas entre ESAM CL₅₀ e o

inseticida Altacor[®] na dose recomendada (1,80) e 50% (0,80) diferenciaram-se dos demais com menor formação de minas aos 7 DAA. Já para 14 DAA, Altacor[®] 50% com ESAM CL₅₀ (3,40) manteve o menor resultado diferenciando-se dos outros tratamentos.

Para o inseticida Benevia 100 OD[®], a formação de minas iniciais ao longo do tempo não demonstrou diferenças significativas de acordo com as médias marginais. (Tabela 13). Todos os tratamentos nas duas datas reduziram a formação de minas quando comparadas com os controles negativos, solvente e água. Aos 7 DAA, Benevia 100 OD[®] na dose recomendada teve menor tamanho de minas iniciais formadas.

Para o inseticida Cartarys[®], foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, mas não entre as datas avaliadas de acordo com as médias marginais. Semelhante aos dois inseticidas comerciais descritos anteriormente, os tratamentos reduziram a média de minas formadas por *L. coffeella* quando comparados aos controles negativos. (Tabela 14). Aos 7 DAA, o menor valor foi observado no tratamento Cartarys[®] + ESAM CL₅₀ (0,8). Para a avaliação de 14 DAA, todos os tratamentos diferiram dos controles negativos, com menores médias nas misturas de Cartarys[®] DR e Cartarys[®] a 50% com ESAM CL₅₀ (5,8 e 7,6, respectivamente).

Tabela 8. Médias de área foliar consumida (\pm EP) por lagartas de 2^o - 3^o instar de *Leucoptera coffeell* após sete dias da aplicação dos tratamentos em ensaio de campo em Botucatu, SP

Tratamentos	Adição	Área consumida (cm ²)	EC (%)
ESAM CL ₅₀		1,07 \pm 0,26	b
Altacor [®] DR		1,59 \pm 0,55	b
Benevia [®] DR		0,60 \pm 0,15	c
Cartarys [®] DR		0,40 \pm 0,16	c
Altacor [®] DR		0,38 \pm 0,12	c
Benevia [®] DR		0,62 \pm 0,36	c
Cartarys [®] DR		0,57 \pm 0,18	c
Altacor [®] 50	ESAM CL ₅₀	0,54 \pm 0,26	c
Benevia [®] 50		1,08 \pm 0,32	b
Cartarys [®] 50		1,06 \pm 0,38	b
Anosom [®]		0,39 \pm 0,07	c
Acetona: Metanol (1:1)		3,13 \pm 0,55	a
Água		3,46 \pm 0,37	a
<i>P</i>		<0,001	

Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (teste de Scott-Knott, $p < 0,05$) EC = Eficiência de controle (Schneider-Orelli (1947)).

Tabela 9 - Médias de mortalidade (\pm EP) de lagartas de *Leucoptera coffeella* após sete dias da aplicação dos tratamentos em ensaio de campo em Botucatu, SP

Tratamentos	Adição	Mortalidade (%)	EC (%)
ESAM CL ₅₀		31,67 \pm 0,40 a	62,06
Altacor [®] DR		40,00 \pm 0,36 a	79,31
Benevia [®] DR		26,67 \pm 0,49 a	51,72
Cartarys [®] DR		36,67 \pm 0,42 a	72,41
Altacor [®] DR		41,16 \pm 0,16 a	82,75
Benevia [®] DR		36,67 \pm 0,42 a	72,41
Cartarys [®] DR		35,50 \pm 0,56 a	68,96
Altacor [®] 50	CL ₅₀ ESAM	40,00 \pm 0,44 a	79,31
Benevia [®] 50		35,00 \pm 0,56 a	68,96
Cartarys [®] 50		33,33 \pm 0,61 a	65,51
Anosom [®]		13,33 \pm 0,42 b	24,13
Acetona: Metanol (1:1)		5,50 \pm 0,22 b	6,89
Água		1,67 \pm 0,16 b	-
$P < 0,001$			

Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (teste de Scott-Knott, $p < 0,05$). EC = Eficiência de controle dos tratamentos Schneider-Orelli (1947).

Tabela 10 - Médias de minas iniciais (\pm EP) de *Leucoptera coffeella* sete dias após a aplicação dos tratamentos em ensaio de campo em Botucatu, SP

Tratamentos	Adição	Nº de minas	EC (%)
ESAM CL ₅₀		7,80 \pm 1,36 c	93,19
Altacor [®] DR		9,20 \pm 2,15 c	91,97
Benevia [®] DR		9,00 \pm 2,37 c	92,14
Cartarys [®] DR		4,60 \pm 1,60 d	95,98
Altacor [®] DR		1,80 \pm 1,11 d	98,42
Benevia [®] DR		4,00 \pm 3,10 d	96,50
Cartarys [®] DR		0,80 \pm 0,49 d	99,30
Altacor [®] 50	ESAM CL ₅₀	0,80 \pm 0,80 d	99,30
Benevia [®] 50		8,40 \pm 2,50 c	92,67
Cartarys [®] 50		9,40 \pm 1,96 c	91,79
Anosom [®]		54,20 \pm 1,62 b	52,70
Acetona: Metanol (1:1)		104,20 \pm 11,87 a	93,19
Água		114,60 \pm 13,91 a	91,97
$P < 0,001$			

Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (teste de Scott-Knott, $p < 0,05$). EC = Eficiência de controle dos tratamentos (Schneider-Orelli (1947)).

Tabela 11 - Médias de minas iniciais (\pm EP) de *Leucoptera coffeella* 14 dias após a aplicação dos tratamentos em ensaio de campo em Botucatu, SP

Tratamentos	Adição	Nº de minas	EC (%)
ESAM CL ₅₀		25,6 \pm 3,30 c	67,59
Altacor [®] DR		17,8 \pm 3,25 c	77,47
Benevia 100 OD [®] DR		12,4 \pm 2,62 c	84,30
Cartarys [®] DR		14,2 \pm 2,80 c	82,03
Altacor [®] DR		15,2 \pm 2,87 c	80,76
Benevia 100 OD [®] DR		13,0 \pm 1,87 c	83,54
Cartarys [®] DR		5,80 \pm 1,59 d	92,66
Altacor [®] 50	ESAM CL ₅₀	3,40 \pm 1,29 d	95,70
Benevia 100 OD [®] 50		18,4 \pm 4,30 c	76,71
Cartarys [®] 50		7,60 \pm 4,31 d	90,38
Anosom [®]		50,0 \pm 4,05 b	36,71
Acetona: Metanol (1:1)		70,4 \pm 6,36 a	67,59
Água		79,0 \pm 6,78 a	77,47
<i>P</i> < 0,001			

Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (teste de Scott-Knott, $p < 0,05$). EC = Eficiência de controle dos tratamentos (Schneider-Orelli (1947)).

Tabela 12. Médias de minas (\pm EP) iniciais de *Leucoptera coffeella* aos sete e 14 dias após a aplicação dos tratamentos envolvendo Altacor® em ensaio decampo em Botucatu, SP

Tratamentos	Adição	N° de minas (0 DAA)		N° de minas (14 DAA)		mm
ESAM CL ₅₀		7,80 \pm 1,36	Bb	25,60 \pm 3,30	Ab	16,70 b
Altacor® DR		9,20 \pm 2,15	Ab	17,80 \pm 3,25	Ab	13,50 b
Altacor® DR	ESAM CL ₅₀	1,80 \pm 1,11	Bc	15,20 \pm 2,87	Ab	8,50 c
Altacor® 50		0,80 \pm 0,80	Ac	3,40 \pm 1,29	Ac	2,10 d
Acetona: Metanol (1:1)		104,20 \pm 11,87	Aa	70,40 \pm 6,36	Ba	87,30 a
Água		114,60 \pm 13,91	Aa	79,00 \pm 6,78	Ba	96,80 a
mm		39,7	A	35,23	A	
<i>P</i>	Tempo	< 0,001				
	Tratamentos	0,02999				
	Interação	< 0,001				

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas e maiúsculas distintas nas linhas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro (*P*: p-valor (Box-Cox ($y+1$), $\lambda= 0,5$)).

Tabela 13 - Médias de minas (\pm EP) iniciais de *Leucoptera coffeella* aos sete e 14 dias após a aplicação dos tratamentos envolvendo Benevia 100 OD® em ensaio de campo em Botucatu, SP

Tratamentos	Adição	N° de Minas (0 DAA)		N° de Minas (14 DAA)		mm	
ESAM CL50		7,80 \pm 1,36	Bb	25,6 \pm 3,30	Ab	16,7	b
Benevia 100 OD® DR		9,00 \pm 2,37	Ab	12,4 \pm 2,62	Ac	10,7	c
Benevia 100 OD® DR	ESAM CL50	4,00 \pm 3,10	Bc	13,0 \pm 1,87	Ac	8,5	c
Benevia 100 OD® 50		8,40 \pm 2,50	Ac	18,4 \pm 4,30	Ac	13,4	c
Acetona: Metanol (1:1)		104,20 \pm 11,87	Aa	70,4 \pm 6,36	Ba	83,3	a
Água		114,60 \pm 13,91	Aa	79,0 \pm 6,78	Ba	96,8	a
mm		41,3	A	36,46	A		
P	Tempo	< 0,001					
	Tratamentos	0,2329					
	Interação	< 0,001					

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas e maiúsculas distintas nas linhas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro (P : p-valor (Box-Cox ($y+1$), $\lambda=0,5$))

Tabela 14 - Médias de minas (\pm EP) iniciais de *Leucoptera coffeella* aos sete e 14 dias após a aplicação dos tratamentos envolvendo Cartarys® em ensaio de campo em Botucatu, SP

Tratamentos	Adição	N° de Minas (0 DAA)		N° de Minas (14 DAA)		mm	
ESAM CL ₅₀		7,80 \pm 1,36	Bb	25,6 \pm 3,30	Ab	16,7	b
Cartarys® DR		4,60 \pm 1,60	Bb	14,2 \pm 2,80	Ac	9,4	c
Cartarys® DR	ESAM CL ₅₀	0,80 \pm 0,49	Ac	5,80 \pm 1,59	Ad	3,3	d
Cartarys® 50		9,40 \pm 1,96	Ab	7,60 \pm 4,31	Ad	8,5	c
Acetona: Metanol (1:1)		104,20 \pm 11,87	Aa	70,4 \pm 6,36	Ba	87,3	a
Água		114,60 \pm 13,91	Aa	79,0 \pm 6,78	Ba	96,8	a
mm		40,2	A	33,7	A		
<i>P</i>	Tratamentos	< 0,001					
	Tempo	0,6120					
	Interação	< 0,001					

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas e maiúsculas distintas nas linhas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro (*P*: p-valor (Box-Cox ($y+1$), $\lambda=0,5$)).

2.4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo confirmaram a promissora atividade do extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* (ESAM) visando ao manejo de *L. coffeella* em testes sob condições de semi-campo e campo, para distintas populações da praga com diferente histórico de exposição a inseticidas. Além disso, ESAM apresentou ser um composto favorável para mistura com três inseticidas sintéticos antranilâmidas e bis(tiocarbamato), os quais agregam os principais ingredientes ativos inseticidas utilizados no cafeeiro no Brasil. Nossos resultados são inéditos para condições de campo e semi-campo, demonstrando que a mistura do ESAM com diamidas (Altacor® e Benevia 100 OD®) e Cloridato de cartape (Cartarys) apresentam significativa eficácia na redução de área foliar consumida e na formação de minas iniciais por *L. coffeella*.

A bioatividade do ESAM foi demonstrada em casa-de-vegetação para populações de *L. coffeella* de três regiões do Brasil. Tanto isoladamente quanto associadamente, ESAM (na CL₅₀) proporcionou significativa redução na área foliar consumida em comparação com os controles negativos. Com insetos provenientes de Franca e Rio Paranaíba foram verificadas mais combinações com sinergismo, em que ESAM CL₅₀ potencializou a redução da média da área foliar consumida por lagartas de 2°- 3° instar de *L. coffeella*. Diferentemente da população de Botucatu, as populações de Franca e Rio Paranaíba foram coletadas em lavouras de café, onde ocorrem aplicações calendarizadas com os três inseticidas estudados. Nessas condições, a presença de ESAM CL₅₀ pode ter reduzido a tolerância das populações dos insetos (TONG et al., 2013).

Ao comparar os inseticidas por região observou-se que a população de Rio Paranaíba foi menos sensível à ação dos inseticidas empregados nas doses recomendadas, onde se verificou maiores médias de área foliar consumida. Entretanto, ao avaliar novamente este parâmetro nos mesmos tratamentos combinados a ESAM (CL₅₀), o consumo de área foliar foi similar ao verificado nas regiões de Franca e Botucatu para a maioria dos tratamentos. Em geral, para Rio Paranaíba, os tratamentos com o inseticida Benevia 100 OD® em mistura com ESAM (CL₅₀) demonstraram similaridade com as regiões de Franca e Botucatu na redução de área foliar consumida, destacando-se frente a Altacor® e Cartarys®.

Em estudo analisando o comportamento alimentar de lagartas de *H. armigera* expostas a folhas tratadas com ESAM, verificou-se redução de aproximadamente 29% na conversão de alimento, o que resultou na redução de 86% no peso das lagartas expostas (SOUZA et al., 2019). A riqueza da composição química dos derivados botânicos, como acetogeninas, alcaloides, amidas e lignanas (Referência?), como é o caso das anonáceas, podem estar relacionadas à fagodeterência das lagartas de *L. coffeella* nas folhas tratadas, reduzindo a formação de minas e, conseqüentemente, a área foliar consumida.

Bastos et al. (2018) discorreram sobre a contaminação do extrato metanólico de sementes de *A. mucosa* por contato e ingestão, destacando alterações no tegumento e intestino de *Tuta absoluta* (MEYRICK, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), uma minadora com hábito alimentar parcialmente semelhante ao do bicho-mineiro-do-cafeeiro. Além dos efeitos deletérios sobre o sistema digestório, o extrato de *A. mucosa* interferiu no desenvolvimento embrionário da traça-do-tomateiro, com redução da taxa de oviposição e alta inviabilidade dos ovos, evidenciando efeitos tóxicos sobre diferentes fases do desenvolvimento da praga. Os efeitos de alteração no comportamento alimentar, taxas de oviposição e inviabilidade dos ovos foram observados em estudos com derivados de outras espécies de *Annona*, as quais possuem em sua composição alcaloides com efeitos citotóxicos e neurotóxicos (CORIA-TÉLLEZ et al., 2018; RAMÍREZ et al., 2019). É possível que esses compostos estejam relacionados à inviabilidade de ovos verificada com *L. coffeella*, corroborando com os resultados desta pesquisa.

O controle do bicho-mineiro-do-cafeeiro nas principais regiões produtoras do Brasil, incluindo a região de Rio Paranaíba- MG e de Franca- SP, é realizado majoritariamente por meio de pulverizações de inseticidas sintéticos (MENDONÇA et al, 2006), principalmente aqueles do grupo das diamidas. No entanto, mesmo sendo um grupo recente no mercado, o uso constante e indevido dessas moléculas tem gerado relatos de perda de eficiência no campo (LEITE et al., 2020). No presente estudo, foi possível observar que a combinação de ESAM (CL₅₀) proporcionou redução do uso de ingredientes ativos sintéticos com significativo incremento de eficácia na comparação com os resultados alcançados pelos inseticidas estudados na dose recomendada de forma isolada.

Em condições de campo na região de Botucatu, Altacor[®] DR, Altacor[®] DR com ESAM CL₅₀ e Altacor[®] 50% com ESAM CL₅₀ resultaram em melhores índices de

eficiência sobre lagartas de 2°-3° instar. Quanto à formação de minas iniciais, todos os tratamentos tiveram eficácia acima de 90% aos 7 DAA, exceto para o inseticida à base de acetogeninas (Anosom[®] 1 EC), o que pode ser atribuído a maiores vulnerabilidades deste produto a fatores ambientais (fotodegradação). Ainda neste parâmetro, ESAM CL₅₀ demonstrou ação sinérgica ao reduzir a formação de minas a partir da combinação com os três inseticidas. Contudo, Altacor[®] demonstrou elevada eficiência independentemente da combinação com ESAM CL₅₀. Os resultados de formação de minas iniciais aos 14 DAA foram comprometidos provavelmente por aspectos ambientais, com redução expressiva de infestação inclusive nos controles negativos. Ainda assim, promissores efeitos residuais foram constatados em Altacor[®] DR e Altacor[®] a 50% com ESAM CL₅₀, Benevia 100 OD[®] DR com ESAM CL₅₀, Cartarys[®] DR com ESAM CL₅₀ e Cartarys[®] a 50% com ESAM CL₅₀.

Dentre as estratégias para contornar características inconvenientes do emprego de derivados botânicos em condição de campo, merece destaque o uso associado com os inseticidas sintéticos (GUEDES E OLIVEIRA, 2002; ZAHID et al., 2016). De fato, o extrato botânico utilizado neste estudo em combinação com os inseticidas revelou elevada eficácia, possibilitando o emprego destes por mais tempo e, ao mesmo tempo, contornando as desvantagens intrínsecas de um derivado de plantas, como baixa estabilidade físico-química, alta volatilidade e sensibilidade térmica (DESNEUX et al. 2015). A possibilidade de redução de concentração do ingrediente ativo e manutenção da eficiência documentados neste estudo, pode ser explicada pela presença de vários ingredientes ativos envolvidos na mistura, que podem atuar em mais de um sítio de ação sobre o inseto (UN E JOHNSON, 1960; CURTIS, 1985; SAHAYARAJ E AMALRAJ, 2005; S FARAONE et al., 2015).

Considerando-se que insetos-praga podem ser expostos a níveis subletais em função da degradação do inseticida por fatores abióticos (luz solar, chuva ou temperatura) (DESNEUX et al., 2015), o conhecimento da atividade subletal também de inseticidas derivados botânicos é de extrema importância uma vez que eles são menos persistentes no ambiente em relação aos inseticidas sintéticos (ISMAN, 2014) e estão cada vez mais presentes na realidade dos sistemas agrícolas. A atividade de derivados botânicos de Annonaceae, muitas vezes relacionados com a alta concentração de acetogeninas, em concentrações subletais, vem sendo associada a disfunções fisiológicas no intestino médio dos insetos expostos, interferindo de

maneira negativa no transporte e absorção de nutrientes, conduzindo a alterações significativas no desenvolvimento e mortalidade larval (FIAZ et al., 2018).

Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que além de efeitos subletais (quando em uso isolado), o extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* (ESAM) pode ser considerado um componente para misturas com inseticidas sintéticos dos grupos das diamidas e cloridato de cartape, além de ser uma significativa fonte de prospecção para ferramentas alternativas visando ao manejo de insetos minadores, como *L. coffeella* em café. Na comparação entre os inseticidas comerciais avaliados, Altacor® e Benevia 100 OD® apresentaram mais parâmetros inseticidas a partir da mistura com *A. mucosa* em relação a Cartarys®. Estes dados são promissores e ampliam o conhecimento sobre a bioatividade do ESAM sobre insetos-praga, contribuindo com os demais estudos que buscam a viabilidade da aplicação de derivados botânicos em outras categorias, como, por exemplo, componentes sinérgicos. Os resultados do estudo também podem servir de base para novas pesquisas que busquem uma melhor compreensão dos aspectos fisiológicos resultantes da interação entre o extrato etanólico de *A. mucosa* e inseticidas sintéticos.

REFERÊNCIAS

- ALALI, FERAS Q.; LIU, XIAO-XI; MCLAUGHLIN, JERRY L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural products**, v. 62, p. 504-540, 1999.
- ALI, S.; ULLAH, M.; ARSHAD, M.; IFTIKHAR, Y.; SAQIB, M.; AFZAL, M. Effect of botanicals and synthetic insecticides on *Pieris brassicae* (L., 1758) (Lepidoptera: Pieridae). **Turkish Journal of Entomology**, v. 41, p. 275-284, 2017.
- ALVES, P. M. P.; J. O. G. LIMA; L. M. OLIVEIRA. Monitoramento da resistência do bicho-mineiro-do-café, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetidae), a inseticidas em Minas Gerais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 21, p. 77–91, 1992.
- ANSANTE, T. F. RIBEIRO, L. P.; BICALHO, K. U.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. da.; VIEIRA, P. C.; VENDRAMIM, J. D. Secondary metabolites from Neotropical Annonaceae: Screening, bioguided fractionation, and toxicity to *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 969-976, 2015.
- BASTOS, J. S.; PEREIRA, M. J.; COSTA, M. S.; TURCHEN, L. M.; PINHEIRO, D. O.; CREMONEZ, P. S. Effect toxic and behavioral of *Annona mucosa* (Annonaceae) on the tomato leaf miner. **Journal of Agricultural Science**, v.10, p. 362-371, 2018.
- BATISTA, G.C. 1974. Fundamentos de química e toxicologia dos inseticidas. ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil.
- BERNARD, C.; PHILOGÈNE, B. JR. Insecticide synergists: role, importance, and perspectives. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 38, p. 199-223, 1993.
- de BRITO, E. F., BALDIN, E. L. L., GONÇALVES, G. L. P., GIMENES, L., FERNANDES, J. B., RIBEIRO, L do P. Growth Inhibition, Residual Contact and Translaminar Toxicity of Annona-based Bioinsecticides on Tomato Leafminer: Laboratory and Greenhouse Assessments. **Gesunde Pflanzen**, v. 72, p.139-154, 2020.
- BLESSING, L.T.; BUDEGUER, F.; RAMOS, J.; BARDÓN, A.; DIAZ, S.; BROVETTO, M.; SEOANE, G.; NESKE, A. Structural factors of annonaceous acetogenins and their semisynthetic analogues related with the toxicity on *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Agricultural Chemistry and Environment**, v. 4, p. 56-61, 2015.
- CAETANO, L. C.; DADOUN, H. Pallidine and aporphinoid alkaloids from *Rollinia mucosa*. **Journal of Natural Products**, v. 50, p. 330-330, 1987.

CARVALHO, A. M. X.; MENDES, F. Q.; MENDES, F. Q.; TAVARES, L. F. SPEED Stat: a free, intuitive, and minimalist spreadsheet program for statistical analyses of experiments. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 20, p.1-6, 2020.

CASIDA, J. E.; DURKIN, K. A. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. **Annual review of entomology**, v. 58, p. 99-117, 2013.

CAVÉ, A.; FIGADÉRE, B.; LAURENS, A.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, v.70, p. 81-288, 1997.

CALOPRISCO, E., FOURNERON, J. D., FAURE, R., & DEMARNE, F. E. Unusual lactones from *Cananga odorata* (Annonaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 78-80, 2002.

CHÁVEZ, D.; MATA, R. Purpuracenin: a new cytotoxic adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenin from the seeds of *Annona purpurea*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 823-828, 1999.

CHEN, Y.-Y.; CHANG, F.-R.; WU, Y.-C. Isoquinoline Alkaloids and Lignans from *Rollinia mucosa*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 904–906, 1996.

CLOYD, R.A.; CHIASSON, H. Activity of an essential oil derived from *Chenopodium ambrosioides* on greenhouse insect pests. **Journal of Economic Entomology**, v. 100, p. 459-466, 2007.

CONAB, **Companhia Nacional de Abastecimento**. 2020. Acompanhamento da Safra Brasileira-Café; safra 2020, terceiro levantamento. Observatório Agrícola, Companhia Nacional de Abastecimento.

CONSTANTINO L., M., J. C. FLOREZ, P. BENAVIDES.; T. BACCA. Minador de las hojas del cafeto. Una plaga potencial por efectos del cambio climático. **Aconteceres Técnicos Cenicafé**, v. 2, p.1-12, 2011.

COLOM, O.A.; BARRACHIMA, I.; MINGOL, I.A.; MAS, M.C.G.; SANZ, P.M.; NESKE, A.; BARDON, A. Toxic effects of annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. **Journal of Pest Science**, v. 81, p. 85-89, 2008.

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

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

CURTIS, C.F. Theoretical models of the use of insecticide mixtures for management of resistance. **Bulletin of Entomological Research**, v.75, p. 259-265, 1985.

DAVID-RUEDA G. Diagnóstico de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) y sus parasitoides en el departamento de Antioquia, Colombia. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 42, p. 4-11, 2016.

DESNEUX, N.; FAUVERGUE, X.; DECHAUME-MONCHARMONT, F. X.; KERHOAS, L.; BALLANGER, Y.; KAISER, L. *Diaeretiella rapae* limits *Myzus persicae* populations after applications of deltamethrin in oilseed rape. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, p. 9-17, 2005.

DE BRITO, E. F.; BALDIN, E. L. L.; GONÇALVES, G. L. P.; GIMENES, L.; FERNANDES, J. B.; RIBEIRO, P. L. Growth inhibition, residual contact and translaminar toxicity of Annona-based bioinsecticides on tomato leafminer: laboratory and greenhouse assessments. **Gesunde Pflanzen**, v.72, p.139-154, 2020.

DJOUMBOU FEUNANG, Y. et al. ClassyFire: automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. *Journal of Cheminformatics*, v. 8, n. 1, p. 1–20, 2016.

ERNST, M. et al. Molnetenhancer: Enhanced molecular networks by integrating metabolome mining and annotation tools. *Metabolites*, v. 9, 2019.

FINNEY, D.J. **Probit analysis**. Cambridge University Press, Cambridge, 1971.

EL ASBAHANI, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, p. 220-243, 2015.

ESTRADA-REYES, R.; LÓPEZ-RUBALCAVA, C.; ROCHA, L.; HEINZE, G.; MORENO, J.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M. Lignans from leaves of *Rollinia mucosa*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57, p. 29-32, 2002.

FARAONE, N.; HILLIER, N.K.; CUTLER, G.C. Plant essential oils synergize and antagonize toxicity of different conventional insecticides against *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). **Plos One**, v.10, e0127774, 2015.

FIAZ, Muhammad et al. Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 156, p. 1-8, 2018.

FINNEY, D. J. Probit analysis. Cambridge University Press. Cambridge, UK, p.31, 1971.

FRAGOSO, D. B.; R. N. GUEDES; R. N. GUEDES; M. C. PICANÇO; L. ZAMBOLIM. Insecticide use and organophosphate resistance in the coffee leaf miner *Leucoptera*

coffeella (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 92, p. 203–212, 2002.

FRAGOSO, D. B.; R. N. C. GUEDES; J. A. Ladeira. Seleção na evolução de resistência a organofosfatos em *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 329–334, 2003.

GIRALDO, M.; POSTALI, J. R. Aspectos biológicos de *Leucoptera coffeella* Guérin Mèneville 1842 Lepidoptera: Lyonetiidae en coffea arabica en condiciones de laboratorio. **Aconteceres Técnicos Cenicafé**, v. 2, p. 20-27, 2017.

GONRING, A. H. R.; DE ANDRADE SILVA; F. M.; PLATA-RUEDA, R. A.; GORRI, J. E. R.; FERNANDES, F. L. Comparative bioassay methods to determine diamide susceptibility for two coffee pests. **Crop Protection**, v. 121, p. 34-38, 2019.

GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I.; CASTRO-MORENO, M.; OROZCO-CASTILLO, J. A.; RILEY-SALDAÑA, C. A. Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 01-16. 2014.

GRESSEL, J. Low pesticide rates may hasten the evolution of resistance by increasing mutation frequencies. **Pest management science**, v. 67, p. 253-257, 2011.

GUEDES, R. N. C.; WALSE, S. S.; THRONE, J. E. Sublethal exposure, insecticide resistance, and community stress. **Current opinion in insect science**, v. 21, p. 47-53, 2017.

GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E. E. Resistência a inseticidas. Pragas do cafeeiro: situação e perspectivas. p. 471-497. In: ZAMBOLIM, L., (Ed.) **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, 2002. 568 p.

HEIN, L.; GATZWEILER, F. The economic value of coffee (*Coffea arabica*) genetic resources. **Ecological economics**, v. 60, p. 176-185, 2006.

ICO. **International Coffee Organization**. Total production by all exporting countries. 2021. (OIC, 2021) International Coffee Organization - Daily Coffee Prices (ico.org). Trade Statistics Tables. Disponível em: <https://www.ico.org/new_historical.asp>. Acesso em: 18 jun. 2021.

ISMAN, M. B.; SEFFRIN, R. Natural insecticides from the Annonaceae: A unique example for developing biopesticides, advances in plant biopesticides. In: Singh D. (Eds) **Advances in Plant Biopesticides**. Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2006-0_2p., pp. 21- 33, 2014.

- KRINSKI, D.; MASSAROLI, A. Nymphicidal effect of vegetal extracts of *Annona mucosa* and *Annona crassiflora* (Magnoliales, Annonaceae) against rice stalk stink bug, *Tibraca limbativentris* (Hemiptera, Pentatomidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 217-224, 2014.
- LEATEMIA, J. A.; ISMAN, M. B. Efficacy of crude seed extracts of *Annona squamosa* against diamondback moth, *Plutella xylostella* L. in the greenhouse. **International Journal of Pest Management**, v. 50, p. 129-133, 2004.
- LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 2, p. 2783-2813, 1980.
- LEITE, S. A.; DOS SANTOS, M. P.; RESENDE-SILVA, G. A.; DA COSTA, D. R.; MOREIRA, A. A.; LEMOS, O. L.; CASTELLANI, M. A. Area-Wide survey of chlorantraniliprole resistance and control failure likelihood of the Neotropical coffee leaf miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Journal of economic entomology**, v. 113, p. 1399-1410, 2020.
- LIAW, C. C.; LIOU, J. R.; WU, T. Y.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. Acetogenins from annonaceae. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, v. 101, p. 113-230, 2016.
- LUNTZ, A. J. M.; NISBET, A. J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against the insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, p. 615-632, 2000.
- MARGUS, Aigi et al. Sublethal pyrethroid insecticide exposure carries positive fitness effects over generations in a pest insect. **Scientific reports**, v. 9, p. 1-10, 2019.
- MARTINEZ, S. S.; VAN EMDEN, H. E. Sublethal concentrations of azadirachtin affect food intake, conversion efficiency and feeding behaviour of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 89, p. 65-72, 1999.
- MESQUITA, C.M.; REZENDE, J.E.; CARVALHO, J.S.; FABRI JÚNIOR, M.A.; MORAES, N.C.; DIAS, P.T.; De CARVALHO, R.M.; De ARAÚJO, W. G. Manual do café: distúrbios fisiológicos, pragas e doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Belo Horizonte: **EMATER-MG**, p.62, 2016.
- MENDONÇA, J. M. A.; CARVALHO, G. A.; GUIMARÃES, R. J.; REIS, P. R.; LUIZ CARLOS DIAS ROCHA, L. C. D. Produtos naturais e sintéticos no controle de *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville & Perrottet, 1842) (Lepdoptera: Lyonetiidae) e seus efeitos sobre a predação por vespas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, p. 892-899, 2006.

MINGYUE, Z.; XIAN, L.; YUAN, X.; HONGLIN, L.; CHENG, L.; HUALIANG, J. Computational methods for drug design and discovery: Focus on China. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, p. 549-559, 2013.

MORALES-RODRIGUEZ, A.; PECK, D. C. Synergies between biological and neonectinoid insecticides for the curative control of white grubs *Amphimallon majale* and *Popillia japonica*. **Biology Control**, v.51, p.169-180, 2009.

MÜLLER, C. Impacts of sublethal insecticide exposure on insects—Facts and knowledge gaps. **Basic and Applied Ecology**, v. 30, p. 1-10, 2018.

NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; ZUCCHI, R. A. Entomologia econômica. **São Paulo: Livrocetes**, p. 314, 1981.

NANSEN, C.; BAISSAC, O.; NANSEN, M.; POWIS, K.; BAKER, G. Behavioral avoidance-will physiological insecticide resistance level of insect strains affect their oviposition and movement responses. **PLoS one**, v. 11, p. e0149994, 2016

MINGYUE, Z.; XIAN, L.; YUAN, X.; HONGLIN, L.; CHENG, L.; HUALIANG, J. Computational methods for drug design and discovery: Focus on China. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, p. 549-559, 2013.

PARRA, J. R. P. Biologia comparada de *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera, Lyonetiidae) visando ao seu zoneamento ecológico no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 29, p.45-76, 1985.

REIS JR, R.; E.R. LIMA; E.F. VILELA; R.S. Barros Method for maintenance of coffee leaves in vitro for mass rearing of *Leucoptera coffeellum* (Guérin-Ménèville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, p. 849-854, 2000.

RAFFA, K.F.; Priester, T.M. Synergists as research tools and control agents in agriculture. **Journal of Agricultural Entomology**, v. 2, p. 27-45, 1985.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020.

RIBEIRO, L. P.; AKHTAR, Y.; VENDRAMIM, J. D.; ISMAN, M. B. Comparative bioactivity of selected seed extracts from Brazilian *Annona* species and an acetogenin-based commercial bioinsecticide against *Trichoplusia ni* and *Myzus persicae*. **Crop Protection**, v. 62, p. 100-106, 2014.

RIBEIRO, L. P.; ANSANTE, T. F.; VENDRAMIM, J. D. Efeito do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* no desenvolvimento e comportamento alimentar de *Spodoptera frugiperda*. **Bragantia**, v.75, p. 322-330, 2016.

RIBEIRO, L.P.; VENDRAMIM, J.D.; GONÇALVES, G.L.P.; ANSANTE, T.F.; GLORIA, E.M.; LOPES, J.C.; MELLO-SILVA, R.; FERNANDES, J.B. Searching for promising sources of grain protectors in extracts from Neotropical Annonaceae. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.15, p. 215-232, 2016.

RIBEIRO, L. P.; VENDRAMIM, J. D.; BICALHO, K. U.; DOS SANTOS ANDRADE, M.; FERNANDES, J. B.; DE ANDRADE MORAL, R.; & DEMÉTRIO, C. G. B. *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): a promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 55: p. 6-14, 2013.

RIGHI, C. A., CAMPOE, O. C., BERNARDES, M. S., LUNZ, A. M. P., PIEDADE, S. M. S.; PEREIRA, C. R. Influence of rubber trees on leaf miner damage to coffee plants in an agroforestry system. **Agroforestry System**, v. 87, p. 1351-1362, 2013.

SAHAYARAJ, K.; AMALRAJ, A. Impact of monocrotophos and neem oil mixture on defoliator mangment in groundnut. **Journal of Central European Agriculture**, v.6, p. 0-11, 2005

SALKELD, E. H.; POTTER, C. The effect of the age and stage of development of insect eggs on their resistance to insecticides. **Bulletin of Entomological Research**, v. 44, p. 527-580, 1953.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, p. 567-573, 2000.

SOARES, M. C. E.; BALDIN, E. L. L.; SANTOS, T. L.B.; CARVALHO, S. S.; VENDRAMIM, J. D.; RIBEIRO, L. P. Comparative bioactivity of annonaceous derivatives and neonicotinoid-based insecticides against the silverleaf whitefly. **Crop Protection**, v.140, 105-130, 2020.

SOUZA, C.M.; BALDIN, E.L.L.; RIBEIRO, L.P.; SANTOS, T.L.B.; SILVA, I.F.; MORANDO, R.; VENDRAMIM, J.D. Antifeedant and growth inhibitory effects of Annonaceae derivatives on *Helicoverpa armigera* (Hübner). **Crop Protection**, v.121, p. 45-50, 2019.

SOUZA, C.M.; BALDIN, E.L.L.; RIBEIRO, L.P.; SANTOS, T.L.B.; SILVA, I.F.; MORANDO, R.; VENDRAMIM, J.D. Antifeedant and growth inhibitory effects of Annonaceae derivatives on *Helicoverpa armigera* (Hübner). **Crop Protection**, v.121, p. 45-50, 2019.

SOUZA, C.M.; BALDIN, E.L.L.; RIBEIRO, L.P.; SILVA, I.F.; MORANDO, R.; BICALHO, K.U.; VENDRAMIM, J.D.; FERNANDES, J.B. Lethal and growth inhibitory activities of Neotropical Annonaceae-derived extracts, commercial formulation, and an isolated acetogenin against *Helicoverpa armigera*. **Journal of Pest Science**, v. 90, p. 701-709, 2017.

SUN, Y.P.; JOHNSON, E. R. Analysis of joint action of insecticides against house flies. **Journal of Economic Entomology**, v. 53, p. 887-892,1960.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine** v.16, p. 97-110, 2009.

ZAFRA-POLO, M. C., GONZÁLEZ, M. C., ESTORNELL, E., SAHPAZ, S., CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. **Phytochemistry**, v. 42, p. 253-271,1996.

ZAHID, S.M.A.; ARSHAD, M.; MURTAZA, G.; ALI, S.; AAQIB, M.; YOUSAF, R.W.; HUSSAIN, S. 2016. Synergetic effect of plant extracts with synthetic insecticides against citrus mealybug *Planococcus citri* (Pseudococcidae: Homoptera). **Journal of Agricultural and Social Studies**, v.1, p.1-7, 2016.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos quanto à atividade inseticida de derivados botânicos sobre insetos-praga de importância econômica são imprescindíveis para a descoberta de novas moléculas e, nesse sentido, faz-se essencial a integração de estudos metabolômicos. A bioatividade de derivados botânicos sobre insetos pragas tem indicado que esses produtos podem se apresentar como valiosas alternativas para o manejo integrado de pragas, bem como para a utilização em sistemas de agricultura orgânica direcionada a pequenos produtores.

Em nosso estudo, extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* foi escolhida como o derivado mais promissor por ocasionar maiores índices de mortalidade larval para *L. coffeella*; contudo, é importante destacar que as demais espécies de Annonaceae avaliadas também demonstraram potencial inseticida. A metabolômica foi utilizada para auxiliar na compreensão da complexidade do derivado botânico etanólico das sementes de *A. mucosa* (ESAM) em frações metanólicas e hexânicas. Foram identificados glicerosfolipídeos, alcaloides, alcaloide derivado do ácido cinâmico, acetogeninas, ácidos graxos, ésteres e fitosteróis.

O comportamento de ESAM sobre populações do bicho-mineiro-do-cafeeiro provenientes de Botucatu, SP; Franca, SP e Rio Paranaíba, MG foi avaliado em casa de vegetação e a campo (Botucatu), constatando-se ação inseticida do derivado em mistura com os inseticidas sintéticos Altacor[®], Benevia 100 OD[®] e Cartarys[®]. Em campo, os tratamentos isolados e/ou em mistura com ESAM atingiram eficiência superior a 90% aos sete dias após a aplicação, reduzindo a eclosão de ovos e a formação de minas iniciais.

Nossa pesquisa é inédita quanto a estudos envolvendo a bioatividade de derivados de *A. mucosa* sobre pragas-chave da cafeicultura, metabolômica e ação sinérgica entre este derivado e produtos recomendados no mercado. Nossos resultados podem contribuir para a disponibilização de novas ferramentas visando ao manejo de *L. coffeella* nos cafezais.

REFERÊNCIAS

ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 504-540, 1999.

ALI, S.; ULLAH, M.; ARSHAD, M.; IFTIKHAR, Y.; SAQIB, M.; AFZAL, M. Effect of botanicals and synthetic insecticides on *Pieris brassicae* (L., 1758) (Lepidoptera: Pieridae). **Turkish Journal of Entomology**, v. 41, p. 275-284, 2017.

ALVES, P. M. P.; J. O. G. LIMA; L. M. OLIVEIRA. Monitoramento da resistência do bicho-mineiro-do-café, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetidae), a inseticidas

ARON, A. T. et al. Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. **Nature Protocols**, v. 15, p. 1954–1991, 2020.

BABUSHOK, V. I., LINSTROM, P. J., & ZENKEVICH, I. G. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. **Journal of Physical and Chemical Reference**, v. 40, 04310, 2011.

BLESSING, L. T.; COLOM, O. A.; POPICH, S.; NESKE, A.; BARDÓN, A. Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Pest Science**, v. 83, p. 307-310, 2010.

BLESSING, L.T.; BUDEGUER, F.; RAMOS, J.; BARDÓN, A.; DIAZ, S.; BROVETTO, M.; SEOANE, G.; NESKE, A. Structural factors of annonaceous acetogenins and their semisynthetic analogues related with the toxicity on *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Agricultural Chemistry and Environment**, v. 4, p. 56-61, 2015.

CAETANO, L. C.; DADOUN, H. Pallidine and aporphinoid alkaloids from *Rollinia mucosa*. **Journal of Natural Products**, v. 50, p. 330-330, 1987.

CALOPRISCO, E., FOURNERON, J. D., FAURE, R., & DEMARNE, F. E. Unusual lactones from *Cananga odorata* (Annonaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 78-80, 2002.

CARVALHO, A. M. X.; MENDES, F. Q.; MENDES, F. Q.; TAVARES, L. F. SPEED Stat: a free, intuitive, and minimalist spreadsheet program for statistical analyses of experiments. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 20, p. 1-6, 2020.

CASIDA, J. E.; DURKIN, K. A. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. **Annual review of entomology**, v. 58, p. 99-117, 2013.

CAVÉ, A.; FIGADÉRE, B.; LAURENS, A.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, v.70, p. 81-288, 1997.

CHÁVEZ, D.; MATA, R. Purpuracenin: a new cytotoxic adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenin from the seeds of *Annona purpurea*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 823-828, 1999.

CHEN, Y.-Y.; CHANG, F.-R.; WU, Y.-C. Isoquinoline Alkaloids and Lignans from *Rollinia mucosa*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 904–906, 1996.

CLOYD, R.A.; CHIASSON, H. Activity of an essential oil derived from *Chenopodium ambrosioides* on greenhouse insect pests. **Journal of Economic Entomology**, v. 100, p. 459-466, 2007.

COLOM, O.A.; BARRACHIMA, I.; MINGOL, I.A.; MAS, M.C.G.; SANZ, P.M.; NESKE, A.; BARDON, A. Toxic effects of annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. **Journal of Pest Science**, v. 81, p. 85-89, 2008.

CONAB, **Companhia Nacional de Abastecimento**. 2020. Acompanhamento da Safra Brasileira-Café; safra 2020, terceiro levantamento. Observatório Agrícola, Companhia Nacional de Abastecimento.

CONSTANTINO L., M., J. C. FLOREZ, P. BENAVIDES.; T. BACCA. Minador de las hojas del cafeto. Una plaga potencial por efectos del cambio climático. **Aconteceres Técnicos Cenicafé**, v. 2, p.1-12, 2011.

COSTA, D. P.; F. L. FERNANDES; F. M. ALVES; E. M. SILVA; L. E. VISÔTTO. 2016. Resistance to neurotoxic insecticides in populations of the coffee leafminer. In Trdan, S. (Ed.), **Insecticide resistance**. IntechOpen, London, United Kingdom, pp. 3–17.

CURTIS, C.F. Theoretical models of the use of insecticide mixtures for management of resistance. **Bulletin of Entomological Research**, v.75, p. 259-265, 1985.

DAVID-RUEDA G. Diagnóstico de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) y sus parasitoides en el departamento de Antioquia, Colombia. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 42, p. 4-11, 2016.

de BRITO, E. F., BALDIN, E. L. L., GONÇALVES, G. L. P., GIMENES, L., FERNANDES, J. B., RIBEIRO, L do P. Growth Inhibition, Residual Contact and Translaminar Toxicity of Annona-based Bioinsecticides on Tomato Leafminer: Laboratory and Greenhouse Assessments. **Gesunde Pflanzen**, v. 72, p.139-154, 2020.

DESNEUX, N.; FAUVERGUE, X.; DECHAUME-MONCHARMONT, F. X.; KERHOAS, L.; BALLANGER, Y.; KAISER, L. *Diaeretiella rapae* limits *Myzus persicae* populations after applications of deltamethrin in oilseed rape. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, p. 9-17, 2005.

DJOUMBOU FEUNANG, Y. et al. ClassyFire: automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. *Journal of Cheminformatics*, v. 8, n. 1, p. 1–20, 2016.

EL ASBAHANI, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, p. 220-243, 2015.

ERNST, M. et al. Molnetenhancer: Enhanced molecular networks by integrating metabolome mining and annotation tools. *Metabolites*, v. 9, 2019.

ESTRADA-REYES, R.; LÓPEZ-RUBALCAVA, C.; ROCHA, L.; HEINZE, G.; MORENO, J.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M. Lignans from leaves of *Rollinia mucosa*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57, p. 29-32, 2002.

FARAONE, N.; HILLIER, N.K.; CUTLER, G.C. Plant essential oils synergize and antagonize toxicity of different conventional insecticides against *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). **Plos One**, v.10, e0127774, 2015.

FIAZ, Muhammad et al. Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 156, p. 1-8, 2018.

FINNEY, D. J. Probit analysis. Cambridge University Press. Cambridge, UK, p.31, 1971.

FINNEY, D.J. **Probit analysis**. Cambridge University Press, Cambridge, 1971.

FRAGOSO, D. B.; R. N. C. GUEDES; J. A. Ladeira. Seleção na evolução de resistência a organofosforados em *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 329–334, 2003.

FRAGOSO, D. B.; R. N. GUEDES; R. N. GUEDES; M. C. PICANÇO; L. ZAMBOLIM. Insecticide use and organophosphate resistance in the coffee leaf miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 92, p. 203–212, 2002.

GIRALDO, M.; POSTALI, J. R. Aspectos biológicos de *Leucoptera coffeella* Guérin Mèneville 1842 (Lepidoptera: Lyonetiidae) en *coffea arabica* en condiciones de laboratorio. **Aconteceres Técnicos Cenicafé**, v. 2, p. 20-27, 2017.

GONRING, A. H. R.; DE ANDRADE SILVA; F. M.; PLATA-RUEDA, R. A.; GORRI, J. E. R.; FERNANDES, F. L. Comparative bioassay methods to determine diamide susceptibility for two coffee pests. **Crop Protection**, v. 121, p. 34-38, 2019.

GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I.; CASTRO-MORENO, M.; OROZCO-CASTILLO, J. A.; RILEY-SALDAÑA, C. A. Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 01-16, 2014.

GRESSEL, J. Low pesticide rates may hasten the evolution of resistance by increasing mutation frequencies. **Pest management science**, v. 67, p. 253-257, 2011.

GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E. E. Resistência a inseticidas. Pragas do cafeeiro: situação e perspectivas. p. 471-497. In: ZAMBOLIM, L., (Ed.) **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, 2002. 568 p.

HALL, R. et al. Plant metabolomics: The missing link in functional genomics strategies. **Plant Cell**, v. 14, p. 1437–1440, 2002.

HEIN, L.; GATZWEILER, F. The economic value of coffee (*Coffea arabica*) genetic resources. **Ecological economics**, v. 60, p. 176-185, 2006.

ICO. **International Coffee Organization**. Total production by all exporting countries. 2021. (OIC, 2021) International Coffee Organization - Daily Coffee Prices (ico.org). Trade Statistics Tables. Disponível em: <https://www.ico.org/new_historical.asp>. Acesso em: 18 jun. 2021.

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

ISMAN, M. B.; SEFFRIN, R. Natural insecticides from the Annonaceae: A unique example for developing biopesticides, advances in plant biopesticides. In: Singh D. (Eds) **Advances in Plant Biopesticides**. Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2006-0_2p., pp. 21- 33, 2014.

GUEDES, R. N. C.; WALSE, S. S.; THRONE, J. E. Sublethal exposure, insecticide resistance, and community stress. **Current opinion in insect science**, v. 21, p. 47-53, 2017.

GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E. E. Resistência a inseticidas. Pragas do cafeeiro: situação e perspectivas. p. 471-497. In: ZAMBOLIM, L., (Ed.) **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, 2002. 568 p.

HEIN, L.; GATZWEILER, F. The economic value of coffee (*Coffea arabica*) genetic resources. **Ecological economics**, v. 60, p. 176-185, 2006.

ICO. **International Coffee Organization**. Total production by all exporting countries. 2021. (OIC, 2021) International Coffee Organization - Daily Coffee Prices (ico.org).

Trade Statistics Tables. Disponível em: <https://www.ico.org/new_historical.asp>. Acesso em: 18 jun. 2021.

ISMAN, M. B.; SEFFRIN, R. Natural insecticides from the Annonaceae: A unique example for developing biopesticides, advances in plant biopesticides. In: Singh D. (Eds) **Advances in Plant Biopesticides**. Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2006-0_2p, pp. 21- 33, 2014.

KRINSKI, D.; MASSAROLI, A. Nymphicidal effect of vegetal extracts of *Annona mucosa* and *Annona crassiflora* (Magnoliales, Annonaceae) against rice stalk stink bug, *Tibraca limbativentris* (Hemiptera, Pentatomidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 217-224, 2014.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 2, p. 2783-2813, 1980.

LEITE, S. A.; DOS SANTOS, M. P.; RESENDE-SILVA, G. A.; DA COSTA, D. R.; MOREIRA, A. A.; LEMOS, O. L.; CASTELLANI, M. A. Area-Wide survey of chlorantraniliprole resistance and control failure likelihood of the Neotropical coffee leaf miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Journal of economic entomology**, v.113, p. 1399-1410, 2020.

RIBEIRO, L. P.; AKHTAR, Y.; VENDRAMIM, J. D.; ISMAN, M. B. Comparative bioactivity of selected seed extracts from Brazilian *Annona* species and an acetogenin-based commercial bioinsecticide against *Trichoplusia ni* and *Myzus persicae*. **Crop Protection**, v. 62, p. 100-106, 2014.

RIBEIRO, L. P.; ANSANTE, T. F.; VENDRAMIM, J. D. Efeito do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* no desenvolvimento e comportamento alimentar de *Spodoptera frugiperda*. **Bragantia**, v.75, p. 322-330, 2016.

RIBEIRO, L. P.; VENDRAMIM, J. D.; BICALHO, K. U.; DOS SANTOS ANDRADE, M.; FERNANDES, J. B.; DE ANDRADE MORAL, R.; & DEMÉTRIO, C. G. B. *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): a promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 55: p. 6-14, 2013.

RIBEIRO, L.P.; VENDRAMIM, J.D.; GONÇALVES, G.L.P.; ANSANTE, T.F.; GLORIA, E.M.; LOPES, J.C.; MELLO-SILVA, R.; FERNANDES, J.B. Searching for promising sources of grain protectors in extracts from Neotropical Annonaceae. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas**, v.15, p. 215-232, 2016.

RIGHI, C. A., CAMPOE, O. C., BERNARDES, M. S., LUNZ, A. M. P., PIEDADE, S. M. S.; PEREIRA, C. R. Influence of rubber trees on leaf miner damage to coffee plants in an agroforestry system. **Agroforestry System**, v. 87, p. 1351-1362, 2013.

- SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, p. 567-573, 2000.
- SOARES, M. C. E., BALDIN, E. L. L., DO PRADO RIBEIRO, L., DOS SANTOS, M. C., BATISTA, Y., & VENDRAMIM, J. D. Lethal and sublethal effects of *Annona* spp. derivatives on *Bemisia tabaci* MEAM 1 (Hemiptera: Aleyrodidae) in tomato. **Neotropical Entomology**, v.1, p.1-10, 2021.
- SOARES, M. C. E.; BALDIN, E. L. L.; DOS SANTOS, T. L. B.; DE CARVALHO, S. S.; VENDRAMIM, J. D.; DO PRADO RIBEIRO, L. Comparative bioactivity of annonaceous derivatives and neonicotinoid-based insecticides against the silverleaf whitefly. **Crop Protection**, v.140, 105430, 2021.
- SOARES, M. C. E.; BALDIN, E. L. L.; SANTOS, T. L.B.; CARVALHO, S. S.; VENDRAMIM, J. D.; RIBEIRO, L. P. Comparative bioactivity of annonaceous derivatives and neonicotinoid-based insecticides against the silverleaf whitefly. **Crop Protection**, v.140, 105-130, 2020.
- SOUZA, C.M.; BALDIN, E.L.L.; RIBEIRO, L.P.; SANTOS, T.L.B.; SILVA, I.F.; MORANDO, R.; VENDRAMIM, J.D. Antifeedant and growth inhibitory effects of Annonaceae derivatives on *Helicoverpa armigera* (Hübner). **Crop Protection**, v.121, p. 45-50, 2019.
- SOUZA, C.M.; BALDIN, E.L.L.; RIBEIRO, L.P.; SILVA, I.F.; MORANDO, R.; BICALHO, K.U.; VENDRAMIM, J.D.; FERNANDES, J.B. Lethal and growth inhibitory activities of Neotropical Annonaceae-derived extracts, commercial formulation, and an isolated acetogenin against *Helicoverpa armigera*. **Journal of Pest Science**, v. 90, p. 701-709, 2017.
- SUMNER, L. W. et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). **Metabolomics**, v. 3, p. 211–221, 2007.
- SUN, Y.P.; JOHNSON, E. R. Analysis of joint action of insecticides against house flies. **Journal of Economic Entomology**, v. 53, p. 887-892, 1960.
- WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine** v.16, p. 97-110, 2009.
- ZAFRA-POLO, M. C., GONZÁLEZ, M. C., ESTORNELL, E., SAHPAZ, S., CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. **Phytochemistry**, v. 42, p. 253-271, 1996.
- ZAHID, S.M.A.; ARSHAD, M.; MURTAZA, G.; ALI, S.; AAQIB, M.; YOUSAF, R.W.; HUSSAIN, S. 2016. Synergetic effect of plant extracts with synthetic insecticides against citrus mealybug *Planococcus citri* (Pseudococcidae: Homoptera). **Journal of Agricultural and Social Studies**, v.1, p.1-7, 2016.