

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**BIOATIVIDADE DE DERIVADOS DE ANNONACEAE SOBRE *Helicoverpa armigera*
(Hübner, 1808) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

CAMILA MOREIRA DE SOUZA

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp – Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre em Agronomia
(Proteção de Plantas)

BOTUCATU - SP

Fevereiro – 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**BIOATIVIDADE DE DERIVADOS DE ANNONACEAE SOBRE *Helicoverpa armigera*
(Hübner, 1808) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

CAMILA MOREIRA DE SOUZA

Orientador: Edson Luiz Lopes Baldin
Coorientador: Leandro do Prado Ribeiro

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp – Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre em Agronomia
(Proteção de Plantas)

BOTUCATU - SP
Fevereiro – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S729b Souza, Camila Moreira de, 1989-
Bioatividade de derivados de Annonaceae sobre *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae / Camila Moreira de Souza. - Botucatu : [s.n.], 2016
viii, 70 f. : fots. color., ils., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2016
Orientador: Edson Luiz Lopes Baldin
Coorientador: Leandro do Prado Ribeiro
Inclui bibliografia

1. Tomate - Doenças e pragas - Controle. 2. Extratos vegetais. 3. Lepidoptero. 4. Anonácea. I. Baldin, Edson Luiz Lopes. II. Ribeiro, Leandro do Prado. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: BIOATIVIDADE DE DERIVADOS DE ANNONACEAE SOBRE
Helicoverpa armigera (Hübner, 1808) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).

AUTORA: CAMILA MOREIRA DE SOUZA

ORIENTADOR: EDSON LUIZ LOPES BALDIN

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

Prof. Dr. EDSON LUIZ LOPES BALDIN
Depto. Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas - Unesp

Prof. Dr. CARLOS FREDERICO WILCKEN
Depto. Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas - Unesp

Prof. Dr. ANTONIO EDUARDO MILLER CROTTI
Depto. Química / Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto -USP

Botucatu, 24 de fevereiro de 2016

DEDICO

Aos meus pais Agostinho e Margarida,
por todo amor, confiança, incentivo e pelo exemplo de vida.

À minha amada irmã Karina,
por todo amor e cumplicidade em todos os momentos.

Ao meu namorado Leontino,
por todo amor, apoio e compreensão em todos os momentos.

À minha avó de coração, Luiza Langeli,
por todo amor e por todas as orações.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Lopes Baldin, pela orientação, amizade, confiança, incentivo, e valiosos ensinamentos ao longo da minha graduação e pós-graduação;

Ao Dr. Leandro do Prado Ribeiro pelo fornecimento dos extratos vegetais, pela orientação, amizade e ensinamentos em cada etapa do trabalho;

Ao Prof. Dr. João Batista Fernandes pelas análises químicas e material fornecido;

À Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Proteção de Plantas, pela oportunidade;

Aos Professores da FCA, em especial aos do Departamento de Proteção Vegetal da FCA/UNESP, pela sabedoria, ensinamentos transmitidos e colaboração;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

À Ivana Silva e Rafaela Morando por todos ensinamentos, apoio e amizade em cada etapa do trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas (LARESPI), Vinícius, Mariane, José Paulo, Luiz Eduardo, Elaine, Patrícia, Georgea e Ana, pelo convívio, momentos de descontração e auxílio em várias etapas da pesquisa;

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

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
1. RESUMO.....	1
2. SUMMARY.....	3
3. INTRODUÇÃO GERAL.....	5
CAPÍTULO I - Efeitos tóxicos de derivados de anonáceas sobre <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae), em dieta artificial e casa de vegetação.....	
Resumo.....	13
Introdução.....	14
Material e métodos.....	15
Resultados.....	20
Discussão.....	22
Agradecimentos.....	25
Referências.....	25
CAPÍTULO II - Efeitos do extrato etanólico de <i>Annona mucosa</i> (Magnoliales: Annonaceae) e do inseticida botânico Anosom [®] 1 EC no comportamento alimentar e aspectos biológicos de <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) em dieta artificial.....	
Resumo.....	43
Abstract.....	44
Introdução.....	44
Material e Métodos.....	46
Resultados e Discussão.....	48
Conclusões.....	51
Agradecimentos.....	51
Referências.....	51
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
5. CONCLUSÕES.....	63
6. REFERÊNCIAS.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
CAPÍTULO I - Efeitos tóxicos de derivados de anonáceas sobre <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae), em dieta artificial e casa de vegetação	
Tabela 1. Informações das espécies botânicas estudadas.	31
Tabela 2. Rendimentos de extratos etanólicos (1:5, p/v) provenientes de sementes de cinco espécies de anonáceas utilizadas no estudo com <i>Helicoverpa armigera</i>	30
Tabela 3. Mortalidade acumulada (%) (\pm EP) de lagartas de <i>Helicoverpa armigera</i> expostas a dieta artificial tratada com diferentes derivados de Annonaceae. Temp.: $25\pm 2^\circ\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; Fotofase: 14 h.	33
Tabela 4. Estimativas da CL_{50} e CL_{90} (em mg kg^{-1}) e intervalo de confiança de inseticida à base de acetogeninas (Anosom® 1 EC) e do extrato etanólico de sementes de <i>Annona mucosa</i> (Annonaceae) - ESAM para lagartas de <i>Helicoverpa armigera</i> , após 168 horas de exposição. Temp.: $25\pm 2^\circ\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; Fotofase: 14 h.	34
Tabela 5. Estimativa da CE_{50} (em mg kg^{-1}) e intervalo de confiança de um inseticida à base de acetogeninas (Anosom® 1 EC) e do extrato etanólico de sementes de <i>Annona mucosa</i> (Annonaceae) - ESAM para lagartas de <i>Helicoverpa armigera</i> , após 168 horas de exposição em dieta artificial tratada. Temp.: $25\pm 2^\circ\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; Fotofase: 14 h.	35
Tabela 6. Estimativa de tempo letal médio (TL_{50} , em horas) e intervalo de confiança de inseticida à base de acetogeninas (Anosom® 1 EC) e extrato etanólico de sementes de <i>Annona mucosa</i> (Annonaceae) - ESAM para lagartas de <i>Helicoverpa armigera</i> , em duas concentrações. Temp.: $25\pm 2^\circ\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; Fotofase: 14 h.	36
Tabela 7. Mortalidade acumulada (%) (\pm EP) de <i>Helicoverpa armigera</i> após 120 horas de exposição em dieta artificial contendo bis-tetrahidrofurano roliniastatina-1, testada a 10% da CL_{50} ($411,55 \text{ mg kg}^{-1}$) estimada para o respectivo extrato bruto. Temp.: $25\pm 2^\circ\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; Fotofase: 14 h.	37
Tabela 8. Mortalidade (%) e peso de lagartas de <i>Helicoverpa armigera</i> após sete dias de exposição em tomate tratado em casa de vegetação.	38

CAPÍTULO II - Efeitos do extrato etanólico de *Annona mucosa* (Magnoliales: Annonaceae) e do inseticida botânico Anosom[®] 1 EC no comportamento alimentar e biologia de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) em dieta artificial

Tabela 1. Médias (\pm EP) de consumo (g) realizado por lagartas de quarto ínstar de *Helicoverpa armigera* em dieta artificial tratada, após 48 h de exposição em teste sem chance de escolha Temp.: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; Fotofase: 14 h.....58

Tabela 2. Médias (\pm EP) da viabilidade e duração das fases larval e pupal de *Helicoverpa armigera* mantida em dieta artificial tratada. Temp.: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; Fotofase: 14 h...
.....59

Tabela 3. Médias (\pm EP) de peso pupal e porcentagens de pupas e adultos defeituosos de *Helicoverpa armigera* após o confinamento em dieta artificial tratada. Temp.: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; Fotofase: 14 h.....60

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
CAPÍTULO I - Efeitos tóxicos de derivados de anonáceas sobre <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae), em dieta artificial e casa de vegetação	
Fig. 1. Detalhes do bioensaio em casa de vegetação. A – Momento de pulverização de folíolos de tomateiro com os tratamentos; B – Condução do bioensaio.....	39
Fig. 2. Estrutura química da acetogenina bis-tetrahidrofurano roliniastatina-1, composto majoritário no extrato etanólico de sementes de <i>Annona mucosa</i>	40
Fig. 3. Bioatividade comparada do extrato etanólico proveniente de <i>Annona mucosa</i> com inseticidas comerciais em casa de vegetação. A – Extrato etanólico proveniente de sementes de <i>Annona mucosa</i> ; B – Anosom [®] 1 EC; C – Belt [®] 48 SC; D – Controle (Tween 80 + solvente); E – Controle (Água).....	41
CAPÍTULO II - Efeitos do extrato etanólico de <i>Annona mucosa</i> (Magnoliales: Annonaceae) e do inseticida botânico Anosom [®] 1 EC no comportamento alimentar e biologia de <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) em dieta artificial	
Figura 1. Desenvolvimento comparativo entre lagartas de <i>Helicoverpa armigera</i> com doze dias de idade, provenientes de dietas contendo diferentes tratamentos. A – Extrato etanólico proveniente de sementes de <i>Annona mucosa</i> ; B – Anosom [®] 1 EC; C – Solvente; D – Testemunha.....	61

BIOATIVIDADE DE DERIVADOS DE ANNONACEAE SOBRE *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). Botucatu, 2016. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas. Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Autor: CAMILA MOREIRA DE SOUZA

Orientador: EDSON LUIZ LOPES BALDIN

Co-Orientador: LEANDRO DO PRADO RIBEIRO

1. RESUMO

Helicoverpa armigera (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) destaca-se pela grande capacidade de dispersão, hábito polífago e por ocasionar expressivos danos em culturas de interesse econômico em todo o mundo. Dentre os métodos de manejo de insetos-praga, o uso de derivados vegetais é considerado uma promissora alternativa ao controle químico, uma vez que estes produtos apresentam mais de um ingrediente ativo em sua composição, dificultando a seleção de insetos resistentes, além de serem provenientes de recursos renováveis. Dentre as famílias botânicas de ocorrência em regiões neotropicais, Annonaceae constitui uma das principais fontes de compostos naturais bioativos. Assim, visando disponibilizar alternativas mais sustentáveis e ao mesmo tempo eficientes para o manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae), avaliou-se a bioatividade de cinco derivados de anonáceas (*Annona montana* Macfad., *A. mucosa* Jacq., *A. muricata* L., *A. reticulata* L. e *A. sylvatica* A. St.-Hil.) e do produto comercial à base de acetogeninas de anonáceas (Anosom[®] 1 EC) sobre lagartas do inseto. Adicionalmente, o composto majoritário do extrato mais ativo foi identificado e também avaliado quanto à sua bioatividade sobre formas neonatas de *H. armigera*. Constatou-se que o extrato de *A. mucosa* (CL₅₀: 411,55 mg kg⁻¹ e CL₉₀: 1.479 mg kg⁻¹) assim como o Anosom[®] 1 EC (CL₅₀: 312,08 mg kg⁻¹ e CL₉₀: 1.151 mg kg⁻¹) apresentaram significativa atividade inseticida sobre *H. armigera*, com toxicidade aguda após sete dias de exposição a dieta artificial tratada. A partir do extrato etanólico de *A. mucosa* realizou-se fracionamento biomonitorado através de

diferentes técnicas cromatográficas, permitindo o isolamento da acetogenina bis-terahidrofurano roliniastatina-1. Este composto foi testado a uma concentração de 41,55 mg kg⁻¹, ocasionando mortalidade total das larvas de *H. armigera* após o quarto dia de incorporação à dieta. Na sequência, em casa de vegetação, avaliou-se a toxicidade comparada do extrato etanólico de *A. mucosa*, do Anosom[®] 1 EC (ambos na CL₉₀ estimada) e do inseticida de origem sintética (Belt[®] 48 SC) sobre larvas neonatas do inseto em plantas de tomateiro. Neste ensaio, todos os tratamentos causaram significativa mortalidade larval (> 90%) do inseto. Por fim, avaliou-se o efeito do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* L. e do inseticida comercial botânico Anosom[®] 1 EC na CL₅₀ (411,55 e 312,08 mg kg⁻¹, respectivamente) sobre o comportamento alimentar e alguns parâmetros biológicos de *H. armigera* em dieta artificial. Constatou-se alteração no comportamento alimentar de lagartas de quarto ínstar de *H. armigera* expostas a dieta artificial contendo Anosom[®] 1 EC e extrato etanólico de *A. mucosa*, com significativa redução no consumo após 48 horas de exposição. Ambos os tratamentos prolongaram a fase larval (acréscimo de seis dias em dieta tratada com Anosom[®] 1 EC e sete dias em dieta tratada com extrato etanólico de *A. mucosa*). Também foi verificado reduções na viabilidade larval (25,00 % para o Anosom[®] 1 EC e 23,00 % para *A. mucosa*) e pupal (34,44 % para Anosom[®] 1 EC e 24,99 % para *A. mucosa*) assim como no peso médio de pupas (redução de aproximadamente 69,31 % para o Anosom[®] 1 EC e 70,80 % para *A. mucosa*). Os resultados obtidos neste estudo são inéditos e indicam que o extrato etanólico de *A. mucosa* apresenta bom potencial no controle alternativo de *H. armigera*, podendo ser inserido como estratégia eficiente em programas de manejo integrado do inseto, principalmente em cultivos orgânicos ou protegidos.

Palavras-chave: Manejo integrado de pragas, controle alternativo, extrato botânico, noctuídeo.

BIOACTIVITY OF ANNONACEAE DERIVATIVES ON *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). Botucatu, 2016. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas. Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Author: CAMILA MOREIRA DE SOUZA

Adviser: EDSON LUIZ LOPES BALDIN

Co-Adviser: LEANDRO DO PRADO RIBEIRO

2. SUMMARY

Helicoverpa armigera (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) is a highly polyphagous species with high dispersion ability and adaptability to different crops of economic interest worldwide. Botanical insecticides emerge as a viable alternative to the use of synthetic insecticides for pest management because they have more of a potentially active ingredient in their composition, delaying the selection of resistant insect, moreover come from renewable resources. Among tropical plant families, the Annonaceae has shown great potential as a source of biopesticides. To determine an alternative tool for *H. armigera* control, this study evaluated the insecticidal activity of ethanolic seed extracts from five species of Annonaceae (*Annona montana* Macfad., *A. mucosa* Jacq., *A. muricata* L., *A. reticulata* L. e *A. sylvatica* A. St.-Hil.) and the acetogenin-based commercial bioinsecticide Anosom[®] 1 EC on larvae of *H. armigera* larvae. In addition, the major active compound of the ethanolic extract was isolated using various chromatographic techniques and assessed for its bioactivity on *H. armigera* neonates. In the initial screening assay we verified that the ethanolic seed extract from *A. mucosa* (LC₅₀ = 411.55 mg kg⁻¹ and LC₉₀ = 1,479 mg kg⁻¹) was the most promising one, showing similar effectiveness to Anosom[®] 1 EC (LC₅₀ = 312.08 mg kg⁻¹ and LC₉₀ = 1,151 mg kg⁻¹) against *H. armigera* at seven days after exposition to treated diet. The acetogenin bis-tetrahydrofuran rolliniastatin-1 was identified as the major compound in ethanolic extract from *A. mucosa*. This compound was assessed at 41.55 mg kg⁻¹, causing 100 % of larval mortality on *H. armigera* neonates for days after exposition to

treated diet. After, in a greenhouse trial using tomato plants, the bioactivity of ethanolic extract of *A. mucosa* was compared to botanical insecticide Anosom[®] 1 EC (both at LC₉₀) and a synthetic insecticide (Belt[®] 48 SC) on neonate larvae of *H. armigera*. In this test, all treatments led to significant larval mortality (> 90 %). In the last step, the bioactivity of the extract from *A. mucosa* and Anosom[®] 1 EC at LC₅₀ (411.55 and 312.08 mg kg⁻¹, respectively) were evaluated against *H. armigera* for feeding behavior and growth inhibitory effects, using dietary exposure bioassays. The feeding behavior effect was evaluated for 4-th instar *H. armigera* larvae after exposure to Anosom[®] 1 EC and *A. mucosa*-treated diets, with significant consume reduction after a 48-hour exposition. Both treatments prolonged the larval phase duration (six days for Anosom[®] 1 EC -treated diet and seven days for *A. mucosa*-treated diet). The larval (25.00% for Anosom[®] 1 EC and 23.00% for *A. mucosa*) and pupal (34.44% for Anosom[®] 1 EC and 24.99% for *A. mucosa*) viabilities decreased significantly, as well as the pupal weight (69.31% for Anosom[®] 1 EC and 70.80% for *A. mucosa*). The results obtained in this study are novel and demonstrate that the ethanolic extract from *A. mucosa* has great potential as alternative control method against *H. armigera*. This tool can be added as an effective strategy in integrated management programs of this pest, especially in organic or protected crops.

Keywords: Integrated Pest Management, alternative control, botanical extract, noctuid.

3. INTRODUÇÃO GERAL

Helicoverpa armigera (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) teve sua taxonomia atual definida por Hardwick (1965), quando o autor estabeleceu *Helicoverpa* como um novo gênero. Venette et al. (2003) relataram que há uma grande dificuldade na identificação da espécie por ocorrência de inconsistências e variabilidade no uso das ferramentas taxonômicas disponíveis para o gênero *Helicoverpa*. Essa espécie encontra-se incluída no reino Animal, filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Lepidoptera, família Noctuidae, subfamília Heliiothinae, gênero *Helicoverpa* (LAMMERS; MACLEOD, 2007). A literatura também apresenta inconsistência na nomenclatura popular, descrevendo-a como “*Old World (African) bollworm*”, “*Cotton bollworm*”, “*Corn earworm*” (LAMMERS; MACLEOD, 2007) ou “*Tomato fruit worm*” (LIN; YUN-CHE 2010), sendo estes dois últimos termos também utilizados para *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850).

O inseto possui ciclo completo em torno de 45 dias (ALI et al., 2009). O desenvolvimento é mais lento e pode até ser interrompido em condições adversas de umidade ou de temperatura; porém, desde que exista alimento disponível, todas as fases do ciclo podem ser encontradas no decorrer do ano (RIJAL, 2006). Tipicamente, *H. armigera* apresenta de duas a cinco gerações ao ano em regiões subtropicais e temperadas e apenas uma geração ao ano em regiões mais frias. Em condições ótimas, nos trópicos, pode apresentar até 11 gerações ao ano (TRIPATHI; SINGH, 1991; KING, 1994; FOWLER; LAKIN, 2001; FITT, 1989; RIJAL, 2006).

Os adultos emergem do solo ao anoitecer, apresentam hábito noturno e acasalam durante o período de um a quatro dias após sua emergência. Durante a madrugada as fêmeas liberam feromônio sexual para atrair parceiros. O acasalamento é fortemente influenciado por condições de umidade e temperatura e pode ocorrer mais de uma vez (KING, 1994). Saito (1999), observando o comportamento reprodutivo deste lepidóptero, relatou que quase todas as mariposas acasalaram até o terceiro dia após a emergência. Durante o voo, os adultos são atraídos pela luz, principalmente do tipo ultravioleta (HARDWICK, 1965).

Uma fêmea produz em média 730 a 1.702 ovos, os quais podem ser depositados ao longo de 10 a 23 dias (KING, 1994). Em quatro dias, uma única fêmea pode depositar até 741 ovos (ATWAL; DHALIWAL, 2002). A oviposição frequentemente ocorre durante a noite e tem início de dois a seis dias após a emergência (KYI; ZALUCKI, 1991; AKASHE et al., 1997; FOWLER; LAKIN, 2001; CABI, 2003). As fêmeas tendem a depositar os ovos de forma isolada. O local de oviposição é escolhido em função de estímulos físicos e químicos, com preferência para superfícies com pelos, sobre ou perto de estruturas florais. O pico de postura normalmente ocorre antes ou durante a produção de flores do hospedeiro; porém, dependendo da qualidade do hospedeiro, essas podem ocorrer também em superfícies foliares (KING, 1994). O período de incubação dura de três a 14 dias, dependendo da temperatura (KING, 1994; FOWLER; LAKIN, 2001; CABI, 2003).

No verão, o desenvolvimento larval varia de 14 a 18 dias, embora possa demorar até 21 dias no outono (CABI, 2003). Durante o desenvolvimento larval, os indivíduos geralmente passam por cinco a sete ínstares, sendo a temperatura o principal fator limitante, seguido pela qualidade nutricional do hospedeiro (KING, 1994; FOWLER; LAKIN, 2001; CABI, 2003). As lagartas recém-eclodidas alimentam-se primeiramente da casca do ovo e posteriormente de folhas ou de estruturas florais, deslocando-se pela planta ou, no caso de escassez de alimento, de uma planta para outra até definirem o melhor sítio de alimentação (KING, 1994). Assim, a lagarta alimenta-se tanto dos órgãos reprodutivos quanto de estruturas vegetativas (LAMMERS; MACLEOD, 2007).

Em um único hospedeiro, a coloração larval pode variar de tons de verde, rosa, marrom ou quase preto, ocorrendo duas linhas escuras no dorso e uma larga faixa clara de cada lado do corpo (RIJAL, 2006). As lagartas podem apresentar canibalismo,

motivo pelo qual vários trabalhos de laboratório confinam apenas uma lagarta por recipiente (LIU et al., 2004; MIRODINIS et al., 2013).

Próximo ao término da fase larval, as lagartas cessam a alimentação e se deslocam para o solo, enterrando-se abaixo da superfície para empuparem. A profundidade é determinada entre outros fatores pela umidade do solo e pelo teor de matéria orgânica na superfície (KING, 1994). Nos trópicos, o período pupal leva de 10 a 14 dias, em geral os machos levam um dia a mais que as fêmeas nessa fase, podendo também ocorrer diapausa, geralmente regulada por dois tipos de estímulos, um relacionado à temperatura (frio) e outro relacionado à umidade (seca) (RIJAL, 2006).

Helicoverpa armigera é um inseto com grande capacidade de dispersão e sobrevivência em condições adversas do ambiente, além de apresentar inúmeros hospedeiros alternativos (polifagia) e ser cosmopolita, ocasionando expressivos danos econômicos para diferentes culturas em muitas partes do mundo (FITZ, 1989). Reed (1982) relatou que a praga já foi registrada em mais de 60 cultivos comerciais e 67 espécies de plantas silvestres em países da África, Ásia e na Australásia (região que inclui Austrália, Nova Zelândia, Nova Guiné e algumas ilhas da Indonésia). Em estudo realizado pela Organização de Proteção de Plantas Europeia e Mediterrânea (EPPO) para a dispersão espacial de *H. armigera*, o inseto foi relatado de forma bastante difundida na África, Ásia e Oceania, encontrando-se estabelecido em vários países da União Europeia (EPPO, 2006; LAMMERS; MACLEOD, 2007).

Sua primeira ocorrência no Brasil foi relatada por Czapak et al. (2013) através da coleta de lagartas nas culturas de soja (Goiás) e algodão (Mato Grosso) e em tiguera de soja (Bahia), durante os meses de janeiro e fevereiro de 2013. Segundo os autores, até então a praga não havia sido registrada no continente americano e era considerada praga quarentenária no Brasil. Até o momento, sua ocorrência no Brasil está associada às culturas do algodão, soja, milho, milheto, tomate e trigo (ÁVILA et al., 2013), além de citros (BUENO et al., 2014) e forrageiras (BUENO; SOSA-GÓMEZ, 2014).

A soma dos custos para o controle e as perdas na produção mundial agrícola devido à presença de *H. armigera* atingem cerca de US\$ 5 bilhões ao ano e estima-se que 50% dos inseticidas utilizados na China e na Índia sejam destinados ao controle deste inseto (LAMMERS; MACLEOD, 2007). Segundo Arnó et al. (1999), *H. armigera* é considerada uma das pragas mais nocivas para o tomate destinado à indústria na Espanha. No

Brasil, durante a safra 2012/2013 produtores relataram perdas da ordem de R\$140,00 ha⁻¹, e a necessidade de três aplicações extras de defensivos para o seu controle em culturas de algodão e soja (CZEPAK et al, 2013).

Segundo Ávila et al. (2013), o controle químico, através de pulverizações com inseticidas sintéticos, é o principal método utilizado no manejo de *H. armigera*. No entanto, problemas associados ao impacto destes compostos sobre o meio ambiente e a saúde humana reforçam a necessidade de desenvolvimento de técnicas alternativas, mas que também sejam eficientes e menos agressivas aos componentes do agroecossistema. Além disso, o uso abusivo de inseticidas nas lavouras pode acelerar a seleção de populações de insetos resistentes para a maioria dos ingredientes ativos, minimizando progressivamente sua eficiência (PERRY et al., 1998).

A necessidade do uso práticas integradas para o manejo de pragas no sistema agrícola se torna cada vez mais evidente, estimulando a investigação de diversas técnicas de controle. Considerando que plantas e insetos passaram por uma coevolução temporal e que as plantas desenvolveram mecanismos químicos de defesa contra os insetos denominados metabólitos secundários ou aleloquímicos, estes podem se apresentar como fontes de inseticidas botânicos ou moléculas modelo para síntese de novos inseticidas (SIMAS et al., 2004).

O ressurgimento dos estudos com produtos vegetais como alternativa para o manejo de artrópodes-praga tornou-se uma realidade, uma vez que os inseticidas botânicos têm seu efeito comprovado, além de apresentarem uma maior diversidade de moléculas ativas (D'AMATO et al., 2002) em comparação com a maioria dos produtos sintéticos formulados. Segundo CLOYD (2004), destacam-se diversas vantagens dos inseticidas botânicos em relação aos inseticidas químicos convencionais, com destaque para a baixa toxicidade a mamíferos e menor persistência no ambiente, o que confere maior segurança ambiental.

Estudos reportam o uso de derivados botânicos no controle de *H. armigera*. Baskar e Ignacimuthu (2012) observaram que isolados de *Cassia tora* L (Fabaceae) quando testados a uma concentração de 1000 ppm resultou em pronunciada mortalidade larval (74,57%) e pupal (63,11 %) bem como o prolongamento de ambas as fases. Jeyasankar et al. (2012) reportaram a atividade inseticida de extratos orgânicos provenientes de sementes de *Solanum pseudocapsicum* (Solanaceae) em diferentes

concentrações, sendo que o maior índice de mortalidade (66,5%) foi observado na maior dose testada (5 mg L⁻¹). Baskar et al. (2009) estudaram o efeito de extratos orgânicos provenientes de folhas de *Atalantia monophylla* (L) (Rutaceae) em diferentes doses sobre lagartas de terceiro ínstar de *H. armigera* onde foi observado significativa mortalidade larval e pupal.

Estudos demonstram a bioatividade da família Meliaceae sobre *H. armigera*, Wondafrash et al. (2012) estudaram a espécie *Azadirachta indica* (A. Juss) onde observaram pronunciada mortalidade larval em diferentes concentrações. Koul et al. (2003) em estudo com isolados da espécie *Entandrophragma candolei* (Harms) (Meliaceae) observaram a redução da alimentação de lagartas de primeiro e terceiro ínstar, no entanto os autores não observaram efeito tóxico. Ma et al. (2000) observaram a bioatividade da espécie *Azadirachta indica* (A. Juss) em lagartas de de primeiro e segundo ínstar onde verificaram redução no desenvolvimento larval e pupal.

Dentre as famílias botânicas que ocorrem em condições neotropicais, Annonaceae constitui uma das principais fontes de compostos naturais bioativos (KRINSKI et al., 2014). Esta família é constituída por 135 gêneros, com cerca de 2.500 espécies descritas e apresenta distribuição pantropical (CHATROU et al., 2004). As plantas de Annonaceae têm como características o porte arbóreo ou arbustivo e o caráter lenhoso (KIILL; COSTA, 2003).

Os principais metabólitos secundários identificados nos indivíduos dessa família são as acetogeninas, as quais podem ser encontradas em folhas, raízes, cascas de galhos e principalmente nas sementes (BERMEJO et al., 2005; CASTILLO-SÁNCHEZ et al., 2010). Em função do isolamento das acetogeninas de anonáceas, a partir da década de 80, ocorreu o ressurgimento dos estudos com essa família (RUPRECHT et al., 1990). Essas moléculas caracterizam-se por apresentarem vasta atividade biológica como: antimicrobiana, antitumoral, citotóxica e inseticida (CAVÉ et al., 1997), com destaque para esta última, a qual vem atraindo a atenção do meio acadêmico (OCAMPO; OCAMPO, 2006).

As acetogeninas são substâncias derivadas de ácidos graxos (C33-C37), apresentando ao longo da cadeia hidrocarbônica um número variável de anéis tetrahydrofurânicos (THF) ou tetrahidropirânicos (THP) (ALALI et al., 1999). Segundo Alali et al. (1999), as acetogeninas bloqueiam a cadeia respiratória NADH-ubiquinona redutase (complexo I), causando diminuição nos níveis de ATP e afetando diretamente o transporte de elétrons na mitocôndria.

Mikolajczak et al. (1988) realizaram o primeiro teste com *Annona triloba* L. sobre *Spodoptera eridania* (Stoll, 1782) (Noctuidae) e os resultados promissores impulsionaram as pesquisas visando o controle de insetos-praga de diferentes ordens e hábitos alimentares (KRINSKI et al., 2014). Segundo Krinski et al. (2014) constam na literatura mais de 42 espécies de Annonaceae com ação inseticida, distribuídas em 14 gêneros (*Annona*, *Artabotrys*, *Asimina*, *Cardiopetalum*, *Dennettia*, *Duguetia*, *Guatteria*, *Monodora*, *Mkilua*, *Oxandra*, *Polyathia*, *Rollinia*, *Unonopsis* e *Xylopia*), onde se destaca as espécies *Annona muricata* L., conhecida como graviola e *Annona squamosa* L., popularmente conhecida como fruta-do-conde ou pinha.

Atualmente já se tem relatado o potencial de controle de espécies de Annonaceae sobre importantes pragas agrícolas como: *Plutela xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) (LEATEMIA et al., 2004; TRINDADE et al., 2006), *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) (RIBEIRO et al., 2014a), *Panonychus citri* (Mc Gregor) (Acari: Tetranychidae) (RIBEIRO et al., 2014b), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (TOLOSA et al., 2014; BLESSING et al., 2010; ANSANTE et al., 2015), *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (RIBEIRO et al., 2015) e sobre os carunchos *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) (RIBEIRO et al., 2013; RIBEIRO et al., 2014c) e *Zabrotes subfasciatus* Bohemann (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) (GONÇALVES et al., 2015).

Em função do elevado potencial de danos que *H. armigera* oferece para inúmeras culturas de importância agrícola no Brasil e do efeito promissor do uso de anonáceas para o controle de lepidópteros, este trabalho teve como objetivo geral avaliar a bioatividade de extratos etanólicos de cinco espécies de anonáceas sobre o inseto, visando a seleção de espécies botânicas mais promissoras para o controle alternativo da praga.

Os objetivos específicos do trabalho foram: a) realizar um teste preliminar (*Screening*) de mortalidade com as espécies de anonáceas e respectivos controles (positivo e negativo); b) estimar as curvas de concentração-resposta (CL₂₅, CL₅₀ e CL₉₀) do extrato mais promissor; c) determinar os efeitos subletais do extrato mais promissor; d) comparar a bioatividade do extrato selecionado com um inseticida comercial botânico (Anosom); e) avaliar a eficácia do extrato selecionado em plantas de tomateiro infestadas com o inseto no interior de casa de vegetação.

Para atingir esses objetivos, a dissertação foi dividida em dois capítulos, sendo o primeiro intitulado “Efeitos tóxicos de derivados de anonáceas sobre *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae), em dieta artificial e casa de vegetação”, o qual foi redigido conforme as normas da revista *Industrial Crops and Products*. O segundo foi intitulado “Efeitos do extrato etanólico de *Annona mucosa* e do inseticida botânico Anosom[®] 1 EC na biologia de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) em dieta artificial” e foi redigido conforme as normas da revista *Pesquisa Agropecuária Brasileira*.

CAPÍTULO I - Efeitos tóxicos de derivados de anonáceas sobre *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae), em dieta artificial e casa de vegetação

Revista: Industrial Crops and Products

Efeitos tóxicos de derivados de anonáceas sobre *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae), em dieta artificial e casa de vegetação

Resumo

Dentre as famílias botânicas de ocorrência em regiões neotropicais, Annonaceae constitui uma das principais fontes de compostos naturais bioativos. Assim, visando disponibilizar alternativas mais sustentáveis e eficientes para o manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae), este estudo avaliou, primeiramente, a bioatividade de extratos etanólicos das sementes de cinco espécies de anonáceas (*Annona montana* Macfad., *Annona mucosa* Jacq., *Annona muricata* L., *Annona reticulata* L. e *Annona sylvatica* A. St.-Hil.) e do inseticida comercial à base de acetogeninas (Anosom[®] 1 EC) sobre lagartas de *H. armigera* através de bioensaios de ingestão (diet exposure bioassay). Na triagem inicial¹, o extrato etanólico das sementes de *A. mucosa* (CL₅₀ = 1479 mg kg⁻¹) e o inseticida à base de acetogeninas - Anosom[®] 1 EC (CL₅₀ = 1151 mg kg⁻¹) foram os tratamentos mais promissores. Além da toxicidade aguda, esses dois tratamentos causaram significativa inibição do desenvolvimento larval de *H. armigera* (CE₅₀ = 411,55 mg kg⁻¹ e 312,08 mg kg⁻¹, respectivamente). Através de diferentes técnicas cromatográficas, a acetogenina majoritária do extrato de *A. mucosa* foi isolada e identificada, por meio de técnicas espectroscópicas e espectrométrica, como a acetogenina bis-terahidrofurano roliniastatina⁻¹. Na concentração de 41,55 mg kg⁻¹, a acetogenina isolada ocasionou a mortalidade total das larvas expostas de *H. armigera* após o quarto dia de incorporação à dieta. Por fim, em casa de vegetação, avaliou-se a toxicidade comparada do extrato etanólico de *A. mucosa*, do Anosom[®] 1 EC (ambos na CL₉₀ estimada previamente) e do inseticida de origem sintética (Belt[®] 48 SC) sobre larvas neonatas do inseto em plantas de tomateiro. Neste ensaio, todos os tratamentos causaram significativa mortalidade larval (> 90%) do inseto. Os resultados obtidos no presente estudo indicam o potencial de derivados de Annonaceae como uma alternativa importante para o manejo integrado de *H. armigera*, especialmente em sistemas orgânicos de produção de hortaliças.

Palavras chave: Inseticidas botânicos, *Helicoverpa armigera*, roliniastatina-1, técnicas cromatográficas

1. Introdução

Helicoverpa armigera (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie-praga polífaga, cujas lagartas atacam estruturas vegetativas e reprodutivas de diversas plantas cultivadas (Lammers e Macleod, 2007) na África, Ásia, Oceania e Europa (Venette et al., 2003). As perdas na produção agrícola mundial decorrentes do ataque deste inseto podem atingir US\$ 5 bilhões ao ano e estima-se que 50% dos inseticidas utilizados na China e na Índia são destinados ao controle dessa praga (Lammers e Macleod, 2007). No Brasil, o primeiro registro de *H. armigera* foi feito na safra de 2012/2013 em culturas de soja na Bahia e algodão no Mato Grosso. No entanto, atualmente o inseto encontra-se amplamente disseminado em todo território brasileiro, com relatos de ataque nas culturas de algodão, soja, milho, milheto, tomate, trigo (Czepak et al., 2013), citros (Bueno et al., 2014) e forrageiras (Bueno e Sosa-Gómez, 2014).

No Brasil, o controle químico com inseticidas sintéticos vem sendo o principal método utilizado no manejo das populações de *H. armigera*; porém, a maior parte dos defensivos utilizados para o seu controle possuem registro temporário e foram liberados em caráter emergencial (Czepak et al., 2013). Além disso, *H. armigera* é descrita como uma das espécies de noctuídeos com mais casos de resistência a inseticidas, incluindo piretroides, organofosforados, carbamatos, organoclorados (Jouben et al., 2013), spinosinas (Aheer et al., 2009) e toxinas derivadas de *Bacillus thuringiensis* (Zhang et al., 2011; Yang et al., 2013), o que motiva estudos com métodos de controle alternativos ao químico.

Dentre as ferramentas do Manejo Integrado de Pragas (MIP), o uso de plantas com atividade inseticida pode ser uma alternativa valiosa no controle de populações de insetos, uma vez que possui baixa toxicidade a mamíferos e organismos não alvo e menor persistência no ambiente, o que conduz maior segurança ambiental. (Cloyd, 2004 e Isman, 2006). Não obstante, constitui uma opção importante para o manejo de espécies-praga em sistemas orgânicos de produção de alimentos onde a utilização de compostos sintéticos não é permitida.

Dentre as famílias botânicas de ocorrência em regiões neotropicais, Annonaceae constitui uma das principais fontes de compostos naturais bioativos (Isman, 2006). Essa família compreende 135 gêneros e cerca de 2.500 espécies descritas até o momento, com a grande maioria de ocorrência na região pantropical (Chatrou et al., 2004). Entre as classes de compostos bioativos encontradas em Annonaceae, as acetogeninas vêm atraindo a atenção desde a década de 1980, devido às suas características estruturais que conferem uma vasta

gama de atividades biológicas, incluindo potente ação inseticida (Ocampo e Ocampo, 2006). Acetogeninas são uma série de produtos naturais (C-35 / C-37), derivados de ácidos graxos de cadeia longa combinados com uma unidade de propan-2-ol (Alali et al., 1999). Essas moléculas são potentes inibidores do complexo I (NADH: ubiquinona oxireductase) do sistema de transporte de elétrons mitocondrial e da enzima NADH: oxidase da membrana celular de artrópodes alvo (Lewis et al., 1993).

Pesquisas recentes mostraram a eficiência de derivados de anonáceas sobre diferentes pragas agrícolas, tais como *Plutela xylostella* L (Lepidoptera: Plutellidae) (Leatemala et al., 2004; Trindade et al., 2006), *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) (Ribeiro et al., 2014a), *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) (Ribeiro et al., 2014b), *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (Tolosa et al., 2014; Blessing et al., 2010; Ansante et al., 2015a), *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (Ribeiro et al., 2015) e sobre coleópteros-praga de grãos armazenados (Ribeiro et al., 2013; Ribeiro et al., 2014c; Gonçalves et al., 2015). No entanto, até o presente momento não existem trabalhos relatando a eficiência de extratos de anonáceas neotropicais sobre *H. armigera*. Assim, visando buscar alternativas mais sustentáveis de manejo, o presente estudo teve como objetivo avaliar, primeiramente, a bioatividade de extratos etanólicos provenientes de sementes de cinco espécies de *Annona* (*A. mucosa*, *A. muricata*, *A. montana*, *A. reticulata* e *A. sylvatica*) e do bioinseticida comercial à base de acetogeninas (Anosom[®] 1 CE) sobre *H. armigera*, em laboratório. Na sequência, foram conduzidos fracionamentos biomonitorados, a fim de isolar a acetogenina majoritária do extrato mais promissor e avaliar o seu efeito sobre *H. armigera*. Por fim, foi avaliado, a eficácia do extrato mais promissor (em formulação do tipo concentrado emulsionável) em comparação com inseticidas comerciais de origem botânica e sintética no controle do inseto em tomateiro cultivado em casa de vegetação (semi-campo).

1. Material e métodos

2.1. Obtenção das espécies e preparo dos extratos vegetais

Exsicatas das espécies estudadas (Tabela 1), previamente identificadas pelo Prof. Dr. Renato Mello-Silva [Departamento de Botânica, Instituto de Biociências/Universidade de São Paulo (IB/USP)], encontram-se depositadas no Herbário E.S.A. do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP, Brasil.

Para a preparação dos extratos, sementes obtidas de frutos maduros foram desidratadas em estufa com circulação de ar forçada a 40 °C por um período de 48 a 72 horas. Feito isso, as sementes secas foram moídas em moinho de facas para obtenção de pó fino, os quais foram armazenados em vidros herméticos e mantidos em freezer doméstico (~ 10 °C) até sua utilização.

Os extratos orgânicos foram obtidos por maceração em solvente etanol (na proporção de 5:1 p/v). Para isso, o pó vegetal foi mantido em repouso com o solvente em um frasco hermeticamente vedado por período de três dias, sendo, posteriormente, em de papel filtro. A torta restante foi ressubmetida ao solvente etanol, repetindo-se todo o processo por três vezes. O solvente remanescente na solução filtrada foi eliminado em rotaevaporador a 50 °C e à pressão de -600 mmHg. Após a completa evaporação do solvente em câmara com fluxo de ar, foi determinado o rendimento da extração para as sementes de cada espécie vegetal estudada.

2.2. Estabelecimento e manutenção da criação de *H. armigera*

A criação foi iniciada a partir da coleta de indivíduos adultos em lavouras de soja e milho no estado de São Paulo. A confirmação da espécie foi feita pelo Dr. Alexandre Specht (Embrapa Cerrados, Brasília, DF, Brasil) por meio de aspectos morfológicos e moleculares com base no protocolo de Specht et al. (2013). Os insetos foram mantidos em sala climatizada ($T = 25 \pm 2$ °C; U.R. = $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h), sendo as lagartas mantidas em dieta artificial (Greene et al., 1976). Para os adultos foram oferecidas porções de algodão umedecidas em solução de água + mel a 10% (p/v). A criação foi conduzida seguindo os protocolos de Kao (1995) e Jah et al. (2012).

2.3. Bioensaios

Os ensaios laboratoriais foram realizados sob condições controladas ($T = 26 \pm 2$ °C, UR = $65 \pm 10\%$ e fotoperíodo = 14 h), enquanto que o bioensaio com plantas de tomateiro infestadas foi conduzido em casa de vegetação (temperatura média de 24,3 °C, com máxima de 25,6 °C e mínima de 16,7 °C; umidade relativa média de 58%, com máxima de 95% e mínima de 38%; luz natural) durante o mês de junho de 2015.

2.3.1. Triagem para identificação dos extratos promissores

Para a seleção do extrato mais promissor no controle de *H. armigera*, foram realizados ensaios preliminares com os extratos etanólicos obtidos das sementes das cinco espécies estudadas (*A. muricata*, *A. mucosa*, *A. reticulata*, *A. sylvatica* e *A. montana*). Para tanto, os extratos foram solubilizados em uma solução de solventes orgânicos [acetona:metanol, 1:1, v/v], na proporção de 5 mL de solução para cada 300 g de dieta, de acordo com o método descrito por Ansante et al. (2015).

Os extratos e o inseticida comercial à base de acetogeninas (Anosom[®]) foram incorporados à dieta artificial (Greene et al., 1976) na concentração diagnóstica de 2.000 mg kg⁻¹, quando o meio se encontrava a temperatura em torno de 50 °C. Como controles, utilizaram-se água deionizada e a solução de solventes [acetona:metanol (1:1, v/v)] empregada na solubilização dos extratos, os quais foram incorporados na mesma proporção mencionada anteriormente.

Os tratamentos (1,5 ml de cada dieta) foram acondicionados em placas de Elisa (TPP[®] Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Cantão Schaffhausen) com auxílio de um micropipetador. Após 24 horas da deposição, cada célula foi infestada com uma lagarta neonata de *H. armigera*. Foi adotado delineamento inteiramente casualizado, efetuando-se seis repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Elisa (24 células), totalizando 144 lagartas expostas por tratamento. A mortalidade das lagartas foi avaliada diariamente por um período de sete dias.

2.3.2. Curvas de concentração-resposta do extrato selecionado

Com base na triagem inicial, o tratamento mais promissor (extrato etanólico de sementes de *A. mucosa*) e o inseticida comercial à base de acetogeninas (Anosom[®]) foram novamente avaliados a fim de estimar a CL₅₀ e CL₉₀ (concentrações necessárias para matar 50 e 90% das lagartas expostas, respectivamente) e a EC₅₀ (concentração necessária para reduzir em 50% o peso das lagartas sobreviventes). Para isso, foram utilizadas cinco concentrações de cada tratamento (intervalo: 0 – 2.000 mg kg⁻¹), definidas com base na fórmula proposta por Finney (1971).

Os mesmos procedimentos experimentais descritos nos ensaios preliminares foram utilizados nesta estimativa. Porém, foram utilizadas quatro repetições por concentração, cada qual consistindo de uma placa de Elisa, totalizando 96 lagartas em cada nível.

2.3.3. Tempo letal médio

Os TL_{50} (tempos letais necessário para matar 50% das lagartas de *H. armigera*) para o inseticida comercial à base de acetogeninas (Anosom[®]) e para o extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* (extrato mais promissor) foram estimados utilizando-se as concentrações de 1.000 mg kg⁻¹ e 2.000 mg kg⁻¹.

Para a realização deste bioensaio, utilizou-se os mesmos procedimentos experimentais descritos anteriormente. A mortalidade das lagartas foi avaliada diariamente por um período de sete dias.

2.3.4. Isolamento e bioensaio com componente majoritário do extrato selecionado

O extrato etanólico selecionado (sementes de *A. mucosa*) foi submetido a procedimentos cromatográficos visando purificar e isolar a acetogenina majoritária presente na amostra. Para isso, utilizaram-se diferentes técnicas cromatográficas, tais como: cromatografia por adsorção em camada delgada analítica (CCDA), usando folhas de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄ com 0,2 mm de espessura; cromatografia por adsorção em coluna (CC), utilizando como fase estacionária sílica-gel 70-230 mesh e 230-400 mesh; e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para esse último procedimento, utilizou-se um cromatógrafo modelo 1200 (Agilent Technologies), equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, amostrador automático G1329A e detector de ultravioleta G1314B. O equipamento foi acoplado a uma interface G1369A e os cromatogramas foram registrados por meio do software EZCrom Ellite. A fase estacionária utilizada foi a fase reversa Phenomenex Luna C-18, em modo analítico (10 µm, 25,0 x 0,46 cm) e preparativo (10 µm, 25,0 x 1,0 cm), com válvula de reciclo e loop de 200 µL.

A caracterização do composto isolado foi realizada por meio de técnicas espectroscópicas [ressonância magnética nuclear unidimensional (RMN de ¹H e ¹³C) e bidimensional (COSY, HSQC, HMBC)] e pela espectrometria de massas. Para tais caracterizações, utilizaram-se os espectrômetros Bruker AvanceTM III NanoBay 9,4T (400 MHz para RMN de ¹H e 100 MHz para RMN de ¹³C) e Micromass Quattro LC, em método de inserção direta e modo de ionização por captura de elétrons (modo negativo).

Afim de testar o efeito inseticida da acetogenina isolada, utilizou-se a concentração equivalente a 10% da CL_{50} estimada para o respectivo extrato bruto. O procedimento

utilizado neste teste foi o mesmo descrito para a triagem inicial, avaliando-se a mortalidade por um período de cinco dias. Foram utilizadas quatro repetições, cada uma constituída por 20 lagartas, totalizando assim 80 lagartas por tratamento (n= 80).

2.3.5. Bioatividade comparada do extrato selecionado e do inseticida à base de acetogeninas com inseticida sintético comercial.

A fim de avaliar a eficácia do extrato mais promissor e do inseticida comercial à base de acetogeninas (Anosom[®]) em condições de semi-campo (casa de vegetação), foi realizado um teste utilizando o inseticida de origem sintética à base de flubendiamida Belt[®] (480 g/L; suspensão concentrada, BAYER Corporation, Dormagen, Alemanha) como controle positivo. O produto Belt[®] foi utilizado na dosagem recomendada pelo fabricante (416,7 mg L⁻¹), enquanto que o extrato etanólico de *A. mucosa* e o Anosom[®] foram utilizados nas concentrações equivalentes à CL₉₀ (1.479,00 mg kg⁻¹ e 1.151 mg kg⁻¹, respectivamente) previamente estimadas. Para o preparo solução do extrato etanólico, foi realizada a ressuspensão em solventes orgânicos acetona:metanol (1:1, v/v) (100 g L⁻¹) sendo em seguida adicionado emulsificante Tween 80 a concentração de 10 g L⁻¹ e água deionizada.

O teste foi realizado com plantas de tomate de 30-45 dias. Cada planta foi cultivada em vasos de 2,5 L contendo solo e substrato (Plantmax[®]) na proporção de 3:1. As plantas foram pulverizadas com os respectivos tratamentos por meio de uma pistola tipo gravidade (Modelo 5A Arprex), acoplada a um compressor de ar ajustado para propiciar uma pressão de 0,5 kgf cm⁻².

A pulverização foi realizada até o ponto de escorrimento e, após a secagem dos resíduos, uma folha de cada planta foi infestada com 10 lagartas neonatas de *H. armigera* oriundas de criação mantida em laboratório. Posteriormente foi acoplada uma gaiola feita em “voile” sobre as folhas, a fim de evitar a fuga dos insetos. Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento (n= 100). Durante os ensaios, as plantas infestadas permaneceram acondicionadas sobre bancadas em casa de vegetação e após seis dias da infestação, a mortalidade e o peso das lagartas sobreviventes foram determinados (Figura 1). Considerou-se morta a lagarta que não apresentou nenhum tipo de reação (movimento) após ser levemente tocada com pincel fino.

2.4. Análise dos dados

Modelos lineares generalizados (Nelder e Wedderburn, 1972) foram utilizados para a análise das variáveis estudadas. A verificação da qualidade do ajuste foi feita por meio do gráfico meio-normal de probabilidades com envelope de simulação (Demétrio e Hinde, 1997; Hinde e Demétrio, 1998). Quando houve diferença significativa entre os tratamentos, múltiplas comparações (teste de Tukey, $p < 0,05$) foram realizadas por meio da função *glht* do pacote Multcomp, com ajuste dos valores de p . Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software estatístico “R”, versão 2.15.1 (R Development Core Team, 2012).

Para estimativa das concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}) foi utilizado um modelo binomial com função de ligação complemento log-log (modelo de gompit), utilizando-se o Probit Procedure do software SAS versão 9.2 (SAS Institute, 2011).

2. Resultados

3.1. Rendimento de extração

O rendimento de extratos etanólicos provenientes de sementes variou de 11 a 27,85% para as espécies estudadas (Tabela 2), sendo o maior índice observado para *A. reticulata* e o menor para *A. sylvatica*.

3.2. Triagem para identificação dos extratos promissores

Na primeira avaliação dos ensaios preliminares (Tabela 3), o inseticida comercial Anosom[®] ocasionou o maior índice de mortalidade (97,92 %) de indivíduos, diferindo ($F = 81,827$, $gl = 5,30$, $P < 0,0001$) dos demais tratamentos. O extrato etanólico de *A. mucosa* também diferiu dos outros extratos, com média de mortalidade igual a 31,55 %.

Após 72 horas, o extrato etanólico de *A. mucosa* provocou mortalidade total das larvas de *H. armigera*, semelhante ao verificado com Anosom[®]. Quanto aos demais extratos, o tratamento à base de *A. muricata* (35,77 %) diferiu ($F = 27,504$, $gl = 5,30$, $P < 0,0001$) dos demais extratos com o maior índice de mortalidade. Na terceira (120 horas) e última (168 horas) avaliações, não houve mudança quanto à mortalidade acumulada dos tratamentos.

3.3. Curvas de concentração-resposta do extrato selecionado

A avaliação da mortalidade acumulada durante o período de sete dias (168 horas de exposição) permitiu CL_{50} de 312,08 mg kg⁻¹ e uma CL_{90} de 1151,00 mg kg⁻¹ ($\chi^2= 4,69$; gl= 3; n= 672) para o Anosom[®] (Tabela 4). Já para o extrato etanólico de *A. mucosa*, os valores estimados para a CL_{50} e CL_{90} foram de 411,55 mg kg⁻¹ e 1.479 mg kg⁻¹, respectivamente ($\chi^2= 9,18$; gl= 4; n= 672).

Quanto às concentrações requeridas para reduzir em 50% o peso das lagartas expostas (Tabela 5), para o Anosom[®] a EC_{50} estimada foi de 173,60 mg kg⁻¹, com intervalo de confiança de 56,82 - 290,40 mg kg⁻¹ (n=324). Já para *A. mucosa* foi obtida uma EC_{50} de 239,00 mg kg⁻¹, com intervalo de confiança de 129,10 - 349,00 mg kg⁻¹ (n=367).

3.4. Tempo letal médio

O tempo letal médio (TL_{50}) para o extrato etanólico de *A. mucosa* na concentração de 1000 mg kg⁻¹ foi de 45,15 horas ($\chi^2= 11,23$; gl= 4; n= 672) (Tabela 6); enquanto que para a concentração de 2.000 mg kg⁻¹ este tempo foi de 34,95 horas ($\chi^2= 6,87$; gl= 4; n= 672). Para o Anosom[®] foi obtido o TL_{50} igual a 47,69 horas na concentração de 1.000 mg kg⁻¹ ($\chi^2= 10,19$; gl= 4; n= 672) e de 39,78 horas para a concentração de 2.000 mg kg⁻¹ ($\chi^2= 17,52$; gl= 4; n= 672).

3.5. Isolamento e bioensaio com componente majoritário do extrato selecionado

A partir das técnicas cromatográficas, o composto majoritário no extrato etanólico de *A. mucosa* foi isolado (fração 4) e posteriormente identificado, através de análises de ressonância magnética nuclear unidimensional (RMN de 1H e 13C) e bidimensional (COSY, HSQC, HMBC), como acetogenina bis-tetrahidrofurano roliniastatina-1 (Figura 2).

O composto provocou mortalidade crescente a partir de 48 horas de exposição, atingindo 100% após 120 horas (F= 0,4081; gl= 1,6; p < 0,5465) (Tabela 7).

3.6. Bioatividade comparada do extrato *A. mucosa* com inseticidas comerciais em casa de vegetação.

Após sete dias da aplicação do extrato etanólico de *A. mucosa* e do inseticida botânico Anosom[®], verificou-se mortalidade larval acima superior a 90% neste tratamento, diferindo dos controles ($F= 113,76$; $gl= 3,36$; $p < 0,0001$). O inseticida sintético Belt[®] provocou 100% de mortalidade no mesmo período (Tabela 8).

Além da mortalidade expressiva observou-se também redução significativa no peso médio das lagartas sobreviventes dos tratamentos *A. mucosa* (0,4875 g) e Anosom[®] (0,8200 g), em comparação àquelas provenientes dos controles água deionizada (5,14 g) e metanol:água, 1:10 (v/v) + Tween 80, 0,5% (5,01 g). Adicionalmente foi verificado menor índice de danos nos folíolos pulverizados com os inseticidas e o extrato, comparativamente aos controles.

3. Discussão

Os resultados obtidos nos bioensaios conduzidos em condições de laboratório e de casa de vegetação são inéditos e demonstraram que o extrato etanólico obtido de sementes de *A. mucosa* apresenta potencial inseticida e inibidor de desenvolvimento sobre larvas de *H. armigera*. A eficácia obtida nos experimentos é semelhante a do bioinseticida comercial à base de acetogeninas (Anosom[®]) e do inseticida comercial sintético à base de flubendiamida (Belt[®]), este último registrado em caráter emergencial no Brasil para o controle dessa espécie-praga. Estes resultados confirmam o potencial de extratos de *A. mucosa* no controle alternativo de importantes pragas agrícolas, conforme demonstrado por outros autores (Ribeiro et al., 2013; Ribeiro et al., 2014a, b, c; Ansante et al., 2015) e podem expandir o espectro de ação de derivados desta espécie de Annonacea, que tem o Brasil como seu centro de origem.

O estudo químico revelou que a acetogenina bis-tetrahidrofurano roliniastatina-1 é o componente majoritário do extrato etanólico de *A. mucosa*, no entanto a ocorrência de sinergismo com compostos de mesma ou de outras classes de compostos não pode ser descartada. Devido à prevalência deste composto, Ansante et al. (2015) sugerem que esta acetogenina pode ser usada como marcador químico no controle de qualidade de formulações provenientes de estruturas de *A. mucosa*.

Estudos recentes vêm destacando o potencial inseticida de espécies de Annonaceae no controle de outros lepidópteros-praga. Neste contexto, Trindade et al. (2006) avaliaram a biatividade da espécie *A. muricata* em folhas de repolho tratadas e observaram que extratos provenientes de folhas na concentração de 5mg ml⁻¹ ocasionam 100% de mortalidade em lagartas de *P. xylostella*. Ribeiro et al. (2014a) realizaram estudos com quatro espécies de *Annona* (*A. montana*, *A. mucosa*, *A. muricata* e *A. sylvatica*) também investigadas em nosso estudo, além do inseticida comercial Anosom[®] sobre a lagarta *T. ni* e verificaram significativa atividade inseticida sobre indivíduos de terceiro ínstar deste noctuídeo. O extrato de *A. mucosa* e o Anosom[®] apresentaram mortalidade maior que 98% para lagartas de terceiro ínstar de *T. ni* após 72 horas de exposição em dieta tratada, mostrando eficiência superior a de um inseticida comercial à base de piretrinas (Insect Spray[®]) utilizado como controle positivo. Em nosso estudo, a mortalidade causada pelo extrato de *A. mucosa* e por Anosom[®] foi ainda superior (=100%) àquela verificada por estes autores; no entanto, no presente trabalho utilizamos lagartas neonatas de *H. armigera*, provavelmente com maior sensibilidade aos compostos.

Em trabalho semelhante, Ansante et al. (2015) avaliaram a bioatividade de extratos orgânicos provenientes de diferentes estruturas e espécies de anonáceas (*Annona cacans* Warming, *A. montana*, *A. mucosa*, *A. reticulata* e *A. sylvatica*) sobre formas neonatas da lagarta-do-cartucho do milho *S. frugiperda* e verificaram que o extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* foi o mais promissor, com CL₅₀ igual a 842,9 mg kg⁻¹ e CE₅₀ de 580,4 mg kg⁻¹. No presente estudo, as lagartas de *H. armigera* mostraram maior suscetibilidade ao extrato etanólico de *A. mucosa* comparativamente a *S. frugiperda*, onde verificou-se CL₅₀ igual a 411,55 mg kg⁻¹ e CE₅₀ de 239,00 mg kg⁻¹.

Quanto à comparação de bioatividade entre compostos majoritários de anonáceas, Blessing et al. (2010) avaliaram a toxicidade de seis acetogeninas isoladas de *A. montana* sobre *S. frugiperda*, incorporadas em dieta artificial (100µg/g de dieta) e verificaram 100% de mortalidade (considerando as fases larval e pupal) em alguns tratamentos. Os autores citaram como mais promissoras as acetogeninas annonacin, cis-annonacin-10-one e gigantetronenin, as quais provocaram mortalidade larval superior a 50%. No caso de *A. mucosa*, Ansante et al. (2015) demonstraram que a incorporação de bis-tetrahidrofurano roliniastatina-1 em dieta de *S. Frugiperda*, nas concentrações de 50 e 100 ppm, proporcionaram, respectivamente, 90 e 100 % de mortalidade após sete dias de exposição. Já no presente estudo, após cinco dias de exposição, obteve-se 100% de mortalidade de formas

neonatas de *H. armigera* na concentração de 41,2 ppm (10% da CL₅₀), demonstrando maior suscetibilidade desta espécie de noctuídeo em comparação com a lagarta-do-cartucho.

Ansante et al. (2015) observou níveis de mortalidade larval muito semelhantes para extrato etanólico de *A. mucosa* na CL₉₀ (1.882 µl l⁻¹), em comparação aos inseticidas comerciais de origem natural [azadiractina + 3-tigloylazadirachtol (Azamax[®] 1.2 EC)] (4.000 µl l⁻¹) e sintético [clorantrolilprol (Premio[®] 20 SC)] (562,25 µl l⁻¹) em lagartas de *S. frugiperda*, porém foram observadas diferenças no TL₅₀, onde *A. mucosa* e Azamax[®] apresentaram menores valores (32,72 e 37,25 horas, respectivamente) não diferindo significativamente entre si, enquanto que Premio[®] apresentou uma ação mais lenta (77,98 h). No presente estudo, os valores de TL₅₀ estimados para o extrato etanólico de *A. mucosa* e o inseticida botânico comercial Anosom[®] também foram semelhantes nas concentrações de 1.000 mg/kg⁻¹ (45,15 e 47,69 horas, respectivamente) e 2.000 mg/kg⁻¹ (34,95 e 39,78 horas respectivamente).

Ensaio realizados em condições de casa de vegetação (semi-campo) também comprovam os efeitos inseticidas de derivados das espécies de anonáceas. Seffrin et al. (2010) estudaram o efeito do extrato metanólico de folhas de *Annona squamosa* L. e *A. atemoya* Mabb. sobre *T. ni* na cultura do repolho e observaram que em ambos os tratamentos ocorreram reduções no consumo foliar e no desenvolvimento larval da espécie-praga. Também em plantas de repolho, Leatemia e Isman (2004) avaliaram o efeito do extrato etanólico da semente de *A. squamosa* sobre a alimentação de *P. xylostella* e observaram maior eficiência do extrato em relação a um inseticida comercial botânico à base de rotenona e um piretroide sintético. Em milho, Tolosa et al. (2014) reportaram redução de 75% na população de lagartas de *S. frugiperda* pela utilização de extrato metanólico (fração com acetogeninas) de sementes de *Rollinia occidentalis* R. E. Fries na concentração de 500 µg ml⁻¹. Para a cultura dos citros, o extrato etanólico de sementes de *A. mucosa*, o qual possui a acetogeninas bis-tetrahydrofurano roliniastatina-1 como composto ativo majoritário, apresentou eficácia superior a 80% e 99% em experimento de semi-campo e campo, respectivamente sobre o psilídeo-dos-citros, *D. citri* (Ribeiro et al., 2015), além de efeito acaricida sobre *P. citri* com nível de atividade superior a outros acaricidas botânicos comerciais e similar a um sintético (Ribeiro et al., 2014c). Já no presente estudo, verificou-se 95% de mortalidade de larvas neonatas de *H. armigera* em plantas de tomateiro previamente pulverizadas com extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* a 1.479 mg kg⁻¹.

Estudos fitoquímicos biomonitorados (He et al., 1997) sugerem que acetogeninas contendo bis-tetrahydrofurano, como a identificada majoritariamente neste estudo em *A.*

mucosa (bis-tetrahidrofurano roliniastatina-1), apresentam maior bioatividade em comparação com outras acetogeninas com estruturas distintas. Quanto ao mecanismo de ação destes compostos, em insetos as acetogeninas atuam como inibidoras do complexo I (NADH - ubiquinona oxidoreductase) na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (Lewis et al., 1993). Porém, estudos mais recentes (Blessing et al., 2010; Ribeiro et al., 2013) sugerem que a inibição deste complexo mitocondrial não seja o único modo de ação das acetogeninas, considerando-se a variação de efeitos biológicos observados, bem como os diferentes grupos funcionais presentes nas cadeias destes compostos.

Considerando-se que *H. armigera* foi recentemente introduzida no país e que muitos produtos sintéticos possuem registro temporário de uso, o uso de inseticidas botânicos com atividade comprovada como o extrato de *A. mucosa* pode ampliar a gama de táticas de controle a serem implementadas dentro do manejo integrado de pragas (MIP), especialmente em sistemas orgânicos com olerícolas como o tomateiro. Embora ainda existam questões relacionadas ao aumento da estabilidade e formulações envolvendo produtos de origem vegetal, o uso da fração etanólica de sementes *A. mucosa* mostra-se bastante promissor, uma vez que é um produto de fácil obtenção (maceração em etanol), com custo baixo, além de ser inócuo às plantas e com rápida degradação, conforme verificado nos ensaios de semi-campo.

4. Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

5. Referências

- Aheer, G.M., Shah, Z., Saeed, M., 2009. Seasonal history and biology of cotton mealy bug, *Phenacoccus Solenopsis* Tinsley. J. Agric. Res. 47, 4.
- Alali, F.Q., Liu, X.X., McLaughlin, J.L., 1999. Annonaceous acetogenins: recent progress. J. Nat. Prod. 62, 504–540.

- Ansante, T.F., Ribeiro, L.P., Bicalho, K.U., Fernandes, J.B., Silva, M.F.G.F., Vieira, P.C., Vendramim, J.D., 2015. Secondary metabolites from Neotropical Annonaceae: Screening, bioguided fractionation, and toxicity to *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae). *Ind. Crops Prod.* 74, 969-976.
- Blessing, L.T., Colom, O.A., Popich, S., Neske, A., Bardón, A., 2010. Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. *J. Pest. Sci.* 83, 307–310.
- Bueno, A.F., Sosa-Gómez, D.R., 2014. The old world bollworm in the Neotropical region: the experience of Brazilian growers with *Helicoverpa armigera*. *Outlook Pest Manag.* 25, 261-264.
- Bueno, R.C.O.D.F., Yamamoto, P.T., Carvalho, M.M., Bueno, N.M., 2014. Occurrence of *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) on citrus in the state of Sao Paulo, Brazil. *Rev. Bras. Frutic.* 36, 520-523.
- Chatrou, L.W., Rainer, H., Maas, P.J.M., 2004. Annonaceae (Soursop family). In: Smith N, *Flowering Plants of the Neotropics.* 25 18–20.
- Cloyd, R., 2004. Natural indeed: Are natural insecticide safer and better than conventional insecticide. *Illinois Pest. Rev.* 17, 1-3.
- Czepak, C., Albernaz, K.C., Vivan, L.M., Guimarães, H.O., Carvalhais, T., 2013. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. *Pesqui. Agropecu. Trop.* 43, 110-113.
- Demétrio, C.G.B., Hinde, J., 1997. Half-normal plots and overdispersion. *Glim Newsletter.* 27, 19-26.
- Finney, D.J., 1971. *Probit analysis.* Cambridge: Cambridge University Press.
- Fitt, G. P., 1989. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. *Annu. Rev. Entomol.* 34, 17-53.

- Gonçalves, G.L.P., Ribeiro, L..P., Gimenes, L., Vieira, P.C., Silva, M.F.G.F., Forim, M.R., Vendramim, J.D., 2015. Lethal and sublethal toxicities of *Annona sylvatica* (Magnoliales: Annonaceae) extracts to *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). Fla. Entomol. 98, 921-928.
- Greene, G.L., Leppla, N.C., Dickerson, W.A., 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. J. Econ. Entomol. 69, 487-488.
- He, H., Zeng, L., Ye, Q., Shi, G., Oberlies, N., Zhao, G., Njoku, C., Mclaughlin, J., 1997. Comparative SAR evaluations of annonaceous acetogenins for pesticidal activity. Pestic. Sci. 49, 372–378.
- Hinde, J., Demétrio, C.G.B., 1998. Overdispersion: models and estimation. Comput. Stat. Data An. 27, 151-170.
- Isman, M.B., 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annu. Rev. Entomol. 51, 45-66.
- Jah, R. K., Chi, H., Tang, L.C., 2012. A comparison of artificial diet and hybrid sweet corn for the rearing of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) based on life table characteristics. Environ. Entomol. 41, 30-39.
- Jouben, N., Agnolet, S., Lorenz, S., Schöne, S.E., Ellinger, R., Schneider, B., Heckel, D.G., 2012. Resistance of Australian *Helicoverpa armigera* to fenvalerate is due to the chimeric P450 enzyme CYP337B3. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 109, 15206-15211.
- Kao, S.S., 1995. Mass rearing of insects. B. Taiwan Agric. Chem. Toxic Subst. Res. Inst. (TACTRI). 37, 1-8
- Lammers, J.W., Macleod, A., 2007. Report of a pest risk analysis: *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808). (acesso em 10.05.14) <http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/helicoverpa.pdf>

- Leatemia, J.A., Isman, M.B., 2004. Efficacy of crude seed extracts of *Annona squamosa* against diamondback moth, *Plutella xylostella* L. in the greenhouse. *Int. J. Pest Manage.* 50, 129-133.
- Lewis, M.A., Arnason, J.T., Philogene, B.J.R., Rupperecht, J.K., Mclaughlin, J.L., 1993. Inhibition of respiration at site I by asimicin, an insecticidal acetogenin of the pawpaw, *Asimina triloba* (Annonaceae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 45, 15-23.
- Murúa MG, Scalora FS, Navarro FR, Cazado LE, Casmuz A, Villagrán ME, Lobos E, Gastaminza G., 2014. First record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina. *Fla Entomol.*97(2), 854-6.
- Nelder, J.A., Wedderburn, R.W.M., 1972. Generalized linear models. *J. R. Stat. Soc.* 135, 370–384.
- Ocampo, D., Ocampo, R., 2006. Bioactividad de la familia Annonaceae. *Rev. Univ. Caldas,* 135-155.
- R DevelopmentCore Team, 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Ribeiro, L.P., Vendramim, J.D., Bicalho, K.U., Andrade, M.S., Fernandes, J.B., Moral, R.A., Demétrio, C.G.B, 2013. *Annona mucosa* Jacq.(Annonaceae): A promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots.(Coleoptera: Curculionidae). *J. Stored Prod. Res.* 55, 6-14.
- Ribeiro, L.P., Akhtar, Y., Vendramim, J.D., Isman, M.B., 2014a. Comparative bioactivity of selected seed extracts from Brazilian *Annona* species and an acetogenin-based commercial bioinsecticide against *Trichoplusia ni* and *Myzus persicae*. *Crop Prot.* 62, 100-106.
- Ribeiro, L.P., Vendramim, J.D., Andrade, M.S., Bicalho, K.U., Silva, M.F.G.F., Vieira, P.C., Fernandes, J.B., 2014c. Tropical plant extracts as sources of grain-protectant compounds against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Neotrop. Entomol.* 43, 470-482.

- Ribeiro, L.P., Zanardi, O.Z., Vendramim, J.D., Yamamoto, P.T., 2014b. Comparative toxicity of an acetogenin-based extract and commercial pesticides against citrus red mite. *Exp. Appl. Acarol.* 64, 87-98.
- Ribeiro, L.P., Santos, M.S., Gonçalves, G.L.P., Vendramim, J.D., 2015. Toxicity of an acetogenin-based bioinsecticide against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and its parasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). *Fla. Entomol.* 98, 835-842.
- SAS Institute, 2011. Statistical analysis system: getting started with the SAS learning. Version 9.2. NC: SAS Institute.
- Seffrin, R.C., Shikano, I., Akhtar, Y., Isman, M.B., 2010. Effects of crude seed extracts of *Annona atemoya* and *Annona squamosa* L. against the cabbage looper, *Trichoplusia ni* in the laboratory and greenhouse. *Crop Prot.* 29, 20-24.
- Specht, A., Gomez, D.R., Paula-Moraes, S.V., Yano SA. 2013. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 48, 689-692.
- Tolosa, D., Hidalgo, J.R., Sal, P.E., Popich, S., Bardón, A., Neske, A., 2014. Insecticidal effects of the Annonaceous acetogenin squamocin and the acetogenin fraction of seeds of *Rollinia occidentalis* on Soybean and Corn Pests. *J. Agric. Food Chem.* 3, 156.
- Trindade, R.C.P., Luna J.S., Lima M.R.F, Silva P.P, Sant'Ana A.E.G., 2006. Actividad larvicida y variacion estacional del extracto de *Annona muricata* en *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Rev. Colomb. Entomol.* 3, 223-228.
- Venette, R.C., Davis, E.E.; Zaspel, Z., Heisler, H., Larson, M., 2003. Mini risk assessment of Old World bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). US Depart. Agric, Anim. Pl. Heal. Insp. Serv.
- Yang, Y., Li, Y., Wu, Y., 2013. Current status of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* after 15 years of *Bt* cotton planting in China. *J. Econ. Entomol.* 106, 375-381.

Zanardi, O.Z., do Prado Ribeiro, L., Ansante, T.F., Santos, M.S., Bordini, G.P., Yamamoto, P.T. and Vendramim, J.D., 2015. Bioactivity of a matrine-based biopesticide against four pest species of agricultural importance. *Crop Prot.* 67,160-167.

Zhang, H., Yin, W., Zhao, J., Jin, L., Yang, Y., Wu, S., Tabashnik, B.E. Wu, Y., 2011. Early warning of cotton bollworm resistance associated with intensive planting of *Bt* cotton in China. *Plos One.* 6, 22874-22874.

Tabela 1. Informações das espécies botânicas estudadas.

Espécie	Local da coleta	Data da coleta	Nº de voucher
<i>Annona muricata</i> L.	ESALQ/USP Campus, Piracicaba, SP, Brasil	12/04/2011	121892
<i>Annona mucosa</i> Jacq.	ESALQ/USP Campus, Piracicaba, SP, Brasil	17/03/2011	120985
<i>Annona sylvatica</i> A. St.-Hil.	Av. Emilio Falcão, Eral Seco, RS, Brasil	25/04/2011	121205
<i>Annona montana</i> Macfad.	ESALQ/USP Campus, Piracicaba, SP, Brasil	21/03/2011	121203
<i>Annona reticulata</i> L.	ESALQ/USP Campus, Piracicaba, SP, Brasil	01/03/2011	123318

Tabela 2. Rendimentos de extratos etanólicos (1:5, p/v) provenientes de sementes de cinco espécies de anonáceas utilizadas no estudo com *Helicoverpa armigera*.

Espécies	Peso do material (g)	Rendimento	
		(g)	(%)
<i>Annona montana</i>	95,60	19,34	20,23
<i>Annona mucosa</i>	106,21	19,95	18,79
<i>Annona muricata</i>	104,50	22,06	21,10
<i>Annona reticulata</i>	100,00	27,85	27,85
<i>Annona sylvatica</i>	100,00	11,00	11,00

Tabela 3. Mortalidade acumulada (%) (\pm EP) de lagartas de *Helicoverpa armigera* expostas a diferentes derivados de Annonaceae incorporados à dieta artificial. Temp.: $25\pm 2^\circ\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; Fotofase: 14 h.

Tratamento	Tempo de exposição (horas) ¹			
	24	72	120	168
E.E.S. <i>Annona reticulata</i>	4,35 \pm 2,20 c	27,66 \pm 3,16 ab	29,11 \pm 2,96 ab	29,36 \pm 3,02 ab
E.E.S. <i>Annona mucosa</i>	31,55 \pm 5,08 b	100,00 \pm 0,00*	100,00 \pm 0,00*	100,00 \pm 0,00*
E.E.S. <i>Annona montana</i>	0,00 \pm 0,00*	21,55 \pm 3,04 b	24,62 \pm 3,30 b	24,62 \pm 3,30 b
E.E.S. <i>Annona muricata</i>	6,05 \pm 2,32 c	35,77 \pm 2,88 a	35,77 \pm 2,88 a	35,77 \pm 2,88 a
E.E.S. <i>Annona sylvatica</i>	0,69 \pm 0,69 c	7,01 \pm 2,03 c	7,01 \pm 2,03 c	7,01 \pm 2,03 c
Anosom [®] 1 EC	97,92 \pm 1,42 a	100,00 \pm 0,00*	100,00 \pm 0,00*	100,00 \pm 0,00*
Água deionizada	0,00 \pm 0,00*	0,72 \pm 0,72 c	1,42 \pm 0,90 c	2,14 \pm 1,47 c
Acetona: metanol (1:1, v v ⁻¹)	2,17 \pm 1,48 c	2,84 \pm 1,79 c	2,84 \pm 1,79 c	2,84 \pm 1,79 c
	$F_{5,30} = 81,827; p < 0,0001$	$F_{5,30} = 27,507; p < 0,0001$	$F_{5,30} = 29,588; p < 0,0001$	$F_{5,30} = 25,398; p < 0,0001$

¹ Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$);

* Não incluído na análise (variância nula);

E.E.S.: Extrato etanólico das sementes.

Tabela 4. Estimativas da CL₅₀ e CL₉₀ (em mg kg⁻¹) e intervalo de confiança de inseticida à base de acetogeninas (Anosom[®] 1 EC) e do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* (Annonaceae) - ESAM para lagartas de *Helicoverpa armigera*, após 168 horas de exposição. Temp.: 25±2°C; U.R.: 60±10%; Fotofase: 14 h.

Tratamento	n ¹	Slope ± EP (valor de p)	CL ₅₀ (IC) ²	CL ₉₀ (IC) ²	χ ²⁽³⁾	g.l. ⁴	h. ⁵
Anosom [®] 1 EC	672	2,11±0,21 (p<0,0001)	312,08 (244,00 – 377,45)	1151,00 (956,83 – 1457,00)	4,69	3	1,56
ESAM	672	2,16±0,37 (p<0,0001)	411,55 (185,07 – 609,85)	1479,00 (1011,00 – 3069,00)	9,18	4	2,29

¹n: número de insetos testados; ²IC: intervalo de confiança a 95% de probabilidade de erro; ⁽³⁾χ²: valor de qui-quadrado de Person; ⁴g.l.: graus de liberdade; ⁵h.: fator de heterogeneidade.

Tabela 5. Estimativa da CE_{50} (em $mg\ kg^{-1}$) e intervalo de confiança de um inseticida à base de acetogeninas (Anosom[®] 1 EC) e do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* (Annonaceae) - ESAM para lagartas de *Helicoverpa armigera*, após 168 horas de exposição em dieta artificial tratada. Temp.: $25\pm 2^{\circ}C$; U.R.: $60\pm 10\%$; Fotofase: 14 h.

Tratamentos	n ¹	CE_{50} (IC) ²
Anosom [®] 1 EC	324	173,60 (56,82 – 290,40)
ESAM	367	239,00 (129,10 – 349,00)

* EC_{50} : concentração requerida para reduzir em 50% o peso das lagartas expostas;

¹n: número de observações;

IC: Intervalo de confiança 95%.

Tabela 6. Estimativa de tempo letal médio (TL₅₀, em horas) e intervalo de confiança de inseticida à base de acetogeninas (Anosom[®] 1 EC) e extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* (Annonaceae) - ESAM para lagartas de *Helicoverpa armigera*, em duas concentrações. Temp.: 25±2°C; U.R.: 60±10%; Fotofase: 14 h.

Tratamento	Concentração (mg kg ⁻¹)	n ¹	Slope ± EP (valor de p)	TL ₅₀ (IC) ²	χ ²⁽³⁾	g.l. ⁴	h. ⁵
Anosom [®] 1 EC	1000	672	2,16±0,36 (p<0,0001)	47,69 (18,51 – 76,22)	10,19	4	2,55
	2000	672	4,28±0,78 (p<0,0001)	39,78 (18,42 – 56,20)	17,52	4	4,38
ESAM	1000	672	4,28±0,78 (p<0,0001)	45,15 (7,66 – 88,40)	11,23	4	2,81
	2000	672	4,16±0,41 (p<0,0001)	34,95 (27,54 – 41,63)	6,87	4	1,71

¹n: número de insetos testados; ² IC: intervalo de confiança a 95% de probabilidade de erro; ⁽³⁾χ²: valor de qui-quadrado de Person; ⁴ g.l.: graus de liberdade; ⁵ h.: fator de heterogeneidade.

Tabela 7. Mortalidade acumulada (%) (\pm EP) de *Helicoverpa armigera* após 120 horas de exposição em dieta artificial contendo bis-tetrahydrofurano roliniastatina-1, testada a 10% da CL_{50} (411,55 mg kg⁻¹) estimada para o respectivo extrato bruto. Temp.: 25 \pm 2°C; U.R.: 60 \pm 10%; Fotofase: 14 h.

Tratamento	Tempo de exposição (horas) ¹				
	24	48	72	96	120
Roliniastatina-1	0,00 \pm 0,00*	28,75 \pm 3,75 a	61,25 \pm 4,27 a	92,50 \pm 3,23	100,00 \pm 0,00*
Controle (acetona)	0,00 \pm 0,00*	1,25 \pm 1,25 b	2,50 \pm 1,44 b	2,50 \pm 1,44	2,50 \pm 1,44
Controle (água deionizada)	0,00 \pm 0,00*	1,25 \pm 1,25 b	1,25 \pm 1,25 b	1,25 \pm 1,25	1,25 \pm 1,25
		$F_{2,9} = 24,99; p < 0,0001$	$F_{2,9} = 74,387 p < 0,0001$	$F_{2,9} = 118,61 p < 0,0001$	$F_{0,4081}^{ns} = 74,387 p < 0,0001$

¹ Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial seguido por teste *post hoc* de Tukey, <0,05);

* Não incluído na análise (variância nula);

^{ns} = não significativo.

Tabela 8. Mortalidade (%) e peso de lagartas de *Helicoverpa armigera* após sete dias de exposição em tomate tratado em casa de vegetação.

Tratamentos	Concentração utilizada (mg L ⁻¹)	Mortalidade (%) ¹	E.C. ²	Peso das lagartas sobreviventes (mg)*
ESAM ³	1479,0	95,00±2,23 a	94,68	0,4875 (5)
Anosom [®] 1 EC	1151,0	93,00±2,60 a	94,16	0,82 (7)
Flubendiamida	416,7	100,00±0,00*	100,00	--
Controle (água deionizada)		4,44±1,75 b	--	5,14±0,05
Controle (metanol:água, 1:10 (v/v) + Tween 80 [®] , 0,5%)		6,00±2,21 b	--	5,01±0,15

$F_{3,36} = 113,25; p < 0,0001$

¹ Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$);

² E.C.: Eficácia de controle calculada pela fórmula de Abbott (1925)

* Dados não analisados devido a pequena unidade amostral. O valor entre parêntesis representa o número de lagartas sobreviventes nos referidos tratamentos.

³ ESAM : Extrato etanólico proveniente de sementes de *A. mucosa*.

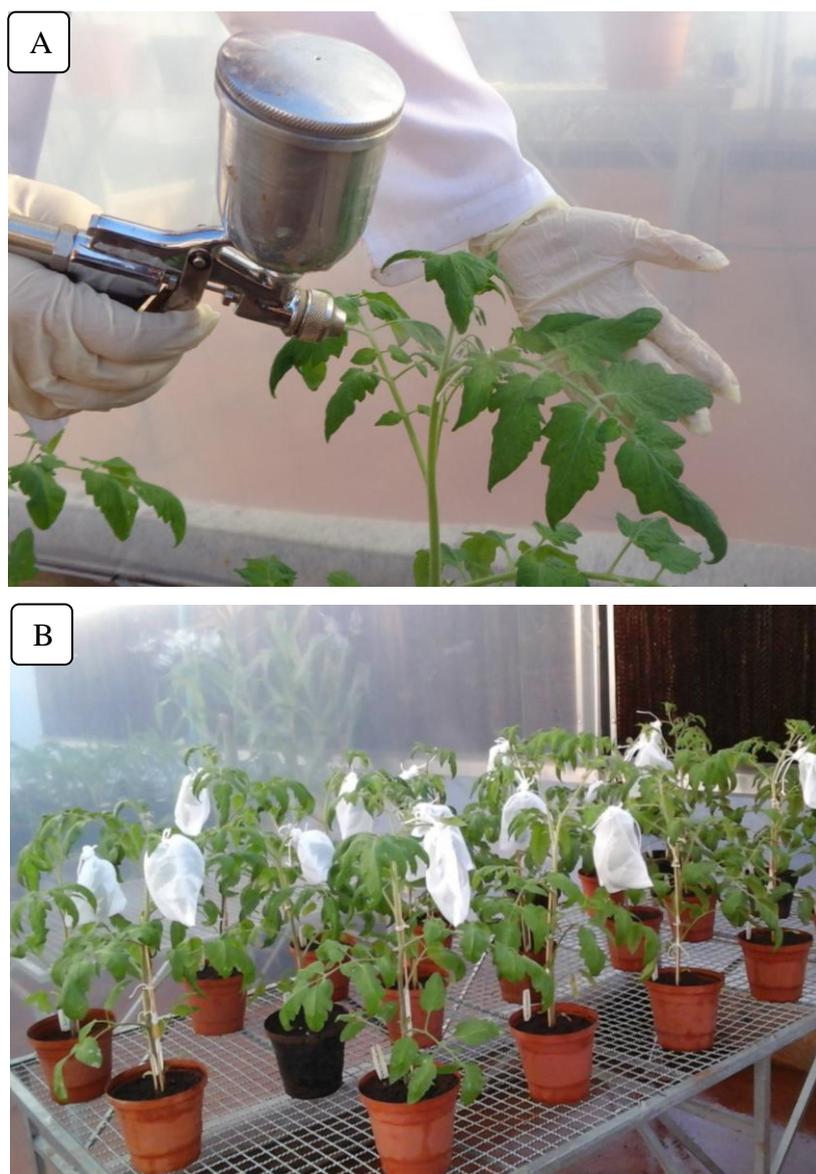


Fig. 1. Detalhes do bioensaio em casa de vegetação. A – Momento de pulverização de folíolos de tomateiro com os tratamentos; B – Condução do bioensaio.

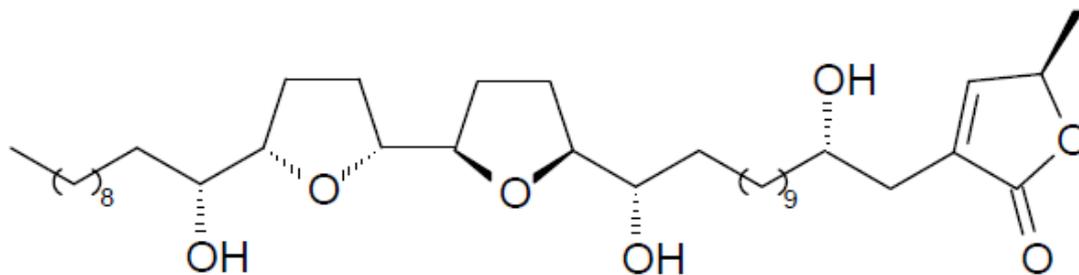


Fig. 2. Estrutura química da acetogenina bis-tetrahydrofurano roliniastatina-1, composto majoritário no extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa*.

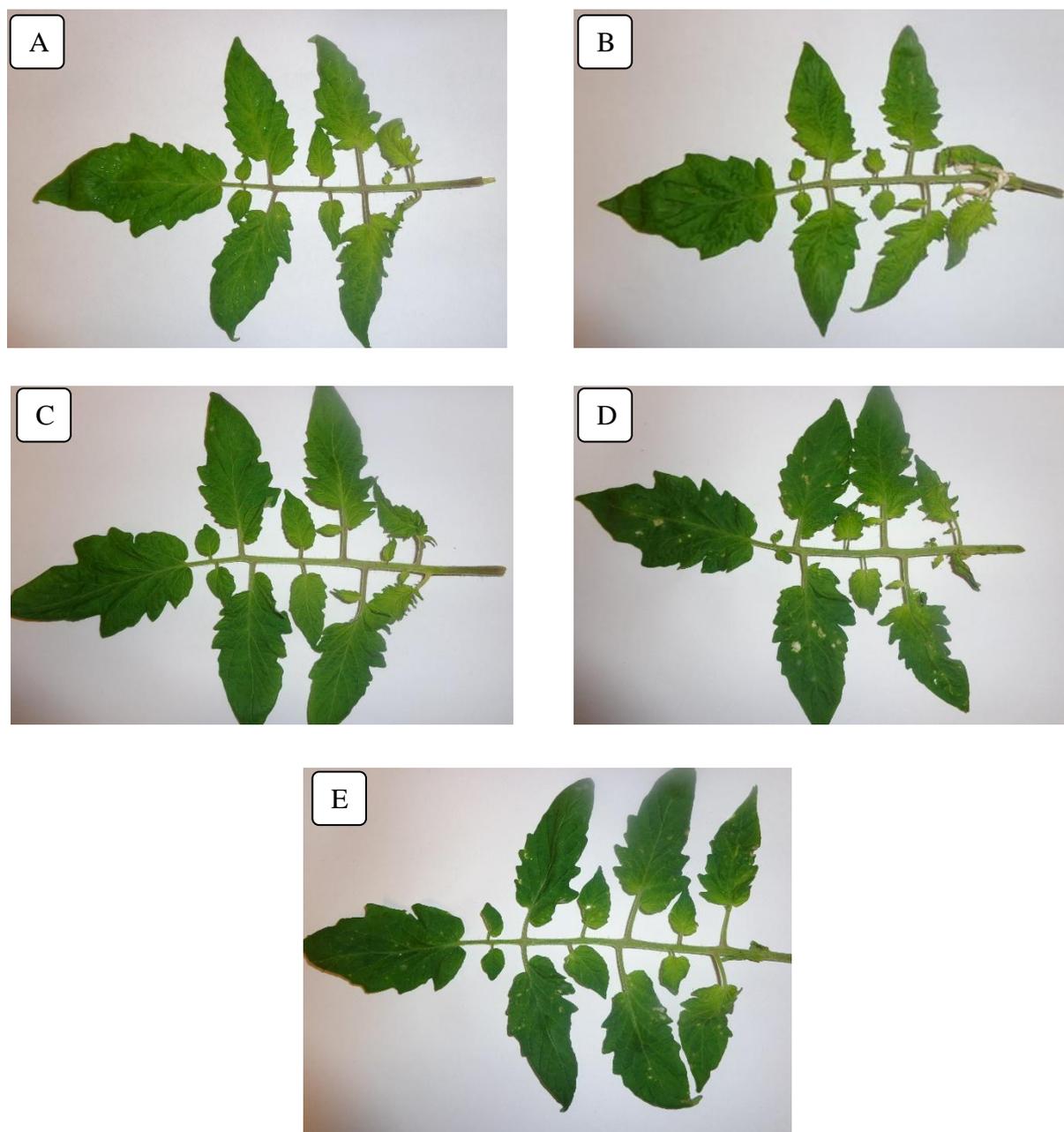


Fig. 3. Bioatividade comparada do extrato etanólico proveniente de sementes *Annona mucosa* com inseticidas comerciais em casa de vegetação. A – Extrato etanólico proveniente de sementes de *Annona mucosa* ; B – Anosom®; C – Belt® 48 SC ; D – Controle (Tween 80 + solvente); E – Controle (Água)

CAPÍTULO II - Efeitos do extrato etanólico de *Annona mucosa* (Magnoliales: Annonaceae) e do inseticida botânico Anosom[®] 1 EC no comportamento alimentar e aspectos biológicos de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) em dieta artificial

Revista: Pesquisa Agropecuária Brasileira

Efeitos do extrato etanólico de *Annona mucosa* (Magnoliales: Annonaceae) e do inseticida botânico Anosom[®] 1 EC no comportamento alimentar e aspectos biológicos de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) em dieta artificial

Resumo – *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga de grande importância agrícola mundial, principalmente devido a hábito polífago e por atacar tanto estruturas reprodutivas quanto vegetativas de plantas cultivadas. O inseto foi recentemente registrado no Brasil e até o presente momento o principal método de controle utilizado é o químico, o qual muitas vezes é empregado de maneira indiscriminada, ocasionando danos ao meio ambiente. O uso de derivados botânicos pode ser uma valiosa ferramenta no manejo de insetos-praga, uma vez que são provenientes de recursos renováveis, além de possuírem mais de um ingrediente ativo, podendo ser produzidos com matéria prima local. Dentre os grupos botânicos com bioatividade reconhecida sobre insetos se destaca a família Annonaceae, cujos derivados vêm se destacando no controle de importantes pragas agrícolas. No presente estudo, avaliou-se o efeito do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* L. e do inseticida comercial botânico Anosom[®] 1 EC na CL₅₀ (411,55 e 312,08 mg kg⁻¹ respectivamente) sobre a comportamento alimentar e parâmetros biológicos de *H. armigera* em dieta artificial. Constatou-se alteração no comportamento alimentar de lagartas de quarto ínstar de *H. armigera* expostas a dieta artificial contendo Anosom[®] 1 EC e extrato etanólico de *A. mucosa*, com significativa redução no consumo após 48 horas de exposição. Ambos os tratamentos prolongaram a fase larval (acrécimo de seis dias em dieta tratada com Anosom[®] 1 EC e sete dias em dieta tratada com extrato etanólico de *A. mucosa*). Também foi verificada reduções nas viabilidades larval (25,00 % para o Anosom[®] 1 EC e 23,00 % para *A. mucosa*) e pupal (34,44 % para Anosom[®] 1 EC e 24,99 % para *A. mucosa*) assim como no peso médio de pupas (redução de aproximadamente 69,31 % para o Anosom[®] 1 EC e 70,80 % para *A. mucosa*). Os resultados obtidos neste estudo indicaram que o extrato etanólico de *A. mucosa* apresenta bom potencial no controle alternativo de *H. armigera*, podendo ser inserido como estratégia eficiente em programas de manejo integrado do inseto, principalmente em cultivos protegidos.

Palavras chave: Aleloquímico, inseticidas botânicos, controle alternativo, noctuídeo

Effect of ethanolic extract from *Annona mucosa* (Magnoliales: Annonaceae) and acetogenin-based insecticide Anosom[®] 1 EC on development and feeding behavior of *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae)

Abstract - *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) is a serious agricultural pest worldwide, mainly to the polyphagous habit and feed on both vegetative and reproductive structures of several crops. This pest was recently reported in Brazil and to date chemical control is the most used method. However, it is known that the abusive use of this method has occasioned environment damage. The use of botanic derivatives can be a valuable tool for the management of pests, because the botanic derivatives come from renewable resources, in addition to carry more than one active compound and can be produced with local resources. Among tropical botanical families, Annonaceae has shown great potential as a source of biopesticides. In this study, the bioactivity of ethanolic extracts from seeds of *Annona mucosa* L. and acetogenin-based commercial bioinsecticide Anosom[®] 1 EC at LC₅₀ (411.55 and 312.08 mg kg⁻¹, respectively) were evaluated against *H. armigera* for antifeedant effect and growth inhibitory effects, using dietary exposure bioassays. Antifeedant effect was verified for 4th-instar *H. armigera* larvae after exposure to Anosom[®] 1 EC and *A. mucosa*-treated diets, with significant consume reduction after a 48-hour exposition. Both treatments prolonged the larval phase duration (six days for Anosom[®] 1 EC -treated diet and seven days for *A. mucosa*-treated diet). The larval (25.00% for Anosom[®] 1 EC and 23.00% for *A. mucosa*) and pupal (34.44% for Anosom[®] 1 EC and 24.99% for *A. mucosa*) viabilities decreased significantly, as well as the pupal weight (69.31% for Anosom[®] 1 EC and 70.80% for *A. mucosa*). The results obtained with this study indicated that the ethanolic extract from *A. mucosa* presents a good potential for alternative control of *H. armigera*. This botanical derivative may be a useful component for the integrated management programs of this pest, in particular under greenhouse conditions.

Keywords: Allelochemical, botanical insecticide, alternative control, noctuid.

Introdução

Helicoverpa armigera (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga que se destaca por seu hábito polífago (Fitt, 1989) e também por atacar órgãos reprodutivos e vegetativos de plantas cultivadas (Lammers & Macleod, 2007). A primeira ocorrência no

Brasil, bem como no continente americano, foi registrada na safra de 2012/2013, neste período em que foram relatados prejuízos da ordem de R\$ 140,00 ha⁻¹ na produção, além dos gastos com aplicações extras de defensivos. Atualmente, o principal método de controle utilizado para o inseto-praga é a aplicação de produtos químicos (Czepak et al., 2013). No entanto, além dos riscos ambientais associados à esta prática, o inseto é reconhecido pela rápida seleção de indivíduos resistentes a diversos ingredientes ativos (piretróides, carbamatos, organofosforados, organoclorados e Bt) utilizados em todo o mundo (Aheer et al., 2009; Zhang et al., 2013; Jouben et al., 2011; Yang et al., 2013), o que me motiva estudos com métodos alternativos de controle. Neste sentido, o uso de derivados botânicos tem sido apontado com uma ferramenta importante no equilíbrio do meio ambiente e a saúde humana (Isman, 2006).

Segundo a teoria da coevolução proposta Ehrlich e Raven em 1964 insetos herbívoros e angiospermas interagem entre si, devido às evoluções químicas ao longo da história do planeta. Interações temporais poderiam ser responsáveis pelos padrões reconhecidos em que plantas relacionadas filogeneticamente apresentam metabólitos secundários semelhantes e insetos filogeneticamente próximos escolhem hospedeiros similares (Cornell & Hawkins, 2003). Estudos mostram que estes compostos podem ocasionar diferentes efeitos sobre os insetos, tais como repelência, deterrência, alterações no sistema hormonal e mortalidade em diferentes fases (Klocke et al., 1991; Wrba et al., 1992; Ahn et al., 1998). Os inseticidas botânicos são baseados nos metabólitos secundários que as plantas geram como parte de sua defesa constitutiva, os quais estão compreendidos em quatro grupos principais de substâncias: compostos nitrogenados, compostos fenólicos, terpenóides e poliacetatos (Miresmailli & Isman, 2013).

O uso de derivados vegetais como ferramenta no manejo de insetos-praga vem aumentando devido aos problemas que os inseticidas sintéticos vêm apresentando à sociedade e ao meio ambiente (Castillo-Sánchez et al., 2010), assim como a maior conscientização do consumidor e aumento do sistema de cultivo orgânico bem como outros sistemas de baixo custo (Willer & Kilcher, 2009). Além disso, os derivados vegetais podem representar uma importante ferramenta de manejo aos pequenos e médios produtores, através da preparação caseira a partir de espécies locais muitas vezes disponíveis para uso direto da propriedade (Vendramim & Castiglioni, 2000).

Dentre os grupos botânicos com potencial inseticida destaca-se a família Annonaceae (Chang et al., 1998; Kotkar et al., 2002; Ribeiro et al., 2013). Isman et al. (2006) relatam a família Annonaceae como promissora fonte de inseticidas botânicos, principalmente os

provenientes de extratos de sementes de *Annona*, em países tropicais onde as frutas são comumente consumidas e utilizadas para produção de polpa. Pesquisas recentes demonstram a eficiência da família Annonaceae sobre diferentes espécies-praga de importância agrícola, tais como: *Plutela xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) (Leatemia et al., 2004; Trindade et al., 2006), *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) (Ribeiro et al., 2014a), *Panonychus citri* (Mc Gregor) (Acari: Tetranychidae) (Ribeiro et al., 2014b), *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (Tolosa et al., 2014; Blessing et al., 2010; Ansante et al., 2015), *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (Ribeiro et al., 2015) e sobre os carunchos *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) (Ribeiro et al., 2013; Ribeiro et al., 2014c) e *Zabrotes subfasciatus* Bohemann (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) (Gonçalves et al., 2015).

Considerando-se a importância crescente de *H. armigera* no cenário agrícola nacional, aliada ao aumento na demanda por produtos sem resíduos químicos e a ocorrência cada vez mais frequente de insetos resistentes a inseticidas sintéticos (Konkala et al., 2012), pesquisas com derivados botânicos tornam-se necessárias e podem gerar ferramentas de manejo menos agressivas ao meio ambiente, mais seletivas, que retardem ou evitem a seleção de insetos resistentes e com menor teor de resíduos nos alimentos (Krinski et al., 2014). Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a bioatividade do extrato etanólico proveniente de sementes de *A. mucosa* e do produto comercial à base de acetogeninas Anosom[®] 1 EC sobre lagartas de *H. armigera*, através de ensaios de comportamento alimentar e desempenho biológico em dieta artificial.

Material e Métodos

Exsicata das sementes de *A. mucosa*, encontram-se depositadas no Herbário E.S.A. do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP, Brasil. A espécie foi previamente identificadas pelo Prof. Dr. Renato Mello-Silva [Departamento de Botânica, Instituto de Biosciências/Universidade de São Paulo (IB/USP)], Para preparação do extrato, as sementes obtidas de frutos maduros foram desidratadas em uma estufa com circulação de ar forçada a 40 °C por um período de 48 a 72 horas. Feito isso, as sementes secas foram moídas em um moinho de facas para obtenção de pó fino, os quais foram armazenados em vidros herméticos e mantidos em freezer doméstico (~ -10 °C) até sua utilização.

O extrato orgânico foi obtido por maceração em solvente etanol (na proporção de 5:1, p/v). Para isso, o pó vegetal foi mantido em repouso com o solvente em um frasco hermeticamente vedado por um período de três dias, sendo após isso filtrado através de papel filtro. A torta restante foi ressuspensa no solvente etanol, repetindo-se todo o processo por três vezes. O solvente remanescente na solução filtrada foi eliminado em rotaevaporador a 50 °C e à pressão de -600 mmHg. Após a completa evaporação do solvente em câmara com fluxo de ar, foi determinado o rendimento da extração para espécie estudada.

A criação de *H. armigera* foi iniciada a partir da coleta de indivíduos adultos em lavouras de soja e milho no Estado de São Paulo. A confirmação da espécie foi feita pelo Dr. Alexandre Specht (Embrapa Cerrados, Brasília) por meio de aspectos morfológicos e moleculares com base no protocolo de Specht et al. (2013). Os insetos foram mantidos em sala climatizada ($T = 25 \pm 2$ °C; U.R. = $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas), sendo as lagartas mantidas em dieta artificial (Greene et al., 1976). Para os adultos foram oferecidas porções de algodão umedecidas em solução de água + mel a 10% (p/v). Maiores informações sobre a criação de *H. armigera* podem ser obtidos nos trabalhos de Kao (1995) e Jah et al. (2012).

Para incorporação do extrato de *A. mucosa* em dieta artificial, o mesmo foi solubilizado em solventes orgânicos [acetona:metanol, 1:1, v/v], na proporção de 5 mL de solvente para cada 300 g de dieta artificial, de acordo o método descrito por Ansante et al. (2015), enquanto que o produto comercial Anosom[®] 1 EC foi solubilizado em água, conforme recomendação do fabricante. Ambos os tratamentos foram incorporados a dieta artificial na dosagem subletal (CL_{50}) previamente estimada, sendo de 411,55 mg kg⁻¹ para o extrato etanólico de *A. mucosa* e de 312,08 mg kg⁻¹ para o Anosom[®] 1 EC.

No bioensaio de comportamento alimentar, a dieta artificial contendo os tratamentos e o controle foram depositados separadamente em caixas plásticas (11 x 11 x 3,5 cm). Após 24 horas, foram cortados pedaços da dieta nas dimensões de 1,5cm x 1,5 cm, os quais foram pesados e depositados em placas de Petri (9 cm de diâmetro x 2 cm de altura) contendo papel filtro umedecido ao fundo na sequência, cada placa foi infestada com uma lagarta de quarto í instar de *H. armigera*. Considerando-se a possível perda de água da dieta artificial, foi mantida uma alíquota de 10 pedaços inteiros que foram pesados no início e no final do experimento para ajuste de umidade. Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado, com 20 repetições por tratamento (n=20). Após 48 horas, os pedaços oferecidos às lagartas foram pesados e o consumo determinado pela diferença entre o peso inicial e o peso final.

A fim de avaliar a bioatividade dos tratamentos sobre parâmetros biológicos de *H. armigera*, as dietas artificiais com os tratamentos devidamente incorporados foram

depositadas em recipientes plásticos (22 cm x 14 cm) e após o resfriamento foram cortadas em cubos de aproximadamente 4 cm³ (aproximadamente 15 ml), sendo posteriormente depositados individualmente em recipientes plásticos (100 ml) com tampa. Cada recipiente foi infestado com uma lagarta neonata (até 24 horas de idade) de *H. armigera* sendo estas mantidas até a formação de pupa. As pupas foram acondicionadas em placas de Petri em poliestireno (96 mm Ø x 21 mm altura) onde permaneceram até a emergência do adulto. Adotou-se um delineamento inteiramente casualizado, efetuando-se 10 repetições por tratamento. Cada repetição foi constituída por 10 recipientes plásticos, totalizando 100 lagartas expostas por tratamento (n=100). Os parâmetros avaliados foram viabilidade e duração da fase larval e pupal, peso de pupa com 24 horas e porcentagem de pupas e adultos defeituosos.

Modelos lineares generalizados (Nelder & Wedderburn, 1972) foram utilizados para a análise das variáveis estudadas. A verificação da qualidade do ajuste foi feita por meio do gráfico meio-normal de probabilidades com envelope de simulação (Demétrio & Hinde, 1997; Hinde & Demétrio, 1998). Quando houve diferença significativa entre os tratamentos, múltiplas comparações (teste de Tukey, $p < 0,05$) foram realizadas por meio da função GLTH do pacote Multcomp com ajuste dos valores de p. Todas essas análises foram realizadas utilizando-se o software estatístico “R”, versão 2.15.1 (R Development Core Team, 2012).

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos neste estudo são inéditos para a espécie *H. armigera* e demonstraram que o extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* e o produto comercial à base de acetogeninas de anonácea (Anosom[®] 1 EC), quando testados em dosagens subletais (DL₅₀), interferem nos parâmetros biológicos do inseto. Quanto ao comportamento alimentar, verificou-se redução significativa no consumo larval pelo inseto após 48 horas de confinamento em dieta tratada com o extrato de *A. mucosa* (0,68 g) e com o Anosom[®] 1 EC (0,56 g), comparativamente aos dois controles (Tabela 1). Segundo Isman (2002), exposições acima de 24 horas a substratos contendo compostos bioativos levam a uma redução na alimentação do inseto devido à toxicidade pós-ingestão, que afeta a fisiologia e comportamento alimentar do mesmo. Em trabalho semelhante, Ansante (2014), não observou redução no consumo larval de *S. frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera Noctuidae) em meio artificial tratado com o extrato etanólico de *A. mucosa*. No entanto, as avaliações destes

autores foram realizadas após 24 horas de exposição, sugerindo que, com um tempo maior de confinamento, poderia ser verificada diferença de consumo entre os tratamentos.

Com relação aos parâmetros biológicos de *H. armigera*, foram observados efeitos adversos em insetos confinados a meio artificial tratado com extrato etanólico de *A. mucosa* e com Anosom[®] 1 EC (Tabela 2). Verificou-se aumento na duração da fase larval (acréscimo próximo a seis dias em meio artificial tratado com Anosom[®] 1 EC e sete dias em meio tratado com *A. mucosa*), em comparação aos controles. A viabilidade da fase imatura também foi significativamente comprometida nos tratamentos contendo o extrato (25,00 %) e o Anosom[®] 1 EC (23,00 %), enquanto que nos controles os índices ficaram ao redor de 70 %. Adicionalmente, foram verificadas expressivas diferenças de tamanho entre lagartas com 12 dias de idade provenientes de dietas tratadas e não tratadas (Figura 1). A partir desta figura é possível verificar o tamanho reduzido (duas a três vezes menor) nos insetos confinados ao meio contendo extrato de *A. mucosa* (A) e do produto Anosom[®] 1 EC (B), comparativamente aos controles (C e D). Trindade et al. (2006) avaliaram os efeitos subletais do extrato etanólico de folhas provenientes de *A. muricata* sobre lagartas de *P. xylostella* e reportaram um aumento de 2,6 dias na fase larval, além de redução na viabilidade larval. Com a lagarta *Spodoptera litura* Fabr. (Lepidoptera: Noctuidae), Leatemia et al. (2004) avaliaram a bioatividade do extrato etanólico de *A. squamosa* e verificaram redução pronunciada do peso larval nos dois primeiros ínstares, reduzindo significativamente no último ínstar. Embora no presente estudo as lagartas não tenham sido pesadas (visando evitar estresse), os indivíduos provenientes de meio tratado apresentaram peso inferior em relação aos oriundos dos controles (Figura 1).

Para o período pupal (Tabela 2), verificou-se tendência de prolongamento da fase nos meios tratados com produtos botânicos em relação aos controles. Já com relação à viabilidade pupal, os tratamentos à base de Anosom[®] 1 EC (24,99 %) e de extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* (34,44 %) reduziram expressivamente a emergência de adultos do inseto, sendo que nos tratamentos controle os índices foram aproximadamente três vezes superiores. Também foi observada uma redução significativa no peso de pupas (cerca de 70,00 %) nos tratamentos com Anosom[®] 1 EC e com extrato etanólico de *A. mucosa* em relação aos controles (Tabela 3). Não houve diferença significativa quanto à porcentagem de pupas defeituosas, embora os índices de deformidades sejam de duas a três vezes superiores nos insetos provenientes de meio tratado. Huang et al. (1996) e Carpinella et al. (2002) relacionam a redução do peso médio pupal com a redução na ingestão de alimentos, devido à presença de compostos inibidores presentes nos extratos.

Alguns estudos demonstram a atividade de derivados de Annonaceae na biologia de importantes insetos-praga. Ansante (2014), observaram o aumento de sete dias da fase larval de *S. frugiperda* em meio artificial tratado com o extrato etanólico de *A. mucosa* em uma CL_{50} de 842,90 mg kg⁻¹, onde constatou-se também uma significativa redução na viabilidade. No presente estudo, um retardo semelhante também foi verificado, porém, neste caso, a CL_{50} do extrato estimada para *H. armigera* foi de 411,55 mg kg⁻¹ (menor que 50 %), sugerindo maior sensibilidade deste lepidóptero comparativamente à lagarta-do-cartucho. Os mesmos autores também reportaram redução no peso pupal, além do surgimento de indivíduos defeituosos. Ainda com *S. frugiperda*, Freitas et al. (2004) observaram o efeito do extrato proveniente de folhas de *A. coriaceae* aplicado sobre folhas de milho e verificaram significativa redução na viabilidade da fase larval e redução no peso médio pupal. Ribeiro et al. (2014a) estudaram os efeitos de cinco extratos etanólicos de anonáceas comuns ao presente estudo (*A. montana*, *A. mucosa*, *A. muricata*, *A. sylvatica*) e do produto comercial Anosom[®] 1 EC sobre lagartas de *T. ni* (Lepidoptera: Noctuidae) e reportaram significativa mortalidade, além de pronunciada redução do peso larval em indivíduos confinados a meio artificial contendo extrato de *A. mucosa*, *A. sylvatica* e Anosom[®] 1 EC.

Efeitos de acetogeninas isoladas de Annonaceae incorporadas à dieta artificial de lepidópteros-praga também já foram reportados na literatura. Colom et al. (2007) avaliaram a bioatividade de cinco acetogeninas provenientes de sementes de *A. cherimolia* Miller, as quais foram incorporadas (50µg/g) à dieta artificial de *S. frugiperda* e reportaram mortalidade pupal superior a 80 %, além de má formação nos adultos. Blessing et al. (2010) avaliaram a toxicidade de seis acetogeninas isoladas de *A. montana* sobre este mesmo inseto (100µg/g) e verificaram aumento na mortalidade e duração da fase jovem e pupal, bem como ocorrência de deformidades.

Conforme descrito na literatura, os principais compostos com atividade inseticida presentes em espécies de anonáceas são as acetogeninas, geralmente presentes em partes vegetativas e reprodutivas (principalmente sementes) das plantas (Bermejo et al., 2005; Castillo-Sánchez et al., 2010). O isolamento das acetogeninas de anonáceas ocorreu na década de 1980 e desde então vem estimulando os estudos de bioatividade com as espécies desta família (Ruprecht et al., 1990). Dentre as atividades já descritas sobre organismos, destacam-se: antimicrobiana, antitumoral, citotóxica e inseticida (Cavé et al., 1997), com destaque para esta última e que vem atraindo a atenção de entomologistas do mundo todo (Ocampo & Ocampo, 2006).

Considerando-se a importância crescente de *H. armigera* para a agricultura brasileira e das limitações envolvendo a aplicação de inseticidas sintéticos, o uso de derivados botânicos com bioatividade comprovada como o extrato de *A. mucosa* pode representar uma valiosa ferramenta a ser incorporada nos programas de manejo integrado de pragas (MIP) deste inseto, especialmente para cultivos orgânicos e/ou cultivos protegidos. Adicionalmente, trata-se de um produto de fácil obtenção (maceração em etanol), com custo baixo e de rápida degradação, reduzindo o impacto ambiental no agroecossistema.

Conclusões

O extrato etanólico proveniente de sementes de *A. mucosa* assim como o Anosom[®] 1 EC quando testados em dosagem subletal (CL₅₀) afetam o comportamento alimentar e os parâmetros biológicos de *H. armigera*, apresentando-se assim como ferramentas promissoras para o manejo desse inseto-praga no Brasil.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Referências

- AHEER, G.M., SHAH, Z. and Saeed, M. seasonal history and biology of cotton mealy bug, *Phenacoccus solenopsis* Tinsley. **Journal of Agricultural Research**. v.47, p.4, 2009.
- AHN, Y.J.; LEE, S.B.; LEE, H.S.; KIM, G.H. Insecticidal and acaricidal activity of carvacrol and beta-thujaplicine derived from *Thujopsis dolabrata* var. *hondai* sawdust. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, p.81-90, 1998.
- ANSANTE, T.F.; RIBEIRO, L.P.; BICALHO, K.U.; FERNANDES, J.B.; 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.

ANSANTE, T.F. **Metabólitos secundários de Annonaceae: triagem, fracionamento biomonitorado e bioatividade frente a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2014. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciências/Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba/SP, 2014.

BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M.C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**, v. 22, p.269-303, 2005.

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, n. 3, p.307-310, 2010.

CARPINELLA, C.; FERRAYOLI C.; VALLADARES G.; DEFAGO M.; PALACIOS S. Potent limonoid insect antifeedant from *Melia azedarach*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 8, p.1731-1736, 2002.

CASTILLO-SÁNCHEZ, L.E.; JIMÉNEZ, J.J.; DELGADO, M.A. Secondary metabolites of the Annonaceae, Solanaceae and Meliaceae families used as biological control of insects. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 12, p.445-462, 2010.

CAVÉ, A.; FIGADÈRE, B.; LAURENS, A.; CORTES, D. 1997. Acetogenins from annonaceae. In: CAVÉ, A.; CORTES, D.; FIGADÈRE, B.; LAURENS, A.; PETTIT, GR. Progress in the chemistry of organic natural products. New York: **Springer**-Wien, p. 81-289, 1997.

CHANG, F.R.; YANG, P.Y.; LIN, J.Y.; LEE, K.H.; WU, Y.C. Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 437-439, 1998.

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.

CORNELL, H.V.; HAWKINS, B.A. A test of phytochemical coevolution theory. **The American Naturalist**, Chicago, v. 161, p. 507-522, 2003.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K.C.; VIVAN, L.M.; GUIMARÃES, H.O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, p.110-113, 2013.

DEMÉTRIO, C.G.B.; HINDE, J. Half-normal plots and overdispersion. **Glim Newsletter**, Oxford, v. 27, p. 19-26, 1997.

EHRlich, P.R.; RAVEN, P.H. Butterflies and plants: a study in coevolution. **Evolution**, p. 586-608, 1964.

FITT, G.P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, v. 34, p.17-53, 1989.

FREITAS, A.F.; PEREIRA, F.F.; FORMAGIO, A.S.N.; LUCCHETTA, J.T.; VIEIRA, M.C.; MUSSURY, R.M. Effects of methanolic extracts of *Annona* species on the development and reproduction of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v. 43, p.446-452, 2014.

GONÇALVES, G.L.P.; RIBEIRO, L.D.P.; GIMENES, L.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.D.G.F.D.; FORIM, M.R.; ... VENDRAMIM, J.D. Lethal and sublethal toxicities of *Annona sylvatica* (Magnoliales: Annonaceae) extracts to *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). **Florida Entomologist**, v. 98, p.921-928, 2015.

GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvet bean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 69, p. 487-488, 1976.

HINDE, J.; DEMÉTRIO, C.G.B. Overdispersion: models and estimation. **Computational Statistics & Data Analysis**, Amsterdam, v. 27, p.151-170, 1998.

HUANG, R.C.; TADERA K.; YAGI F.; MINAMI Y.; OKAMURA H.; IWAGAWA T.; NAKATANI M. Limonoids from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, v. 43, p.581-583, 1996.

ISMAN, M.B. Insect antifeedants. *Pesticide outlook*, v. 13, n. 4, p. 152-157, 2002

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.

JAH, R K.; CHI, H; TANG, Li-Cheng. A comparison of artificial diet and hybrid sweet corn for the rearing of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) based on life table characteristics. **Environmental Entomology**, v. 41, p.30-39, 2012.

JOUBEN, N., AGNOLET, S., LORENZ, S., SCHÖNE, S.E., ELLINGER, R., SCHNEIDER, B. AND HECKEL, D.G., 2012. Resistance of Australian *Helicoverpa armigera* to fenvalerate is due to the chimeric P450 enzyme CYP337B3. **Proceedings of the National Academy of Sciences.**, v. 109, p.15206-15211.

KAO, S. S. Mass rearing of insects. **Bulletin of Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute (TACTRI)**, v. 37, p.1-8, 1995.

KLOCKE, J.A.; HU, M.; CHIU, S.F.; KUBO, I. Grayanoid diterpene insect antifeedants and insecticides from *Rhododendron molle*. **Phytochemistry**, v. 30, p.1797-1800, 1991.

KONKALA, A.; SABITA RAJA, S.; KAUR, Amarjit. Insect growth regulating activity of the phytochemical (+)-O-methylarmepavine, against the stored pulse pest *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Pharmacy and Biological Science**, v. 2, p. 25-29, 2012.

KOTKAR, H.M.; MENDKI, P.S.; SADAN, S.V.; JHA, S.R.; UPASANI, S.M.; MAHESHWARI, V.L. Antimicrobial and pesticidal activity of partially purified flavonoids of *Annona squamosa*. **Pest Management Science**, v. 58, p.33-37, 2002.

KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. Insecticidal potential of the Annonaceae family plants. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p.225-242, 2014.

LAMMERS, J.W.; MACLEOD, A. Report of a pest risk analysis: *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808). 2007. Disponível em: <<http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/helicoverpa.pdf>>. Acesso em: 10 maio. 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.

MIRESMAILLI, S.; ISMAN, M.B. Botanical insecticides inspired by plant–herbivore chemical interactions. **Trends in Plant Science**, v. 19, p.29-35, 2014.

NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 135, p.370–384, 1972.

OCAMPO, D.; OCAMPO, R. Bioactividad de la familia Annonaceae. **Revista Universidad de Caldas**, p. 135-155, 2006.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2012.

RIBEIRO, L.P.; VENDRAMIM, J.D.; BICALHO, K.U. *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.; 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, 2014a.

RIBEIRO, L.P.; VENDRAMIM, J.D.; ANDRADE, M.S.; BICALHO, K.U.; SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B. Tropical plant extracts as sources of grain-protectant compounds against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v. 43, p. 470-482, 2014c.

RIBEIRO, L.P.; ZANARDI, O.Z.; VENDRAMIM, J.D.; YAMAMOTO, P.T. Comparative toxicity of an acetogenin-based extract and commercial pesticides against citrus red mite. **Experimental and Applied Acarology**, v. 64, p. 87-98, 2014b.

RIBEIRO, L.D.P.; SANTOS, M.S.; GONÇALVES, G.L.P.; VENDRAMIM, J.D. Toxicity of an acetogenin-based bioinsecticide against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and its parasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). **Florida Entomologist**, v. 98, p. 835-842, 2015.

RUPPRECHT, J. K.; HUI, Yu-Hua; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: a review. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 237-278, 1990.

SPECHT, A.; GOMEZ, D. R. S.; PAULAMORAES, S. V. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, p. 689-692. 2013.

TOLOSA, D.; HIDALGO, J.R.; SAL, P.E.; POPICH, S.; BARDÓN, A.; NESKE, A. Insecticidal effects of the annonaceous acetogenin squamocin and the acetogenin fraction of seeds of *Rollinia occidentalis* on Soybean and Corn pests. **Journal of Agricultural Chemistry and Environment**, v. 3, p. 156, 2014.

TRINDADE, R.C.P.; LUNA J.S.; LIMA M.R.F; SILVA P.P, SANT'ANA A.E.G. Actividad larvicida y variacion estacional del extracto de *Annona muricata* en *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 37, p. 223-228, 2006.

VENDRAMIM, J.D., CASTIGLIONI, E. Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas. In: GUEDES, J.C., COSTA, I.D., CASTIGLIONI, E. (Eds.), **Bases e técnicas do manejo de insetos**. Pallotti, Santa Maria, p. 113-128, 2000.

ZHANG, H., YIN, W., ZHAO, J., JIN, L., YANG, Y., WU, S., TABASHNIK, B.E. AND WU, Y. Early warning of cotton bollworm resistance associated with intensive planting of Bt cotton in China. **PLoS one**, v.6, p.22874-22874, 2011.

WILLER, H., KILCHER, L. **The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends.** IFOAM, Bonn, Germany, 2009.

WRBA, H.; ELMOFTY, M.M.; SCHWAIREB, M.H.; DUTTER. A. Carcinogenicity testing of some constituents of Black Pepper (*Piper nigrum*). **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 44, p.61-65, 1992.

YANG, Y., LI, Y. AND WU, Y. Current status of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* after 15 years of Bt cotton planting in China. **Journal of Economic Entomology**, v.106, p.375-381, 2013.

Tabela 1. Médias (\pm EP) de consumo (g) realizado por lagartas de quarto ínstar de *Helicoverpa armigera* em dieta artificial tratada, após 48 h de exposição em teste sem chance de escolha. Temp.: $25\pm 2^\circ\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; Fotofase: 14 h.

Tratamentos	Dieta consumida (g) ¹
ESAM ²	0,68 \pm 0,04 b
Anosom	0,56 \pm 0,04 b
Controle (água)	0,97 \pm 0,06 a
Controle (solvente)	0,94 \pm 0,07 a
F	15,038
g.l.	3, 76
Valor de <i>p</i>	<0,0001

¹Diferença não significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana, $p < 0,05$).

²ESAM : Extrato etanólico proveniente de sementes de *A. mucosa*.

Tabela 2. Médias (\pm EP) da viabilidade e duração das fases larval e pupal de *Helicoverpa armigera* mantida em dieta artificial tratada. Temp.: $25\pm 2^\circ\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; Fotofase: 14 h.

Tratamentos	Fase larval		Fase pupal	
	Duração (dias) ²	Viabilidade (%) ¹	Duração (dias) ²	Viabilidade (%) ¹
ESAM ³	27,65 \pm 0,30 a	25,00 \pm 5,43 b	13,30 \pm 0,41(9)**	34,44 \pm 13,85 b
Anosom	26,47 \pm 0,26 b	23,00 \pm 5,17 b	12,83 \pm 0,44 (4)**	24,99 \pm 13,73 b
Controle (água)	20,35 \pm 0,09 c	69,00 \pm 4,58 a	11,88 \pm 0,15	89,86 \pm 4,53 a
Controle (solvente)	20,86 \pm 0,15 c	71,00 \pm 5,67 a	11,69 \pm 0,17	86,55 \pm 5,14 a
F	387,65	20,983	0,71	13,329
g.l.	3, 36	3, 36	1, 18	3, 33
Valor de <i>p</i>	<0,0001	<0,0001	0,4105	<0,0001

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p<0,05$);

²Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição Gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p<0,05$);

³ESAM : Extrato etanólico proveniente de sementes de *A. mucosa*.

** Tratamento não incluído na análise devido a pequena unidade amostral. O valor entre parêntesis indica o número de pupas sobreviventes.

Tabela 3. Médias (\pm EP) de peso pupal e porcentagens de pupas e adultos defeituosos de *Helicoverpa armigera* após o confinamento em dieta artificial tratada. Temp.: $25\pm 2^\circ\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; Fotofase: 14 h.

Tratamento	Peso de pupas (mg) ¹	Pupas defeituosas (%) ²
ESAM ⁴	265,84 \pm 9,62 b	13,33 \pm 7,26
Anosom	271,54 \pm 9,68 b	14,37 \pm 7,40
Controle (água)	380,83 \pm 4,00 a	4,58 \pm 2,50
Controle (solvente)	383,53 \pm 3,61 a	6,98 \pm 3,83
F	118,02	1,2801
g.l.	3, 36	3, 33
Valor de <i>p</i>	<0,0001	0,2974

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição Gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$);

²Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$);

³Não analisado (variância nula).

⁴ESAM : Extrato etanólico proveniente de sementes de *A. mucosa*.



Figura 1. Desenvolvimento comparativo entre lagartas de *Helicoverpa armigera* com doze dias de idade, provenientes de dietas contendo diferentes tratamentos. A – Extrato etanólico proveniente de sementes de *Annona mucosa*; B – Anosom[®] 1 EC; C – Solvente; D – Testemunha.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato etanólico proveniente de sementes de *A. mucosa* assim como o inseticida comercial a base de acetogeninas de Annonaceae Anosom[®] 1 EC apresentaram promissora bioatividade sobre *H. armigera*, onde foram observados efeito agudo quando testados em maiores concentrações e efeitos crônicos quando testados em concentrações menores (subletais), apresentando eficiência similar ao inseticida comercial sintético a base de flubendiamida (Belt[®] 48 SC). Estes resultados são inéditos para a espécie *H. armigera*, uma praga nova e com importância crescente no cenário agrícola brasileiro. Face à facilidade de acesso e produção (solubilização em etanol) do extrato etanólico de *A. mucosa*, o uso deste derivado botânico mostra-se compatível com as demais práticas adotadas nos programas de manejo integrado de pragas.

5. CONCLUSÕES

- Dentre as cinco espécies de *Annona* avaliadas, o extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* apresenta maior atividade sobre formas imaturas de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae);
- O extrato etanólico de *A. mucosa* e o inseticida comercial à base de acetogeninas Anosom[®] 1 EC apresentam elevado potencial inseticida sobre insetos;
- A acetogenina bis-tetrahydrofurano roliniastatina-1 é o composto majoritário presente no extrato etanólico de sementes de *A. mucosa*, este composto apresenta efeito inseticida sobre lagartas de *H. armigera*;
- O extrato etanólico de *A. mucosa* assim como o produto Anosom[®] 1 EC apresentam eficiência similar do inseticida comercial sintético a base de flubendiamida (Belt[®] 48 SC) sobre lagartas de *H. armigera* em plantas de tomateiro;
- Em doses subletais (CL₅₀), o extrato etanólico de *A. mucosa* e o Anosom[®] 1 EC afetam negativamente o comportamento alimentar e o desempenho biológico do inseto.

6. REFERÊNCIAS

AKASHE, V.; MEHTRE, S.; KOLI, B.; VEER, D. Biology of *Helicoverpa armigera* (Hb.) on safflower. The P.K.V. **Research Journal**, v. 21, p. 230-231, 1997.

ALALI, F.Q.; LIU, X.-X.; McLAUGHLIN, J.L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 504-40, 1999.

ALI, A., CHOUDHURY, R. A., AHMAD, Z., RAHMAN, F., KHAN, F. R., & AHMAD, S. K. (2009). Some biological characteristics of *Helicoverpa armigera* on chickpea. **Tunisian Journal of Plant Protection**, 4(1), 99-106.

ANSANTE, T.F., RIBEIRO, L.P., BICALHO, K.U., FERNANDES, J.B., 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.

ARNÓ, J.; GABARRA, R.; ROIG, J.; FOSCH, T. Integrated pest management for processing tomatoes in the Ebro Delta (Spain). **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 487, n. 1, p. 207-212, 1999.

ATWAL, A. S.; DHALIWAL, G. S. **Agricultural pests of South Asia and their management** (4th edition). Ludhiana: Kalyani publishers, p. 498, 2002.

ÁVILA, C. J.; VIVAN, L. M.; TOMQUELSKI, G. V. Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas. **Dourados: Embrapa**, 2013.

BASKAR, K., KINGSLEY, S., VENDAN, S.E., PAULRAJ, M.G., DURAI PANDIYAN, V. AND IGNACIMUTHU, S. Antifeedant, larvicidal and pupicidal activities of *Atalantia monophylla* (L) Correa against *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). **Chemosphere**, v. 75, n.3, p.355-359. 2009.

BASKAR, K.; IGNACIMUTHU, S. Antifeedant, larvicidal and growth inhibitory effects of ononitol monohydrate isolated from *Cassia tora* L. against *Helicoverpa armigera* (Hub.) and *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Chemosphere**, v. 88, n.4, p. 384-388. 2012.

BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M.C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**, London, v. 22, n. 2, p.269-303, 2005.

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, n. 3, p. 307-310, 2010.

BUENO, A. F.; SOSA-GÓMEZ, D. R. The old world bollworm in the Neotropical region: the experience of Brazilian growers with *Helicoverpa armigera*. **Outlooks on Pest Management**, v. 25, n. 4, p. 261-264, 2014.

BUENO, R. C. O. F.; YAMAMOTO, P. T.; CARVALHO, M. M.; BUENO, N. M. "Occurrence of *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) on citrus in the state of Sao Paulo, Brazil." *Revista Brasileira de Fruticultura* 36.2 520-523, 2014.

CABI. 2003. Crop protection compendium: global module. **Commonwealth Agricultural Bureau International**, Wallingford, UK.

CASTILLO-SÁNCHEZ, L. H. C.; JIMÉNEZ-OSORNIO, J. J.; DELGADO-HERRERA, M. A. Secondary metabolites of the Annonaceae, Solanaceae and Meliaceae families used as biological control of insects. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, Yucatán, v. 12, n.3, p.445-462, 2010.

CAVÉ, A.; FIGADÈRE, B.; LAURENS, A.; CORTES, D. 1997. Acetogenins from annonaceae. **Progress in the chemistry of organic natural products**. New York: Springer-Wien, p. 81-289, 1997.

CHATROU, L.W.; RAINER, H.; MAAS, P.J.M. Annonaceae (Soursop Family). In: SMITH, N. **Flowering plants of the Neotropics**, v. 25, n. 4, p. 18-20, 2004.

CLOYD, R. Natural indeed: Are natural insecticide safer and better then conventional insecticide? **Illinois Pesticide Review**, v. 17, p. 1-3, 2004.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K.C.; VIVAN, L.M.; GUIMARÃES, H.O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, p. 110-113, 2013.

D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6a, p. 995-1002, 2002.

EPPO, 2006. Distribution maps of Quarantine Pests. *Helicoverpa armigera*.

FITT, G. P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, v. 34, n. 1, p. 17-53, 1989.

FOWLER, G.; LAKIN, K. Risk Assessment: The Old Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner), (Lepidoptera: Noctuidae), USDA-APHIS, **Center for Plant Health Science and Technology** (Internal Report), Raleigh, NC, p. 1-19, 2001.

GONÇALVES, G.L.P. et al. Lethal and sublethal toxicities of *Annona sylvatica* (Magnoliales: Annonaceae) extracts to *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). **Florida Entomologist**, v. 98, n. 3, p. 921-928, 2015.

HARDWICK, D.F. The corn earworm complex. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v.40, p. 1-247, 1965.

JEYASANKAR A, PREMALATHA S, ELUMALAI K. Biological activities of *Solanum pseudocapsicum* (Solanaceae) against cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner and armyworm, *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, p. 981-6, 2012.

KING, A. B. S. *Heliothis/Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). In: MATTHEWS, G. A.; TUNSTALL J.P. [ed.], **Insect Pests of Cotton. CABI International**, Wallingford, p. 39-106, 1994.

KIILL, L.H.P.; COSTA, J.G. Biologia floral e sistema de reprodução de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) na região de Petrolina-PE. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 851-856, 2003.

KOUL, O., DANIEWSKI, W.M., MULTANI, J.S., GUMULKA, M. AND SINGH, G. Antifeedant effects of the limonoids from *Entandrophragma candolei* (Meliaceae) on the gram pod borer, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n 25, p. 7271-7275, 2003.

KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. Insecticidal potential of the Annonaceae family plants. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, SPE1, p 225-242, 2014.

KYI, A.; ZALUCKI, M. An experimental study of early stage survival of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton. **Bulletin of Entomological Research**, v. 81, p. 263-271, 1991.

LAMMERS, J. W.; MACLEOD, A. Report of a pest risk analysis: *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808). 2007. Disponível em: <<http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/helicoverpa.pdf>>. Acesso em: 10 maio. 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, n. 2, p. 129-133, 2004.

LIN, M. Y.; YUN-CHE, H. Insect and mite pests on tomato: identification and management. In SRINIVASAN, R. **Safer Tomato production techniques: A field guide for soil fertility and pest management**, AVRDC-WorldVegetableCenter Publication. Taiwan p. 23-61, 2010.

LIU, Z.; LI, D.; GONG, P.; WU, K. Life table studies of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), on different host plants. **Environmental Entomology**, v. 33, n. 6, p. 1570-1576, 2004.

MA, D.L., GORDH, G. AND ZALUCKI, M.P. Biological effects of azadirachtin on *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed on cotton and artificial diet. **Australian Journal of Entomology**, v. 39, n. 4, p 301-304, 2000.

MIRONIDIS, G. K.; KAPANTAIDAKI, D.; BENTILA, M.; MOROU, E.; SAVOPOULOU-SOULTANI, M.; VONTAS, J. Resurgence of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* in northern Greece associated with insecticide resistance. **Insect science**, v. 20, n. 4, p. 505-512, 2013.

MIKOLAJCZAK, K. L.; McLAUGHLIN, J. L.; RUPPRECHT, J. K. Control of pests with annonaceous acetogenins. **Washington: Secretary of Agriculture**, 1988. Patent number: 4.721.727, Jan. 26, 1988.

OCAMPO, D.; OCAMPO, R. Bioactividad de la familia Annonaceae. Revista **Universidad de Caldas**, p. 135-155, 2006.

PERRY AS, YAMAMOTO I, ISHAAYA I, PERRY RY. Insecticides in Agriculture and Environment: Retrospects and Prospects. Berlin: **Springer**, p, 261, 1998.

REED, W.; PAWAR, C . S. **Heliothis: a global problem**, p. 9- 14, 1982.

RIBEIRO, L.P.; VENDRAMIM, J.D.; BICALHO, K.U. *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.; 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, 2014a.

RIBEIRO, L.P.; VENDRAMIM, J.D.; ANDRADE, M.S.; BICALHO, K.U.; SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B. Tropical plant extracts as sources of grain-protectant compounds against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v. 43, n. 5, p. 470-482, 2014c.

RIBEIRO, L.P.; ZANARDI, O.Z.; VENDRAMIM, J.D.; YAMAMOTO, P.T. Comparative toxicity of an acetogenin-based extract and commercial pesticides against citrus red mite. **Experimental and Applied Acarology**, v. 64, n. 1, p. 87-98, 2014b.

RIBEIRO, L.D.P.; SANTOS, M.S.; GONÇALVES, G.L.P.; VENDRAMIM, J.D. Toxicity of an acetogenin-based bioinsecticide against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and its parasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). **Florida Entomologist**, v. 98, n. 3, p. 835-842, 2015.

RIJAL, J. P. Monitoring and management of *Helicoverpa armigera* (Hübner) with native isolates of insect pathogenic fungi. 2006. 129p. **Dissertação (Master of Sciences in Agriculture - Entomology)** - Tribhuvan University Institute of Agriculture and Animal Sciences, Rampur, Chitwan, Nepal, 2006.

RUPPRECHT, J. K.; HUI, Yu-Hua; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: a review. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 237-278, 1990.

SAITO, O. Flight activity changes of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), by aging and copulation as measured by flight actograph. **Applied Entomology and Zoology**, v. 35, p. 53-61, 1999.

SIMAS, N. K.; LIMA, E. C.; CONCEIÇÃO, S. R. et al. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 46-49, 2004.

TOLOSA, D.; HIDALGO, J.R.; SAL, P.E.; POPICH, S.; BARDÓN, A.; NESKE, A. Insecticidal effects of the annonaceous acetogenin squamocin and the acetogenin fraction of seeds of *Rollinia occidentalis* on soybean and corn pests. **Journal of Agricultural Chemistry and Environment**, v. 3, n. 04, p. 156, 2014.

TRINDADE, R.C.P.; LUNA J.S.; LIMA M.R.F; SILVA P.P, SANT'ANA A.E.G. Actividad larvicida y variacion estacional del extracto de *Annona muricata* en *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 37, n. 2, p. 223-228, 2006.

TRIPATHI, S.; SINGH, R. Population dynamics of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Insect Science Applications**, v. 12, p. 367-374, 1991.

VENETTE, R. C.; DAVIS, E. E.; ZASPEL, Z.; HEISLER, H.; LARSON, M. (2003). Mini risk assessment, Old World bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **US Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service**, 2003.

WONDAFRASH, M., GETU, E; TEREFE, G. Survival and Feeding of African Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) Affected by Neem, *Azadirachta indica*(A. Juss) Extracts. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 8, n. 4, p 280-285, 2012.