



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



CAMILA MOREIRA DE SOUZA

**BIOATIVIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DE SEMENTES DE *Annona mucosa*
Jacq. SOBRE *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) e
Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Erebidiae)**

Botucatu

2020

CAMILA MOREIRA DE SOUZA

**BIOATIVIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DE SEMENTES DE *Annona mucosa*
Jacq. SOBRE *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) e
Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Erebidae)**

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrônômicas da Unesp –
Campus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Agronomia (Proteção
de Plantas)

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Lopes Baldin

Coorientador: Dr. Leandro do Prado Ribeiro

Botucatu

2020

S729b

Souza, Camila Moreira de

Bioatividade do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* Jacq. sobre *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebididae) / Camila Moreira de Souza. -- Botucatu, 2021

74 p. : il., tabs.

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

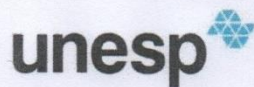
Orientador: Edson Luiz Lopes Baldin

Coorientador: Leandro do Prado Ribeiro

1. Soja - Doenças e pragas - Controle. 2. Extratos vegetais. 3. Lepdóptero. 4. Anonácea. 5. Inseticidas. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



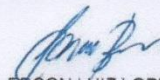
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

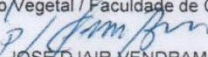
Título: **"BIOATIVIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DE SEMENTES DE *Annona mucosa* SOBRE *Chrysodeixis includens* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E *Anticarsia gemmatilis* (LEPIDOPTERA: EREBIDAE)"**

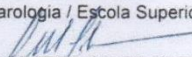
AUTORA: CAMILA MOREIRA DE SOUZA

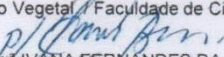
ORIENTADOR: EDSON LUIZ LOPES BALDIN

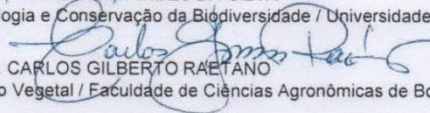
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. EDSON LUIZ LOPES BALDIN
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP


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


Prof. Dr. CARLOS FREDERICO WILCKEN
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP


Prof.^a Dr.^a IVANA FERNANDES DA SILVA
Entomologia e Conservação da Biodiversidade / Universidade Federal da Grande Dourados


Prof. Dr. CARLOS GILBERTO RAETANO
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP

Botucatu, 31 de março de 2020.

DEDICO

Aos meus pais, Agostinho Coelho de Souza e Margarida Moreira de Souza, pelo amor, incentivo e exemplo de vida.

À minha irmã Karina Moreira de Souza, pelo amor, amizade, apoio e companheirismo.

A Leontino Neto, pelo amor e compreensão em todas as etapas.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

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

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

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

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

Ao Dr. Leandro do Prado Ribeiro, pelo fornecimento dos extratos vegetais e pela orientação;

Aos amigos do Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas (LARESPI), pelo apoio e auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho;

À Igreja Batista Nacional de Sorriso, pela amizade, ensinamentos e oportunidade de crescimento pessoal e profissional;

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

“O Senhor me confiou dois talentos; eis
aqui outros dois que ganhei”
(BÍBLIA, Mateus, 25, 22)

RESUMO

Chrysodeixis includens (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae) são importantes pragas desfolhadoras para diferentes plantas cultivadas, especialmente na soja [*Glycine max* (L.) Merrill], onde são consideradas espécies-chave da cultura. Os inseticidas botânicos podem constituir em uma valiosa ferramenta frente aos problemas recorrentes dos métodos convencionais de controle, uma vez que majoritariamente apresentam menor toxicidade para mamíferos e organismos não-alvo e por se adequarem aos preceitos da produção orgânica ou de base ecológica. Visando encontrar alternativas para o manejo de lagartas desfolhadoras da cultura da soja, a bioatividade do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae) foi avaliada sobre *C. includens* e *A. gemmatalis* e comparada ao inseticida comercial botânico à base de limonoides (Azamax® 1,2 EC, azadiractina + 3-tigloilazadiractol) por meio de ensaios de laboratório e semi-campo. Nos ensaios preliminares (bioensaio de ingestão), o extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* (ESAM) (CL₅₀ de 452,38 e 66,91 mg kg⁻¹ para *C. includens* e *A. gemmatalis*, respectivamente) apresentou um nível de atividade comparável ou superior ao do bioinseticida Azamax® 1,2 EC utilizado como controle positivo. Adicionalmente, o ESAM apresentou uma ação mais rápida que o controle positivo Azamax® 1,2 EC e efeito inibidor sobre o desenvolvimento dos insetos. Em condições de semi-campo, a emulsão aquosa do ESAM e Azamax® 1,2 EC ocasionaram mortalidades larvais acima de 95% para ambas as espécies-praga expostas aos folíolos de soja tratados. Tal atividade foi semelhante à obtida com o inseticida comercial sintético à base de flubendiamida (Belt 480 SC). Em adição, os efeitos tóxicos subletais do ESAM sobre lagartas de *C. includens* e *A. gemmatalis* foram avaliados após 24 h de exposição a meio artificial tratado em laboratório e após 168 h em semi-campo por meio de exposição a folíolos de soja tratados nas CL₅₀ previamente estimadas para cada espécie, ESAM não ocasionou deterrência alimentar para lagartas de terceiro ínstar de *C. includens* e *A. gemmatalis* expostas ao meio artificial tratado. Em condições de semi-campo, ESAM não afetou as espécies estudadas quanto à mortalidade e desfolha após 72 h de exposição. Foram registrados índices de mortalidade de 38 e 44 % para lagartas de *C. includens* e de 27 e 39% para lagartas de *A. gemmatalis* após 120 e 168 h, respectivamente. Embora não tenha sido constatado significativo efeito deterrente alimentar nos ensaios,

verificou-se uma redução na desfolha ocasionada por ambas as espécies após 120 e 168 h de exposição, sugerindo uma redução no consumo ao longo do tempo em decorrência da toxicidade pós ingestão do extrato. Além do efeito letal tóxico, os resultados demonstraram a promissora bioatividade do ESAM em concentrações não letais sobre lagartas de *C. includens* e *A. gemmatilis*, ressaltando o potencial deste derivado botânico como ferramenta no manejo integrado de lepidópteros-praga.

Palavra-chave: Lagarta-falsa-medideira. Lagarta-da-soja. Inseticidas botânicos. Anonáceas. Acetogeninas. Mortalidade. Deterência.

ABSTRACT

Chrysodeixis includens (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) and *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae) are two important defoliating insect of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. Botanical insecticides might have an important role in integrated pest management programs as alternatives to synthetic insecticides, especially in organically based production systems, also in the most of cases these compounds have low toxicity to mammals and non-target organisms. To develop an alternative tool for control of *C. includens* and *A. gemmatalis*, efficacy of ethanolic extracts from seeds of *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae) and limonoid-based biopesticide formulation (Azamax® 1.2 EC, azadiractin + 3-tigloylazadirachtol) were evaluated through laboratory and greenhouse trials. In an initial screening, ethanolic extracts from seeds of *A. mucosa* (ESAM) ($LC_{50} = 452.38$ and 66.91 mg L^{-1} for *C. includens* and *A. gemmatalis*, respectively) was equivalent to the mortality caused by positive control limonoid-based biopesticide formulation Azamax® 1.2 EC and showed a faster kill time and pronounced larval growth inhibition after 168 h of exposure. In greenhouse trials, ESAM (as an emulsifiable concentrate formulation) and Azamax® 1.2 EC, both at LC_{90} values previously estimated, were compared with a diamide-based commercial insecticide (flubendiamide 480 SC) for mortality after 168 h of exposure to larvae on soybean plants; all treatments caused high larval mortality (> 90%). This study evaluated the sublethal effects of ESAM at their previously estimated concentrations LC'_{50} after 24 and 168 h of exposure to artificial media and soybean leaves treated, respectively. In laboratory trial ESAM were not antifeedant agents on third-instar *C. includens* and *A. gemmatalis* larvae. In greenhouse trial, ESAM did not reduced *C. includens* and *A. gemmatalis* foliar consumption after 72 h of exposure. Nevertheless, ESAM significantly decreased ingested food of both species after 120 and 168 h of exposure, suggesting the insects post-ingestion toxicity. Additionally, was observed 38 and 44% mortality of *C. includens* and 27 and 39 % mortality of *A. gemmatalis* after 120 and 168 h, respectively, of exposure. Thus, the results of this study indicate that ESAM represents a potential source of insecticidal compounds with lethal and sublethal activities against *C. includens* and *A. gemmatalis* and may be a useful component for the integrated management of this important pest species.

Keywords: Soybean looper. Velvetbean caterpillar. Botanical insecticides. Soursop family. Acetogenins. Mortality. Antifeedant.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 - Efeito deterrente alimentar e inibição do desenvolvimento larval de derivado botânico rico em acetogeninas sobre *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Erebidae) em testes laboratoriais e semi-campo

Fig. 1. Curva de sobrevivência (Kaplan-Meier) de lagartas de *Chrysodeixis includens* mantidas em meio artificial contendo o extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* (ESAM) na concentração equivalente a CL_{50} ($452,32 \text{ mg kg}^{-1}$) previamente estimada.....59

Fig. 2. Curva de sobrevivência (Kaplan-Meier) de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* mantidas em meio artificial contendo o extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* (ESAM) na concentração equivalente a CL_{50} ($66,91 \text{ mg kg}^{-1}$) previamente estimada.....60

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Efeitos tóxicos de formulação derivada de acetogeninas de Annonaceae e de inseticida comercial botânico à base de limonoides sobre *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Erebidae)

Tabela 1. Mortalidade (% $\pm$ EP) e peso larval (mg) de lagartas de <i>Chrysodeixis includens</i> e de <i>Anticarsia gemmatalis</i> após 168 h de exposição ao extrato etanólico de sementes de <i>Annona mucosa</i> (ESAM, roliniastatina-1) e ao bioinseticida comercial à base de limonoides (Azamax [®] 1,2 EC) na concentração de 1.000 mg L ⁻¹ em condições de laboratório.	40
Tabela 2. Estimativa da CL ₅₀ e CL ₉₀ (mg L ⁻¹) e intervalo de confiança do extrato etanólico de sementes de <i>Annona mucosa</i> (ESAM, roliniastatina-1) para lagartas de <i>Chrysodeixis includens</i> e <i>Anticarsia gemmatalis</i> após 168 h de exposição.	41
Tabela 3. Estimativa do tempo letal médio (TL ₅₀ , em horas) e intervalo de confiança do extrato etanólico de sementes de <i>Annona mucosa</i> (Annonaceae) para lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> e <i>Chrysodeixis includens</i> mantidas em dieta artificial (1.000 mg L ⁻¹).	42
Tabela 4. Mortalidade (% $\pm$ EP) de lagartas de <i>Chrysodeixis includens</i> e de <i>Anticarsia gemmatalis</i> após 168 h de exposição ao extrato etanólico de sementes de <i>A. mucosa</i> (ESAM, roliniastatina-1), inseticida comercial botânico à base de limonoides (Azamax [®] 1,2 CE) e inseticida comercial a base de flubendiamida (Belt 480 SC) em condições de semi-campo.	43

CAPÍTULO 2: Efeito deterrente alimentar e inibição do desenvolvimento larval de derivado botânico rico em acetogeninas sobre *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Erebidae) em testes laboratoriais e semi-campo

Tabela 1. Viabilidade e duração da fase larval de <i>C includens</i> (CL ₅₀ = 452,38) e <i>A. gemmatalis</i> (CL ₅₀ = 276,55) mantida em meio artificial com o extrato etanólico de sementes de <i>Annona mucosa</i> (ESAM).	61
---	----

Tabela 2. Consumo (médias $\pm$ EP) de lagartas de terceiro ínstar de <i>Chrysodeixis includens</i> e <i>Anticarsia gemmatalis</i> após 24 h de exposição ao meio artificial tratado com o extrato etanólico de sementes de <i>Annona mucosa</i> (ESAM).	62
Tabela 3. Mortalidade (% $\pm$ EP) de lagartas de <i>Chrysodeixis includens</i> (CL ₅₀ = 452,38 mg L ⁻¹) e <i>Anticarsia gemmatalis</i> (CL ₅₀ = 66,91 mg L ⁻¹) expostas a folíolos de soja tratados com a emulsão aquosa do extrato etanólico de sementes de <i>Annona mucosa</i> (ESAM pré-formulado), após 72, 120 e 168 h de exposição em teste de semi-campo.	63
Tabela 4. Desfolha (% $\pm$ EP) ocasionada por lagartas de <i>Chrysodeixis includens</i> (CL ₅₀ = 452,38 mg L ⁻¹) e <i>Anticarsia gemmatalis</i> (CL ₅₀ = 66,91 mg L ⁻¹) expostas a folíolos de soja tratados com a emulsão aquosa do extrato etanólico de sementes de <i>Annona mucosa</i> (ESAM pré-formulado), após 72, 120 e 168 h de exposição em teste de semi-campo.	64

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	21
CAPÍTULO 1: Efeitos tóxicos de formulação derivada de acetogeninas de Annonaceae e de inseticida comercial botânico à base de limonoides sobre <i>Chrysodeixis includens</i> (Lepidoptera: Noctuidae) e <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera: Erebidae)	27
Resumo	27
Introdução	28
Material e Métodos	29
Resultados	33
Discussão	33
Referências	35
CAPÍTULO 2: Efeito deterrente alimentar e inibição do desenvolvimento larval de derivado botânico rico em acetogeninas sobre <i>Chrysodeixis includens</i> (Lepidoptera: Noctuidae) e <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera: Erebidae) em testes laboratoriais e semi-campo	44
Resumo	44
Introdução	45
Material e Métodos	46
Resultados	50
Discussão	51
Referências	53
CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
REFERÊNCIAS	67

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o maior exportador de soja do mundo [*Glycine max* (L). Merrill] e o segundo maior produtor do grão, com uma área estimada em 115 milhões de toneladas, com uma área cultivada de 35 milhões de ha na safra 2018/2019 (CONAB, 2019; LIMA et al., 2019). Dentre as espécies desfolhadoras que atacam a cultura da soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae) e *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) se destacam por ocasionar expressivas perdas na cultura (MOSCARDI et al., 2012; FORMENTINI et al., 2015; LUZ et al., 2019) e por representarem os principais lepidópteros-praga na cultura da soja (LUZ et al., 2019).

Chrysodeixis includens tem sua presença registrada apenas no Hemisfério ocidental, onde há relatos de sua ocorrência desde o norte dos Estados Unidos até o sul da América do Sul (KOGAN, 1981; ALFORD; HAMOND, 1982). No Brasil, até a década de 1990 o inseto-praga era considerado praga secundária; no entanto, sua presença se intensificou a partir de 2003, principalmente na cultura da soja, e atualmente sua presença é relatada em diferentes culturas o ano todo (SORGATTO et al., 2015).

As lagartas no último estágio de desenvolvimento possuem entre 40 e 45 mm de comprimento e são caracterizadas pela coloração verde-clara, com presença de listra longitudinais brancas e pontuações pretas (SOSA-GÓMEZ et al., 2010). As pupas se fixam sob teias na parte abaxial das folhas das plantas e este período dura entre 7 e 9 dias. Inicialmente possuem coloração verde-clara brilhante e, próximo à emergência, assumem coloração marrom (SOSA-GÓMEZ et al., 2010). As mariposas possuem 35 mm de envergadura, sendo as posteriores de coloração marrom e as anteriores de coloração escura com presença de duas manchas prateadas na parte central (GALLO et al., 2002; SOSA-GÓMEZ et al., 2010). A longevidade do adulto é cerca de 14 dias, podendo variar conforme a temperatura (MASON; MACK, 1984).

O comportamento alimentar é caracterizado pelo aspecto rendilhado deixado nas folhas, uma vez que, lagartas a partir do terceiro ínstar se alimentam do limbo foliar deixando as nervuras intactas (BUENO et al., 2007). O inseto ocorre principalmente durante o período reprodutivo da soja, podendo ocasionar danos econômicos, além de ser mais tolerante aos inseticidas convencionais em comparação com *A. gemmatilis*. Em adição, *C. includens* também pode atacar

vagens já formadas de soja, o que potencializa seus danos sobre a cultura (MARTINS et al., 2015; TOMQUELSKI et al., 2015; LUZ et al., 2019).

Anticarsia gemmatalis, também conhecida como lagarta-da-soja, é comum em todos os países americanos e pode acarretar prejuízos, principalmente na cultura da soja, em razão da desfolha ocasionada pelas formas imaturas durante os estádios vegetativo e reprodutivo da cultura (HOFFMANN CAMPO et al., 2000; FUGI, 2003; REICHERT COSTA, 2003). A soja é considerada seu principal hospedeiro; no entanto, as lagartas podem atacar culturas que sucedem a mesma, como amendoim, girassol e alfafa (HOFFMAN-CAMPO et al., 2000).

As mariposas possuem coloração marrom, cinza ou bege, com envergadura de aproximadamente 40 mm. As fêmeas depositam os ovos de maneira isolada na parte inferior das folhas, ramos e pecíolos, principalmente aqueles localizados no terço médio-inferior da planta (LEPPLA, 1976; HOFFMAN-CAMPO et al., 2000). Durante o dia, as mariposas são encontradas em locais sombreados na base da planta ou sob vegetação natural ao redor de áreas de soja (GALLO et al., 2002; MOSCARDI et al., 2012).

As lagartas medem entre 3 e 9 mm nos dois primeiros ínstaes e possuem os dois primeiros pares de pernas vestigiais podendo ser confundidas com *C. includens*. Possuem coloração verde, com estrias longitudinais brancas sobre o dorso, podendo assumir outras cores na falta de alimento ou em alta densidade populacional (HOFFMAN-CAMPO et al., 2000; GALLO et al., 2002). A fase de pupa ocorre no solo, sob profundidade de até 2 cm e dura de nove a dez dias. Inicialmente, as pupas são verde-claras, tornando-se marrom-escuras e brilhantes com o decorrer do tempo (HOFFMAN-CAMPO et al., 2000).

Chrysodeixis includens e *A. gemmatalis* são geralmente controladas a partir da aplicação de inseticidas sintéticos, bem como pelo uso de plantas transgênicas expressando toxinas de Bt. Dentre os grupos de inseticidas utilizados controle, se destacam as benzoilureias e diamidas do ácido ftálico inseridos no mercado nos últimos anos; além de piretroides, organofosforados e carbamatos (GALLO et al., 2002; TOMQUELSKI et al., 2015).

O uso abusivo de inseticidas convencionais e seus efeitos negativos sobre o meio ambiente têm estimulado o aumento de pesquisas com inseticidas botânicos nas últimas décadas, tornando a identificação de novos compostos derivados de plantas extremamente atrativa à comunidade científica (CASTILLO-SÁNCHEZ et al., 2010;

TAK et al., 2015; TOGNI et al., 2019). O desenvolvimento de métodos de controle alternativos aos inseticidas químicos e que se adequem aos preceitos da produção orgânica ou de base ecológica são extremamente importantes para a sustentabilidade dos sistemas de produção (TOGNI et al. 2019).

Os inseticidas botânicos podem constituir em uma valiosa ferramenta frente aos problemas recorrentes dos métodos convencionais de controle, uma vez que em sua composição se encontram misturas complexas com diferentes compostos bioativos, reduzindo a pressão de seleção e retardando o surgimento de populações de insetos resistentes (ISMAN, 2006; RATTAN, 2010). Além disso, a possibilidade de obtenção de derivados botânicos por meio de espécies nativas com alta disponibilidade de matéria-prima pode permitir sua aplicação em larga escala e de forma sustentável (ISMAN; SEFFRIN, 2014; RIBEIRO et al., 2016).

O advento dos inseticidas sintéticos (organoclorados, organofosforados e carbamatos) a partir da Segunda Guerra Mundial, associado a limitações dos inseticidas botânicos como baixo efeito residual e variações na eficiência e concentração de ingredientes ativos, fizeram com que seu uso fosse reduzido gradativamente (EL-WAKEIL, 2013). No entanto, o uso de inseticidas sintéticos vem sendo associado a problemas ambientais, toxicidade a organismos não alvo; bem como a rápida seleção de populações de insetos resistentes para a maioria dos ingredientes ativos, minimizando progressivamente sua eficiência (PERRY et al., 1998; EL-WAKEIL, 2013).

Em 1990, autoridades norte-americanas se posicionaram frente a este cenário, por meio de medidas regulamentares, substituindo produtos químicos de interesse por outros que representavam menores riscos à saúde humana e para o meio ambiente; esta ação denominada “política de risco reduzido” (HEDIN et al., 1997), foi um dos fatores que alavancaram o retorno das pesquisas por métodos alternativos ao químico convencional para o controle de pragas (PRAKASH; RAO, 1997).

Cronologicamente, os inseticidas botânicos podem ser divididos em três grupos distintos (REGNAULT-ROGER et al., 2005, p. 313 apud EL-WAKEIL, 2013). O primeiro grupo compreende os inseticidas botânicos de primeira geração e consistem em compostos provenientes de folhas de plantas de *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae), de raiz ou rizomas de espécies de *Derris*, *Lonchocarpus*, e *Tephrosia* (Fabaceae), de sementes de *Schoenocaulon officinale* (Schlecht & Cham) (Melanthiaceae), de flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. (Asteraceae), da

madeira do arbusto *Ryania speciosa* Vahl. (Flacourtiaceae) e os óleos essenciais, principalmente os provenientes das famílias Lamiaceae e Myrtaceae. O segundo grupo é constituído pelos inseticidas botânicos de segunda geração, os quais são provenientes da síntese de *N. tabacum* e os oriundos de sementes do nim indiano *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae). Por fim, no terceiro grupo estão incluídos os potenciais inseticidas botânicos da atualidade, com destaque para os ésteres de açúcar provenientes das folhas de tabaco (*N. gossei*) e derivados de espécies da família Annonaceae.

A família Annonaceae é encontrada principalmente em regiões tropicais da América, África e Sudeste da Ásia e tem como característica o porte arbóreo ou arbustivo e o caule lenhoso (KIILL; COSTA, 2003; BLESSING et al., 2010). Pertencente a ordem Magnoliales, o grupo é constituído por 2.500 espécies e 135 à gêneros encontrados em todo mundo. No Brasil, foram identificados 33 gêneros e 250 espécies (CHATROU et al., 2004; SOUZA; LORENZI, 2005). Algumas espécies, principalmente as do gênero *Annona*, despertam o interesse no mercado internacional tanto no segmento de frutos *in natura* como no segmento de frutas processadas (LEMOES, 2014). A extração de compostos bioativos é outro segmento que também desperta interesse, sendo estes usados com finalidade pesticida, alelopática e medicinal (INOUE et al., 2009).

O potencial inseticida da família Annonaceae vêm chamando a atenção desde meados da década de 80, com a descoberta das acetogeninas, as quais demonstraram ampla atividade biológica (OCAMPO; OCAMPO, 2006). Desde a descoberta da acetogenina uvaricina, pelo menos 400 compostos desta classe já foram descritos. Estes compostos estão presentes em folhas, ramos e sementes, principalmente em espécies dos gêneros: *Annona*, *Asimina*, *Goniothalamus*, *Rollinia*, *Uvaria* e *Xylopia* (ZENG et al., 1996; ÁLVAREZ et al., 2008).

As acetogeninas são os principais compostos bioativos presentes na família Annonaceae e são quimicamente caracterizadas por uma estrutura comum, geralmente formado por 35 a 37 átomos de carbono, apresentando um terminal de γ -lactona α , β -insaturada na cadeia de hidrocarboneto ligada à lactona na posição 2. Há geralmente uma, duas, ou, mais raramente, três anéis tetra-hidrofurano (THF), contendo alguns grupos de oxigênio funcionais (BLESSING et al., 2012).

O principal sitio de ação das acetogeninas é no complexo I mitocondrial (NADH: ubiquinona redutase) atuando na inibição do transporte de elétrons e levando a morte

celular programada (LONDERHAUSEN et al., 1991; ALALI et al., 1999; GUPTA et al., 2011). No entanto, estudos recentes apontam um novo sítio de ação por meio da interação molecular de fosfatos da membrana celular com os anéis tetrahidrofuranos, bem como em disfunções no intestino médio de insetos expostos aos derivados (BLESSING et al., 2010; BOMBASARO et al., 2011; FIAZ et al., 2019).

Os inseticidas botânicos derivados de Annonaceae vêm sendo utilizados principalmente a partir de extratos de suas sementes. No gênero *Annona* a espécie *Annona mucosa* Jacq. é considerada uma das mais promissoras, representando potencial candidata à produção de inseticidas botânicos a serem utilizados para proteção de lavouras no Brasil (RIBEIRO et al., 2014; ANSANTE et al., 2015; LIAW, 2016; SOUZA et al., 2017). Com base na literatura, países tropicais possuem um maior potencial para o desenvolvimento de inseticidas botânicos provenientes de sementes de Annonaceae, uma vez que possuem disponibilidade de matéria-prima a baixo custo e/ou a partir de resíduos das indústrias de processamento de polpa (LEATEMIA; ISMAN 2014a).

Estudos realizados por diversos autores demonstraram a bioatividade de derivados de Annonaceae sobre lepidópteros-praga, como: *Trichopusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (LEATEMIA; ISMAN 2004a; LEATEMIA; ISMAN 2004b), *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) (LEATEMIA; ISMAN 2004b), *Rachiplusia nu* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae) (COLOM et al., 2007), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (COLOM et al., 2007; BLESSING et al., 2010; TOLOSA et al., 2014; ANSANTE et al., 2015; RIBEIRO et al., 2016; HIDALGO et al., 2018), *C. includens* (TOLOSA et al., 2014; MASSAROLI et al., 2016), *A. gemmatalis* (TOLOSA et al., 2014; FIAZ et al., 2018), e *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (SOUZA et al., 2017; SOUZA et al., 2019).

Considerando-se a perspectiva de que as acetogeninas continuem a ser empregadas no manejo de pragas por meio de formulações provenientes de extratos brutos ou parcialmente refinados, e que a espécie *A. mucosa* é considerada a principal candidata ao desenvolvimento de inseticidas botânicos no Brasil (LEATEMIA; ISMAN 2004a; RIBEIRO et al., 2014), o presente estudo teve como objetivo avaliar a bioatividade do extrato etanólico proveniente de sementes de *A. mucosa* (ESAM), por meio da avaliação de efeitos letais e subletais sobre os lepidópteros-praga *C. includens* e *A. gemmatalis*, a fim de oferecer mais subsídios que viabilizem a

comercialização e aplicação deste inseticida botânico em plantios de soja sob diferentes sistemas de cultivo.

CAPÍTULO 1 - Efeitos tóxicos de formulação derivada de acetogeninas de Annonaceae e de inseticida comercial botânico à base de limonoides sobre *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Erebidae)

Resumo

Derivados de Annonaceae ricos em acetogeninas vêm se destacando nas últimas décadas como uma ferramenta para o manejo de pragas em sistemas agrícolas de base orgânica ou ecológica, sendo o extrato etanólico de *Annona mucosa* (ESAM, composto majoritário: acetogenina bis-tetrahidrofurânica roliniastatina-1) considerado como um dos mais promissores. Visando encontrar alternativas para o manejo de lagartas desfolhadoras da cultura da soja, o efeito do ESAM foi avaliado sobre duas espécies de noctuídeos (Lepidoptera): *Chrysodeixis includens* (Walker) e *Anticarsia gemmatalis* Hübner em comparação ao inseticida comercial botânico à base de limonoides (Azamax® 1,2 EC, azadiractina + 3-tigloilazadiractol) por meio de ensaios de laboratório e semi-campo. Nos ensaios preliminares (bioensaio de ingestão), ESAM (CL₅₀ de 66,91 e 452,38 mg L⁻¹ para *A. gemmatalis* e *C. includens*, respectivamente) apresentou atividade comparável ou superior à do bioinseticida Azamax® 1,2 EC, utilizado como controle positivo para as duas espécies de lepidópteros-praga. Além disso, ESAM apresentou uma ação mais rápida (TL₅₀ de 27,23 e 51,01 horas para *A. gemmatalis* e *C. includens*, respectivamente) do que Azamax® 1,2 EC. Em condições de semi-campo (casa-de-vegetação), a emulsão aquosa do ESAM (formulação pré-comercial) e o bioinseticida à base de limonoides, ambos na CL₉₀, ocasionaram mortalidades larvais acima de 95% para ambas as espécies-praga expostas aos folíolos de soja tratados. Esse índice foi semelhante ao obtido com o inseticida comercial sintético à base de diamida (flubendiamida, Belt 480 SC) na concentração fornecida pelo fabricante. Dessa forma, ESAM se apresenta como uma promissora alternativa para o manejo de *C. includens* e *A. gemmatalis*, podendo ser inserido em programas de manejo integrado de pragas da cultura da soja, principalmente em cultivos orgânicos ou de base ecológica.

Palavras-chave: Lagarta-falsa-medideira; lagarta-da-soja; plantas inseticidas; anonáceas; extrato etanólico

Introdução

Chrysodeixis includens (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae) são importantes pragas desfolhadoras de diferentes espécies cultivadas, especialmente da soja [*Glycine max* (L.) Merrill, Fabaceae], onde são consideradas pragas-chave da cultura (Togni et al. 2019). Recentemente, *C. includens* vem se destacando no cenário agrícola brasileiro, especialmente na região do cerrado onde, além da soja, sua ocorrência também é relatada na cultura do algodão, *Gossypium hirsutum* L. (Busoli et al. 2014; Baldin et al. 2014; Bortolotto et al. 2015; Specht et al. 2015). Sua adaptação em se alimentar de plantas não hospedeiras favorece o aumento populacional e propicia sua manutenção no campo mesmo na entressafra, uma vez que essas plantas atuam como pontes temporárias ou pontes verdes entre diferentes cultivos (Zulin et al. 2018).

Em soja, o manejo de populações de *A. gemmatalis* e *C. includens* é realizado principalmente por meio de aplicações de inseticidas sintéticos (Bel et al. 2017; Stacke et al. 2019) e por transgenia, a partir de plantas que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Luz et al. 2019; Stacke et al. 2019). O uso da tecnologia Bt na produção de soja tem aumentado significativamente nos últimos anos, principalmente devido à lucratividade, alta demanda do mercado nacional e internacional e disponibilidade de diferentes tecnologias de sementes (ISAAA 2018; Luz et al. 2019).

O desenvolvimento de métodos de controle alternativos aos inseticidas químicos é extremamente importante para a sustentabilidade dos sistemas de produção (Togni et al. 2019). O uso abusivo de inseticidas convencionais e seus efeitos negativos sobre o meio ambiente estimularam o aumento de pesquisas com inseticidas botânicos nas últimas décadas, o que tornou a identificação de novos compostos derivados de plantas extremamente importante (Castillo-Sánchez et al. 2010; Tak et al. 2015; Togni et al. 2019). Os inseticidas botânicos podem constituir em uma valiosa ferramenta frente aos problemas recorrentes dos métodos convencionais de controle, uma vez que em sua composição se encontram misturas complexas com diferentes compostos bioativos, o que retarda o surgimento de populações de insetos resistentes (Isman 2006; Rattan, 2010). Além disso, se adequam perfeitamente aos preceitos da produção orgânica ou de base ecológica.

As acetogeninas representam uma classe de moléculas de ocorrência exclusiva em alguns gêneros da família Annonaceae a qual tem sido considerada o grupo

detentor de aleloquímicos mais promissores nas últimas três décadas (Gupta et al. 2011). A atividade inseticida das acetogeninas é relacionada a sua atuação na enzima NADH: ubiquinona redutase (complexo I) do sistema de transporte de elétrons na mitocôndria, levando à morte celular programada em detrimento da privação da produção de ATP (Londerhausen et al. 1991, Alali et al. 1999). No entanto, pesquisas mais recentes vêm sugerindo um novo sítio de ação por meio da interação das acetogeninas com fosfatos da membrana celular, levando à desidratação e gerando danos irreversíveis à sua estrutura e funções biológicas (Bombasaro et al. 2011, Blessing et al. 2012).

Os inseticidas botânicos derivados de Annonaceae vêm sendo utilizados principalmente a partir de extratos de suas sementes, sendo a espécie *Annona mucosa* Jacq. considerada uma das mais promissoras e principal candidata para a produção de inseticidas botânicos a serem utilizados para proteção de lavouras no Brasil (Isman and Seffrin, 2014; Ribeiro et al. 2014; 2016; Bernardi et al., 2017, Souza et al., 2019). Em adição, países neotropicais possuem uma grande diversidade de espécies cultivadas de *Annona* e, conseqüentemente, elevado potencial para o desenvolvimento de inseticidas botânicos proveniente de sementes de Annonaceae, uma vez que possuem disponibilidade de matéria-prima a baixo custo ou a partir de subprodutos (sementes e cascas) das indústrias de processamento de polpa (Isman and Seffrin, 2014, Ribeiro et al., 2016).

Material e Métodos

Coleta do material vegetal e preparação dos derivados

As sementes de *A. mucosa* foram obtidas de frutos maduros coletados de exemplares cultivados em Piracicaba, SP, Brasil (22° 42'28"S; 47°37'59"W; elevação: 534 m). Exsiccatas das espécies estudadas, 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.

Após a coleta e separação dos frutos, as sementes foram secas em estufas com circulação de ar forçada a 40 °C por um período de 48 a 72 horas e, posteriormente, moídas em moinho de facas para obtenção de um pó fino, o qual foi armazenado 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 período de três dias, passando posteriormente por filtragem em papel filtro. A torta restante foi ressubmetida ao solvente etanol, todo o processo foi repetido por três vezes. O solvente remanescente na solução filtrada foi eliminado em evaporador rotativo a 50 °C e à pressão de -600 mmHg. Por fim, a torta foi mantida em câmara com fluxo de ar até a evaporação completa do solvente, sendo posteriormente determinado o rendimento de extração (27,81%).

Insetos

Os insetos utilizados nos bioensaios foram provenientes da criação estoque mantida em laboratório ($T = 25 \pm 2$ °C; U.R.= $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h). Os adultos foram alimentados a partir de algodão umedecido em solução de água + mel a 10% (p/v) e as lagartas foram mantidas em meio artificial (Greene et al. 1976).

Bioensaios

Os ensaios laboratoriais foram conduzidos sob condições controladas ($T = 25 \pm 2$ °C, UR= $65 \pm 10\%$ e fotoperíodo= 14 h), enquanto que o bioensaio com plantas de soja (semi-campo) foi conduzido em casa de vegetação sob temperatura e umidade semi-controladas durante o mês de janeiro de 2017 na Fazenda Experimental Lageado, Faculdade de Ciências Agrônômicas, em Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil ($22^{\circ} 51'S$, $48^{\circ} 26'W$ e altitude de 770 m).

Bioensaios laboratoriais

Toxicidade letal e subletal (avaliação em concentração diagnóstica)

A fim de avaliar a bioatividade do ESAM sobre lagartas de *A. gemmatilis* e de *C. includens*, foi utilizada a concentração diagnóstica de 1.000 mg L^{-1} por meio de exposição ao meio artificial tratado. O nível de atividade foi comparado ao do inseticida botânico à base de limonoides (Azamax® 1,2 EC) na mesma concentração.

Inicialmente, o ESAM foi solubilizado em uma solução de solventes orgânicos [acetona:água, 1:3, v/v], na proporção de 5 mL de solução para cada 300 g de meio artificial, conforme descrito por Ansante et al. (2015). Além do extrato etanólico, foram utilizados como controles negativos água deionizada (empregada na solubilização do

inseticida comercial botânico Azamax® 1 EC) e a solução de solventes [acetona:água (1:3, v/v)], empregada solubilização do ESAM.

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 individualmente com uma lagarta neonata de cada uma das espécies (bioensaios conduzidos separadamente). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo que para cada tratamento foram utilizadas seis repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Elisa (24 células), totalizando 144 lagartas expostas por tratamento ($n = 144$). A mortalidade das lagartas foi avaliada diariamente por um período de sete dias. Após o sétimo de exposição também foi avaliado o peso larval das lagartas sobreviventes.

Curva de concentração-resposta e estimativa do tempo letal médio

Com base nos resultados preliminares, ESAM foi novamente avaliado a fim de estimar a CL_{50} e CL_{90} (concentrações necessárias para matar 50 e 90% das lagartas expostas, respectivamente) e a EC_{50} (concentração necessária para reduzir em 50% o peso das lagartas sobreviventes). Para isso, foram utilizadas cinco concentrações de cada tratamento, as quais foram definidas com base na fórmula proposta por Finney (1971). Foram utilizados os mesmos procedimentos experimentais descritos no ensaio anterior. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado e foram utilizadas quatro repetições por tratamento, cada qual consistindo de uma placa de Elisa (24 células), totalizando 96 lagartas por concentração estimada ($n = 96$).

O tempo necessário para matar 50% das lagartas de *C. includens* e *A. gemmatilis* (TL_{50}) foi estimado para o ESAM na concentração de 1.000 mg L^{-1} . Para isso foram utilizados os mesmos procedimentos experimentais descritos anteriormente.

Eficácia comparada do ESAM e inseticidas comerciais de origem natural e sintética (teste em casa-de-vegetação)

A eficácia do ESAM ($CL_{90} = 885,70$ e $288,36 \text{ mg L}^{-1}$ para *C. includens* e *A. gemmatilis*, respectivamente) em condições de semi-campo (casa de vegetação) foi comparada ao inseticida comercial botânico Azamax® 1,2 EC ($CL_{90} = 1.000 \text{ mg L}^{-1}$, para ambas as espécies) e o inseticida sintético à base de flubendiamida Belt® (480 g i.a.L^{-1} ;

suspensão concentrada, Bayer SA, São Paulo, SP, Brasil) nas concentrações de 240 mg i.a L⁻¹ para *C. includens* e 96 mg i.a L⁻¹ para *A. gemmatilis*.

Para preparo da emulsão aquosa do ESAM (formulação pré-comercial), a solução do extrato etanólico foi solubilizada em solventes orgânicos [acetona:água (3:1, v/v), 100 g L⁻¹] sendo em seguida adicionado o emulsificante Tween® 80 na concentração de 10 g L⁻¹ e água deionizada. O teste foi realizado com plantas de soja (MG/BR46 Conquista) entre 30 e 45 dias. Cada planta foi cultivada em vasos de 5,0 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 Arprex; Equipamentos para Pintura Majam Ltda., São Paulo, SP, Brasil), 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 da pulverização, uma folha de cada planta foi infestada com 10 lagartas neonatas provenientes da criação mantida em laboratório. Posteriormente foi acoplada uma gaiola feita em “voil” sobre as folhas, a fim de evitar a fuga dos insetos. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo que para cada tratamento foram utilizadas 12 repetições, sendo cada repetição constituída por uma planta de soja, totalizando 120 lagartas por tratamento (n = 120). Durante os ensaios, as plantas infestadas permaneceram acondicionadas sobre bancadas em casa de vegetação e após seis dias da infestação, a mortalidade foi determinada. A lagarta foi considerada morta quando não apresentava nenhum tipo de reação (movimento) após ser levemente tocada com pincel fino.

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 através do software estatístico “R”, versão 2.15.1 (R Development Core Team, 2012).

Resultados

Bioatividade em condições laboratoriais

Em relação à lagarta *C. includens* foi observada uma mortalidade acumulada após 168 h de exposição aos tratamentos ESAM e ao inseticida comercial de origem botânica Azamax® 1,2 EC de 99 e 81%, respectivamente (Tabela 1). A partir da avaliação da mortalidade acumulada foram estimadas as concentrações letais e subletais do ESAM para as lagartas *C. includens* ($CL_{50} = 452,38 \text{ mg L}^{-1}$, $CL_{90} = 885,70 \text{ mg L}^{-1}$) e *A. gemmatalis* ($CL_{50} = 66,91 \text{ mg L}^{-1}$, $CL_{90} = 288,36 \text{ mg L}^{-1}$) (Tabela 2). Os tratamentos ocasionaram 100% de mortalidade para *A. gemmatalis* nas mesmas condições de exposição.

Os tempos letais médios (TL_{50}) estimados para as lagartas de *C. includens* e *A. gemmatalis* foram de respectivamente 51,01 h (95% IC = 46,21 – 55,59 h, $\chi^2 = 6,14$, gl = 5, n = 144) e de 27,23 h (95% IC = 25,96 – 28,80 h, $\chi^2 = 0,02$, gl = 5, n = 144) quando expostas ao meio artificial tratado com o ESAM (Tabela 3).

Bioensaios em condições de semi-campo

Sob condições de semi-campo, ESAM nas CL_{90} previamente estimadas (885,70 e 288,36 mg L^{-1} para *C. includens* e *A. gemmatalis*, respectivamente) ocasionou mortalidade superior a 95% das lagartas de *C. includens* e *A. gemmatalis* após 168 h de exposição aos folíolos de soja tratados, sem diferir do inseticida comercial de origem botânica (Azamax® 1 EC, limonoides) ($CL_{90} = 1.000 \text{ mg L}^{-1}$ para ambas as espécies) e do inseticida sintético a base de flubendiamida (Belt® 480 SC) na concentração de 240 mg i.a L^{-1} para *C. includens* e 96 mg i.a L^{-1} para *A. gemmatalis* (Tabela 4).

Discussão

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram demonstrar a promissora ação inseticida do extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* (ESAM) sobre *C. includens* e *A. gemmatalis*, com bioatividade comparada a inseticidas comerciais registrados para o controle de ambos insetos-praga no Brasil. A bioatividade do ESAM foi evidenciada em laboratório e semi-campo, com índices de mortalidade acima de 95% para lagartas de *A. gemmatalis* e *C. includens* após 168 h de exposição, constatando-se, por outro lado, maior suscetibilidade de lagartas de *A. gemmatalis* em relação a *C. includens*. Em estudo semelhante, o efeito tóxico do ESAM e das acetogeninas mono

e bis-tetrahidrofurano foi relatado sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) expostas a meio artificial tratado, onde foi observado que a acetogenina majoritária bis-tetrahidrofurano esquamocina foi a única que ocasionou 100% de mortalidade larval (Colom et al. 2007). Resultados semelhantes foram observados em estudos que avaliaram a bioatividade de diferentes espécies do gênero *Annona* (*A. mucosa*, *Annona muricata* L., *Annona reticulata* L. e *Annona sylvatica* A. St-Hil.), bem como da acetogenina majoritária bis-tetrahidrofurano roliniastatina-1 sobre lagartas de *S. frugiperda* e *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) com destaque para o ESAM, que ocasionou 100% de mortalidade nos estágios larvais, sendo sua atividade comparável aos inseticidas sintéticos recomendados para o controle desses lepidópteros-praga no Brasil (Ansante et al. 2015, Souza et al. 2017).

Neste estudo, o tempo letal médio do ESAM sobre as lagartas de *C. includens* e *A. gemmatilis* foi de 51,01 e 27,23 h, respectivamente estudos que avaliaram a ação de derivados de anonáceas através da estimativa do tempo letal médio em lepidópteros-praga corroboram com os dados da literatura, sendo observado a mortalidade média dos indivíduos em períodos próximos a 36 h. O tempo letal médio estimado para lagartas de *S. frugiperda* e *H. armigera* expostas ao ESAM foi de 32,72 h (Ansante et al. 2015) e 45,15 h (Souza et al. 2017), respectivamente. Estudos comparativos da ação do ESAM em relação a inseticidas comerciais botânicos e sintéticos ressaltam sua promissora bioatividade. Em estudo comparando a ação do ESAM ($CL_{90} = 1.882 \text{ mg L}^{-1}$) em relação ao inseticida comercial botânico Azamax® 1,2 EC em uma concentração 2,1 vezes maior (4.000 mg L^{-1}), não foi observada diferença significativa entre o tempo letal médio dos tratamentos ($TL_{50} = 32,72 \text{ h}$ e $TL_{50} = 37,25 \text{ h}$, respectivamente) (Ansante et al. 2015). Além disso, os mesmos autores observaram diferença significativa entre o ESAM e o inseticida comercial sintético clorantraniliprole (Premio® 20 SC, $562,25 \text{ mg L}^{-1}$), tendo sido observada uma ação duas vezes mais rápida do ESAM em relação ao inseticida comercial sintético (Ansante et al. 2015). Em estudo semelhante, a ação do ESAM ($TL_{50} = 34,95 \text{ h}$) sobre a lagarta *H. armigera* não diferiu de maneira significativa do inseticida comercial botânico à base de acetogeninas Anosom® ($TL_{50} = 39,78 \text{ h}$) na concentração de 2.000 mg L^{-1} , dose recomendada do produto comercial para o controle do inseto-praga (Souza et al. 2017).

Em condições de semi-campo, o ESAM formulado (após 168 h de exposição) ocasionou uma mortalidade > 95% de lagartas de *C. includens* e *A. gemmatalis*, não sendo observada diferença significativa em relação ao inseticida comercial botânico Azamax® 1,2 EC bem como o inseticida comercial sintético a base de flubendiamida (Belt® 480 SC). ESAM e o inseticida comercial botânico à base de acetogeninas Anosom® 1 EC também causaram mortalidades superiores a 90% para os lepidópteros-praga *Trichoplusia ni* (Hübner)] (Lepidoptera: Noctuidae) (Ribeiro et al 2014) e *H. armigera* (Souza et al. 2017), e para ambos os trabalhos foi ressaltado que os derivados de Annonaceae foram tão ativo quando os inseticidas comerciais utilizados como controles positivos.

O extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* (ESAM) pode ser considerado como uma potencial ferramenta no manejo de lepidópteros desfolhadores na soja, principalmente em pequenas propriedades, considerando a simplicidade do preparo do mesmo e a disponibilidade da matéria-prima. Nossos resultados ampliam o conhecimento sobre a bioatividade do ESAM sobre insetos-praga, contibundo com os demais estudos que buscam a viabilidade da aplicação do inseticida botânico em menor escala ou em sistemas de produção de alimentos de base orgânica ou ecológica.

Referências

Alali FQ, Liu XX, Mclaughlin JL (1999) Annonaceous acetogenins: recent progress. J Nat Prod 62:504–540

Ansante TF, Ribeiro LP, Bicalho KU, Fernandes JB, Silva MFGF, Vieira PC, Vendramim JD (2015) Secondary metabolites from Neotropical Annonaceae: screening, bioguided fractionation, and toxicity to *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae). Ind Crops Prod 74:969–976

Baldin ELL, Lourenção AL, Schlick-Souza EC (2014) Outbreaks of *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) in common bean and castor bean in São Paulo State Brazil. Bragantia 73:458-461

Blessing LD, Ramos J, Diaz S, Ben AA, Bardon A, Brovotto M, Neske A (2012) Insecticidal properties of annonaceous acetogenins and their analogues. Interaction with lipid membranes. *Nat Prod Commun* 7:1215–1218

Bombasaro JA, Blessing LDT, Diaz S, Neske A, Suvire FD, Enriz RD, Rodríguez AM (2011) Theoretical and experimental study of the interactions of annonaceous acetogenins with artificial lipid bilayers. *J Mol Struct* 1003:87-91

Bortolotto OC, Pomari-Fernandes A, Bueno RCOF, Bueno AF, Kruz YKS, Queiroz AP, Ferreira RB (2015) The use of soybean integrated pest management in Brazil: a review. *Agronomy Science and Biotechnology* 1:25-32.

Busoli AC, Crosariol Netto J, Viana DL, Aguirre-Gil OJ, Rainho HL (2004) Manejo integrado de pragas: pesquisas, avanços e desafios. In: Busoli AC, Souza LA, Alencar JRCC, Fraga DF, Grigolli JFJ. (ed) *Tópicos em Entomologia Agrícola VII*, Jaboticabal, pp 309-330

Castillo LE, Jiménez JJ, Delgado MA (2010) Secondary metabolites of the Annonaceae, Solanaceae and Meliaceae families used as biological control of insects. *Trop Subtrop Agroecosyst* 12:445-462

Colom OÁ, Neske A, Popich S, Bardón A (2012) Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Pest Sci* 80:63-67

Demétrio CGB, Hinde J (1997) Half-normal plots and overdispersion. *Glim Newsl* 27:19–26

Fiaz M, Martínez LC, Costa MS, Cossolin JFS, Plata-Rueda A, Gonçalves WG, Sant'Ana AEG, Zanuncio JC, Serrão JE (2018) Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ecotoxicol Environ Safety* 156:1-8

Finney DJ (1971) *Probit analysis*. Cambridge University Press, Cambridge

Greenberg SM, Li YX, Liu TX (2010) Effect of age of transgenic cotton on mortality of lepidopteran larvae. *Southwest Entomol* 35:261–268

Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA (1976) Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J Econ Entomol* 69:487-488

Gupta A, Pandey S, Shah DR, Yadav JS, Seth NR (2011) Annonaceous acetogenins: the unrevealed area for cytotoxic and pesticidal activities. *Sys Rev Pharm* 2:104–109

Hinde J, Demétrio CGB (1998) Overdispersion: models and estimation. *Comput Stat Data Anal* 27:151–170

Isman MB (2000) Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot* 19:603–608

Isman MB (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu Rev Entomol* 51:45–66

ISAAA (2018) Executive summary - Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2018: Biotech Crops Continue to Help Meet the Challenges of Increased Population and Climate. Disponível em: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/54/>

Kogan M (1981) Dynamics of insect adaptations to soybean: impact of integrated pest management. *Environ Entomol* 10: 363-371

Kumar ARV, Jayadevi HC, Ashoka HJ, Chandrasekara K (2003) Azadiractin use efficiency in commercial neem formulations. *Curr Sci* 84:459-1464

Leatemia JA, Isman MB (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

Londerhausen M, Leicht W, Leib F (1991) Moeschler H. Molecular mode of action of annonins. *Pest Manag Sci* 33: 427

Luz PMC, Specht A, Paula-Moraes SV, Malaquias JV, Ferreira LFM, Otanásio PN, Diniz IR (2019) Owlet moths (Lepidoptera: Noctuoidea) associated with Bt and non-Bt soybean in the brazilian savanna. *Braz. J. Biol* 79:248-256.

Nelder JA, Wedderburn RWM (1972) Generalized linear models. *J R Stat Sci* 135:370–384

Rattan RS (2010) Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Prot* 29:913–920

R Development Core Team (2012) R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, pp 73–80

Ribeiro LP, Vendramim JD, Bicalho KU, Andrade MS, Fernandes JB, Moral RA, Demétrio CGB (2013) *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): a promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). *J Stored Prod Res* 55:6–14

Specht A, Paula-Moraes SV, Sosa-Gómez DR (2015) Host plants of *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae, Plusiinae). *Rev Bras Entomol* 59:343-345

Souza CM, Baldin ELL, Ribeiro LP, Silva IF, Morando R, Bicalho KU, Fernandes JB, Vendramim JD (2017) Lethal and growth inhibitory activities of Neotropical Annonaceae-derived extracts, commercial formulation, and an isolated acetogenin against *Helicoverpa armigera*. *J Pest Sci* 90:701-709

Tak JH, Jovel E, Isman MB (2016) Contact, fumigant, and cytotoxic activities of thyme and lemongrass essential oils against larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *J Pest Sci* 89:183–193

Togni PHB, Venzon M, Lagôa ACG, Sujii ER (2019) Brazilian Legislation Leaning Towards Fast Registration of Biological Control Agents to Benefit Organic Agriculture Neotrop. Entomol 48:175-185

Tolosa D, Hidalgo JR, Sal PE, 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 3:156–160

Zulin D, Ávila CJ, Schlick-Souza EC (2018) Population Fluctuation and Vertical Distribution of the Soybean Looper (*Chrysodeixis includens*) in Soybean Culture. American J Plant Sci 9:1544

Tabela 1. Mortalidade (% $\pm$ EP) e peso larval (mg) de lagartas de *Chrysodeixis includens* e de *Anticarsia gemmatalis* após 168 h de exposição ao meio artificial tratado com o extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* (ESAM, roliniastatina-1) e a bioinseticida comercial à base de limonoides (Azamax® 1,2 EC) na concentração de 1.000 mg L⁻¹ em condições de laboratório.

Tratamentos	<i>Chrysodeixis includens</i>		<i>Anticarsia gemmatalis</i>	
	Mortalidade (%) ¹	Peso larval (mg) ²	Mortalidade (%) ¹	Peso larval (mg) ²
ESAM ³	98,61 $\pm$ 0,88 a	1,27 $\pm$ 0,36 b	100,00 $\pm$ 0,00*	--
Azamax® 1,2 EC	81,25 $\pm$ 3,53 b	0,80 $\pm$ 0,29 b	100,00 $\pm$ 0,00*	--
Controle (acet:água, 1	6,94 $\pm$ 0,88 c	21,52 $\pm$ 3,06 a	12,50 $\pm$ 2,15	67,76 $\pm$ 3,93
Controle (água)	9,03 $\pm$ 1,67 c	25,88 $\pm$ 4,27 a	14,58 $\pm$ 3,18	75,15 $\pm$ 1,98
F	240,65	25,126	0,3001 ^{ns}	2,8241 ^{ns}
df	3,20	3,20	1,10	1,10
Valor de p	<0,0001	<0,0001	0,5958	0,1238

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 Médias 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 das sementes de *Annona mucosa*;

*Tratamento não incluído na análise (variância nula);

^{ns} Não significativo.

Tabela 2. Estimativa da CL₅₀ e CL₉₀ (mg L⁻¹) e intervalo de confiança do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* (ESAM, roliniastatina-1) incorporado em meio artificial sobre lagartas de *Chrysodeixis includens* e *Anticarsia gemmatalis* após 168 h de exposição.

Espécie	n ¹	Slope ± EP (<i>p</i> value)	LC ₅₀ (IC ²)	LC ₉₀ (IC ²)	χ ² (3)	g.l. ⁴	h ⁵
<i>Chrysodeixis includens</i>	576	3,93 ± 0,71 (<i>p</i> <0,0001)	452,38 (219,57 – 604,11)	885,70 (666,49 – 1.651,00)	0,92	3	0,82
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	576	1,89 ± 0,27 (<i>p</i> <0,0001)	66,91 (38,04 – 93,60)	288,36 (237,94 – 359,19)	7,93	3	2,64

¹ n: 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 3. Estimativa do tempo letal médio (TL₅₀, em horas) e intervalo de confiança do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* (Annonaceae) para lagartas de *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens* mantidas em meio artificial (1.000 mg L⁻¹).

Espécie	n ¹	Slope ± EP (<i>p</i> value)	TL ₅₀ (IC ²)	χ ² (3)	g.l. ⁴	h ⁵
<i>Chrysodeixis includens</i>	144	4,44 ± 0,24 (<i>p</i> <0,0001)	51,01 (46,21 – 55,59)	6,14	5	1,21
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	144	10,00 ± 1,23 (<i>p</i> <0,0001)	27,23 (25,96 – 28,80)	0,02	5	0,004

¹ n: 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 4. Mortalidade (% $\pm$ EP) de lagartas de *Chrysodeixis includens* e de *Anticarsia gemmatalis* após 168 h de exposição ao extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* (ESAM, roliniastatina-1), inseticida comercial botânico à base de limonoides (Azamax[®] 1,2 CE) e inseticida comercial a base de flubendiamida (Belt 480 SC) em folíolos de soja tratados em condições de semi-campo.

Tratamentos	<i>Chrysodeixis includens</i>			<i>Anticarsia gemmatalis</i>		
	Dose	Mortalidade ¹	E. C ²	Dose	Mortalidade ¹	E.C ²
ESAM ³	885,70 mg L ⁻¹	97,50 $\pm$ 2,63 a	97,28	288,36 mg L ⁻¹	98,33 $\pm$ 1,12 a	96,00
Azamax [®] 1,2 EC	1.000,00 mg L ⁻¹	95,00 $\pm$ 3,13 a	94,55	1.000,00 mg L ⁻¹	99,17 $\pm$ 0,83 a	99,04
Flubendiamida	240,00 mg L ⁻¹	100,00 $\pm$ 0,00*	100,00	96,00 mg L ⁻¹	100,00 $\pm$ 0,00*	100,00
Controle (água deionizada)		8,30 $\pm$ 2,64 b	-		9,17 $\pm$ 2,88 b	-
Controle (metanol/água, 1:10 (v/v) + Tween 80 [®] , 0.5 %)		8,00 $\pm$ 2,90 b	-		7,50 $\pm$ 2,79 b	-
<i>F</i>		512,76			177,90	
<i>df</i>		4,55			4,55	
<i>p</i>		<0,0001			<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);

³ ESAM: Extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa*.

CAPÍTULO 2 - Efeito deterrente alimentar e inibição do desenvolvimento larval de derivado botânico rico em acetogeninas sobre *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Erebidae) em testes laboratoriais e semi-campo

Resumo

Derivados de sementes de Annonaceae ricos em acetogeninas apresentam promissora atividade inseticida sobre diferentes insetos-praga de importância agrícola, porém os efeitos subletais desses compostos ainda são pouco explorados e compreendidos. Assim, a ação inibitória ao desenvolvimento e deterência alimentar do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* Jacq. (ESAM) em concentrações não letais (CL_{50}) previamente estimadas, foi avaliada sobre lagartas de *C. includens* ($CL_{50} = 452,38 \text{ mg L}^{-1}$) e *A. gemmatalis* ($CL_{50} = 66,91 \text{ mg L}^{-1}$) por meio de ensaios em condições de laboratório e semi-campo. Em laboratório foi constatado que o ESAM reduziu em mais de 90% a viabilidade larval, mas não ocasionou efeito deterrente alimentar em ambas as espécies expostas ao meio artificial tratado. Em condições de semi-campo, a emulsão aquosa do extrato etanólico de *A. mucosa* (ESAM pré-formulado, na CL_{50} previamente estimada) não causou mortalidade significativa após 72 h de exposição; no entanto, após 120 e 168 h foi observada mortalidade de 38 e 44 % de lagartas de *C. includens* e 27 e 39 % de lagartas de *A. gemmatalis*, respectivamente. Além disso, a presença do ESAM proporcionou uma significativa redução da taxa de desfolha de plantas de soja para ambas as espécies-praga após 120 e 168 h de exposição. Dessa forma, derivados de sementes de *A. mucosa*, ricos em acetogeninas, constituem uma alternativa importante para o manejo das duas principais espécies-praga desfolhadoras da cultura da soja no Brasil, especialmente para sistemas de cultivo de base orgânica ou ecológica.

Palavras-chave: Lagarta-falsa-medideira; lagarta-da-soja; anonáceas; inibição alimentar

Introdução

Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Erebidae) e *Chrysodeixis includens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) são consideradas as principais pragas desfolhadoras da cultura da soja no Brasil (Sosa-Gomes 2004; Panizzi 2013; Bel et al. 2017). Apesar de sua reconhecida polifagia e preferência por leguminosas (Fabaceae), intensos surtos populacionais de *C. includens* também vem sendo reportados, nos últimos anos em algodão, principalmente na região do cerrado brasileiro (Busoli et al. 2015). O uso de controle químico e plantas transgênicas expressando proteínas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) representam os principais métodos de controle para *C. includens* e *A. gemmatalis* nas lavouras do Brasil (Stacke et al. 2019, Luz et al. 2019).

Chrysodeixis includens é relacionada a reduções severas na área foliar e intenso dano econômico na cultura da soja, especialmente se a desfolha ocorrer durante o período reprodutivo da cultura, sendo esta mais tolerante aos métodos de controle convencionais em relação a *A. gemmatalis* (Moscardi et al. 2012, Specht et al. 2015; Luz et al. 2019). Além disso, o hábito da lagarta em ficar na região do “baixeiro” e no interior das plantas, resulta na necessidade de utilização de doses elevadas de produtos químicos para melhorar o controle (Degrande; Vivan 2008), sendo recentemente relatadas populações com alta frequência de resistência aos principais grupos de inseticidas disponíveis, incluindo piretroides e reguladores de crescimento (Stacke et al. 2019).

Os inseticidas botânicos têm sido amplamente investigados e considerados como valiosa ferramenta frente aos problemas recorrentes dos métodos convencionais de controle, principalmente em sistemas agrícolas de base orgânica ou ecológica (Castillo-Sánchez et al. 2010, Tak et al. 2015, Togni et al. 2019). Isso se deve ao fato de que na composição dos inseticidas botânicos se encontram misturas complexas de diferentes compostos bioativos, os quais tem contribuído para retardar o processo de evolução de populações resistentes (Kumar et al. 2003, Isman 2006, Isman 2014). Além disso, a possibilidade de produção dos derivados botânicos a partir de espécies nativas com alta disponibilidade de matéria-prima viabiliza sua aplicação em larga escala (Isman e Seffrin, 2014; Ribeiro et al. 2016).

As sementes obtidas de frutos maduros de *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae), espécie nativa da região Neotropical, são consideradas como importante fonte de derivados bioativos passíveis de serem utilizados na produção de inseticidas botânicos no Brasil (Isman e Seffrin 2014; Ribeiro et al. 2014; Ribeiro et al.

2016). O extrato etanólico bruto preparado a partir de sementes de *A. mucosa* (ESAM) é composto por uma mistura de alcaloides, triglicerídeos e acetogeninas de estruturas químicas diversificadas, sendo sua toxicidade relacionada principalmente a presença da acetogenina majoritária bis-tetrahidrofurânica roliniastatina-1 (Ansante et al. 2015, Souza et al. 2017), o qual pode ser utilizado como marcador químico para o controle de qualidade das formulações a serem desenvolvidas. De modo geral, as acetogeninas atuam como inibidores do complexo I (NADH: ubiquinona oxidoreductase) do sistema de transporte de elétrons mitocondrial (Lewis et al. 1993; Gupta et al. 2011). No entanto, estudos recentes demonstram diferentes mecanismos de ação em insetos expostos as concentrações subletais, principalmente no sistema digestório dos insetos-alvo (Costa et al. 2016, Fiaz et al. 2018).

Além da toxicidade letal, efeitos subletais de derivados de anonáceas vêm sendo reportados para diferentes espécies de lepidópteros-praga, como *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) (Leatemia e Isman et al. 2004), *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (Ribeiro et al. 2014), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (Ribeiro et al. 2016), *A. gemmatalis* (Fiaz et al. 2018) e *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (Souza et al. 2019). Desta forma, o presente estudo avaliou, através de ensaios conduzidos em condições de laboratório e semi-campo, os efeitos do ESAM no comportamento alimentar e em parâmetros biológicos das lagartas *C. includens* e *A. gemmatalis* em laboratório e casa de vegetação.

Material e Métodos

Coleta do material vegetal e preparação do extrato etanólico bruto

Sementes de *A. mucosa* foram obtidas de exemplares cultivados em Piracicaba, SP, Brasil (22° 42'28"S;47°37'59"W; elevação: 534 m), e posteriormente encaminhadas para o Prof. Dr. Renato Mello-Silva (Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da USP), visando à identificação botânica. A respectiva exsicata se encontra depositada no Herbário do ESA do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP.

Para a preparação do extrato, as sementes foram desidratadas em forno a 40° C por um período de 48 a 72h. Posteriormente, o material foi moído em moinho de facas para a obtenção de um pó fino o qual foi armazenado em recipientes de vidro herméticos e mantidos em freezer doméstico (-10° C) até o uso.

Para obtenção do extrato orgânico, foi feita a maceração a frio em solvente etanol na proporção de 5:1 (p/v), sendo o pó fino mantido em repouso no solvente por três dias, sendo, posteriormente filtrado através de papel filtro. A torta restante foi ressubmetida ao solvente etanol, e esse processo foi repetido por três vezes. O solvente da solução foi eliminado em rotaevaporador a 50° C e à pressão de -600 mmHg, sendo determinado o rendimento de extração da espécie (27,81%).

Insetos testados

Os insetos utilizados foram provenientes de criação de laboratório ($T = 25 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. = $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo = 14h), sendo as lagartas mantidas em dieta artificial (Greene et al. 1976) e os adultos alimentados com solução de água + mel a 10% (p/p).

Bioensaios

Os ensaios laboratoriais foram conduzidos sob condições controladas, enquanto que os bioensaios com plantas de soja foram realizados em casa de vegetação sob condições de temperatura e umidade semi-controladas durante o mês de dezembro de 2016, na Fazenda Experimental Lageado, Faculdade de Ciências Agrônômicas, em Botucatu, São Paulo, Brasil ($22^\circ 51'S$, $48^\circ 26'W$ e altitude de 770 m).

Bioensaios laboratoriais

Efeito do ESAM sobre aspectos biológicos de duas espécies de lepidópteros-praga da soja

O efeito do ESAM sobre aspectos biológicos de *C. includens* e de *A. gemmatilis* foi avaliado na CL_{50} previamente estimada para as duas espécies-praga (452,38 e 66,91 mg kg^{-1} , respectivamente), por meio de exposição ao meio artificial tratado. Para isso, o extrato foi inicialmente solubilizado em uma solução de solventes orgânicos [acetona:água, 1:3, v/v], na proporção de 5 mL de solução para cada 300 g de meio artificial, de acordo com o método descrito por Ansante et al. (2015). Dada a termoinstabilidade dos compostos naturais presentes no derivado em teste, o extrato solubilizado foi adicionado ao meio artificial somente quando a temperatura atingiu 50°C . Como controle negativo foi utilizada a solução de solventes [acetona:água, 1:3, v/v] empregada na solubilização do extrato.

Após a incorporação dos tratamentos ao meio artificial, estes foram depositados individualmente em recipientes plásticos (22 cm × 14 cm), onde foram mantidos por um período de 24 horas para que ocorresse o resfriamento do meio, bem como a evaporação dos solventes usados na solubilização. Após esse período, os meios foram fracionados em cubos de aproximadamente 4 cm³ (cerca de 15 mL), os quais foram depositados individualmente em recipientes plásticos (100 mL) com tampa. Cada recipiente foi infestado com uma lagarta neonata (até 24 horas de idade).

As lagartas foram mantidas nos copos plásticos (unidades experimentais) até a formação de pupas, que foram acondicionadas em placas de Petri de poliestireno (96 mm Ø × 21 mm altura), onde permaneceram até a emergência do adulto. As variáveis avaliadas foram mortalidade diária, duração das fases larval e pupal, peso de pupas com 24 horas e porcentagem de pupas e adultos defeituosos.

Os ensaios foram conduzidos separadamente por espécie-praga alvo, sendo, em ambos os casos, adotado o delineamento inteiramente casualizado, contendo 12 repetições por tratamento. Cada repetição foi constituída por 10 recipientes plásticos, totalizando 120 lagartas expostas por tratamento (n= 120).

Efeito deterrente alimentar do ESAM para duas espécies de lepidópteros-praga

A atividade deterrente alimentar do ESAM foi avaliada através da incorporação do mesmo em meio artificial em concentrações subletais (CL₂₅ e CL₅₀) previamente estimadas, ou seja, 276,55 e 452,38 mg kg⁻¹ para lagartas de *C. includens* e de 22,95 e 66,91 mg kg⁻¹ para lagartas de *A. gemmatilis*.

Os procedimentos de incorporação dos tratamentos foram os mesmos descritos anteriormente. Após a preparação e solidificação, o meio artificial tratado com os referidos tratamentos foi cortado em pedaços de dimensões aproximadas de 1,5 cm × 1,5 cm, individualmente pesados e acondicionados em placas de Petri (9 cm de diâmetro × 2 cm de altura) contendo papel filtro umedecido ao fundo. Cada placa foi infestada com uma lagarta de terceiro ínstar das respectivas espécies e os ensaios conduzidos separadamente por espécie-praga alvo.

A possível perda de água do meio artificial foi verificada por meio de alíquotas de 10 pedaços inteiros que foram pesados no início e no final do experimento para ajuste da umidade. Foi adotado o delineamento inteiramente casualizado com 20 repetições por tratamento (n= 20). Os pedaços de meio artificial tratado oferecidos às

lagartas foram pesados após 24 h da infestação, sendo o consumo determinado pela diferença entre o peso inicial e o peso final.

Bioensaio em condições de semi-campo

A atividade inseticida do ESAM em concentração subletal (CL_{50}), sobre *C. includens* ($CL_{50} = 452,38 \text{ mg L}^{-1}$) e *A. gemmatilis* ($CL_{50} = 66,91 \text{ mg L}^{-1}$), foi avaliada em condição de semi-campo em plantas de soja com 72, 120 e 168 h de infestação. Para isso, uma emulsão aquosa (pré-formulação) foi preparada por meio de uma solução de solventes orgânicos [acetona:água (1:3, v/v) (100 g L^{-1})], adicionando-se posteriormente o emulsificante Tween[®] 80 à concentração de 10 g L^{-1} .

O ensaio em casa de vegetação foi realizado em plantas de soja com 30-45 dias. As plantas foram cultivadas em vasos de 5 L contendo solo e substrato (Plantmax[®]) na proporção de 3:1 (v/v) e 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 $0,5 \text{ kgf cm}^{-2}$. A pulverização foi realizada até o ponto de escorrimento e, após a secagem dos resíduos, o primeiro trifólio totalmente expandido foi infestado com 10 lagartas neonatas oriundas da criação mantida em laboratório. Posteriormente, foi acoplada uma gaiola confeccionada de tecido fino (voil) sobre os trifólios infestados, a fim de evitar a fuga dos insetos.

O delineamento adotado foi inteiramente casualizado, sendo cada tratamento foi constituído por 10 plantas de soja para cada período de infestação avaliado (72, 120 e 168h), com 6 repetições por tratamento ($n = 60$). Durante o ensaio, as plantas infestadas permaneceram acondicionadas sobre bancadas em casa de vegetação. A mortalidade e a taxa de desfolha foram determinadas para cada período de infestação, sendo a desfolha quantificada por meio do aplicativo BioLeaf (Machado et al. 2016). As lagartas expostas foram consideradas mortas quando não apresentaram nenhum tipo de reação após serem levemente tocadas com pincel fino.

Análises estatísticas

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 and 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`. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software estatístico “R”, versão 2.15.1 (R Development Core Team 2012).

As curvas de sobrevivência larval foram analisadas pelo método Kaplan-Meier, por meio do modelo de regressão paramétrico com distribuição Weibull, sendo a comparação entre os tratamentos realizada pelo teste de log-rank, a análise foi realizada utilizando o software SigmaPlot Versão 11.0 (Systat Software 2008).

Resultados

Inibição do desenvolvimento e efeito deterrente alimentar do ESAM em testes laboratoriais

Na CL_{50} previamente estimada, ESAM ocasionou a mortalidade total de lagartas de *C. includens* (Tabela 1, Fig 1) um valor superior a 90% de lagartas de *A. gemmatalis* expostas ao meio artificial durante 168 h (Tabela 1, Fig 2). A duração do período larval de foi de aproximadamente 11 dias para ambas as espécies (Fig 1, Fig 2).

Independentemente da concentração testada (CL_{25} e CL_{50} previamente estimadas), não houve diferença significativa no consumo do meio artificial tratado por lagartas de terceiro ínstar de *C. includens* ($F = 0,881$, $P = 0,419$) (Tabela 2) e *A. gemmatalis* ($F = 1,545$, $P = 0,228$) (Tabela 2) expostas ao meio artificial tratado em comparação ao controle negativo, após 24 horas de exposição.

Mortalidade larval e taxa de desfolha de duas espécies de lepidópteros-praga expostas ao ESAM: bioensaio em condições de semi-campo

Na concentração equivalente a CL_{50} previamente estimada, ESAM não ocasionou mortalidade significativa de lagartas de *C. includens* ($F = 0,322$, $P = 0,582$) (Tabela 3) e de *A. gemmatalis* ($F = 0,102$, $P = 0,756$; Tabela 3) após 72 h de exposição em condições de casa de vegetação. No entanto, foi verificado que o extrato ocasionou mortalidade significativa em ambas as espécies após 120 (*C. includens*, $F = 35,58$, $P < 0,0001$; *A. gemmatalis*, $F = 35,71$ $P < 0,0001$, Tabela 3) e 168 h (*C. includens*, $F =$

64,28, $P < 0,0001$; *A. gemmatilis*, $F = 47,87$, $P < 0,0001$; Tabela 3) de exposição a trifólios de soja tratados.

Com relação a taxa de desfolha, também não foi constatada diferença significativa entre o ESAM e o controle após 72 h de exposição para ambas as espécies (*C. includens*, $F = 0,681$, $P = 0,415$; *A. gemmatilis*, $F = 0,299$, $P = 0,588$; Tabela 4). As lagartas de *C. includens* e *A. gemmatilis* ocasionaram desfolha significativamente menor nos folíolos tratados com ESAM após 120 (*C. includens*, $F = 59,17$, $P < 0,0001$; *A. gemmatilis*, $F = 60,71$, $P < 0,0001$; Tabela 4) e 168 h (*C. includens*, $F = 118,3$, $P < 0,0001$; *A. gemmatilis*, $F = 470,2$, $P < 0,0001$; Tabela 4) de exposição aos trifólios de soja tratados.

Discussão

A compreensão do efeito das concentrações subletais é fundamental para a implementação de novos compostos no manejo de pragas, uma vez que tais fatores podem afetar a fisiologia e o comportamento do inseto-alvo (Müller, 2018; Margus et al. 2019), bem como representar um fator agravante na evolução da resistência de insetos a inseticidas (Greesel et al. 2011, Casida e Durkin 2013, Nansen et al. 2016, Guedes et al. 2017. Margus et al. 2019). A atividade de acetogeninas em concentrações subletais vem sendo associada a disfunções fisiológicas no intestino médio dos insetos expostos, interferindo de maneira negativa no transporte e absorção de nutrientes, conduzindo a alterações significativas no desenvolvimento e mortalidade larval (Fiaz et al. 2018). Em nossos estudos, ESAM ocasionou mortalidade larval acima de 90% para lagartas de *C. includens* e *A. gemmatilis* após 10 dias de exposição ao meio artificial tratado. Em estudo semelhante, foi relatada uma taxa de mortalidade de 90% em lagartas de *A. gemmatilis* expostas a concentrações 37,14 mg L⁻¹ (= CL₅₀) até 72 h de exposição (Fiaz et al. 2018). Além disso, foram observadas reduções de aproximadamente 60% da viabilidade em lagartas de *S. frugiperda* (Ribeiro et al. 2016) e 37% em lagartas de *H. armigera* (Souza et al. 2019) expostas ao meio tratado com o ESAM nas concentrações letais medianas estimadas para as respectivas espécies-praga.

Nossos resultados demonstraram que o ESAM não causa alterações significativas no comportamento alimentar de lagartas de terceiro ínstar de *C. includens* e de *A. gemmatilis* após 24 h de exposição. A ausência do efeito deterrente alimentar constatada em nossos ensaios destacam a atividade do ESAM em doses

não letais, uma vez que a atividade deterrente alimentar é relacionada com a redução da eficácia do manejo após períodos contínuos de exposição através da tolerância dos insetos-alvo aos compostos (Isman, 2002). Em estudo semelhante, ao avaliar o comportamento alimentar de lagartas de *H. armigera* não foi observada diferença significativa entre os intervalos exposição de 6, 12, 18 e 24 h ao meio artificial tratado com o ESAM, não sendo observada redução no consumo nos diferentes períodos avaliados (Souza et al. 2019). No entanto, foi observado redução de aproximadamente 29% na conversão de alimentos, o que resultou na redução de 86% no peso das lagartas expostas (Souza et al. 2019). Além disso, em estudo avaliando o efeito de acetogeninas isoladas sobre o consumo de lagartas de *S. frugiperda* de segundo ínstar após 24 h de exposição, também não foi observada diferença entre o consumo de lagartas expostas a meio artificial tratado com acetogeninas e o lagartas expostas a meio artificial não tratado (Álvarez-Colom et al. 2007).

Em condições de semi-campo, lagartas de *C. includens* e *A. gemmatilis* expostas a folíolos de soja tratados com o ESAM reduziram a taxa de desfolha de maneira significativa a partir de 72 h de exposição. Sendo assim, embora o ESAM não apresente efeito deterrente alimentar, nossos resultados sugerem que sua bioatividade esteja relacionada à toxicidade pós-ingestão, podendo ser observada em testes de longo prazo (> 24 h) (Isman, 2002). Além disso, a mortalidade das lagartas de *C. includens* e *A. gemmatilis* expostas a folíolos de soja tratados com o ESAM também só foi observada de maneira significativa a partir de 72 h de exposição. Em estudos semelhantes, foi observado que o extrato etanólico de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) na menor concentração avaliada (7,5%) reduziu de maneira significativa a viabilidade de lagartas de terceiro ínstar de *P. xylostella* após 72 h de exposição, sendo que em maiores concentrações (15% e 30%) foi observada uma redução na mortalidade dos indivíduos nos períodos de 48 e 72 h, respectivamente (Laetemia e Isman 2004). Em estudo recente, foram observadas mortalidades de 30 (CL₂₅), 70 (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) em populações de lagartas de terceiro ínstar de *A. gemmatilis* após 72 h de exposição (Fiaz et al. 2018). Os mesmos autores também relataram alterações fisiológicas no intestino médio de lagartas de *A. gemmatilis* expostas a diferentes concentrações da acetogenina isolada esquamocina. Os autores observaram concentrações significativas de vacúolos autofágicos no intestino médio de lagartas de *A. gemmatilis* a partir da CL₅₀ testada, após 72 h de exposição,

o que justifica a bioatividade de derivados de Annonaceae em dosagens subletais sobre insetos-praga (Fiaz et al. 2018).

Embora o efeito subletal seja pouco abordado, seu conhecimento é fundamental devido suas possíveis consequências na resistência de insetos a inseticidas, bem como na dinâmica populacional dos insetos (Guedes et al. 2017; Margus et al. 2019). Considerando-se que insetos-praga podem ser expostos a níveis subletais em função da degradação do inseticida por fatores abióticos (luz solar, chuva ou temperatura) (Desneux et al. 2015), o conhecimento da atividade subletal em inseticidas derivados botânicos é de extrema importância uma vez que eles são menos persistentes no ambiente em relação aos inseticidas sintéticos (Isman 2014). Nossos resultados demonstram a promissora atividade do ESAM em concentrações não letais, sugerindo a ausência de atividade no comportamento alimentar, bem como alta taxa de mortalidade larval (>90%), resultando possivelmente na redução da progênie. Além disso, *A. mucosa* é comumente cultivada no Brasil, sendo configurada como matéria-prima abundante e de fácil acesso, o que torna viável a produção em pequena e média escala suprimindo um maior número de aplicações e tentando manter o equilíbrio ecológico.

Referências

Álvarez-Colom, O., S. Neske, S. Popich e A. Bardón. 2007. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Pest. Sci. 80: 63-67.

Ansante, T. F., L. P. Ribeiro and J. D. Vendramim. 2015. Secondary metabolites from Neotropical Annonaceae: Screening, bioguided fractionation, and toxicity to *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Ind. Crops Prod. 74: 969-976.

Bel, Y., J. J. Sheets, S. Y. Tan, K. E. Narva and B. Escriche. 2017. Toxicity and binding studies of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac, Cry1F, Cry1C, and Cry2A proteins in the soybean pests *Anticarsia gemmatilis* and *Chrysodeixis (Pseudoplusia) includens*. Appl. Environ. Microbiol. 83: e00326-17.

Bortolotto, O. C., A. Pomari-Fernandes, R. D. F. Bueno, A. D. F. Bueno, A. Queiroz, A. Sanzovo, and R. Ferreira. 2015. The use of soybean integrated pest management in Brazil: A review. *Agron. Sci. Biotech.* 1: 25–32.

Busoli, A. C., F. F. Pereira, V. G. A. Lopez, J. J. Soares, R. S. Melo and C. A. Almeida. 2004. Preferência alimentar do bicudo-do-algodoeiro por frutos de diferentes cultivares e idades. *Pesq. Agropecu. Bras.* 39: 101-104.

Casida, J. E., Durkin, K. A. 2013. Neuroactive insecticides: Targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu. Rev. Entomol.* 58: 99–117.

Céleres. 2017. 3rd follow-up on agricultural biotechnology adoption for the 2016/17 crop. (<http://www.celeres.com.br/3o-levantamento-de-adocao-dabiotecnologia-agricola-no-brasil-safra-201617/>)

Costa, S. M., S. O. Paula, G. F. Martins, J. C. Zanuncio, A. E. G. Santana and J. E. Serrão. 2016. Multiple modes of action of the squamocin in the midgut cells of *Aedes aegypti* larvae. *PloS One* 11: e0160928.

Demétrio, C. G. B. and J. Hinde. 1997. Half-normal plots and overdispersion. *GLIM Newsletter* 27: 19-26.

Desneux, N., Fauvergue, X., Dechaume-Moncharmont, F.X., Kerhoas, L., Ballanger, Y. and Kaiser, L., 2005. *Diaeretiella rapae* limits *Myzus persicae* populations after applications of deltamethrin in oilseed rape. *J Econ Entomol.* 98: 9-17.

Dowd, P. F., and T. C. Sparks. 1986. Characterization of a trans-permethrin hydrolyzing enzyme from the midgut of the soybean looper, *Pseudoplusia includens*. *Pest. Biochem. Physiol.* 25: 73–81.

Fiaz, M., Martíneza, L. C., Costa, M. S., Cossolin, J. F. S., Plata-Rueda, A., Gonçalves, W. G., Sant’Ana, A. E. G., Zanuncio, J. C., Serrão, J. E. 2018.

Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 156: 1-8.

Greene, G. L., N. C. Leppla and W. A. Dickerson. 1976. Velvetbean caterpillar: A rearing procedure and artificial medium. *J. Econ. Entomol.* 69: 487-488.

Gressel J. 2011. Low pesticide rates may hasten the evolution of resistance by increasing mutation frequencies. *Pest Manag. Sci.* 67: 253–257.

Guedes, R. N. C., Walse, S. S., Throne, J. E. 2017. Sublethal exposure, insecticide resistance, and community stress. *Insect Sci.* 21: 47–53.

Hinde, J. and C. G. B. Demétrio. 1998. Overdispersion: Models and estimation. *Comput. Stat. Data. An.* 27: 151-170.

Isman M. B. and R. Seffrin. 2014. Natural insecticides from the Annonaceae: a unique example for developing biopesticides. In: *Advances in plant biopesticides*. 21-33

Kumar, A. R. V., H. C. Jayadevi, H. J. Ashokaand K. Chandrasekara. 2003. Azadiractin use efficiency in commercial neem formulations. *Curr. Sci.* 84: 1459-1464.

Leatemala, J. A. and M. B. Isman. 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., J. T. Arnason, B. J. R. Philogene, J. K. Rupprecht, and J. L. McLaughlin. 1993. Inhibition of respiration at site I by asimicin, an insecticidal acetogenin of the pawpaw, *Asimina triloba* (Annonaceae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 45: 15-23.

Luz, P. M. C., Specht, A., Paula-Moraes, S. V., Malaquias, J. V., Ferreira, L. F. M., Otanásio P. N., Diniz, I. R. 2019. Owlet moths (Lepidoptera: Noctuoidea) associated with Bt and non-Bt soybean in the brazilian savanna. *Braz. J. Biol* 79: 248-256.

Machado, B. B., Orue, J. P., Arruda, M. S., Santos, C. V., Sarath, D. S., Goncalves, W. N., Silva, G. G., Pistori, H., Roel, A. R., Rodrigues-Jr, J. F. 2016. BioLeaf: A professional mobile application to measure foliar damage caused by insect herbivory. *Comput Electron Agric* 129: 44-55.

Margus, A., Piironen, S., Lehmann, P., Santtu, T., Karvanen, J., Lindström L. 2019. Sublethal Pyrethroid Insecticide Exposure Carries Positive Fitness Effects Over Generations in a Pest Insect. *Sci Rep.* 1: 10-1.

Moscardi, F., Bueno, A.F., Sosa-Gómez, D.R., Roggia, S., Hoffmann Campo, C.B., Pomari, A.F., Corso, I.C. and Yano, S.A.C. 2012. Capítulo 4 - Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: Hoffmann-Campo, C.B., Correa-Ferreira, B.S. and Moscardi, F. eds. *Soja - manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga*. Brasília: Embrapa, pp. 213-334.

Müller, C. 2018. Impacts of sublethal insecticide exposure on insects - Facts and knowledge gaps. *Basic. Appl. Ecol.* 30: 1-10.

Nansen, C., Baissac, O., Nansen, M., Powis, K., Baker, G. 2016. Behavioral avoidance will physiological insecticide resistance level of insect strains affect their oviposition and movement responses. *PLoS Genet.* 11: e0149994.

Nelder, J. A. and R. W. M. Wedderburn. 1972. Generalized linear models. *J. R. Stat. Soc.* 135: 370-384.

Panizzi, A. R. 2013. History and contemporary perspectives of the integrated pest management of soybean in Brazil. *Neotrop. Entomol.* 42: 119-127.

R Development Core Team. 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. 73-80.

Ribeiro, L. P., T. F. Ansante, and J. D. Vendramim. 2016. Efeito do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* no desenvolvimento e comportamento alimentar de *Spodoptera frugiperda*. *Bragantia* 75: 322-330.

Ribeiro, L. P., A. Yasmin, J. D. Vendramim and M. B. Isman. 2014. Comparative bioactivity of selected seed extracts from Brazilian *Annona* species and and acetogenin-based commercial bioinsecticide against *Trichoplusia ni* and *Myzus persicae*. Crop. Prot. 62: 100-106.

Systat Software Inc. 2008. SigmaPlot 11 for Windows version 11.0. Statistics for user's guide. Chicago, Systat Software Inc. 578 p.

Sorgatto, R. J., Bernardi, O., Omoto, C. 2015 Survival and development of *Spodoptera frugiperda* and *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) on Bt cotton and implications for resistance management strategies in Brazil. Environ. Entomol .44: 186-192.

Sosa-Gómez, D. R. and C. Omoto. 2013. Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja. Soja: Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-Praga. 673-723.

Souza, C. M., E. L. L. Baldin, L. P. Ribeiro, I. F. Silva, R. Morando, K. U. Bicalho, J. B. Fernandes, and J. D. Vendramim. 2017. Lethal and growth inhibitory activities of Neotropical Annonaceae-derived extracts, commercial formulation, and an isolated acetogenin against *Helicoverpa armigera*. J. Pest. Sci. 90: 701-709.

Souza, C. M., E. L. L. Baldin, L. P. Ribeiro, T. L. B. Santos, I. F. Santos, R. Morando and J. D. Vendramim. 2019. Antifeedant and growth inhibitory effects of Annonaceae derivatives on *Helicoverpa armigera* (Hübner). Crop. Prot. 121: 45-10.

Stacke, R. F., T. Giacomelli, E. S. Bronzatto, S. A. Halberstadt, C. G. Garlet, D. S. Muraro, J. V. C. Guedes, and O. Bernardi. 2019. Susceptibility of Brazilian populations of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) to selected insecticides. J. Econ. Entomol. 112: 1378–1387.

Togni, P. H. B., Venzon, M., Lagôa, A. C. G., Sujii, E. R. 2019. Brazilian legislation leaning towards fast registration of biological control agents to benefit organic Agriculture Neotrop. Entomol. 48:175-185.

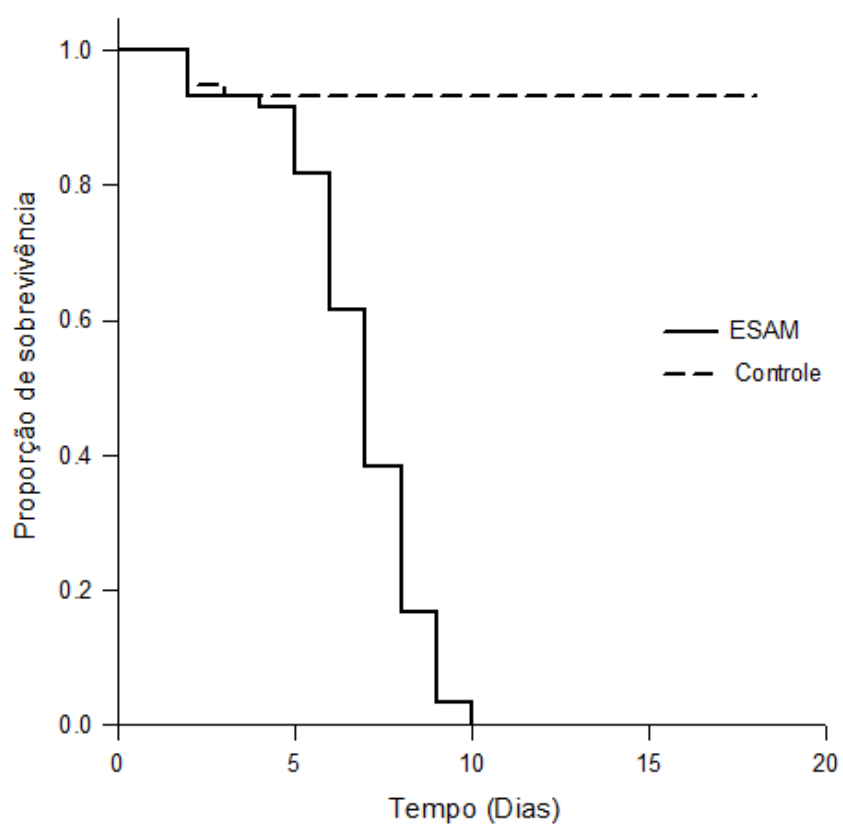


Fig. 1. Curva de sobrevivência (Kaplan-Meier) de lagartas de *Chrysodeixis includens* mantidas em meio artificial contendo o extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* (ESAM) na concentração equivalente a CL_{50} ($452,32 \text{ mg kg}^{-1}$) previamente estimada.

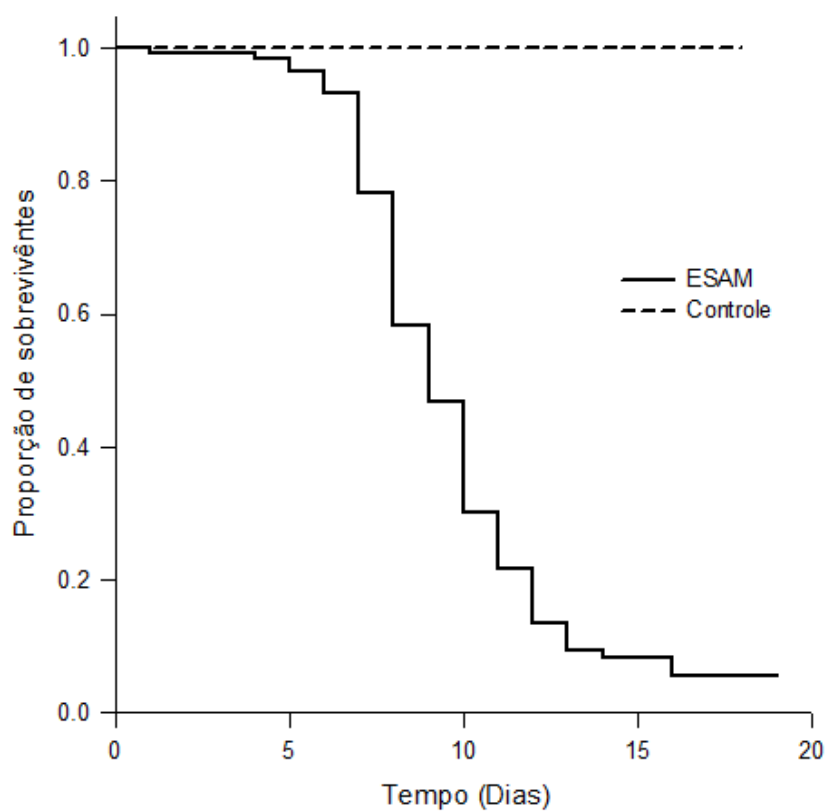


Fig. 2. Curva de sobrevivência (Kaplan-Meier) de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* mantidas em meio artificial contendo o extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* (ESAM) na concentração equivalente a CL_{50} ($66,91 \text{ mg kg}^{-1}$) previamente estimada.

Tabela 1. Viabilidade e duração da fase larval de *C includens* (CL₅₀ = 452,38) e *A. gemmatalis* (CL₅₀ = 276,55) mantida em meio artificial com o extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* (ESAM).

Tratamentos	<i>Chrysodeixis includens</i>		<i>Anticarsia gemmatalis</i>	
	Viabilidade (%) ¹	Duração (dias) ¹	Viabilidade (%) ¹	Duração (dias) ²
ESAM (=CL ₅₀)	0,00 ± 0,00*	0,00 ± 0,00*	7,50 ± 2,18	8,92 (9)
Controle (acet:água)	93,33 ± 0,57	14,60 ± 0,28	100,00 ± 0,00*	12,99 ± 0,10
<i>F</i>	-	-	-	-
<i>df</i>	-	-	-	-
Valor de <i>p</i>	-	-	-	-

¹ Não avaliados (variância nula)

² Dados não analisados devido a pequena unidade amostral. O valor entre parêntesis representa o número de lagartas sobreviventes nos referidos tratamentos.

Tabela 2. Consumo (médias $\pm$ EP) de lagartas de terceiro ínstar de *Chrysodeixis includens* e *Anticarsia gemmatalis* após 24 h de exposição ao meio artificial tratado com o extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* (ESAM).

Tratamentos	<i>Chrysodeixis includens</i> Consumo (g) ^{ns}	<i>Anticarsia gemmatalis</i> Consumo (g) ^{ns}
ESAM (= CL ₅₀)	0,131 $\pm$ 0,007	0,103 $\pm$ 0,006
ESAM (= CL ₂₅)	0,126 $\pm$ 0,005	0,119 $\pm$ 0,005
Controle (acet: água)	0,137 $\pm$ 0,004	0,117 $\pm$ 0,008
<i>F</i>	0,881	1,545
df	2,42	2,42
Valor de <i>p</i>	0,419	0,228

^{ns}Diferença não significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição Gaussiana, $p < 0,05$)

Tabela 3. Mortalidade (% $\pm$ EP) de lagartas de *Chrysodeixis includens* (CL₅₀ = 452,38 mg L⁻¹) e *Anticarsia gemmatalis* (CL₅₀ = 66,91 mg L⁻¹) expostas a folíolos de soja tratados com a emulsão aquosa do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* (ESAM pré-formulado), após 72, 120 e 168 h de exposição em teste de semi-campo.

Tratamentos	<i>Chrysodeixis includens</i>			<i>Anticarsia gemmatalis</i>		
	72 ^{ns}	120 ¹	168 ¹	72 ^{ns}	120 ¹	168 ¹
ESAM (= CL ₅₀)	12,2 $\pm$ 0,25	37,7 $\pm$ 0,31 a	44,2 $\pm$ 0,34 a	8,89 $\pm$ 1,62	26,67 $\pm$ 1,72 a	38,89 $\pm$ 0,34 a
Controle (acet:água (1:3, v/v) + Tween 80®, 0,5 %))	10,0 $\pm$ 0,27	13,3 $\pm$ 0,23 b	12,2 $\pm$ 0,14 b	7,78 $\pm$ 1,18	4,44 $\pm$ 1,28 b	5,56 $\pm$ 1,54 b
<i>F</i>	0,322 ^{ns}	35,58	64,28	0,102	35,71	47,87
<i>df</i>	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10
Valor de <i>p</i>	0,582	<0,001	<0,0001	0,756	<0,001	<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, $p < 0,05$);

^{ns} Diferença não significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial, $p < 0,05$);

Tabela 4. Desfolha (% $\pm$ EP) ocasionada por lagartas de *Chrysodeixis includens* (CL_{50} = 452,38 mg L⁻¹) e *Anticarsia gemmatalis* (CL_{50} = 66,91 mg L⁻¹) expostas a folíolos de soja tratados com a emulsão aquosa do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* (ESAM pré-formulado), após 72, 120 e 168 h de exposição em teste de semi-campo.

Tratamentos	<i>Chrysodeixis includens</i>			<i>Anticarsia gemmatalis</i>		
	72 ^{ns}	120 ¹	168 ¹	72 ^{ns}	120 ¹	168 ¹
ESAM (= CL_{50})	0,13 $\pm$ 0,03	0,74 $\pm$ 0,10 a	5,18 $\pm$ 0,36 a	1,72 $\pm$ 0,29	3,26 $\pm$ 0,35 a	7,11 $\pm$ 0,26 a
Controle (acet:água) (1:3, v/v) + Tween 80®, 0,5 %))	0,17 $\pm$ 0,04	1,79 $\pm$ 0,09 b	9,82 $\pm$ 0,20 b	2,00 $\pm$ 0,39	10,31 $\pm$ 0,36 b	18,07 $\pm$ 0,39 b
<i>F</i>	0,681 ^{ns}	59,17	118,3	0,299	60,71	470,2
<i>df</i>	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34
Valor de <i>p</i>	0,415	<0,0001	<0,0001	0,588	<0,0001	<0,0001

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

^{ns} Diferença não significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição Gaussiana, $p < 0,05$);

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A agricultura intensiva, associada ao uso abusivo de inseticidas sintéticos, tem sido relacionada a sérios impactos ecológicos. Nos últimos anos, diversos estudos foram conduzidos a fim de obter opções alternativas aos inseticidas sintéticos no manejo sustentável de pragas. Sendo assim, muitas espécies botânicas vêm demonstrado sua promissora atividade inseticida; podendo ser utilizadas por meio de extratos brutos ou da extração de seus compostos majoritários para a confecção de novos derivados inseticidas.

Provenientes da família Annonaceae, os derivados das sementes de espécies tropicais do gênero *Annona* são considerados potenciais candidatos à produção de inseticidas botânicos a serem utilizados para proteção de lavouras no Brasil e sua bioatividade tem sido relatada em diversos estudos sobre diferentes insetos-praga na última década. Em nosso estudo, o extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* (ESAM) apresentou promissora atividade inseticida letal sobre lagartas de *C. includens* e *A. gemmatilis*, ocasionando mortalidade superior ao inseticida botânico à base de limonóides Azamax® 1.2 E. C e semelhante ao inseticida comercial de origem sintética à base de flubendiamida Belt® 480 SC em condições de laboratório e semi-campo.

A atividade de acetogeninas em concentrações não letais vem sendo associada a distúrbios no intestino médio dos insetos expostos, afetando o transporte e absorção de nutrientes dos insetos expostos. Neste trabalho, ESAM em concentração não letal afetou a viabilidade de lagartas de *C. includens* e *A. gemmatilis* expostas; no entanto, não apresentou efeito deterrente alimentar. Contudo, foi verificada a redução do consumo de ambas as espécies após 72 h de exposição a folíolos de soja tratados, sugerindo o efeito pós ingestão do extrato.

A promissora bioatividade do ESAM demonstrada em nosso trabalho associada à abundância de matéria-prima e facilidade de obtenção do extrato (maceração em etanol) a baixo custo destacam o potencial de derivados da família Annonaceae como potencial ferramenta no manejo integrado de insetos-praga em pequena e média escala.

REFERÊNCIAS

- ALFORD, A. R.; HAMMOND-JUNIOR, A. M. Plusiinae (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Louisiana soybeans ecosystems as determined with looplurebaited traps. **Journal of Economic Entomology**, v. 75, p. 647-650, 1982.
- ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 504–540, 1999.
- ÁLVAREZ, O.; BARRACHINA, I.; AYALA, I.; GONCALVEZ, M.; MOYA, P.; NESKE, A. Y.; BARDÓN, A. Toxic effects annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. **Journal Pesticide Science**, Tokyo, v. 81, n. 2, p. 85-89, 2008.
- ANDOW, D. A. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews**, v. 4, p. 142–199, 2008.
- ANSANTE, T. F.; RIBEIRO, L. P.; BICALHO, K. U.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; 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 Products**, v. 74, 969-976, 2015.
- BAUR, M.E.; SOSA-GOMEZ, D.R.; OTTEA, J.; LEONARD, B.R.; CORSO, I.C.; DA SILVA, J.J.; TEMPLE, J.; BOETHEL, D.J. Susceptibility to insecticides used for control of *Piezodorus guildinii* (Heteroptera: Pentatomidae) in the United States and Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, 869-876, 2010.
- BÍBLIA, N. T Mateus. In **A Bíblia Sagrada**. Novo Testamento. Tradução de João Ferreira de Almeida. São Paulo: Sociedade Bíblica do Brasil, 2018. p. 755.
- BLESSING, L. D.; RAMOS, J.; DIAZ, S.; BEN, A. A.; BARDÓN, B. A. Insecticidal properties of annonaceous acetogenins and their analogues. Interaction with lipid membranes. **Natural product communications**, v.7, p 1215-1218, 2012.

BOMBASARO, J. A.; BLESSING, L. D. T.; DIAZ, S.; NESKE, A.; SUVIRE, F. D., ENRIZ, R. D; RODRÍGUEZ, A. M. Theoretical and experimental study of the interactions of annonaceous acetogenins with artificial lipid bilayers .**Journal of Molecular Structure**, v. 1003, p 87-91, 2011.

BUENO, R. C. O. F.; PARRA, J. R. P.; BUENO, A. F.; MOSCARDI, F.; OLIVEIRA, J. R. G.; CAMILLO, M. F. Sem barreira. **Revista Cultivar**, v. 93, p. 12-15, 2007.

CASTILLO, 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.

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.

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, n. 1, p. 63-67, 2012.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, quinto levantamento, safra 2017/18. p. 140. 2018.

CRIALESI-LEGORI, P. C. B.; DAVOLOS, C. C.; LEMES. A. R. N.; MARUCCI, S. C.; LEMOS, M. V. F.; FERNANDES, O. A.; DESIDÉRIO, J. A. Interação de proteínas Cry1 e Vip3A de *Bacillus thuringiensis* para controle de lepidópteros-praga. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p. 79-87. 2014.

EL-WAKEIL, N. E. Botanical pesticides and their mode of action. **Gesunde Pflanzen**, v. 65, n. 4, p. 125-149, 2003.

FIAZ, M.; MARTÍNEZA, L. C.; COSTA, M. S.; COSSOLIN, J. F. S.; PLATA-RUEDA, A.; GONÇALVES, W. G.; SANT'ANA, A. E. G.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of

Anticarsia gemmatalis (Lepidoptera: Noctuidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, p. 1-8, 2018.

FORMENTINI, A. C.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; PAULA-MORAES, S. V.; BARROS, N. M.; SPECHT, A. Lepidoptera (Insecta) associated with soybean in Argentina, Brazil, Chile and Uruguay. **Ciência Rural**, vol. 45, n. 12, p. 2113-2120, 2015.

FUGI, C. G. Q. Aspectos biológicos de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 em genótipos de soja com diferentes graus de resistência a insetos (**Doctoral dissertation, Instituto Agronômico**), 2003.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola. Piracicaba**, v. 920, 2002.

GUPTA, A.; PANDEY, S.; SHAH, D. R.; YADAV, J. S.; SETH, N. R.; Annonaceous acetogenins: the unrevealed area for cytotoxic and pesticidal activities. **Systematic Reviews in Pharmacy**, p. 104–109, 2011.

HEDIN, P. A.; HOLLINGWORTH, R. M.; MASLER, E. P.; MIYAMOTO J.; THOMPSON D. G. Phytochemicals for pest control. **American Chemical Society**, v. 372, 1997.

HIDALGO, J.; PARELLADA, E. A.; BARDON, A. D. V.; NESKE, A. N. Annonaceous Acetogenins with insecticidal effects on *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Agricultural Chemistry and Environment**, v. 7, n. 3, p. 105-116, 2018.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA-GOMEZ, D. R.; PANIZZU, A. R.; CORSO, I. C.; GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado: EMBRAPA Soja (Circular Técnica, 30)**, p. 70, 2000.

INOUE, M. H.; SANTANA, D. C.; PEREIRA, M. J. B.; POSSAMAI, A. C. S.; AZEVEDO, V. H. Extratos aquosos de *Xylopiia aromatica* e *Annona crassiflora* sobre capim-marandu (*Brachiaria brizantha*) e soja. **Scientia Agraria**, v. 10, p. 245-250, 2009.

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

ISMAN M. B.; SEFFRIN R. Natural insecticides from the Annonaceae: a unique example for developing biopesticides. In: **Advances in plant biopesticides**. Springer, New Delhi, 2014, 21-33 p.

KENNEDY, G. G; STORER, N. P. Life systems of polyphagous arthropod pests in temporally unstable cropping systems. **Annual Review of Entomology**, v. 45, n. 1, p. 467-493, 2000.

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.

KOGAN, M. Dynamics of insect adaptations to soybean: Impact of integrated pest management. **Environmental Entomology**, v. 10, p. 363-371, 1981.

LEMOS, E. E. P. D. The production of annona fruits in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 77, p. 85, 2014.

LEPPLA, N. C.; HUETTEL, M. D.; CHAMBERS, D. L.; TURNER, W. K. Comparative life history and respiratory activity of “wild” and colonized Caribbean fruit flies [Dipt.: Tephritidae]. **Entomophaga**, v. 21, n. 4, p. 353-357, 1976.

LEATEMIA, J. A.; ISMAN, M. B. Toxicity and antifeedant activity of crude seed extracts of *Annona squamosa* (Annonaceae) against lepidopteran pests and natural enemies. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 24, n. 2, p. 150-158, 2004a.

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, 2004b.

LIAW, CHIH-CHUANG. "Acetogenins from Annonaceae." Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 101. **Springer International Publishing**, p. 113-230, 2016.

LIMA, M.; JUNIOR C. A. S.; RAUSCH, L., GIBBS, H. K., JOHANN, J. A. Demystifying sustainable soy in Brazil. **Land use policy**, v. 82, p. 349-352, 2019.

LUZ, P. M. C.; SPECHT, A.; PAULA-MORAES, S. V.; MALAQUIAS, J. V.; FERREIRA, L. F. M.; OTANÁSIO, P. N.; DINIZ, I. R. Owllet moths (Lepidoptera: Noctuoidea) associated with Bt and non-Bt soybean in the brazilian savanna. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, p. 248-256, 2019.

LONDERHAUSEN M.; LEICHT W.; LEIB F.; MOESCHLER H. Molecular mode of action of annonons. **Pest Management Science**, v. 33; p. 427, 1991.

MARTINS, G. L. M.; TOMQUELSKI, G. V. Eficiência de inseticidas no controle de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura da soja. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 2, n. 4, p. 25-30, 2015.

MASSAROLLI, A.; PEREIRA, M. J. B.; FOERSTER, L. A. *Annona mucosa* Jacq.(Annonaceae): A promising phytoinsecticide for the control of *Chrysodeixis includens* (Walker)(Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomology**, v. 13, n. 4, p. 132-140, 2016.

MASON, L. J.; JOHNSON, S. J.; WOODRING, J. Seasonal and ontogenetic examination of the reproductive biology of *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, v. 18, p. 980-985, 1989.

MOSCARDI, F.; BUENO, A. F.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; ROGGIA, S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; POMARI, A. F.; CORSO, I. C.; YANO, S. A. C. Artrópodes que atacam

as folhas da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B., CORREA-FERREIRA, B.S. AND MOSCARDI, F. **Soja - manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília, Embrapa, 2012, 213-334 p.

OCAMPO, D.; OCAMPO, R. Bioactividad de la familia Annonaceae. **Revista Universidad de Caldas**, v. 26, p. 135–155, 2006.

PERRY, A. S.; YAMAMOTO, I.; ISHAAYA, I.; PERRY, R. Y. Insecticides in Agriculture and Environment: Retrospects and Prospects. **Springer**, p. 261, 1998.

PRAKASH, A., RAO, J. **Botanical Pesticides in Agriculture**. CRC Press, 1998.

RATTAN, R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Protection**, v. 29, p. 913–920, 2010.

REGNAULT-ROGER, C.; PHILOGÈNE, B. J. R.; VINCENT, C. Biopesticides of plant origin. **Lavoisier**, p. 313, 2005.

REICHERT, J. L.; COSTA, E. C. Desfolhamentos contínuos e seqüenciais simulando danos de pragas sobre a cultivar de soja BRS 137. **Ciência Rural**, v. 33, p. 1-6, 2003.

RIBEIRO, L. P.; VENDRAMIM, J. D.; BICALHO, K. U.; ANDRADE, M. S.; FERNANDES, J. B.; MORAL, R. A.; DEMÉTRIO, C. G. B. *Annona mucosa* Jacq.(Annonaceae): A promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots.(Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v 55, p. 6-14, 2014.

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.

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

SORGATTO, R. J.; BERNARDI, O.; OMOTO, C. Survival and Development of *Spodoptera frugiperda* and *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) on Bt Cotton and Implications for Resistance Management Strategies in Brazil. **Environmental entomology**, v. 18, 2015.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, p. 82-85, 2005.

TAK, J. H.; JOVEL, E.; ISMAN, M. B. Contact, fumigant, and cytotoxic activities of thyme and lemongrass essential oils against larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Journal of Pest Science**, v. 89, n. 1, p. 183-193, 2016.

TOGNI, P. H. B.; VENZON, M.; LAGÔA, A. C. G.; SUJII, E. R. Brazilian Legislation Leaning Towards Fast Registration of Biological Control Agents to Benefit Organic Agriculture. **Neotropical Entomology**, v. 48, p. 175-185, 2019.

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.

TOMQUELSKI, G. V.; MARTINS, G. L. M.; DIAS, T. S. **Características e manejo de pragas da cultura da soja. Pesquisa, Tecnologia e Produtividade**. v. 2, n. 9, p. 61-82, 2015.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORSO, I.C.; OLIVEIRA, L. J.; Iul, F.; PANIZZI, A. R.; BUENO, A. F.; HIROSE, E.

Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja. Londrina: **Embrapa-CNPSO**, p. 90, 2010.

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

SOUZA, C. M., E. L. L. BALDIN, L. P. RIBEIRO, T. L. B. SANTOS, I. F. SANTOS, R. MORANDO AND J. D. VENDRAMIM. Antifeedant and growth inhibitory effects of Annonaceae derivatives on *Helicoverpa armigera* (Hübner). **Crop Protection**, v. 121, p. 45-10, 2019.

VIANA, D. D. L.; NETTO, J. C.; AGUIRRE-GIL, O. J.; BUSOLI, A. C. Biological parameters of soybean looper in cotton cultivars with the Cry1Ac and Cry1F proteins. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 7, p. 569-572, 2014.

WAGNER, D. L.; SCHWEITZER, D. F.; SULLIVAN, J. B.; REARDON, R. C. Owlet caterpillars of eastern North America (Lepidoptera: Noctuidae). **Princeton: Princeton University Press**, p. 576, 2011.