



**DEJANE SANTOS ALVES**

**PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS DE  
ANONÁCEAS ATIVOS PARA *Spodoptera*  
*frugiperda* e *Tetranychus* spp.**

**LAVRAS - MG**

**2014**

**DEJANE SANTOS ALVES**

**PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS DE ANONÁCEAS ATIVOS PARA  
*Spodoptera frugiperda* e *Tetranychus* spp.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, área de concentração em Entomologia, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Geraldo Andrade Carvalho

**LAVRAS - MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Alves, DeJane Santos.

Prospecção de metabólicos de anonáceas ativos para *Spodoptera frugiperda* e *Tetranychus* spp. / DeJane Santos Alves. – Lavras : UFLA, 2014.

261 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Geraldo Andrade Carvalho.

Bibliografia.

1. Inseticida botânico. 2. Metabolômica. 3. *Annonaceae*. 4. Produtos naturais. 5. Lagarta-militar. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.96

**DEJANE SANTOS ALVES**

**PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS DE ANONÁCEAS ATIVOS PARA  
*Spodoptera frugiperda* e *Tetranychus* spp.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, área de concentração em Entomologia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 21 de fevereiro de 2014.

Dr. Denilson Ferreira de Oliveira	UFLA
Dr. João Batista Fernandes	UFSCAR
Dr. Martin Francisco Pareja Piaggio	UFLA
Dr. Ronald Zanetti Bonetti Filho	UFLA

Dr. Geraldo Andrade de Carvalho  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2014**

Ao meu pai (*in memoriam*),  
minha mãe e meu irmão,

**dedico.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, ao Cristo e aos meus anjos de guarda, pela concessão do dom da vida e presença constante durante essa caminhada.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo auxílio financeiro.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão de bolsa de doutorado sanduíche.

Ao professor Geraldo A. Carvalho, pela orientação, confiança, amizade, compreensão, exemplo e estímulo à pesquisa científica e docência.

Ao professor Denilson F. Oliveira, pelo apoio, orientação, amizade, incentivo e por ter me apresentado ao mundo da pesquisa.

Aos professores do Departamento de Entomologia, pelos ensinamentos transmitidos durante todo o curso. Em especial ao Prof. Martin, pelo ombro amigo, bons conselhos e parceria no rock.

Aos membros do Laboratório de Seletividade.

Aos membros do Laboratório de Produtos Naturais.

Aos funcionários do Departamento de Entomologia e de Química, pelos bons momentos de convivência. Em especial, a D. Irene e Julinho.

Aos anjos Alan, Lea e Viviane, sem eles esse trabalho não seria possível.

À esposa e à filha do Alan por terem me acolhido tão bem e aos funcionários da UFMG, em especial a Vany.

Ao Vinicius e ao Elisson por me ajudarem no laboratório nos momentos em que mais precisei.

Aos companheiros cubanos por todo carinho. Em especial ao Reinaldo e à Dra. Maria.

A minha mãe, que nunca mediu esforços para que eu chegasse até aqui.

Ao meu pai que, mesmo não estando de corpo presente, certamente esteve olhando por mim.

Ao meu irmão David, por todo incentivo, carinho e amizade.

A minha irmã Déia, meu cunhado e minhas sobrinhas, Yasmin e Victória, por todo incentivo e carinho.

Ao meu irmão Jean, pelo carinho.

Aos amigos de departamento, em especial Juracy, Marianne, Flávio, Adriano, Judith, Natália, Juliana, Willian e Priscilla pelos ótimos momentos de convivência.

Aos queridos amigos Aline, Flávia, Ney Robson, Lucas, André e Helvécio pelos bons ensinamentos, pela agradável companhia e por todo incentivo e amizade.

Aos amigos que, mesmo longe, sempre se fizeram muito presentes na minha vida, Irene, Paulinho, Cleide Mara e Edileusa.

A Jeimy pelos ótimos momentos de convivência.

A minha querida amiga Ana Beatriz pelo exemplo, carinho e amizade.

Aos irmãos do Centro Espírita Augusto Silva pelo apoio e orientação espiritual.

Ao movimento estudantil de Lavras, em especial ao Núcleo de Apoio à Reforma Agrária e ao Movimento Feminista, Marias de Minas.

Ao meu companheiro Roney, pela amizade, carinho e paciência.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Sinceramente agradeço.

"Todo o conhecimento humano começou com intuições, passou daí aos  
conceitos e terminou com ideias."

Immanuel Kant

## RESUMO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a bioatividade de frações solúveis em diclorometano, provenientes de extratos metanólicos de plantas da família Annonaceae para *Spodoptera frugiperda* e populações cubanas de *Tetranychus tumidus* e *Tetranychus urticae* e, realizar uma prospecção química da fração mais ativa. A fração das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* foi a mais ativa para *S. frugiperda*, causando altas taxas de mortalidade. Assim, foi conduzida a análise exploratória do perfil metabólito dessa planta, empregando-se ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ). Em seguida, procedeu-se à análise multivariada por meio de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), sendo as variáveis de entrada: os deslocamentos químicos e intensidade dos sinais obtidos por RMN de  $^1\text{H}$  e atividade biológica para *S. frugiperda*. Foram distinguidos os deslocamentos químicos possivelmente responsáveis pela atividade biológica e, empregando-se experimentos uni e bidimensionais de RMN, pôde-se inferir que possivelmente a substância responsável pela atividade biológica foi o 2,4,5-trimetoxiestireno. Ademais, procedeu-se o fracionamento da fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *D. lanceolata*, por meio de cromatografia em coluna de sílica gel do tipo *flash*, cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o que possibilitou o isolamento de uma mistura contendo a *trans*-asarona + 2,4,5-trimetoxiestireno e mais sete substâncias. Dentre as substâncias isoladas, duas delas e mais a mistura de *trans*-asarona + 2,4,5-trimetoxiestireno, tiveram a bioatividade avaliada para *S. frugiperda*. Foi constatado que a mistura da *trans*-asarona + 2,4,5-trimetoxiestireno foi a responsável pela atividade biológica para lagartas de *S. frugiperda*. O ensaio biológico com as substâncias *trans*-asarona e 2,4,5-trimetoxiestireno isoladas, revelaram que ambas são ativas para lagartas de *S. frugiperda*; entretanto, o 2,4,5-trimetoxiestireno é a substância mais ativa, o que corrobora com os resultados encontrados na análise metabolômica. Também foi constatado que possivelmente o efeito inseticida dessas substâncias para *S. frugiperda* ocorreu por meio de dissuasão alimentar. Em se tratando dos ensaios com *T. tumidus* e *T. urticae* a fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *D. lanceolata* também foi a mais ativa; entretanto, a atividade foi mais pronunciada para o ácaro *T. urticae*. Análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) confirmaram que os constituintes majoritários da fração das cascas do caule de *D. lanceolata* são a *trans*-asarona + 2,4,5-trimetoxiestireno.

Palavras-chave: Inseticida botânico. Anonáceas. Produtos naturais. Lagarta militar. Controle.

## GENERAL ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the bioactivity fractions soluble in dichloromethane, derived from methanolic extracts from plants of the Annonaceae family to *Spodoptera frugiperda* and Cuban populations of *Tetranychus urticae* and *Tetranychus tumidus*, and perform a chemical prospection of the most active fraction. The stem bark fraction of *Duguetia lanceolata* was the most active for *S. frugiperda*, causing high mortality rates. Thus, an exploratory analysis of this plant's metabolite profile was conducted using hydrogen nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  NMR). Subsequently, a multivariate analysis using partial least squares (PLS) regression, was performed with the input variables: chemical displacements, intensity of the signals obtained by  $^1\text{H}$  NMR and biological activity for *S. frugiperda*. The chemical displacements possibly responsible for the biological activity was distinguished and, employing uni and bidimensional RMN experiments, we inferred that the possible substance responsible for the biological activity was the 2,4,5-trimethoxystyrene. Furthermore, the fractioning the soluble fraction of the *D. lanceolata* stem bark into dichloromethane was conducted by means of silica gel column chromatography of the flash type, layer chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC), which allowed the isolation of a mixture containing trans-asarone + 2,4,5-trimethoxystyrene and seven other substances. Among the isolated substances, two of them plus the mixture of trans-asarone + 2,4,5-trimethoxystyrene, had bioactivity evaluated for *S. frugiperda*. It was noted that the trans-asarone + 2,4,5-trimethoxystyrene mixture was responsible for the biological activity against *S. frugiperda* larvae. The biological assay with the isolated substances, trans-asarone and 2,4,5-trimethoxystyrene, revealed that both are active for *S. frugiperda* larvae, however the 2,4,5-trimethoxystyrene is the most active substance, which corroborates the results found in the metabolomics analysis. It was also noted that the insecticidal effect of these substances for *S. frugiperda* is possibly given via feeding deterrence. Regarding the *T. tumidus* and *T. urticae* trials, the fraction soluble in dichloromethane of the *D. lanceolata* stem bark was also the more active, however, the activity was more pronounced for the *T. urticae* mite. Analyses by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) confirmed that the major constituents of the *D. lanceolata* stem bark fraction are trans-asarone + 2,4,5-trimethoxystyrene.

Keywords: Botanical insecticide. Annonaceae. Natural products. Fall armyworm. Control.

## LISTA DE FIGURAS

### SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

#### ARTIGO 1

- Figura 1 Sobrevivência de lagartas de *Spodoptera frugiperda* ao longo do tempo, alimentadas com dieta artificial contendo frações solúveis em diclorometano, sendo  $S(t) = \exp(-(\text{tempo}/\delta)^\alpha)$ ,  $\delta$  = parâmetro de forma;  $\alpha$  = parâmetro de escala. Grupo 1: *Duguetia lanceolata* cascas (n=173). Grupo 2: *Xylopiya sericea* (frutos (n=120), folhas (n=119) e cascas (n=118)); *Annona sylvatica* (cascas (n=118) e folhas (n=119)); *Annona cacans* (folhas (n=111) e cascas (n=88)); *Gutteria australis* (folhas (n=117) e cascas (n=120)); *Annona coriacea* (folhas (n=114)); *Annona neolaurifolia* (folhas (n=111)); *Xylopiya emarginata* (folhas (n=107) e cascas (n=107)); *Duguetia lanceolata* (folhas (n=119) e frutos (n=116)); *Xylopiya brasiliensis* (folhas (n=119)) e *Duguetia arenicola* (folhas (n=116)). Grupo 3: Água (n=401), solução aquosa de Tween 80 a 1% (n=400), *Annona neolaurifolia* (cascas (n=112)) e *Xylopiya brasiliensis* (cascas (n=113))..... 84
- Figura 2 Médias ( $\pm$ SD) para massa (g) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas dietas artificiais as quais foram incorporadas frações solúveis em diclorometano proveniente de extratos metanólicos de plantas da família Annonaceae. .... 86

Figura 3	<p>Sobrevivência de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> ao longo do tempo, alimentadas com dieta artificial contendo frações solúveis em diclorometano provenientes dos extratos das cascas do caule de <i>Duguetia lanceolata</i>, sendo <math>S(t) = \exp(-(\text{tempo}/\delta)^\alpha)</math>, <math>\delta</math> = parâmetro de forma; <math>\alpha</math> = parâmetro de escala. Grupo 1: <i>Duguetia lanceolata</i> cascas 1818,1 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math> de dieta (n=58). Grupo 2: <i>Duguetia lanceolata</i> cascas 909,0 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math> de dieta (n=57). Grupo 3: <i>Duguetia lanceolata</i> cascas 454,5 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math> de dieta (n=57). Grupo 4: Água (n=60); solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL (n=58); <i>Duguetia lanceolata</i> cascas 227,2 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math> de dieta (n=56) e 113,6 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math> de dieta (n=60) (n=173).....</p>	92
Figura 4	<p>Sobrevivência de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> ao longo do tempo, alimentadas com dieta artificial contendo frações solúveis em diclorometano provenientes do extrato das cascas do caule de diferentes espécimes de <i>Duguetia lanceolata</i>, sendo <math>S(t) = \exp(-(\text{tempo}/\delta)^\alpha)</math>, <math>\delta</math> = parâmetro de forma; <math>\alpha</math> = parâmetro de escala. Grupo 1: Espécime 1 (n=60), Espécime 2 (n=60), Espécime 5 (n=60), Espécime 6(n=59). Grupo 2 : Espécime 3 (n=59), Espécime 4 (n=59). Grupo 3: Água (n=60), Tween 80 a 1% (n=60).....</p>	95
Figura 5	<p>Espectros de RMN de <math>^1\text{H}</math> das frações solúveis em diclorometano das cascas do caule de <i>Duguetia lanceolata</i> (400 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>).....</p>	98

Figura 6	Gráfico de <i>score</i> da <i>PLS</i> (a) apresenta o agrupamento dos espécimes de <i>Duguetia lanceolata</i> com base nos valores da atividade inseticida e similaridade do perfil metabólito. Gráfico de peso da <i>PLS</i> (b) mostra os sinais (eixo negativo) correlacionados com atividade biológica para <i>S. frugiperda</i> , ou seja, os sinais que contribuíram para a separação entre os espécimes de <i>D. lanceolata</i> .....	100
Figura 7	Mapa de contornos bidimensionais <i>J-resolvido</i> obtido da fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de <i>Duguetia lanceolata</i> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	102
Figura 8	Mapa de contornos COSY obtido da fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de <i>Duguetia lanceolata</i> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	103
Figura 9	Mapa de contornos HSQC obtido da fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de <i>Duguetia lanceolata</i> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	104
Figura 10	Espectros de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H (a) e <sup>13</sup> C (b) da fração das cascas do caule de <i>Duguetia lanceolata</i> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	106
Figura 11	Estrutura molecular da substância <b>1</b> (2,4,5-trimetoxiestireno) .....	107

## ARTIGO 2

Figura 1	Resumo dos procedimentos adotados durante o fracionamento da fração solúvel em diclorometano, proveniente do extrato metanólico, das cascas do caule de <i>Duguetia lanceolata</i> .....	132
----------	--	-----

Figura 2	Cromatograma obtido durante o processo de fracionamento do 2,4,5-trimetoxiestireno (a) e <i>trans</i> -asarona (b) em CLAE-DAD. Condições cromatográficas: coluna de sílica, modo isocrático com Hex/ AcOEt (94:6) ..... 133
Figura 3	Estruturas moleculares do 2,4,5-trimetoxi-estireno (1) <i>trans</i> -asarona (2)..... 145
Figura 4	Sobrevivência de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> ao longo do tempo, alimentadas com dieta artificial contendo diferentes concentrações da fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de <i>Duguetia lanceolata</i> , sendo $S(t) = \exp(-(\text{tempo}/\delta)^\alpha)$ , $\delta$ = parâmetro de forma; $\alpha$ = parâmetro de escala. Grupo 1: Fração das cascas do caule de <i>Duguetia lanceolata</i> 1818,1 $\mu\text{g/ml}$ (n=56). Grupo 2: Fração das cascas do caule de <i>Duguetia lanceolata</i> 909,0 $\mu\text{g/ml}$ (n=54). Grupo 3: Fração das cascas do caule de <i>Duguetia lanceolata</i> 454,5 $\mu\text{g/ml}$ (n=50). Grupo 4: Fração das cascas do caule de <i>Duguetia lanceolata</i> 113,6 $\mu\text{g/ml}$ (n=57) e 227,2 $\mu\text{g/ml}$ (57). Grupo 5: Água (n=60), solução aquosa de Tween 80 a 1% (n=58)..... 150
Figura 5	Sobrevivência de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> ao longo do tempo, alimentadas com dieta artificial contendo substâncias isoladas das cascas do caule de <i>Duguetia lanceolata</i> , sendo $S(t) = \exp(-(\text{tempo}/\delta)^\alpha)$ , $\delta$ = parâmetro de forma; $\alpha$ = parâmetro de escala. Grupo 1: Fração das cascas do caule de <i>Duguetia lanceolata</i> (n=57), 2,4,5-trimetoxiestireno + <i>trans</i> -asarona (De02D-34-10) (n=60). Grupo 2: Água (n=60), solução aquosa de Tween 80 a 1% (n=60), substância pura 3 (De02D-63-05) (n=56) e substância pura 5. .... 153

- Figura 6 Sobrevivência de lagartas de *Spodoptera frugiperda* ao longo do tempo, alimentadas com dieta artificial contendo diferentes concentrações da mistura de 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona, sendo  $S(t) = \exp(-(\text{tempo}/\delta)^\alpha)$ ,  $\delta$  = parâmetro de forma;  $\alpha$  = parâmetro de escala. Grupo 1: 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona – 727,2  $\mu\text{g/ml}$  (n=59). Grupo 2: 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona – 363,6  $\mu\text{g/ml}$  (n=57). Grupo 3: 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona – 181,8  $\mu\text{g/ml}$  (n=59). Grupo 4: 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona – 90,9  $\mu\text{g/ml}$  (n=60). Grupo 5: Água (n=59); solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL (n=59); 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona – 45,4  $\mu\text{g/ml}$  (n=60)..... 155
- Figura 7 Ensaio de preferência alimentar com chance de escolha para lagartas de *Spodoptera frugiperda*..... 157
- Figura 8 Ensaio de preferência alimentar sem chance de escolha para lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas dieta acrescida de água (n=38), solução aquosa de Tween 80 a 1% (n=43), fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *D. lanceolata* (n=36), e 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona (45)..... 159
- Figura 9 Lagartas alimentadas com dieta acrescida de: água (a), solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL, fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *D. lanceolata* e mistura do 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona..... 160
- Figura 10 Sobrevivência de lagartas de *Spodoptera frugiperda* ao longo do tempo, alimentadas com dieta artificial contendo diferentes concentrações da fração das cascas do caule de *D. lanceolata* e da mistura de 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona, sendo

$S(t) = \exp(-(\text{tempo}/\delta)^\alpha)$ ,  $\delta$  = parâmetro de forma;  $\alpha$  = parâmetro de escala. Grupo 1: Fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* (295,4  $\mu\text{g/ml}$  de dieta) (n=111); 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona (122,7  $\mu\text{g/ml}$  de dieta) (n=115). Grupo 2: 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona (77,2  $\mu\text{g/ml}$  de dieta) (n=117). Grupo 3: Fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* (113,6  $\mu\text{g/ml}$  de dieta) (n=112); Fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* (131,8  $\mu\text{g/ml}$  de dieta) (n=114); 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona (45,4  $\mu\text{g/ml}$  de dieta) (n=113). Grupo 4: Água (n=200); solução aquosa de Tween 80 a 1% (n=210)..... 163

Figura 11 Sobrevivência de lagartas de *Spodoptera frugiperda* ao longo do tempo, alimentadas com dieta artificial contendo substâncias isoladas das cascas do caule de *Duguetia lanceolata*, sendo  $S(t) = \exp(-(\text{tempo}/\delta)^\alpha)$ ,  $\delta$  = parâmetro de forma;  $\alpha$  = parâmetro de escala. Grupo 1: 2,4,5-trimetoxiestireno (n=59). Grupo 2: 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona (n=60). Grupo 3: *trans*-asarona (n=59) (122,7  $\mu\text{g/ml}$  de dieta). Grupo 4: água (n=60), solução aquosa de Tween 80 a 1% (n=60)..... 166

### ARTIGO 3

Figura 1 Cromatograma e espectros de massas para a fração solúvel em diclorometano proveniente do extrato metanólico das cascas do caule de *Duguetia lanceolata*, após ionização por impacto de elétrons a 70 e V ..... 213

Figura 2    Fórmulas estruturais dos constituintes majoritários da fração  
solúvel em diclorometano proveniente do extrato metanólico  
das cascas do caule de *Duguetia lanceolata*. .....214

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

#### ARTIGO 1

- Tabela 1 Materiais botânicos, empregados para preparo dos extratos vegetais e realização de *screening* com *S. frugiperda*, coletados no período de março a abril de 2011 ..... 72
- Tabela 2 Materiais botânicos, coletados no mês de junho de 2012, provenientes das cascas do caule de espécimes de *Duguetia lanceolata* com diferentes parâmetros morfométricos de circunferência do caule..... 76
- Tabela 3 Deslocamentos químicos (ppm) de  $^1\text{H}$  da substância (1) e comparado com a literatura. .... 106

#### ARTIGO 2

- Tabela 1 Deslocamentos químicos (ppm) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das substâncias presentes na amostra De02D-34-10, *trans*-asarona (1) e 2,4,5-trimetoxi-estireno (2) e comparados com a literatura. Utilizou-se o pico de TMS para a calibração dos picos..... 146
- Tabela 2 Variáveis biológicas de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta contendo a fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* e 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona..... 164

#### ARTIGO 3

- Tabela 1 Materiais botânicos empregados para preparo dos extratos vegetais e obtenção das frações solúveis em diclorometano ..... 190

Tabela 2	Sobrevivência média (%) ( $\pm$ erro-padrão da média) de <i>Tetranychus tumidus</i> submetidos a tratamento com frações solúveis em diclorometano de extratos metanólicos provenientes de anonáceas, empregando o método de microimersão, com adaptações.....	201
Tabela 3	Efeito da fração solúvel em diclorometano proveniente do extrato metanólico das cascas do caule de <i>Duguetia lanceolata</i> sobre a fecundidade e viabilidade dos ovos de <i>Tetranychus tumidus</i> , empregando o método de microimersão, com adaptações. ....	205
Tabela 4	Efeito da fração solúvel em diclorometano proveniente do extrato metanólico das cascas do caule de <i>Duguetia lanceolata</i> sobre ovos de <i>Tetranychus tumidus</i> .....	207
Tabela 5	Sobrevivência média (%) ( $\pm$ erro-padrão da média) de <i>Tetranychus urticae</i> submetidos a tratamento com frações solúveis em diclorometano provenientes de extratos metanólicos de <i>Duguetia lanceolata</i> , empregando o método de microimersão, com adaptações.....	209
Tabela 6	Íons moleculares e fragmentos iônicos dos picos <b>1</b> e <b>2</b> , obtidos a partir do espectro de massas da fração solúvel em diclorometano proveniente do extrato metanólico das cascas do caule de <i>Duguetia lanceolata</i> , após ionização por impacto de elétrons a 70 eV .....	211

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	22
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	27
3	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	28
3.1	<b>Lagarta-do-cartucho-do-milho, <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)</b> .....	28
3.2	<b><i>Tetranychus</i> spp.</b> .....	29
3.3	<b>Família Annonaceae</b> .....	31
3.4	<b>Atividade pesticida de anonáceas</b> .....	32
3.5	<b>Anonáceas selecionadas para esse estudo</b> .....	34
3.5.1	<b><i>Annona cacans</i> Warm.</b> .....	34
3.5.2	<b><i>Annona coriacea</i> Mart.</b> .....	34
3.5.3	<b><i>Annona neolaurifolia</i> H. Rainer</b> .....	36
3.5.4	<b><i>Annona sylvatica</i> A.St.-Hil.</b> .....	36
3.5.5	<b><i>Duguetia arenicola</i> Maas</b> .....	37
3.5.6	<b><i>Duguetia lanceolata</i> A. St.-Hil.</b> .....	38
3.5.7	<b><i>Gutteria australis</i> A.St.-Hil.</b> .....	39
3.5.8	<b><i>Xylopiã brasiliensis</i> Spreng.</b> .....	39
3.5.9	<b><i>Xylopiã emarginata</i> Mart.</b> .....	40
3.5.10	<b><i>Xylopiã sericea</i> A.St.-Hil.</b> .....	41
3.6	<b>Métodos empregados para a busca de metabólitos de plantas bioativas</b> .....	41
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	46
	<b>SEGUNDA PARTE- ARTIGOS</b> .....	64
	<b>ARTIGO 1 Seleção de anonáceas para o controle de <i>Spodoptera frugiperda</i> e análise exploratória do perfil metabólito de <i>Duguetia lanceolata</i> por RMN</b> .....	64
1	<b>Introdução</b> .....	67
2	<b>Material e Métodos</b> .....	70
2.1	<b>Solventes e outras substâncias químicas</b> .....	70
2.2	<b>Insetos</b> .....	70
2.3	<b>Coleta do material botânico para a realização de <i>screening</i> com <i>S. frugiperda</i></b> .....	71
2.4	<b>Coleta do material botânico de espécimes de <i>D. lanceolata</i> com diferentes parâmetros morfométricos</b> .....	75
2.5	<b>Preparo dos extratos vegetais e fracionamento</b> .....	77
2.6	<b>Bioensaios com <i>S. frugiperda</i></b> .....	78
2.6.1	<b><i>Screening</i> com <i>S. frugiperda</i></b> .....	78

2.6.2	Bioensaio de concentração-resposta com a fração do extrato das cascas do caule de <i>D. lanceolata</i> .....	79
2.6.3	Bioensaio com as frações provenientes das cascas do caule de espécimes de <i>D. lanceolata</i> .....	79
2.7	Análise exploratória do perfil metabólito de <i>D. lanceolata</i> .....	80
2.8	Análise estatística .....	81
3	Resultados e Discussão .....	83
3.1	<i>Screening</i> com <i>S. frugiperda</i> .....	83
3.2	Bioensaio de concentração-resposta com a fração das cascas do caule de <i>D. lanceolata</i> .....	90
3.3	Bioensaio com as frações provenientes das cascas do caule de diferentes espécimes de <i>D. lanceolata</i> .....	94
3.4	Análise exploratória do perfil metabólito de <i>D. lanceolata</i> .....	97
4	CONCLUSÕES .....	109
	REFERÊNCIAS .....	112
	ARTIGO 2 Purificação de metabólitos das cascas do caule de <i>Duguetia lanceolata</i> ativos para <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	123
1	INTRODUÇÃO .....	126
2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	128
2.1	Procedimentos experimentais gerais .....	128
2.2	Material vegetal .....	129
2.3	Preparo do extrato e partição líquido-líquido .....	130
2.4	Purificação dos metabólitos das cascas do caule de <i>D. lanceolata</i> .....	131
2.5	Bioensaios .....	135
2.5.1	Insetos .....	135
2.5.2	Resposta concentração - mortalidade de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com a fração solúvel em diclorometano do extrato das cascas do caule de <i>D. lanceolata</i> .....	136
2.5.3	Determinação do TL <sub>50</sub> para lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com substâncias isoladas das cascas do caule de <i>D. lanceolata</i> .....	137
2.5.4	Resposta concentração - mortalidade de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com combinação de 2,4,5-trimetoxiestireno + <i>trans</i> -asarona .....	138
2.5.5	Efeito antialimentar para <i>S. frugiperda</i> .....	139
2.5.6	Variáveis nutricionais de lagartas de <i>S. frugiperda</i> .....	140
2.5.7	Variáveis biológicas de lagartas de <i>S. frugiperda</i> .....	140
2.5.8	TL <sub>50</sub> de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com 2,4,5-trimetoxiestireno e <i>trans</i> -asarona .....	141
2.6	Análise estatística .....	142
3	RESULTADOS .....	143

4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	167
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	175
	<b>ARTIGO 3</b> Atividade acaricida de frações de anonáceas para <i>Tetranychus tumidus</i> e <i>Tetranychus urticae</i> e análise do perfil metabólito de <i>Duguetia lanceolata</i> por CG-EM .....	184
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	187
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	189
2.1	Coleta e processamento do material botânico .....	189
2.2	Preparo dos extratos vegetais e partição líquido-líquido .....	193
2.3	Criação de manutenção dos ácaros .....	194
2.4	Efeito das frações solúveis em diclorometano sobre fêmeas adultas de <i>T. tumidus</i> .....	194
2.5	Efeito da fração solúvel em diclorometano do extrato das cascas do caule de <i>D. lanceolata</i> sobre a fecundidade e viabilidade de ovos de <i>T. tumidus</i> .....	196
2.6	Efeito da fração solúvel em diclorometano do extrato das cascas do caule de <i>D. lanceolata</i> sobre ovos de <i>T. tumidus</i> .....	196
2.7	Efeito das frações solúveis em diclorometano do extrato de <i>D. lanceolata</i> sobre fêmeas adultas de <i>T. urticae</i> .....	197
2.8	Análise por CG-EM .....	198
2.9	Análise estatística .....	198
3	<b>Resultados e Discussão</b> .....	200
3.1	Efeito das frações solúveis em diclorometano sobre fêmeas adultas de <i>T. tumidus</i> .....	200
3.2	Efeito da fração das cascas do caule de <i>D. lanceolata</i> sobre a fecundidade e viabilidade de ovos de fêmeas de <i>T. tumidus</i> .....	204
3.3	Efeito da fração das cascas do caule de <i>D. lanceolata</i> sobre ovos de <i>T. tumidus</i> .....	206
3.4	Efeito das frações de <i>D. lanceolata</i> sobre fêmeas adultas de <i>T. urticae</i> .....	208
3.5	Análise por CG-MS.....	210
4	<b>CONCLUSÕES</b> .....	216
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	219
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	228
	<b>APÊNDICES</b> .....	229

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

Dentre os inúmeros artrópodes que causam danos às plantas cultivadas, destacam-se a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e os ácaros fitófagos da família Tetranychidae, *Tetranychus tumidus* Banks, 1900 (Acari: Tetranychidae) e *Tetranychus urticae* Koch, 1836 (Acari: Tetranychidae). A lagarta-do-cartucho é o principal inseto que ataca a cultura do milho no Brasil e nas Américas. Quanto ao *T. tumidus*, esse causa muitos prejuízos em viveiro de *plátano* (*Musa* spp.) em Cuba, enquanto *T. urticae* é uma importante praga, que ataca várias culturas, dentre elas diversas hortícolas, no Brasil e em Cuba.

Os métodos comumente usados para o controle de *S. frugiperda* e *Tetranychus* spp. são baseados no uso de inseticidas sintéticos que, além de causarem inúmeros efeitos adversos a organismos não alvos, também selecionam populações de artrópodes resistentes aos pesticidas, o que por sua vez, torna o método ineficiente em várias situações. Mais recentemente, plantas geneticamente modificadas têm sido empregadas para o controle de *S. frugiperda*. Entretanto, já existem relatos da seleção de populações de lepidópteros pragas resistentes a essa tecnologia (MANNION; MORSE, 2012). Nesse sentido, vale ressaltar que *S. frugiperda* foi o primeiro inseto no qual foi detectada a seleção de populações resistentes a plantas geneticamente modificadas em condições de campo (TABASHNIK; RENSBURG; CARRÍRE, 2009; STORER et al., 2010).

Consequentemente, é de fundamental importância a realização de pesquisas visando ao desenvolvimento de novos produtos para o controle desses artrópodes. Nesse contexto, as substâncias advindas do metabolismo de plantas

se apresentam bastante promissoras, pois várias delas se mostram muito ativas contra artrópodes fitófagos. Destaca-se ainda que as substâncias de origem natural podem servir como moléculas modelo para a síntese de novos compostos, ou ainda, podem ser modificadas estruturalmente com vistas a aumentar a atividade biológica contra o artrópode alvo, e ainda reduzir a toxicidade aos organismos não alvos (JEFFERIES; YU; CASIDA, 1997; XU; ZHANG, 2011; HE et al., 2013; TANIMOTO; KAKIUCHI, 2013; ZHANG et al., 2013; WANG et al., 2013).

Diante disso, nos últimos anos, as pesquisas com pesticidas botânicos têm sido intensificadas, sendo inúmeros os relatos em literatura da atividade de metabólitos de plantas contra artrópodes pragas de plantas (HANSSON et al., 2013; OLOTUAH, 2013; PAVELA; VRCHOTOVÁ, 2013). Destacam-se ainda os diversos produtos naturais provenientes de fontes vegetais, que foram patenteados recentemente para o controle de pragas agrícolas (CHEN; KUANG; ZHENG, 2012; MENSAH, 2012; XIE et al., 2013).

Vale ressaltar que dentre as inúmeras famílias botânicas conhecidas por produzirem metabólitos tóxicos a herbívoros, as anonáceas vêm merecendo destaque, tendo-se intensificado os estudos com vistas a avaliar o potencial de plantas dessa família botânica como inseticidas (OKONKWO, 2004; ISMAN, 2006; ARRIAGA et al., 2008; LLANOS; ARANGO; GIRALDO, 2008; FEITOSA et al., 2009; KIHAMPA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2013; WEERASINGHE et al., 2013). O elevado potencial de anonáceas como pesticidas pode ser corroborado pelo desenvolvimento de produtos comerciais, à base de plantas desta família, dentre as quais é possível destacar a comercialização de um xampu pediculicida pela empresa Nature's Sunshine Products, Inc., Estados Unidos, que tem como ingrediente ativo acetogeninas provenientes da anonácea *Asimina trilobai* L. (ISMAN, 2006; MCLAUGHLIN, 2008). Ainda é possível citar que um biopesticida extraído das sementes de

*Annona squamosa* L. foi patenteado para uso como inseticida e fungicida (SIKDAR, 2006).

No contexto de busca por moléculas bioativas de plantas, várias abordagens podem ser empregadas, tais como o fracionamento biodirecionado com ensaios biológicos. Entretanto, essa abordagem apresenta algumas limitações, pois necessita realizar ensaios biológicos rápidos e com pouca quantidade de material teste. Também podem ser conduzidos fracionamentos não biodirecionados, nos quais são isoladas as substâncias majoritárias que posteriormente são submetidas aos ensaios biológicos. Essa última abordagem apresenta a desvantagem de que a substância isolada pode não ser a responsável pela atividade biológica.

Mais recentemente, a metabolômica vem sendo empregada para a busca por moléculas ativas de plantas. A metabolômica pode ser definida como um conjunto de dados qualitativos e quantitativos sobre todos os metabólitos de uma determinada matriz de origem biológica. Essa é considerada uma das mais avançadas abordagens sobre o mapeamento químico da biodiversidade de um organismo (FUNARI et al., 2013). Tal abordagem permite, por exemplo, sugerir qual metabólito é o responsável por determinada atividade biológica sem a necessidade de um isolamento prévio, o que nos casos de compostos já conhecidos, permite economia considerável de tempo.

Em se tratando do uso da metabolômica aplicada à entomologia, até o momento, os trabalhos realizados visam ao estudo da interação entre os artrópodes herbívoros e suas plantas hospedeiras (GIORGI et al., 2010; KERSTEN et al., 2013; SUN et al., 2013). Para exemplificar, é possível mencionar um estudo no qual foi avaliado o efeito de diferentes genótipos de cenoura *Daucus carota* L. (Apiaceae) quanto à resistência ao tripses *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). Os autores constataram que os perfis metabólitos das folhas das cenouras resistentes, analisados por RMN de

$^1\text{H}$ , foram diferentes daqueles das cenouras susceptíveis. Empregando-se a análise por componentes principais, os autores obtiveram o *score*, pelo qual os genótipos foram agrupados de acordo com a resistência e/ou susceptibilidade. Também foi obtido o *loading*, com os sinais que estavam contribuindo para a separação dos genótipos. Assim, a partir de experimentos de *J-resolvido*, COSY (correlação homonuclear  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ ) e da análise dos deslocamentos químicos característicos (*fingerprint*), foi possível inferir que as folhas das cenouras resistentes continham maiores teores de luteolina, ácido sinápico e alanina. Ademais, os autores confirmaram os resultados empregando-se tais substâncias em teste *in vitro* com *F. occidentalis* (LEISS et al., 2013).

No mesmo sentido, a metabolômica também pode ser empregada para a busca por moléculas bioativas, apesar de que grande parte dos trabalhos objetiva a busca por agentes fitoterápicos (YULIANA et al., 2011; WATKINS et al., 2012; YULIANA et al., 2013). É possível mencionar um trabalho que consistiu na extração de metabólitos produzidos por diversas espécies de esponjas marinhas. Alíquotas dos metabólitos foram empregadas para a obtenção do perfil metabólito por RMN de  $^1\text{H}$ , ao passo que a outra parte do material foi submetida a ensaio com vistas a verificar a capacidade de inibição do receptor de adenosina A1. Foram conduzidas análises multivariadas, através de regressão por mínimos quadrados parciais (*PLS*) e ortogonais (*OPLS*), sendo que os dados de entrada foram os deslocamentos químicos e a intensidade dos sinais obtidos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e o resultado do ensaio biológico. Foi possível o agrupamento das espécies de esponjas de acordo com a atividade biológica e perfil metabólito, distinguindo-se os sinais químicos que contribuíram para a separação dos espécimes. Os sinais de deslocamento químico foram atribuídos a halissulfato e suvanine, o que foi confirmado pelo uso de padrões comerciais das substâncias em ensaio biológico (ALI et al., 2013).

Trabalhos envolvendo o uso da metabolômica para a busca de substâncias bioativas de plantas apresentam a desvantagem de que a identificação de substâncias em misturas é um processo bastante complexo, sendo possível no caso de moléculas já conhecidas. Na maioria das vezes, os compostos têm suas estruturas moleculares inferidas com base em deslocamentos químicos característicos, *fingerprint*. Assim, além do emprego da metabolômica, é de fundamental importância a condução de estudos paralelos empregando-se o fracionamento clássico, com vistas à confirmação dos resultados.

Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo geral realizar a prospecção química de metabólitos de anonáceas ativos para *S. frugiperda* e *Tetranychus* spp., empregando uma abordagem metabolômica e fracionamento por meio de técnicas cromatográficas.

## 2 OBJETIVOS

- a) Selecionar frações solúveis em diclorometano, provenientes de extratos metanólicos de plantas da família anonáceae, que apresentassem toxicidade para lagartas de *Spodoptera frugiperda*, em condições de laboratório.
- b) Através de análises metabolômicas inferir qual seria a substância, possivelmente responsável, pela bioatividade para as lagartas de *S. frugiperda*.
- c) Por meio de estudo fitoquímico, isolar a(s) substância(s) responsável (eis) pela atividade inseticida para lagartas de *S. frugiperda*.
- d) Condução de *screening*, em condições de laboratório, com vistas a avaliar o efeito de frações solúveis em diclorometano, provenientes de extratos metanólicos de plantas da família anonáceae, para os ácaros *T. tumidus* e *T. urticae*.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

Também conhecida como lagarta militar, *S. frugiperda* é um inseto polígrafo, amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais das Américas (UNIVERSITY OF FLORIDA, 2013), que causa prejuízos a diversas culturas, como, por exemplo, gramíneas, forrageiras e algodoeiros (NAGOSHI; MEAGHER, 2008). Esse inseto é capaz de se alimentar de mais de 80 espécies de plantas (POGUE, 2002). No Brasil, é considerada praga chave da cultura do milho (CRUZ, 1995; BARROS et al., 2005), além de causar prejuízos a outras culturas, tais como arrozeiro (BUSATO et al., 2002), amendoim (ISIDRO; ALMEIDA; PEREIRA, 1997) e algodoeiro (FERNANDES; BUSOLI; BARBOSA, 2002).

O controle químico é o método geralmente utilizado para o controle desse inseto, porém vem favorecendo a seleção de populações desse noctuídeo resistentes aos pesticidas (YU, 2006; YU; MCCORD JUNIOR, 2007; VIRLA et al., 2008). Destaca-se que foram constatadas, no Brasil, susceptibilidades de diferentes populações de *S. frugiperda* ao inseticida espinosade, uma classe de pesticida com modo de ação único (DOURADO, 2009), o que demonstra a necessidade de rever as alternativas empregadas para o manejo de *S. frugiperda*.

Outro método de controle empregado é o uso de plantas geneticamente modificadas; entretanto, a seleção de populações de insetos resistentes, em condições de campo vem sendo constatada. Nesse sentido, Storer et al. (2010) detectaram e caracterizaram a redução na sensibilidade de lagartas de *S. frugiperda* ao milho Bt, em Porto Rico. A seleção de populações de *S.*

*frugiperda* resistentes também foi documentada por Tabashnik, Rensburg e Carrère (2009).

Diante do exposto, torna-se imprescindível a busca por novas moléculas para o controle de *S. frugiperda*. Consequentemente, são inúmeros os relatos da atividade inseticida de substâncias provenientes do metabolismo secundário de plantas para *S. frugiperda* (ELISA et al., 2010; ROEL et al., 2010; SILVA-AGUAYO et al., 2010; TOLOSA et al., 2012; CESPEDES et al., 2013; ZAVALA-SÁNCHEZ et al., 2013). Dentre as famílias botânicas estudadas, existem relatos da atividade inseticida de anonáceas para *S. frugiperda*. Entretanto, o potencial dessas plantas no controle da lagarta-do-cartucho ainda é subexplorado, necessitando assim de novos estudos.

### **3.2 *Tetranychus* spp.**

A família Tetranychidae compreende o principal grupo de ácaros fitófagos, pois várias das espécies desta família são pragas em muitos sistemas de cultivo (MARCIC, 2012). Os danos causados por esses artrópodes são resultado da alimentação dos adultos e formas jovens, os quais provocam ruptura das células dos vegetais e com o aparelho bucal sugam o conteúdo extravasado. Como consequência da alimentação, ocorre redução na área fotossintética da planta, o que, por sua vez, acarreta em redução no desenvolvimento das mesmas.

Dentre as espécies de ácaros fitófagos que causam prejuízos agrícolas, *Tetranychus tumidus* Banks (Acari: Tetranychidae), conhecido popularmente em Cuba como *araña roja del platano*, se destaca como praga chave em viveiros de *plátano* (*Musa* spp.) no referido país. Já *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), popularmente conhecido como *ácaro-rajado*, além de ser uma importante praga em diversos cultivos no Brasil e em Cuba, apresenta distribuição cosmopolita. Esse ácaro causa prejuízos a inúmeras culturas, tais

como, frutíferas, algodoeiro, hortaliças e plantas ornamentais. Vale ressaltar, que essa espécie já foi encontrada em 3.877 espécies de plantas hospedeiras (ATTIA et al., 2013).

O método mais empregado para o controle de *Tetranychus* spp. é o uso de inseticidas sintéticos. Entretanto, o alto potencial biótico desses ácaros aliado ao ciclo de vida curto, favorecem a seleção de populações resistentes a pesticidas. Para exemplificar, é possível mencionar o relato de populações de *T. urticae* resistentes ao clorfenapir em cultivos de algodoeiro e mamoeiro no Brasil (NICASTRO et al., 2013). De forma análoga, já foram detectadas diversas populações de *T. urticae* resistentes aos acaricidas abamectin e fenpyroximate em morangueiro e plantas ornamentais, no estado de São Paulo (SATO et al., 2009). Dessa maneira, é de extrema importância a procura por novas moléculas que possam ser empregadas para o controle de *Tetranychus* spp. Consequentemente, nos últimos anos, tem-se intensificado a busca por metabólitos de plantas para o controle de *Tetranychus* spp. (EL-SHARABASY, 2010; YANAR; KADIOĞLU; GÖKÇE, 2011; AFIFY; ALI; TURKY, 2012; MOZAFFARI et al., 2013; SRIMONGKOLCHAI; VICHITBANDHA; PUNG, 2013). Foi observado que os óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) e *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) causaram toxicidade aguda por contato para *T. urticae*, sendo que a última planta provocou efeitos mais pronunciados com redução na fertilidade e fecundidade das fêmeas (LABORDA et al., 2013). De forma análoga, os extratos metanólicos de *Anisosciadium orientale* DC. (Apiaceae), *Scaligeria meifolia* Boiss. (Apiaceae), *Trigonella elliptica* Boiss (Fabaceae) e *Ptelea viscosa* L. (Rutaceae) apresentaram atividade ovicida e acaricida para fêmeas adultas de *T. urticae* (GHADERI et al., 2013).

No que se refere especificamente à atividade acaricida de plantas da família Annonaceae, os trabalhos ainda são escassos; entretanto, cita-se a

atividade biocida do óleo das sementes de *A. squamosa* para *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acari: Tetranychidae) em folhas de soja (LIN et al., 2009).

### 3.3 Família Annonaceae

As anonáceas compreendem uma família botânica com cerca de 2.500 espécies descritas, distribuídas pelo mundo, dentre as quais, aproximadamente, 900 espécies estão presentes nas Américas (JUNIKKA; KOEK-NOORMAN, 2007). A família é constituída por árvores, arbustos e raramente por arbustos escandentes. Caracterizam-se por apresentarem flores vistosas, solitárias ou em inflorescências, geralmente carnosas ou crassas. Os frutos, por sua vez, podem ser secos ou carnosos (PONTES; BARBOSA; MAAS, 2004).

Salienta-se que muitas espécies de anonáceas são utilizadas na medicina popular, principalmente como antiparasíticos, antidiabéticos e para o tratamento de malária e hipertensão (FALL et al., 2003; VENDRUSCOLO; MENTZ, 2006; ASASE; AKWETEY; ACHEL, 2010; QI et al., 2010). Diante de toda essa variedade de empregos na medicina tradicional, é de se esperar também uma grande diversidade de metabólitos secundários. Dentre os derivados do metabolismo secundário presentes em anonáceas, destacam-se os alcaloides (ALIAS et al., 2010; CASTRO-MORENO et al., 2013; SILVA et al., 2014), terpenoides (FARAG, 2009; BOYOM et al., 2011; REJÓN-ORANTES et al., 2011; SCOTTI et al., 2012), flavonoides (SENA FILHO et al., 2008; BRINDIS et al., 2013), esteroides (JAYASURIYA et al., 2005), aminoácidos (MUNDHE et al., 2009) e acetogeninas (LÜMMEN, 1998; DESMARCHELIER, 2010).

### 3.4 Atividade pesticida de anonáceas

Dentre as inúmeras famílias botânicas, conhecidas por produzirem metabólitos secundários tóxicos a herbívoros, as anonáceas vêm merecendo destaque, tendo-se intensificado os estudos com vistas a avaliar o potencial de plantas dessa família botânica como pesticidas (OKONKWO, 2004; ISMAN, 2006; ARRIAGA et al., 2008; LLANOS; ARANGO; GIRALDO, 2008; FEITOSA et al., 2009; KIHAMPA et al., 2009; WEERASINGHE et al., 2013; RIBEIRO et al., 2013). São inúmeros os exemplos encontrados em literatura da atividade pesticida de anonáceas, sendo possível mencionar a alta atividade larvicida de *Goniothalamus hookeri* Thw. (Annonaceae) e *Goniothalamus gardneri* Hook. f. & Thoms. (Annonaceae) para *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) (WEERASINGHE et al., 2013). Salienta-se que o extrato das sementes de *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae) se apresentou ativo contra *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) e, assim foram conduzidos estudos fitoquímicos e de fracionamento, os quais revelaram a presença de alcaloides e acetogeninas, que por sua vez, podem estar envolvidos com a bioatividade dessa planta (RIBEIRO et al., 2013).

Outro exemplo consiste na eficiência de um inseticida, a base do óleo essencial de *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. (Annonaceae), caulinita e argila, que se mostrou bastante eficiente para o controle do inseto praga de grãos armazenados, *S. zeamais* (NGUEMTCHOUIN et al., 2010). Tem-se ainda a constatação da atividade pesticida do extrato aquoso das cascas dos frutos de *A. squamosa* para adultos de *Haemaphysalis bispinosa* Neumann (Acari: Ixodidae), para a mosca hematófaga *Hippobosca maculata* Leach (Diptera: Hippoboscidae), e para o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) e larvicida para *Anopheles subpictus* Grassi e *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) (MADHUMITHA et al., 2012).

Os óleos essenciais das anonáceas *Guatteria hispida* R.E.Fr., *Guatteria blepharophylla* Mart. e *Guatteria friesiana* Erkens & Maas tiveram suas bioatividades avaliadas para *A. aegypti*, sendo o mais ativo aquele proveniente de *G. friesiana*. Ademais, análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear demonstraram que os constituintes majoritários de *G. hispida* são o pineno e o cariofileno, ao passo que para *G. blepharophylla* e *G. friesiana*, são, respectivamente, óxido de cariofileno e eudesmol (ACIOLE et al., 2011).

Extratos de folhas de *A. squamosa* mostraram-se tóxicos para *Callosobruchus chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidae) sendo que estudos fitoquímicos demonstraram que possivelmente a bioatividade ocorria devido à presença de flavonoides. De forma análoga, foi constatada a atividade inseticida para dípteros *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) e *Anopheles gambiae* Giles *sensu stricto* (Diptera: Culicidae), do extrato etanólico das folhas de *A. squamosa*, as quais foram coletadas em diferentes zonas ecológicas. O estudo fitoquímico revelou a presença de substâncias pertencentes às classes químicas dos alcaloides, terpenoides e flavonoides (DANIEL et al., 2011).

Em se tratando das acetogeninas produzidas por anonáceas, são inúmeros os relatos de bioatividade para artrópodes pragas (ALALI et al., 1998; GONZÁLEZ-COLOM et al., 2002; ÁLVAREZ-COLOM et al., 2010; HOE et al., 2010; TOLOSA et al., 2012). Especificamente para *S. frugiperda*, é possível mencionar a bulatacina que afeta a respiração celular em culturas de células de *S. frugiperda* e em preparações mitocondriais de *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae) (AHAMMADSAHIB et al., 1993; LÜMMEN, 1998). Outro exemplo consiste no trabalho realizado por Álvarez-Colom et al. (2007), que isolaram quatorze acetogeninas das sementes de *Annona cherimolia* Mill. (Annonaceae), sendo selecionadas nove dessas substâncias para serem testadas contra *S. frugiperda*. Foi constatado que a esquamocina foi o composto mais

tóxico para *S. frugiperda*, provocando alta mortalidade nos primeiros estágios larvais. Os outros compostos, tais como itrabina, asimicina, neoanonina, motrilina, tucumanina, cherimolina-1, cherimolina-2 e almunequina, causaram mortalidade durante a fase pupal e malformações nos adultos.

### **3.5 Anonáceas selecionadas para esse estudo**

Para a seleção das espécies vegetais no presente estudo, foi levado em consideração se as mesmas não apresentavam relato, em literatura, de atividade inseticida para *S. frugiperda* e *Tetranychus* spp. Ademais, foi verificada a abundância das mesmas na região de Lavras - MG e a escassez de estudos fitoquímicos.

#### **3.5.1 *Annona cacans* Warm.**

*Annona cacans* conhecida popularmente como cortição, araticum-cagão ou quaresma, é uma planta decídua, pioneira, característica da Floresta Pluvial Atlântica e nativa das regiões Sul e Sudeste do Brasil (LORENZI, 2002). Trabalhos prévios realizados por Saito e Alvarenga (1994) possibilitaram o isolamento e identificação de flavonoides e ácido *p*-cumárico.

#### **3.5.2 *Annona coriacea* Mart.**

*Annona coriacea* é uma árvore bastante abundante nos Cerrados do Brasil, conhecida popularmente como fruto-do-conde, cabeça-de-negro, araticum-do-campo, araticum-dos-lisos ou marolinho. Estudos etnofarmacológicos realizados com os índios Krahô, que habitam o Cerrado brasileiro, indicaram que essa planta é tóxica, sendo contra indicada a sua

ingestão por mulheres grávidas (RODRIGUES, 2007). Entretanto, essa planta também possui propriedades analgésicas, anti-inflamatórias (SOUSA; DEL-VECHIO-VIEIRA; KAPLAN, 2007) e antinociceptivas (SOUSA et al., 2011).

Dentre as suas atividades biológicas é possível relatar a toxicidade contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, e a não toxicidade para eritrócitos humanos (TOLEDO et al., 2010). Além da constatação da atividade antileishmaniose e tripanocida do óleo essencial dessa planta, análises cromatográficas revelaram que os constituintes majoritários são sesquiterpenos (76,7%) e monoterpenos (20,0%) (SIQUEIRA et al., 2011).

Também vale destacar que as lectinas provenientes de *A. coriacea* foram tóxicas a *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) e *Corcyra cephalonica* (Stainton) (Pyralidae: Galleriinae), reduzindo a sobrevivência e a massa dos insetos. Ademais, foram constatadas alterações na membrana intestinal, com conseqüente interrupção dos mecanismos de reciclagem de enzimas digestivas desses insetos (COELHO; MARANGONI; MACEDO, 2007). Também é possível relatar o isolamento de uma lectina com atividade hemaglutinante, a partir de sementes de *A. coriacea* (COELHO et al., 2006). Já os alcaloides totais, obtidos dessa planta, foram tóxicos às formas promastigotas de *Leishmania chagasi*, além de apresentarem efeitos deletérios sobre *Trypanosoma cruzi* (TEMPONE et al., 2005). Também é possível relatar a presença de alguns diterpenoides nessa espécie (FERRARI; PELIZZONI; FERRARI, 1971; MUSSINI et al., 1973).

No que diz respeito aos estudos com acetogeninas, já foram isoladas as seguintes estruturas das raízes de *A. coriacea*: coriaciclodienina e coricicloenina (SILVA; ROBLOT; CAVÉ, 1997), coriadienina (SILVA et al., 1996), coriaciana e 4-deoxicoriacina (MENESES et al., 1995) e coriaheptocinas A e B (SILVA et al., 1997).

Quanto à atividade inseticida, o extrato metanólico dessa planta causou alterações morfológicas no intestino de *A. aegypti*, sugerindo indução no processo de apoptose das células intestinais de larvas desse inseto (COSTA et al., 2012). Também foi constatado que o extrato dessa planta interrompeu o desenvolvimento de ninfas e adultos de *Rhodnius neglectus* Lent (Hemiptera, Reduviidae), provocando altas taxas de mortalidade. Também foi constatada inibição de ecdise em ninfas, redução na capacidade reprodutiva das fêmeas, dissuasão na alimentação e alterações morfológicas em ninfas e adultos (CARNEIRO; PEREIRA; GALBIATI, 2013).

### 3.5.3 *Annona neolaurifolia* H. Rainer

**Sinonímia:** *Rollinia laurifolia* Schltd (OLIVEIRA-FILHO, 2013).

Estudos realizados com *Annona neolaurifolia* já permitiram a purificação e identificação de diversas acetogeninas, tais como laurifolina (SANTOS PIMENTA et al., 2001), uvariamicina, solamina e gonionenina (NASCIMENTO et al., 2003), rolifolina, anonina-I, rolilaurina, uvariamicina-I e uvariamicina-II (NASCIMENTO et al., 2005). Essa planta apresentou atividade citotóxica para diferentes linhagens celulares (CUNHA et al., 2009) e também já foi relatada atividade antiviral (BRANDÃO et al., 2011).

### 3.5.4 *Annona sylvatica* A.St.-Hil.

**Sinonímias:** *Annona silvestris* Vell., *Annona fagifolia* A.St.-Hil. & Tul., *Annona exalbida* Vell., *Rollinia sylvatica* (A.St.-Hil.) Mart., *Rollinia exalbida* (Vell.) Mart. e *Rollinia fagifolia* A.St.-Hil. (OLIVEIRA-FILHO, 2013).

Estudos com essa espécie são bastante escassos. Contudo, a partir dos frutos secos de *Annona sylvatica* foi isolada a silvacitina, um composto

extremamente citotóxico para células tumorais humanas e com atividade inseticida para *O. nubilalis* (MIKOLJCZAK et al., 1990). Salienta-se que os frutos dessa planta são ricos em ácido oleico e vitamina C (ANDRADE et al., 2012; PEREIRA et al., 2013).

A atividade anti-inflamatória e anticancerígena do óleo essencial de *A. sylvatica* também já foi relatada; ademais análises por cromatografia gasosa revelaram que os constituintes majoritários são sesquiterpenos (FORMAGIO et al., 2013).

### 3.5.5 *Duguetia arenicola* Maas

**Sinónimias:** *Duguetia furfuracea* A.St.-Hil. (= *Duguetia coriacea* Sonder), *Duguetia duckei* R.E.Fr., *Duguetia glabriuscula* (R.E.Fr.) R.E.Fr., *Duguetia phaeoclados* (Mart.) Maas & H.Rainer e *Duguetia rotundifolia* R.E.Fr.] (OLIVEIRA-FILHO, 2013).

*Duguetia arenicola*, popularmente conhecida como pindaúva-do-campo ou araticum-miúdo, é um arbusto típico de cerrados secos do Brasil Central, sendo particularmente frequente em Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Minas Gerais (VALTER et al., 2008). Essa espécie é utilizada na medicina tradicional para o tratamento de reumatismo (RODRIGUES; CARVALHO, 2007) e como antitérmico (RODRIGUES; MENDES; NEGRI, 2006).

Dentre os estudos realizados com essa espécie, já foram constatadas atividades antitumoral, tripanocida, antiplasmodial e leishmanicida do extrato bruto e de alcaloides isolados de *D. arenicola* (FISCHER et al., 2004; MESQUITA et al., 2005; SILVA et al., 2009). Vale ainda destacar o isolamento de princípios ativos provenientes do caule subterrâneo de *D. arenicola*, os quais foram tóxicos para *Artemia salina* (SILVA et al., 2007). O extrato hexânico dessa planta também se mostrou ativo para larvas de *A. aegypti* (CL<sub>50</sub> = 56,6

µg/mL) (RODRIGUES et al., 2006). Estudos realizados com o extrato hexânico das folhas dessa planta, revelaram que o mesmo não apresentou bioatividade para *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) (VALENTE et al., 2014). Em outros estudos realizados com o óleo essencial dessa planta, foi revelada a presença de terpenos e sesquiterpenos (HELLMANN; SIQUEIRA, 2005; SILVA et al., 2007).

Alcaloides também foram isolados das partes aéreas de *D. arenicola* por Carollo et al. (2006) e Carollo e Siqueira (2009). Estudos fitoquímicos realizados com a casca do caule de *D. arenicola* possibilitaram o isolamento de terpenoides (GOMES PEREIRA et al., 2003). Ainda vale ressaltar o isolamento de alcaloides a partir da casca do caule de *D. arenicola*, utilizando fracionamento biodirecionado com *A. salina* (SIQUEIRA et al., 2001).

### **3.5.6 *Duguetia lanceolata* A. St.-Hil.**

*Duguetia lanceolata* conhecida popularmente como pindaíva, pindaíba, pindaúva e perovana, é empregada na medicina popular para o tratamento de contusões (RODRIGUES; CARVALHO, 2008).

Sousa et al. (2008) constataram os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato etanólico das folhas de *D. lanceolata*. Também pode ser mencionada a atividade antitripanosoma do extrato etanólico dessa planta (TEMPONE et al., 2005). A fração de alcaloides de *D. lanceolata* também apresentou atividade antiplasmodial (FISCHER et al., 2004).

O óleo essencial das cascas dos galhos de *D. lanceolata* apresentou efeito antimicrobiano e citotóxico; ademais, por meio de análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas constataram que os constituintes majoritários são o elemeno, óxido de cariofileno e selineno (SOUSA et al., 2012).

### 3.5.7 *Guatteria australis* A.St.-Hil.

**Sinonímias:** *Guatteria acutiflora* Mart., *Guatteria acutipetala* R.E.Fr., *Guatteria asterantha* R.E.Fr., *Guatteria blanchetiana* R.E.Fr., *Guatteria clavigera* R.E.Fr., *Guatteria curvinervia* R.E.Fr., *Guatteria densicoma* Mart., *Guatteria dimorphopetala* R.E.Fr., *Guatteria dusenii* R.E.Fr., *Guatteria flava* A.St.-Hil., *Guatteria fruticosa* R.E.Fr., *Guatteria glabrescens* R.E.Fr., *Guatteria gomeziana* A.St.-Hil., *Guatteria hilariana* Schltld., *Guatteria hookeri* A.St.-Hil. & Tul., *Guatteria klotzschiana* Mart., *Guatteria lutea* A.St.-Hil., *Guatteria minarum* R.E.Fr., *Guatteria mosenii* R.E.Fr., *Guatteria neglecta* R.E.Fr., *Guatteria nigrescens* Mart., *Guatteria odontopetala* Mart., *Guatteria paranensis* R.E.Fr., *Guatteria parvifolia* R.E.Fr., *Guatteria penduliflora* R.E.Fr., *Guatteria polycarpa* R.E.Fr., *Guatteria psilopus* Mart., *Guatteria reflexa* R.E.Fr., *Guatteria riedeliana* R.E.Fr., *Guatteria salicifolia* R.E.Fr., *Guatteria silvatica* R.E.Fr., *Guatteria sordida* R.E.Fr. e *Guatteria tenuis* R.E.Fr. (OLIVEIRA-FILHO, 2013).

A cortiça ou pindaúva-negra (*Guatteria australis*) apresenta atividade antifúngica contra *Cladosporium sphaerospermum* (CARDOSO-LOPES et al., 2008). Também foi demonstrada atividade de alcaloides dessa planta contra as formas promastigotas de *Leishmania chagasi* (TEMPONE et al., 2005) e cepas de *Plasmodium falciparum* (FISCHER et al., 2004). Dentre os alcaloides isolados dessa espécie é possível citar a guaterina e a aterospermidina (HARRIS; GEISSMAN, 1965).

### 3.5.8 *Xylopiya brasiliensis* Spreng.

**Sinonímia:** *Xylopiya gracilis* (R.E.Fr.) R.E.Fr. (OLIVEIRA-FILHO, 2013).

Estudos fitoquímicos realizados com os galhos de *Xylopiã brasiliensis*, conhecida popularmente como pindaíba, revelaram a presença de sesquiterpenos, diterpenos, esteroides e alcaloides (MOREIRA; LAGO; ROQUE, 2005). Em trabalho empregando o material proveniente das folhas de *X. brasiliensis* foi constatada a presença de sesquiterpenos, juntamente com quatro derivados do aromadendrano e três esteroides (MOREIRA et al., 2003). O óleo essencial de *X. brasiliensis* apresentou grande abundância de monoterpenos e sesquiterpenos (LAGO et al., 2003). Também já foram isolados alcaloides aporfínicos de *X. brasiliensis* (CASAGRANDE; MEROTTI, 1970).

### 3.5.9 *Xylopiã emarginata* Mart.

Estudos conduzidos com o extrato hexânico, oriundo da casca da raiz de *Xylopiã emarginata*, demonstraram a presença de metabólitos com forte atividade antimalárica (MESQUITA et al., 2007). Também empregando o extrato hexânico proveniente dos frutos de *X. emarginata*, Moreira et al. (2007) isolaram sesquiterpenos, hidrocarbonetos e uma cetona alifática. Existem registros da atividade antiplasmodial do extrato etanólico de *X. emarginata* (FISCHER et al., 2004). Vale ressaltar o isolamento de diterpenos a partir dos galhos de *X. emarginata* (MOREIRA; ROQUE; LAGO, 2006). O estudo do óleo essencial das folhas desta planta revelou a presença de sesquiterpenos como compostos majoritários (LAGO et al., 2005; MAIA et al., 2005). Também já foi reportado o isolamento de alcaloides, flavonoides, sesquiterpenos, diterpenos e fitoesteroides dessa planta (MOREIRA; LAGO; ROQUE, 2003). Ainda é possível exemplificar que, Colman-Saizarbitoria et al. (2009) isolaram uma nova acetogenina, a ximarginatina, a partir do fracionamento biodirecionado com ensaio de letalidade com *A. salina*.

### 3.5.10 *Xylopi* *sericea* A.St.-Hil.

**Sinonímia:** *Xylopi* *intermedia* R.E.Fr. (OLIVEIRA-FILHO, 2013).

Em estudos etnobotânicos conduzidos em comunidades indígenas bolivianas, foi constatado o emprego popular dessa planta para o tratamento de sarna (HAJDU; HOHMANN, 2012).

Quanto aos estudos fitoquímicos, os óleos essenciais das folhas e frutos de *Xylopi* *sericea* apresentaram monoterpenos e sesquiterpenos como constituintes majoritários, sendo que o óleo das folhas foi mais ativo que o dos frutos para *T. urticae* (PONTES et al., 2007). Especificamente das sementes de *X. sericea*, foram isolados mono e diterpenoides (TAKAHASHI et al., 2001). A constituição química de diferentes partes de *X. sericea* revelou que as raízes apresentam como compostos majoritários mono, sesqui e diterpenos, ao passo que no tronco, folhas e frutos, mono e sesquiterpenos se apresentaram como constituintes majoritários (CÂMARA; ALENCAR; SILVEIRA, 1996). O óleo da casca da raiz de *X. sericea* apresentou moderada atividade bacteriostática e fungistática. Quando submetido a análises cromatográficas apresentou como constituintes majoritários monoterpenos e sesquiterpenos (FOURNIER et al., 1994).

### 3.6 Métodos empregados para a busca de metabólitos de plantas bioativas

No contexto de busca por metabólitos bioativos de plantas, várias abordagens podem ser empregadas, sendo que em todos os casos a primeira etapa envolve a extração das substâncias presentes nos tecidos vegetais. Atualmente, existem vários métodos disponíveis para a extração de metabólitos, tais como, destilação, maceração, extração por solvente, extração com fluido, extração assistida por ultrassom, percolação, extração Soxhlet, extração por

solvente pressurizado, extração sob refluxo, destilação a vapor, extração empregando ácido/base entre outras (SEIDEL, 2012; YALAVARTHI; THIRUVENGADARAJAN, 2013), o produto resultante da extração é uma mistura complexa com grande número de substâncias oriundas do tecido vegetal em estudo.

De forma geral, o produto resultante da extração é submetido a ensaios com vistas a avaliar o potencial biológico das substâncias ali presentes. É possível mencionar que os óleos essenciais das folhas frescas de *Pelargonium graveolens* L. (Geraniaceae) e *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) foram extraídos empregando-se o método de hidrodestilação, tendo, em seguida, sido submetidos a bioensaios com lagartas de *S. frugiperda*, que permitiu constatar a atividade biocida de ambos os óleos (NICULAU et al., 2013). No mesmo sentido, é possível citar a bioatividade de extratos aquosos e orgânicos (hexânico, clorofórmico e metanólico) das folhas, sementes e caule de *Cleome arabica* L. (Capparidaceae) para lagartas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae), destacando-se que os extratos solúveis em metanol foram os mais bioativos (LADHARI et al., 2013).

Após comprovada a atividade biológica, o passo seguinte consiste na purificação da(s) substância(s) responsável(is) pela atividade biológica, o que se faz pelo emprego de várias técnicas de separação de substâncias. De maneira geral, a primeira etapa da separação (ou fracionamento) consiste na partição do extrato da planta com uma série de solventes com diferentes graus de polaridade, originando frações, as quais são submetidas a várias técnicas cromatográficas (cromatografia em camada delgada, cromatografia em coluna de sílica gel e cromatografia líquida de alta eficiência) com vista ao isolamento da(s) substância(s) bioativa(s).

O processo de fracionamento pode ser biodirecionado com testes biológicos e nesse caso em cada etapa as frações obtidas devem ser submetidas

aos ensaios biológicos, o que consiste na grande limitação técnica desse método, pois os bioensaios devem ser rápidos e requerer pouca quantidade de material.

Por outro lado, o fracionamento pode ser realizado sem ser biodirecionado. Assim são isoladas as substâncias majoritárias, as quais no final do processo são submetidas a ensaios biológicos. Como exemplo de sucesso do fracionamento não bidirecionado, é possível citar que o estudo fitoquímico das cascas das raízes de *Tripterygium wilfordii* Hook. F. (Celastraceae) permitiu o isolamento de sete alcaloides sesquiterpênicos. Alguns desses alcaloides, quando empregados em ensaios biológicos, apresentaram largo espectro de atividade inseticida, com toxicidade para *Mythimna separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae), *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae), *Culex pipiens pallens* Coquillett (Diptera: Culicidae) e *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) (MA et al., 2014).

Uma das limitações do processo de fracionamento é que muitas das vezes é possível que se tenha mais de um componente ativo, na amostra a ser fracionada, sendo que nesses casos durante o processo de fracionamento pode ocorrer uma aparente perda da atividade dos compostos isolados, quando testados separadamente (INUI et al., 2012).

Em decorrência dessa e de outras limitações, uma abordagem que vem sendo empregada na busca por metabólitos ativos de plantas é a metabolômica. A metabolômica é uma ciência cujo objetivo é explorar qualitativa e quantitativamente os metabólitos produzidos por um organismo, sob certas condições (KIM; CHOI; VERPOORTE, 2010). Dentre as técnicas disponíveis para o estudo metabolômica, a espectrometria por ressonância magnética nuclear (RMN) consiste em um dos métodos mais empregados (SIMMLER et al., 2014), pois consiste na técnica mais poderosa para elucidação estrutural de compostos orgânicos.

Até o momento o emprego da metabolômica na entomologia se encontra restrito a estudos envolvendo interações entre os insetos e suas plantas hospedeiras, com o objetivo de inferir sobre os compostos envolvidos na resistência à herbivoria (LEISS et al., 2011). Exemplificando, é possível mencionar a análise do perfil metabólito por RMN de duas variedades de pêsego, com níveis diferentes de suscetibilidade ao ataque por *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera: Tephritidae). Para a condução do trabalho foram preparados extratos aquosos provenientes das duas variedades de pêsego, os quais foram submetidos à análise por RMN. Em seguida, procedeu-se à análise multivariada dos dados, empregando-se análise por componentes principais (PCA). Os autores constataram que os níveis de glicose, xilose, mio-inositol, colina, isoleucina e valina, foram maiores na cultivar mais susceptível. Ao passo que os níveis de ácido fumárico, alanina, ácido quínico, sacarose, fucose, ácido clorogênico e neoclorogênico foram maiores na cultivar mais resistente. Assim, os autores puderam inferir sobre os metabólitos envolvidos no processo de resistência dessas cultivares (CAPITANI et al., 2013).

Desse modo, a metabolômica viabiliza a identificação e análise quantitativa de substâncias ativas em misturas complexas. Tal abordagem permite, por exemplo, inferir qual metabólito é o responsável por determinada atividade biológica sem a necessidade de um isolamento prévio, o que nos casos de compostos já conhecidos, permite economia considerável de tempo.

Exemplificando o uso desta técnica, que tem sido mais empregada na procura por substâncias fitoterápicas, pode-se citar que o rizoma de *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. (Zingiberaceae) foi submetido à extração com vários solventes de diferentes graus de polaridade, o que originou 17 frações. Uma alíquota de cada uma das frações foi submetida à análise por RNM de  $^1\text{H}$  e a outra parte foi empregada na realização de ensaio *in vitro*, com vista a verificar a capacidade de inibição do receptor de adenosina A1. Posteriormente, foi

conduzida a análise multivariada, empregando-se como entrada os dados de RMN de  $^1\text{H}$  das frações e da atividade biológica, possibilitando o agrupamento das frações de acordo com o perfil metabólito e atividade biológica. Também foram distinguidos os sinais que possivelmente estariam contribuindo para a atividade biológica, e por meio de experimentos de RMN bidimensionais, foi sugerido que as moléculas bioativas seriam a pinocembrina e hidroxi-panduratin (YULIANA et al., 2013).

Outro exemplo consiste na extração de metabólitos produzidos por diversas espécies de esponjas marinhas, seguida de análise por RMN de  $^1\text{H}$ , e realização de ensaio com vista a verificar a capacidade de inibição do receptor de adenosina A1. Foram conduzidas análises multivariadas, empregando-se regressão por mínimos quadrados parciais (*PLS*) e ortogonais (*OPLS*). Os dados de entrada foram os deslocamentos químicos e intensidade dos sinais obtidos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , e os dados do ensaio biológico. Foi possível o agrupamento das espécies de esponjas de acordo com a atividade biológica e do perfil metabólito, sendo distinguidos os sinais que contribuíram para a separação dos espécimes. Os sinais de deslocamento químico foram atribuídos ao halisulfate e suvanine. Em seguida, padrões comerciais dessas substâncias foram testados corroborando os resultados da análise metabolômica (ALI et al., 2013).

A limitação do emprego da metabolômica na busca por moléculas bioativas é a complexidade da identificação de substâncias em misturas complexas, havendo assim, a necessidade de conduzir paralelamente estudos de fracionamentos clássicos.

## REFERÊNCIAS

ACIOLE, S. D. G. et al. Insecticidal activity of three species of *Guatteria* (Annonaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, Bogotá, v. 37, n. 2, p. 262-268, jul./dic. 2011.

AFIFY, A. E.-M. M. R.; ALI, F. S.; TURKY, A. F. Control of *Tetranychus urticae* Koch by extracts of three essential oils of Chamomile, Marjoram and Eucalyptus. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Haikou, v. 2, n. 1, p. 24-30, 2012.

AHAMMADSAHIB, K. I. et al. Mode of action of bullatacin: a potent antitumor and pesticidal annonaceous acetogenin. **Life Sciences**, Elmsford, v. 53, n. 14, p.1113-1120, 1993.

ALALI, F. Q. et al. Annonaceous acetogenins as natural pesticides: potent toxicity against insecticide-susceptible and - resistant german cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, n. 3, p. 641-649, June 1998.

ALI, K. et al. Identification of bioactive metabolites against adenosine A1 receptor using NMR-based metabolomics. **Metabolomics**, New York, v. 9, n. 4, p. 778-785, Aug. 2013.

ALIAS, A. et al. Alkaloids from *Fissistigma latifolium* (Dunal) Merr. **Molecules**, Switzerland, v. 15, n. 7, p. 4583-4588, June 2010.

ÁLVAREZ-COLOM, O. et al. Insecticidal, mutagenic and genotoxic evaluation of annonaceous acetogenins. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 5, n. 3, p. 391-394, Mar. 2010.

ÁLVAREZ-COLOM, O. et al. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Pest Science**, New York, v. 80, n. 1, p. 63-67, Feb. 2007.

ANDRADE, J. M. D. M. et al. Comparison of the fatty acid profiles of edible native fruit seeds from Southern Brazil. **International Journal of Food Properties**, Philadelphia, v. 15, n. 4, p. 815-822, June 2012.

ARRIAGA, A. M. C. et al. Chemical constituents and insecticidal activity of *Rollinia leptopetala* (Annonaceae). **Natural Product Communications**, Westerville, v. 3, n. 10, p. 1687-1688, 2008.

ASASE, A.; AKWETEY, G. A.; ACHEL, D. G. Ethnopharmacological use of herbal remedies for the treatment of malaria in the Dangme West District of Ghana. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 129, n. 3, p. 367-376, June 2010.

ATTIA, S. et al. A review of the major biological approaches to control the worldwide pest *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) with special reference to natural pesticides: Biological approaches to control *Tetranychus urticae*. **Journal of Pest Science**, New York, v. 86, n. 3, p. 361-386, Sept. 2013.

BARROS, R. G. et al. Eficiência de inseticidas no controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 3, p. 179-182, set./dez. 2005.

BOYOM, F. F. et al. Antiplasmodial volatile extracts from *Cleistopholis patens* Engler & Diels and *Uvariastrum pierreanum* Engl. (Engl. & Diels) (Annonaceae) growing in Cameroon. **Parasitology Research**, Berlin, v. 108, n. 5, p. 1211-1217, May 2011.

BRANDÃO, G. C. et al. Antiviral activity of plants occurring in the state of Minas Gerais (Brazil): Part III. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, Rajasthan, v. 3, n. 4, p. 223-236, 2011.

BRINDIS, F. et al. Aqueous extract of *Annona macrophyllata*: a potential  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. **BioMed Research International**, Cairo, Art. ID 591313, 6 p. 2013.

BUSATO, G. R. et al. Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, das culturas do milho e do arroz irrigado. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 525-529, Oct./Dec. 2002.

CÂMARA, C. A. G. da; ALENCAR, J. W. de; SILVEIRA, E. R. Volatile constituents of *Xylopiya sericea* St. Hill. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 8, n. 1, p. 75-78, Jan./Feb. 1996.

CAPITANI, D. et al. Peach fruit: metabolic comparative analysis of two varieties with different resistances to insect attacks by NMR spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 61, n. 8, p. 1718-1726, Feb. 2013.

CARDOSO-LOPES, E. M. et al. Screening for antifungal, DNA-damaging and anticholinesterasic activities of Brazilian plants from the Atlantic Rainforest - Ilha do Cardoso State Park. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, Dec. 2008. Supplement, 0.

CARNEIRO, A. P.; PEREIRA, M. J.; GALBIATI, C. Biocide activity of *Annona coriacea* seeds extract on *Rhodnius neglectus* (Hemiptera: Reduviidae). **Revista de Biologia Tropical**, San José, v. 61, n. 1, p. 419-427, mar. 2013.

CAROLLO, C. A. et al. N-Nitrosoanonaine and N-nitrosoxylophine, aporphine alkaloids from *Duguetia furfuracea*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 69, n. 8, p. 1222-1224, Aug. 2006.

CAROLLO, C. A.; SIQUEIRA, J. M. de. Isolation of a minor nitro-alkaloid from the aerial parts of *Duguetia furfuracea* – Annonaceae. **Natural Product Research**, Abingdon, v. 23, n. 7, p. 633-637, 2009.

CASAGRANDE, C.; MEROTTI, G. Studies in aporphine alkaloids. 3. Isolation and synthesis of alkaloids of *Xylophia brasiliensis* St. Hil. **Farmaco: edizione scientifica**, Pavia, v. 25, n. 11, p. 799-808, Nov. 1970.

CASTRO-MORENO, M. et al. Influence of seasonal variation on the phenology and liriodenine content of *Annona lutescens* (Annonaceae). **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 126, n. 4, p. 529-537, July 2013.

CESPEDES, C. L. et al. The insecticidal, molting disruption and insect growth inhibitory activity of extracts from *Condalia microphylla* Cav. (Rhamnaceae). **Industrial Crops and Products**, New York, v. 42, n. 1, p. 78-86, Mar. 2013.

CHEN, A.; KUANG, J.; ZHENG, P. **Plant extract insecticide useful for controlling *Tetranychus cinnabarinus*, *Plutella xylostella*, vegetables aphids, armyworm and pine wood nematode, comprises *Lycoris radiata* bulb extract and an agrochemical adjuvant**. Patent Number(s) CN102613257-A. 2012.

COELHO, M. B. et al. Neutrophil migration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. **Toxicon**, Elmsford, v. 48, n. 5, p. 529-535, 2006.

COELHO, M. B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Coreyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). **Comparative Biochemistry and Physiology - C toxicology and pharmacology**, New York, v. 146, n. 3, p. 406-414, Sept. 2007.

COLMAN-SAZARBITORIA, T. et al. Xymarginatin: A new acetogenin inhibitor of mitochondrial electron transport from *Xylopiia emarginata* Mart., Annonaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 19, n. 4, p. 871-875, Oct./Dec. 2009.

COSTA, M. S. et al. Morphological changes in the midgut of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae following exposure to an *Annona coriacea* (Magnoliales: Annonaceae) extract. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 41, n. 4, p. 311-314, June 2012.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1995. 45 p.

CUNHA, M. M. et al. Screening of cytotoxic activity in hexanic and ethanolic extracts of *Rollinia laurifolia*. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 28, n. 2, p. 234-240, 2009.

DANIEL, B. et al. Comparison of mosquito larvicidal activity of *Annona squamosa* leaves growing in different eco-zones in Tanzania. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, New Delhi, v. 2, n. 4, p. 566-572, 2011.

DESMARCHELIER, C. Neotropics and natural ingredients for pharmaceuticals: Why isn't South American Biodiversity on the Crest of the Wave? **Phytotherapy Research**, London, v. 24, n. 6, p. 791-799, June 2010.

DOURADO, P. M. **Resistência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a spinosad no Brasil**. 2009. 70 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2009.

EL-SHARABASY, H. M. Acaricidal activities of *Artemisia judaica* L. extracts against *Tetranychus urticae* Koch and its predator *Phytoseiulus persimilis* Athias Henriot (Tetranychidae: Phytoseiidae). **Journal of Biopesticides**, Tamilnadu, v. 3, n. 2, p. 514-519, 2010.

ELISA, G.-P. L. et al. Biological activity of *Ipomoea pauciflora* Martens and Galeotti (Convolvulaceae) extracts and fractions on larvae of *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae). **African Journal of Biotechnology**, Grahamstown, v. 9, n. 24, p. 3659-3665, 2010.

FALL, D. et al. Antiparasitic effect of Senegalese Annonaceae used in traditional medicine. **Dakar Medical**, Dakar, v. 48, n. 2, p.112-116, 2003.

FARAG, M. A. Chemical composition and biological activities of *Asimina triloba* leaf essential oil. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 47, n. 10, p. 982-986, Oct. 2009.

FEITOSA, E. M. A. et al. Chemical composition and larvicidal activity of *Rollinia leptopetala* (Annonaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 375-378, 2009.

FERNANDES, M. G.; BUSOLI, A. C.; BARBOSA, J. C. Amostragem seqüencial de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) em algodoeiro. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 8, n. 3, p. 213-218, set./dez. 2002.

FERRARI, M.; PELIZZONI, F.; FERRARI, G. New diterpenoids with clerodane skeleton. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 10, n. 12, p. 3267-3269, 1971.

FISCHER, D. C. H. et al. In vitro screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. **Acta Tropica**, Basel, v. 92, n. 3, p. 261-266, nov./dic. 2004.

FORMAGIO, A. S. N. et al. Composition and evaluation of the anti-inflammatory and anticancer activities of the essential oil from *Annona sylvatica* A. St.-Hil. **Journal of Medicinal Food**, Florida, v. 16, n. 1, p. 20-25, Jan. 2013.

FOURNIER, G. et al. Volatile constituents of *Xylopiya frutescens*, *X. pynaertii* and *X. sericea*: chemical and biological study. **Phytotherapy Research**, London, v. 8, n.3, p. 166-169, May 1994.

FUNARI, C. S. et al. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 10, 1605-1609, 2013.

GHADERI, S. et al. Toxicity and ovicidal activity of different plant extracts on two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, London, v. 46, n. 1, p. 120-126, 2013.

GIORGI, A. et al. Chemometric analysis of the secondary metabolite profile of Yarrow (*Achillea collina* Becker ex Rchb.) affected by phloem feeding *Myzus persicae* Sulzer aphids. **Journal of Entomological and Acarological Research, Ser. II**, Milano, v. 42, n. 2, p. 91-102, 2010.

GOMES PEREIRA, N. F. et al. Novel santalane sesquiterpenoids from the stem bark of *Duguetia glabriuscula* – Annonaceae. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 512-516, 2003.

GONZÁLEZ-COLOM, A. et al. Selective action of acetogenin mitochondrial complex I inhibitors. **Zeitschrift fur Naturforschung: section C journal of biosciences**, Tubigen, v. 57c, n. 11-12, p. 1028-1034, Nov./Dec. 2002.

HAJDU, Z.; HOHMANN, J. An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of Porvenir, Bajo Paraguá Indian Reservation, Bolivia. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 139, n. 3, p. 838-857, Feb. 2012.

HANSSON, D. et al. Green peach aphid [*Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae)] control using Brassicaceae ethyl ester oil sprays. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 137, n. 7, p. 530-539, Aug. 2013.

HARRIS, W. M.; GEISSMAN, T. A. Alkaloids of *Guatteria psilopus* Mart. guatterine and atherospermidine. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 30, n. 2, p.432-434, Feb. 1965.

- HE, S. et al. Synthesis and quantitative structure-activity relationship (QSAR) study of novel 4-acyloxypodophyllotoxin derivatives modified in the A and C rings as insecticidal agents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 61, n. 3, p. 618-625, Jan. 2013.
- HELLMANN, A. R.; SIQUEIRA, J. M. de. Sesquiterpenoids from the essential oil from leaves of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 33, n. 6, p. 647-649, 2005.
- HOE, P. K. et al. Biological activity of *Annona muricata* seed extracts. **Malaysian Journal of Science**, Kuala Lumpur, v. 29, n. 2, p. 153-159, 2010.
- INUI, T. et al. Unbiased evaluation of bioactive secondary metabolites in complex matrices. **Fitoterapia**, New York, v. 83, n. 7, p. 1218-1225, Oct. 2012.
- ISIDRO, R.; ALMEIDA, R.P.; PEREIRA, J. O. V. Consumo foliar de *Spodoptera frugiperda* em amendoim cultivares TATU e CNPA BR-1. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 37-42, dez. 1997.
- ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 51, n. 1, p. 45-66, Jan. 2006.
- JAYASURIYA, H. et al. Diterpenoid, steroid, and triterpenoid agonists of liver X receptors from diversified terrestrial plants and marine sources. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 68, n. 8, p. 1247-1252, Aug. 2005.
- JEFFERIES, P. R.; YU, P.; CASIDA, J. E. Structural modifications increase the insecticidal activity of ryanodine. **Pesticide Science**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 33-38, 1997.
- JUNIKKA, L.; KOEK-NOORMAN, J. Anatomical structure of barks in Neotropical genera of Annonaceae. **Annales Botanici Fennici**, Helsinki, v. 44, p. 79-132, 2007.
- KERSTEN, B. et al. Integrated transcriptomics and metabolomics decipher differences in the resistance of pedunculate oak to the herbivore *Tortrix viridana* L. **BMC Genomics**, v. 14, n. 737, Oct. 2013.

KIHAMPA, C. et al. Larvicidal and IGR activity of extract of Tanzanian plants against malaria vector mosquitoes. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 46, n. 2, p. 145-152, June 2009.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. **Nature Protocols**, London, v. 5, n. 3, p. 536-549, Mar. 2010.

LABORDA, R. et al. Effects of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* essential oils on *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Industrial Crops and Products**, New York, v. 48, p. 106-110, 2013.

LADHARI, A. et al. Effect of the extracts of the spider flower, *Cleome arabica*, on feeding and survival of larvae of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. **Journal of Insect Science**, v. 13, n. 61, p. 1-14, June 2013.

LAGO, J. H. G. et al. Composition of the leaf oil of *Xylopiya emarginata* Mart. (Annonaceae). **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 17, n. 6, p. 622-623, 2005.

LAGO, J. H. G. et al. Mono and sesquiterpenes from the leaf essential oil of *Xylopiya brasiliensis* Spreng. (Annonaceae). **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 15, n. 6, p. 406-407, 2003.

LEISS, K. A. et al. An eco-metabolomic study of host plant resistance to Western flower thrips in cultivated, biofortified and wild carrots. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 93, p. 63-70, Sept. 2013.

LEISS, K. A. et al. NMR-based metabolomics to identify secondary plant compounds involved in host plant resistance. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 2, p. 205-216, June 2011.

LIN, C.-Y. et al. Control of silverleaf whitefly, cotton aphid and kanzawa spider mite with oil and extracts from seeds of sugar apple. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, n. 4, p. 531-536, July/Aug. 2009.

LLANOS, C. A. H.; ARANGO, D. L.; GIRALDO, M. C. Insecticidal activity of *Annona muricata* (Anonaceae) seed extracts on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, Bogotá, v. 34, n. 1, p. 76-82, 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 2 v.

LÜMMEN, P. Complex I inhibitors as insecticides and acaricides. **Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics**, Amsterdam, v. 1364, n. 2, p. 287-296, May 1998.

MA, Z. et al. Isolation and insecticidal activity of sesquiterpenes alkaloids from *Tripterygium wilfordii* Hook F. **Industrial Crops and Products**, New York, v. 52, p. 642-648, Jan. 2014.

MADHUMITHA, G. et al. Acaricidal, insecticidal, and larvicidal efficacy of fruit peel aqueous extract of *Annona squamosa* and its compounds against blood-feeding parasites. **Parasitology Research**, Berlin, v. 111, n. 5, p. 2189-2199, Nov. 2012.

MAIA, J. G. S. et al. Leaf volatile oils from four Brazilian *Xylopi*a species. **Flavour and Fragrance Journal**, Chischester, v. 20, n. 5, p. 474-477, Sept. 2005.

MANNION, A. M.; MORSE, S. Biotechnology in agriculture: Agronomic and environmental considerations and reflections based on 15 years of GM crops. **Progress in Physical Geography**, London, v. 36, n. 6, p. 747-763, Aug. 2012.

MARCIC, D. Acaricides in modern management of plant-feeding mites. **Journal of Pest Science**, New York, v. 85, n. 4, p. 395-408, Dec. 2012.

MCLAUGHLIN, J. L. Paw Paw and Cancer: Annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 71, n. 7, p. 1311–1321, July 2008.

MENESES, S. E. L. et al. Coriacin and 4-deoxycoriacin, two new mono-THF acetogenins from the roots of *Annona coriacea*. **Natural Product Letters**, Basingstoke, v. 7, n. 3, p. 235-242, Sept. 1995.

MENSAH, R. **Control of insect pests**: composition for controlling insect pests e.g. cotton bollworm comprises an extract from *Clitoria ternatea* comprising secondary plant compounds e.g. which have insecticidal activity or which repel the insect pest; and optionally carrier. Patent Number: WO2012113017-A1. 30 ago. 2012; 21 fev. 2012

- MESQUITA, M. L. de. et al. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 7, p. 783-787, nov. 2005.
- MESQUITA, M. L. de. et al. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 110, n. 1, p. 165-170, Mar. 2007.
- MIKOLJCZAK, K. J. et al. Sylvaticin: a new cytotoxic and insecticidal acetogenin from *Rollinia sylvatica* (Annonaceae). **Experientia**, v. 46, n. 3, p. 324-327, Mar. 1990.
- MOREIRA, I. C. et al. Antifungal aromadendrane sesquiterpenoids from the leaves of *Xylopiya brasiliensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 14, n. 5, p. 828-831, Sept./Oct. 2003.
- MOREIRA, I. C. et al. Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopiya emarginata* (Annonaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 55-58, jan./mar. 2007.
- MOREIRA, I. C.; LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F. Alkaloid, flavonoids and terpenoids from leaves and fruits of *Xylopiya emarginata* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 535-537, 2003.
- MOREIRA, I. C.; LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F. Sesquiterpenes, diterpenes, steroids and alkaloid from branches of *Xylopiya brasiliensis* Spreng (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 33, n. 9, p. 948-951, 2005.
- MOREIRA, I. C.; ROQUE, N. F.; LAGO, J. H. G. Diterpene adducts from branches of *Xylopiya emarginata*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 34, v. 11, p. 833-837, July 2006.
- MOZAFFARI, F. et al. Toxicity and oviposition deterrence and repellency of *Mentha pulegium* (Lamiaceae) essential oils against *Tetranychus urticae* Koch (Teteranychidae). **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, London, v. 16, n. 5, p. 575-581, Nov. 2013.
- MUNDHE, K. S. et al. Detection of amino acids from the seeds of *Polyalthia longifolia*. **International Journal of ChemTech Research**, v. 1, n. 2, p. 298-299, Apr. 2009.

MUSSINI, P. et al. Constituents of *Annona coriacea*: the structure of a new diterpenoid. **Journal of the Chemical Society**, London, p. 2551-2557, 1973.

NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L. Review of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) genetic complexity and migration. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 91, n. 4, p. 546-554, 2008.

NASCIMENTO, F. C. et al. Acetogenins from the leaves of *Rollinia laurifolia*. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 88, n. 12, p. 3225-3231, Dec. 2005.

NASCIMENTO, F. D. C. do. et al. Annonaceous acetogenins from leaves of *Rollinia laurifolia*. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 319-322, maio/jun. 2003.

NGUEMTCHOUIN, M. M. G. et al. Insecticidal formulation based on *Xylopi aethiopica* essential oil and kaolinite clay for maize protection. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 9, p. 985-991, Sept. 2010.

NICASTRO, R. L. et al. Chlorfenapyr resistance in the spider mite *Tetranychus urticae*: Stability, cross-resistance and monitoring of resistance. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 41, n. 5, p. 503-513, Dec. 2013.

NICULAU, E. S. et al. Insecticidal activity of essential oils of *Pelargonium graveolens* l'Herit and *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 9, p. 1391-1394, 2013.

OKONKWO, E. U. Plant materials used for controlling insect pests of stored products in Nigeria, families Annonaceae, Piperaceae, and Rutaceae. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, Birmingham, v. 11, n. 1-2, p. 47-69, 2004.

OLIVEIRA-FILHO, A. T. **TreeAtlas 2.0, flora arbórea da América do Sul cisandina tropical e subtropical**: um banco de dados envolvendo biogeografia, diversidade e conservação. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.icb.ufmg.br/treetlan/>>. Acesso em: 20 nov. 2013.

OLOTUAH, O. F. Laboratory evaluation of pesticidal activities of *Hyptis suaveolens* in pest management. **International Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 2, p. 101-106, 2013.

PAVELA, R.; VRCHOTOVÁ, N. Insecticidal effect of furanocoumarins from fruits of *Angelica archangelica* L. against larvae *Spodoptera littoralis* Boisd. **Industrial Crops and Products**, New York, v. 43, n. 1, p. 33-39, May 2013.

PEREIRA, M. C. et al. Characterization, bioactive compounds and antioxidant potential of three Brazilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 29, n. 1, p. 19-24, Feb. 2013.

POGUE, G. M. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomological Society**, Philadelphia, v. 43, p. 1-202, 2002. (Paperback).

PONTES, A. F.; BARBOSA, M. R. V.; MAAS, P. J. M. Flora paraibana: Annonaceae Juss. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 18, n. 2, p. 281-293, abr./jun. 2004.

PONTES, W. J. T. et al. The essential oils of the leaves and fruits obtained by hydrodistillation of *Xylopi*a. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 838-841, jul./ago. 2007.

QI, L.W. et al. Anti-diabetic agents from natural products-an update from 2004 to 2009. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 10, n. 4, p. 434-457, Mar. 2010.

REJÓN-ORANTES, J. et al. Annonomontine, an alkaloid isolated from *Annona purpurea*, has anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 77, n. 4, p. 322-327, Mar. 2011.

RIBEIRO, L. D. P. et al. *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): a promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 55, p. 6-14, Oct. 2013.

RODRIGUES, A. M. S. et al. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 22, n. 2, p. 314-317, June 2006.

RODRIGUES, E.; MENDES, F. R.; NEGRI, G. Plants indicated by Brazilian Indians for disturbances of the central nervous system: a bibliographical survey. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, Baltimore, v. 6, n. 3, p. 211-244, 2006.

RODRIGUES, E. Plants of restricted use indicated by three cultures in Brazil (Caboclo-river dweller, Indian and Quilombola). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 111, n. 2, p. 295-302, May 2007.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Florística de plantas medicinais nativas de remanescentes de floresta estacional semidecidual na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Cerne**, Lavras, v. 14, n. 2, p. 93-112, abr./jun. 2008.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio dos cerrados na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 9, n. 2, p. 17-35, 2007.

ROEL, A. R. et al. Efeito de doses subletais do óleo de *Azadirachta indica* (Meliaceae) no mesêntero de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera, Noctuidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 54, n. 3, p. 505-510, 2010.

SAITO, M. L.; ALVARENGA, M. A. Alkaloids from *Annona cacans*. **Fitoterapia**, New York, v. 65, n. 1, p. 87, 1994.

SANTOS PIMENTA, L. P. et al. Laurifolin, a novel acetogenin from *Rollinia laurifolia* leaves. **Tetrahedron Letters**, Elmsford, v. 42, n. 48, p. 8433-8434, 2001.

SATO, M. E. et al. Monitoramento da resistência de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) a abamectin e fenpyroximate em diversas culturas no estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 2, p. 217-223, abr./jun. 2009.

SCOTTI, L. et al. Chemotaxonomy of three genera of the annonaceae family using self-organizing maps and <sup>13</sup>C NMR data of diterpenes. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 11, p. 2146-2152, 2012.

SEIDEL, V. Initial and bulk extraction of natural products isolation. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 864, p. 27-41, 2012.

SENA FILHO, J. G. et al. Preliminary phytochemical profile and characterization of the extract from the fruits of *Xylopia frutescens* Aubl. (Annonaceae). **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 20, n. 6, p. 536-538, 2008.

SIKDAR, D. C. **Extraction and preparation of eco-friendly bio-pesticide from custard apple seeds containing pesticidal composition**. Patent Number: IN200501477-14. 10 Mar. 2006.

SILVA-AGUAYO, G. et al. Bioactivity of boldo (*Peumus boldus* Molina) (Laurales: Monimiaceae) on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) and *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae). **Southwestern Entomologist**, Weslaco, v. 35, n. 3, p. 215-231, 2010.

SILVA, D. B. da. et al. Chemical constituents of the underground stem bark of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 18, n. 8, p. 1560-1565, 2007.

SILVA, D. B. da. et al. The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, Jena, v. 16, n. 11, p. 1059-1063, Nov. 2009.

SILVA, E. L. M. da. et al. Coriadienin, the first annonaceous acetogenin with two double bonds isolated from *Annona coriacea*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 59, n. 5, p. 528-530, May 1996.

SILVA, E. L. M. da. et al. Coriaheptocins A and B, the first heptahydroxylated acetogenins, isolated from the roots of *Annona coriacea*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 60, n. 2, p. 162-167, Feb. 1997.

SILVA, E. L. M. da.; ROBLOT, F.; CAVÉ, A. Coriacyclodienin and coriacycloenin: two new annonaceous acetogenins from *Annona coriacea*. **Heterocycles**, Sendai, v. 45, n. 5, p. 915-925, 1997.

SILVA, F. M. A. da. et al. Phytochemical study of the alkaloidal fractions of *Unonopsis duckei* R. E. Fr. guided by electrospray ionisation ion-trap tandem mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 25, n. 1, p. 45-49, Jan./Feb. 2014.

- SIMMLER, C. et al. Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 25, p. 51-59, Feb. 2014.
- SIQUEIRA, C. A. T. et al. Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriacea* and in vitro antiprotozoal activity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 33-40, Jan./Feb. 2011.
- SIQUEIRA, J. de. et al. Activity-guided isolation of the constituents from bark of stem of *Duguetia glabriuscula* - Annonaceae, using Brine Shrimp Lethality Test (BSL). **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 185-187, mar./abr. 2001.
- SOUSA, O. V.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; KAPLAN, M. A. C. Analgesic and anti-inflammatory properties of *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) leaves methanol extract. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 26, n. 6, p. 872-877, 2007.
- SOUSA, O. V. et al. Chemical composition and biological activities of the essential oils from *Duguetia lanceolata* St. Hil. Barks. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 11056-11066, Sept. 2012.
- SOUSA, O. V. et al. Efeitos antinociceptivo e antiinflamatório do extrato etanólico das folhas de *Duguetia lanceolata* St.-Hil. (Annonaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 27, n. 3, p. 398-402, 2008.
- SOUSA, O. V. et al. Pharmacological effects of the hexane and dichloromethane fractions from *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) leaves. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 30, n. 5, p. 868-873, 2011.
- SRIMONGKOLCHAI, W.; VICHITBANDHA, P.; PUNG, T. Toxic effects of leaf and flower crude extracts from *Lantana camara* on *Tetranychus urticae*. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 4881-4884, 2013.
- STORER, N. P. et al. Discovery and characterization of field resistance to Bt Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, May 2010.
- SUN, J. et al. Metabolites of *Ammopiptanthus mongolicus* induced by *Orgyia ericae* attack and mechanical wounding. **Plant, Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 69, p. 101-107, Aug. 2013.

TABASHNIK, B. E.; RENSBURG, J. B. J. van; CARRÍRE, Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, n. 6, p. 2011-2025, Dec. 2009.

TAKAHASHI, J. A. et al. Mono and diterpenes from seeds of *Xylopia sericea*. **Química Nova**, Sao Paulo, v. 24, n. 5, p. 616-618, 2001.

TANIMOTO, H.; KAKIUCHI, K. Recent applications and developments of organic azides in total synthesis of natural products. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 8, n. 7, p. 1021-1034, 2013.

TEMPONE, A. G. et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, Jena, v. 12, n. 5, p. 382-390, May 2005.

TOLEDO, C. E. M. de. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 133, n. 2, p. 420-425, Jan. 2010.

TOLOSA, D. et al. Insecticidal effects of acetogenins from *Rollinia occidentalis* seed extract. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 7, n. 12, p. 1645-1646, Dec. 2012.

UNIVERSITY OF FLORIDA. **Featured creatures: entomology and nematology**. Disponível em: <[http://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/fall\\_armyworm.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/fall_armyworm.htm)>. Acesso em: 7 set. 2013.

VALENTE, P. P. et al. In vitro acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, Berlin, v. 113, n. 1, p. 417-423, Jan. 2014.

VALTER, J. L. et al. Variação química no óleo essencial das folhas de seis indivíduos de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). **Revista Brasileira Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, n. 3, July/Sept. 2008.

VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ L. A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, Porto Alegre, v. 61, n. 1-2, p. 83-103, 2006.

VIRLA, E. G. et al. Fall armyworm strains (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina, their associate host plants and response to different mortality factors in laboratory. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 91, n. 1, p. 63-69, 2008. WANG, J. et al. Synthesis and insecticidal activity of new deoxypodophyllotoxin-based phenazine analogues against *Mythimna separata* Walker. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 61, n. 26, p. 6336-6343, July 2013.

WATKINS, F. et al. Antimicrobial assays of three native British plants used in Anglo-Saxon medicine for wound healing formulations in 10th century England. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 144, n. 2, p. 408-415, Nov. 2012.

WEERASINGHE, A. et al. Potent bioactivities of the endemic annonaceae heighten its dire conservation status. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, Colombo, Sri Lanka, v. 41, n. 4, p. 345-350, Dec. 2013.

XIE, H. et al. **Natural sesquiterpene guaiol compound and medicinal application thereof.** New seven-membered and five-membered framework guaiacol compound, i.e. 2-((3S,5R,8S)3,8-dimethyl-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydroazulen-5-yl)propan-2-ol, used as insecticidal active ingredient for natural plant pesticide. Patent Number: CN102795969-A. 23 maio 2011; 28 nov. 2012. 2013.

XU, H.; ZHANG, J. L. Natural products-based insecticidal agents 9. Design, semisynthesis and insecticidal activity of 28-acyloxy derivatives of toosendanin against *Mythimna separata* Walker in vivo. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, New York, v. 21, n. 7, p. 1974-1977, 2011.

YALAVARTHI, C.; THIRUVENGADARAJAN, V. S. A review on identification strategy of phyto constituents present in herbal plants. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 2, p. 123-140, 2013.

YANAR, D.; KADIOĞLU, I.; GÖKÇE, A. Acaricidal effects of different plant parts extracts on two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **African Journal of Biotechnology**, Grahamstown, v. 10, n. 55, p. 11745-11750, Sept. 2011.

YU, S. J. Insensitivity of acetylcholinesterase in a field strain of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 84, n. 2, p. 135-142, 2006.

YU, S. J.; MCCORD JUNIOR, E. Lack of cross-resistance to indoxacarb in insecticide-resistant *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Plutella Xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 63, n. 1, p. 63-67, Jan. 2007.

YULIANA, N. D. et al. Comprehensive extraction method integrated with NMR metabolomics: a new bioactivity screening method for plants, adenosine A1 receptor binding compounds in *Orthosiphon stamineus* Benth. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 83, n. 17, p. 6902-6906, July 2011.

YULIANA, N. D. et al. NMR metabolomics for identification of adenosine A1 receptor binding compounds from *Boesenbergia rotunda* rhizomes extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 150, n. 1, p. 95-99, 2013.

ZAVALA-SÁNCHEZ, M. A. et al. Activity of four salvia species against *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Southwestern Entomologist**, Weslaco, v. 38, n. 1, p. 67-74, 2013.

ZHANG, J. et al. Combinatorial synthesis of a series of alkyl/alkenylacyloxy derivatives at the C-28 position of toosendanin as insecticidal agents. **Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening**, v. 16, n. 5, p. 394-399, June 2013.

**SEGUNDA PARTE- ARTIGOS**

**ARTIGO 1** Seleção de anonáceas para o controle de *Spodoptera frugiperda* e análise exploratória do perfil metabólito de *Duguetia lanceolata* por RMN

**Artigo normalizado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003).**

**Seleção de Anonáceas para o Controle de *Spodoptera frugiperda*  
e Análise Exploratória do Perfil Metabólito de *Duguetia lanceolata*  
por RMN**

**Dejane S. Alves<sup>\*1</sup>; Alan R. T. Machado<sup>2</sup>; Viviane A. Campos<sup>3</sup>;  
Denilson F. Oliveira<sup>3</sup>; Geraldo A. Carvalho<sup>1</sup>**

**RESUMO**

Frações solúveis em diclorometano, provenientes de extratos metanólicos de plantas pertencentes à família Annonaceae, foram empregadas para a realização de *screening* com vistas a avaliar a atividade biológica das mesmas para lagartas de *Spodoptera frugiperda*, através de incorporação em dieta artificial. As frações provenientes de *Xylopia emarginata* (cascas), *Annona neolaurifolia* (folhas e cascas), *Xylopia sericea* (frutos e cascas) e *Annona coriacea* (folhas) causaram redução na massa das lagartas de *S. frugiperda*. A fração oriunda das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* apresentou atividade inseticida para *S. frugiperda*, com TL<sub>50</sub> de 61,4 horas e CL<sub>50</sub> de 946,57 µg/mL de dieta. Em decorrência, foi realizada uma nova coleta do material botânico, objetivando-se avaliar a bioatividade para *S. frugiperda* de seis espécimes de *D. lanceolata*, com diferentes aspectos morfológicos. Todos os espécimes apresentaram atividade inseticida, entretanto dois espécimes causaram atividade menos pronunciada. Por meio de teste de correlação de Pearson, não foi constatada correlação entre a circunferência das árvores e o TL<sub>50</sub>. Com vistas a inferir qual(is) a(s) substância(s) responsável(is) pela atividade biológica foi empregada uma abordagem metabolômica. Para tanto, as frações dos seis espécimes de *D. lanceolata* foram analisadas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de <sup>1</sup>H). Em seguida, procedeu-se a análise

---

\*<sup>1</sup> Universidade Federal de Lavras, Departamento de Entomologia - Caixa Postal 3037, CEP 37.200-000 Lavras, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Lavras, Departamento de Química - Caixa Postal 3.037, CEP 37.200-000 Lavras, MG, Brasil.

quimiométrica empregando como variáveis os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e os valores de  $\text{TL}_{50}$ , obtido no experimento com os diferentes espécimes de *D. lanceolata*, a análise empregada foi projeção de estruturas latentes (PLS). Foi possível o agrupamento dos espécimes de *D. lanceolata* de acordo com o perfil metabólito e atividade inseticida. Por meio do gráfico de peso foram distinguidos os sinais nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  que contribuíram para a separação dos espécimes de *D. lanceolata*, os quais poderiam estar influenciando a bioatividade para *S. frugiperda*. Tais sinais foram analisados detalhadamente por meio de experimentos de RMN, uni e bidimensionais, sendo possível inferir que um dos metabólitos que pode estar envolvido com a atividade inseticida da fração das cascas do caule de *D. lanceolata* seja o 2,4,5-trimetoxiestireno.

Palavras-chave: Metabolômica. Quimiometria. Inseticida botânico.

## 1 INTRODUÇÃO

É estimado que as plantas produzam cerca de 200.000 substâncias não essenciais ao crescimento e desenvolvimento das mesmas. Entretanto, acredita-se que tais substâncias possuam função de adaptação evolutiva às pressões seletivas do ambiente, tal como a herbivoria (MITHÖFER; BOLAND, 2011; GREEN et al., 2013). Ressalta-se que, muitos pesquisadores aboliram o termo metabólitos secundários devido ao fato dessas substâncias apresentarem função ecológica evolutiva, por isso tais substâncias vêm sendo denominadas metabólitos especializados (PATRA et al., 2013). Devido à grande diversidade de moléculas e ao fato de muitas dessas possuírem função de defesa contra a herbivoria, são inúmeros os relatos da atividade inseticida dessas substâncias (AHMAD et al., 2012; TONG; COATS, 2012; CHAIEB, 2013). Logo, tais substâncias podem ser empregadas, na forma natural (GRDIŠA; GRŠIĆ, 2013) ou sintética (JESCHKE; NAUEN; BECK, 2013), para o controle de insetos.

Dentre as inúmeras famílias botânicas conhecidas por produzirem metabólitos tóxicos a insetos. As anonáceas vêm merecendo destaque, tendo-se intensificado os estudos com vistas a avaliar o potencial de plantas dessa família botânica como inseticidas (OKONKWO, 2004; ISMAN, 2006; ARRIAGA et al., 2008; LLANOS; ARANGO; GIRALDO, 2008; FEITOSA et al., 2009; KIHAMPA et al., 2009; COSTA et al., 2012; RIBEIRO et al., 2013; NYANDORO et al., 2013). Como exemplo é possível citar as acetogeninas, que são metabólitos exclusivos dessa família botânica, bastante promissoras para o controle de

diversos insetos (ÁLVAREZ-COLOM et al.; 2010; HOE et al., 2010; TOLOSA et al., 2012). Há também estudos que atribuem a atividade inseticida de anonáceas aos terpenos (NGUEMTCHOUIN et al., 2010; ORAFIDIYA et al., 2010; ACIOLE et al., 2011; COSTA et al., 2011; SILVA et al., 2012 ) e aos alcaloides (FEITOSA et al., 2009; KABIR, 2010).

No contexto de busca por moléculas bioativas de plantas, uma abordagem que vem sendo utilizada recentemente com bastante sucesso é a metabolômica, que consiste no estudo da medida quantitativa da resposta metabólica multiparamétrica dinâmica de sistemas vivos a estímulos fisiopatológicos ou ainda modificações genéticas, permitindo assim o estudo dos metabólitos produzidos por determinado organismo (IZQUIERDO-GARCÍA et al., 2011). Assim, a metabolômica viabiliza a identificação e análise quantitativa de substâncias ativas em misturas complexas. Tal abordagem permite, por exemplo, inferir qual metabólito é o responsável por determinada atividade biológica sem a necessidade de um isolamento prévio, o que nos casos de compostos conhecidos, permite economia considerável de tempo. Outra vantagem dessa abordagem é que nos estudos envolvendo produtos naturais é possível que se tenha mais de um componente ativo, sendo que nesses casos durante o processo de fracionamento pode ocorrer uma aparente perda da atividade dos compostos isolados, quando testados separadamente (INUI et al., 2012).

Em se tratando de estudos entomológicos, até o momento, o uso da metabolômica se encontra restrito ao estudo das interações entre os insetos herbívoros e suas plantas hospedeiras, com o objetivo de identificar os metabólitos que conferem resistência à herbivoria (GIORGI

et al., 2010; KERSTEN et al., 2013; LEISS et al., 2013; SUN et al., 2013). Entretanto, são inúmeros os exemplos de sucesso do emprego dessa técnica para o estudo da atividade biológica, em especial na busca por agentes fitoterápicos presentes em misturas complexas de origem natural (YULIANA et al., 2011; WATKINS et al., 2012; ALI et al., 2013; YULIANA et al., 2013). Dessa forma, é razoável propor a expansão do emprego da metabolômica na busca por metabólitos de plantas ativos contra insetos.

Dentre os insetos pragas que vêm merecendo destaque nos últimos anos devido às dificuldades encontradas para o controle, vale mencionar a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), que é considerada praga chave na cultura do milho no Brasil e outros países das Américas. O método comumente empregado para o seu controle é o uso de inseticidas sintéticos, sendo que, mais recentemente, plantas geneticamente modificadas vêm sendo intensivamente utilizadas visando o controle desse inseto. Entretanto, existem relatos da seleção de populações de *S. frugiperda* resistentes a essa tecnologia em condições de campo (TABASHNIK; RENSBURG; CARRÍRE, 2009; STORER et al., 2010). Assim, faz-se de fundamental importância a busca por novas moléculas que possam ser empregadas no controle desse inseto.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi realizar um *screening* da bioatividade de plantas pertencentes à família Annonaceae para *S. frugiperda* e correlacionar os dados do perfil metabólito de *Duguetia lanceolata* A.St.-Hil. (Annonaceae), que foi a planta mais ativa contra o inseto, com a atividade inseticida, empregando-se a espectroscopia de

ressonância magnética nuclear (RMN) e métodos quimiométricos, com vistas a sugerir qual(is) a(s) substância(s) eram responsável(is) pela bioatividade.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Solventes e outras substâncias químicas**

Empregou-se as seguintes substâncias durante a realização deste trabalho: metanol PA, diclorometano PA, ácido sórbico PA; ácido ascórbico PA, 4-hidroxibenzoato de metila PA, ágar, solução de formaldeído (teor: 36 a 40%) PA, ácido propanoico PA e ácido fosfórico PA, todos provenientes da empresa Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, Brasil. Outros componentes foram Tween 80 (Polissorbato), adquirido da empresa Nuclear, São Paulo, Brasil, e clorofórmio deuterado (D, 99,98%) contendo 0,05% (v/v) de tetrametilsilano (TMS) obtido de CIL® (Cambridge Isotope Laboratories, Inc).

### **2.2 Insetos**

Para a realização dos experimentos foram utilizadas lagartas de *S. frugiperda* com 48 horas de idade, alimentadas com dieta artificial e provenientes da segunda postura de espécimes criadas em laboratório. A dieta artificial foi constituída de feijão do grupo Carioca (166,66 g); gérmen de trigo (79,20 g); levedo de cerveja (50,70 g); ácido sórbico (1,65 g); ácido ascórbico (5,10 g); 4-hidroxibenzoato de metila (3,15 g);

ágar (27,0 g); formaldeído (4,15 mL); solução inibidora de crescimento microbiano (4,15 mL) preparada a partir de ácido propanoico (18,0 mL), ácido fosfórico (43,0 mL) e água (540,0 mL). Para o preparo da dieta, o feijão foi levado ao fogo até cozimento com 1,5 L de água. As proporções de ingredientes supracitadas foram empregadas para o volume de 750 mL de água destilada, usada para dissolução do ágar, mais 750 mL de caldo de feijão, proveniente do cozimento do feijão. Os adultos foram alimentados com solução aquosa de mel (0,1 mL/mL). Todos os insetos foram mantidos em sala climatizada a  $25 \pm 2$  °C,  $70 \pm 10\%$  UR e fotofase de 12 horas por dia.

### **2.3 Coleta do material botânico para a realização de *screening* com *S. frugiperda***

Os materiais botânicos (Tabela 1) foram coletados na Região do Alto Rio Grande – Lavras/Minas Gerais, no período de março a abril de 2011, sendo que amostras do material também foram empregadas para as confecções de exsiccatas, as quais foram depositadas no Herbário ESAL da Universidade Federal de Lavras.

Tabela 1 Materiais botânicos, empregados para preparo dos extratos vegetais e realização de *screnning* com *S. frugiperda*, coletados no período de março a abril de 2011

continua

Nome científico	Sinonímias <sup>1</sup>	Parte coletada	Estágio fenológico	Coordenadas	Número de exsicata
<i>Annona cacans</i> Warm.		Cascas Folhas	Vegetativo	S 21°13.649'; W 044°58.234'	27639
<i>Annona coriacea</i> Mart.		Cascas Folhas	Vegetativo	S 21°15.685'; W 044°58.254'	27640
<i>Annona neolaurifolia</i> H. Rainer	<i>Rollinia laurifolia</i> Schlttd	Cascas Folhas	Vegetativo	S 21°13.648'; W 044°57.405'	27638
<i>Annona sylvatica</i> A.St.-Hil.	<i>Annona silvestris</i> Vell., <i>Annona fagifolia</i> A.St.-Hil. & Tul., <i>Annona exalbida</i> Vell., <i>Rollinia sylvatica</i> (A.St.-Hil.) Mart., <i>Rollinia exalbida</i> (Vell.) Mart., <i>Rollinia fagifolia</i> A.St.-Hil.	Cascas Folhas	Vegetativo	S 23°00.00.000' W 049°23.080'	27647
<i>Duguetia arenicola</i> Maas	<i>Duguetia furfuracea</i> A.St.-Hil.(= <i>Duguetia coriacea</i> Sonder), <i>Duguetia duckei</i> R.E.Fr., <i>Duguetia glabriuscula</i> (R.E.Fr.) R.E.Fr., <i>Duguetia phaeoclados</i> (Mart.) Maas & H.Rainer, <i>Duguetia rotundifolia</i> R.E.Fr.]	Folhas	Reprodutivo com flores e frutos	S 21°15.684'; W 044°58.245'	27637
<i>Duguetia lanceolata</i> A. St.-Hil.		Folhas Frutos Cascas	Reprodutivo com frutos	S 21°13.567'; W 044°57.575'	27629

Tabela 1 Materiais botânicos, empregados para preparo dos extratos vegetais e realização de *screening* com *S. frugiperda*, coletados no período de março a abril de 2011

continuação					
Nome científico	Sinonímias <sup>1</sup>	Parte coletada	Estágio fenológico	Coordenadas	Número de exsicata
<i>Guatteria australis</i> A.St.-Hil.	<i>Guatteria acutiflora</i> Mart., <i>Guatteria acutipetala</i> R.E.Fr., <i>Guatteria asterantha</i> R.E.Fr., <i>Guatteria blanchetiana</i> R.E.Fr., <i>Guatteria clavigera</i> R.E.Fr., <i>Guatteria curvinervia</i> R.E.Fr., <i>Guatteria densicoma</i> Mart., <i>Guatteria dimorphopetala</i> R.E.Fr., <i>Guatteria dusenii</i> R.E.Fr., <i>Guatteria flava</i> A.St.-Hil., <i>Guatteria fruticosa</i> R.E.Fr., <i>Guatteria glabrescens</i> R.E.Fr., <i>Guatteria gomeziana</i> A.St.-Hil., <i>Guatteria hilariana</i> Schltdl., <i>Guatteria hookeri</i> A.St.-Hil. & Tul., <i>Guatteria klotzschiana</i> Mart., <i>Guatteria lutea</i> A.St.-Hil., <i>Guatteria minarum</i> R.E.Fr., <i>Guatteria mosenii</i> R.E.Fr., <i>Guatteria neglecta</i> R.E.Fr., <i>Guatteria nigrescens</i> Mart., <i>Guatteria odontopetala</i> Mart., <i>Guatteria paranensis</i> R.E.Fr., <i>Guatteria parvifolia</i> R.E.Fr., <i>Guatteria penduliflora</i> R.E.Fr., <i>Guatteria polycarpa</i> R.E.Fr., <i>Guatteria psilopus</i> Mart., <i>Guatteria reflexa</i> R.E.Fr., <i>Guatteria riedeliana</i> R.E.Fr., <i>Guatteria salicifolia</i> R.E.Fr., <i>Guatteria silvatica</i> R.E.Fr., <i>Guatteria sordida</i> R.E.Fr., <i>Guatteria tenuis</i> R.E.Fr.	Cascas Folhas	Vegetativo	S 21°15.436'; W 044°57.216'	27645

Tabela 1 Materiais botânicos, empregados para preparo dos extratos vegetais e realização de *screening* com *S. frugiperda*, coletados no período de março a abril de 2011

Nome científico	Sinonímias <sup>1</sup>	Parte coletada	Estágio fenológico	Coordenadas	conclusão
					Número de exsicata
<i>Xylopia brasiliensis</i> Spreng.	<i>Xylopia gracilis</i> (R.E.Fr.) R.E.Fr.	Cascas	Reprodutivo com frutos	S 21°13.732'; W 044°58.064'	27636
<i>Xylopia emarginata</i> Mart.		Folhas			
		Cascas	Vegetativo	S 21° 17.8071'; W 044°42.8061'	-
		Folhas			
<i>Xylopia sericea</i> A.St.-Hil.	<i>Xylopia intermedia</i> R.E.Fr.	Cascas	Reprodutivo	S 23°000.000 W 049°22.910'	27646
		Folhas			
		Frutos			

<sup>1</sup>Oliveira-Filho (2013).

#### **2.4 Coleta do material botânico de espécimes de *D. lanceolata* com diferentes parâmetros morfométricos**

As cascas do caule de espécimes de *D. lanceolata*, com diferentes parâmetros morfométricos, foram coletadas na região do Alto do Rio Grande – Lavras/Minas Gerais, no mês de junho do ano de 2012. Por ocasião da coleta, os espécimes tiveram mensurado o parâmetro morfométrico, circunferência do caule à distância de 1,20 m do solo (Tabela 2).

Tabela 2 Materiais botânicos, coletados no mês de junho de 2012, provenientes das cascas do caule de espécimes de *Duguetia lanceolata* com diferentes parâmetros morfométricos de circunferência do caule

<b>Identificação</b>	<b>Diâmetro a 1,20 m do solo (m)</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>Número da exsicata</b>
<i>Duguetia lanceolata</i> - Espécime 1	0,890	23 K 0,501314; UTM 76650906	27629
<i>Duguetia lanceolata</i> - Espécime 2	0,715	23 K 0,504197; UTM 7652831	27634
<i>Duguetia lanceolata</i> - Espécime 3	1,69	23 K 0,504123; UTM 7652758	27633
<i>Duguetia lanceolata</i> - Espécime 4	1,61	23 K 0,504037; UTM 7652711	27635
<i>Duguetia lanceolata</i> - Espécime 5	2,08	23 K 0,503609; UTM 7652514	27631
<i>Duguetia lanceolata</i> - Espécime 6	1,20	23 K 0,503610; UTM 7652528	27630

## 2.5 Preparo dos extratos vegetais e fracionamento

Os materiais vegetais secos e moídos (50 g) foram imersos em metanol (300 mL) por 24 horas. Em seguida, filtraram-se as misturas em algodão hidrófilo. As fases líquidas foram guardadas, enquanto aos resíduos foram acrescentados 200 mL de metanol. O procedimento de extração foi repetido por oito vezes, sendo, ao final, combinadas as fases líquidas oriundas de cada amostra vegetal. O solvente de cada fase líquida resultante foi removido em evaporador rotatório, dando origem aos extratos vegetais metanólicos.

Os extratos vegetais metanólicos (5 g) foram submetidos à partição líquido-líquido. Para tanto, adicionou-se cada extrato a uma mistura de diclorometano (20 mL) e água (20 mL). Após agitação por 10 min, seguida de repouso por 10 min, removeu-se a fase inferior (diclorometano) por decantação e se repetiu o processo duas vezes com mais diclorometano (2 x 20 mL). Combinaram-se as três fases de diclorometano provenientes de cada amostra, para a obtenção de soluções as quais foi adicionado Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Filtraram-se as misturas obtidas em algodão e se removeu o solvente de cada solução final, dando origem a resíduos que, em seguida, foram liofilizados por 24 horas. Com tal procedimento, se obteve as frações solúveis em diclorometano dos extratos (ÁLVAREZ-COLOM et al., 2007; 2008; 2009).

## 2.6 Bioensaios com *S. frugiperda*

### 2.6.1 *Screening* com *S. frugiperda*

As frações solúveis em diclorometano (200 mg; Tabela 1) foram solubilizadas em solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL (20 mL) e incorporadas em dieta artificial (200 mL) na temperatura de 50 °C. Após o resfriamento e solidificação da dieta, pedaços da mesma, de igual tamanho (1,0 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura), foram transferidos para tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro x 8,0 cm de altura), no qual foi inoculada uma lagarta de *S. frugiperda* com 48 horas de idade, alimentada previamente com dieta artificial. Os tubos de vidro permaneceram tampados com algodão hidrófilo.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo a parcela experimental constituída por uma lagarta mantida individualizada. Os tratamentos consistiram de vinte frações solúveis em diclorometano (Tabela 1) e as testemunhas negativas, água e solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL. Devido ao grande número de tratamentos os mesmos foram distribuídos em vários experimentos, ademais cada experimento foi repetido por duas vezes no tempo. Foram empregadas sessenta repetições por tratamento em cada experimento.

A sobrevivência foi avaliada diariamente até o décimo segundo dia após o início da alimentação das lagartas com as dietas tratadas, sendo que no último dia também foram mensuradas as massas das lagartas.

### **2.6.2 Bioensaio de concentração-resposta com a fração do extrato das cascas do caule de *D. lanceolata***

A fração solúvel em diclorometano, proveniente do extrato das cascas do caule de *D. lanceolata* (Tabela 1; 25, 50, 100, 200 e 400 mg) foi solubilizada em Tween 80 a 0,01 g/mL (20 mL) e incorporada em dieta artificial (200 mL) para a construção da curva de concentração-resposta. Foram empregadas lagartas com 48 horas de idade, alimentadas previamente com dieta artificial.

O delineamento foi inteiramente casualizado, sendo que cada parcela experimental foi constituída por uma lagarta, mantida de forma individualizada e sessenta repetições. Os tratamentos consistiram na fração das cascas do caule de *D. lanceolata* (Tabela 1) nas concentrações de 113,6; 227,2; 454,5; 909,0 e 1.818,1 µg/mL de dieta, e das testemunhas, água e Tween 80 a 0,01 g/mL. A sobrevivência dos insetos foi avaliada diariamente, durante 11 dias, para a determinação do tempo letal mediano (TL<sub>50</sub>), sendo que os dados de sobrevivência após 72 horas da montagem do bioensaio foram empregados para o cálculo da concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>).

### **2.6.3 Bioensaio com as frações provenientes das cascas do caule de espécimes de *D. lanceolata***

As frações solúveis em diclorometano dos extratos das cascas do caule de espécimes de *D. lanceolata* (200 mg; Tabela 2) foram solubilizadas em solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL (20 mL) e

adicionadas à dieta artificial (200 mL). O delineamento foi inteiramente casualizado, sendo que cada parcela experimental foi constituída por uma lagarta, mantida de forma individualizada. Empregaram-se água e solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL como testemunhas negativas.

A sobrevivência dos insetos foi avaliada diariamente, durante 11 dias, para a determinação do tempo letal mediano ( $TL_{50}$ ). Por meio de análise de correlação de Pearson, buscou-se analisar a relação entre o parâmetro morfométrico, circunferência das árvores, e a atividade inseticida para *S. frugiperda*.

## **2.7 Análise exploratória do perfil metabólito de *D. lanceolata***

As frações solúveis em diclorometano (100 mg), preparadas conforme descrito em 2.6, provenientes de diferentes espécimes de *D. lanceolata* (Tabela 2), foram solubilizadas em  $CDCl_3$  (1 mL) contendo 0,05% (v/v) de TMS. Alíquotas (0,8 mL) de cada solução obtida foram transferidas para tubos de RMN com diâmetro de 5,0 mm.

Os espectros de RMN de  $^1H$  foram obtidos a 25 °C, em aparelho Bruker *AVANCE* DRX400 com campo de 9,4 Tesla (com frequência de 400,13 MHz para o hidrogênio), equipado com uma sonda multinuclear inversa (BBI) de 5 mm. Os espectros de hidrogênio foram obtidos em triplicata (a amostra foi analisada três vezes), com pulso de 30 graus, largura espectral de 20 ppm, 16 promediações (promediações = varredura = scan = ns) e com 65.536 pontos adquiridos. Para o processamento, foi realizada a multiplicação exponencial com fator de alargamento de linha (lb) de 0,3 Hz, anterior à transformada de Fourier. As fases e linhas de

base foram corrigidas utilizando o programa TopSpin 1.3 e, por fim, o espectro foi calibrado pelo sinal do tetrametilsilano (TMS) em 0,00 ppm.

Também foram conduzidos experimentos bidimensionais, tais como *J-resolvido* (homonuclear - HOM2DJ), HSQC (correlação heteronuclear de quantum-simples -  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ), HMBC (correlação heteronuclear através de múltiplas ligações -  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) e COSY (correlação homonuclear  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ ).

## 2.8 Análise estatística

Os dados coletados no experimento de *screening* da atividade inseticida foram previamente submetidos ao teste de Bartlett (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013), com vistas a verificar a homogeneidade de variâncias e realizar a análise conjunta dos dados nos diferentes experimentos.

Os dados de sobrevivência foram submetidos à análise de sobrevivência, aplicando-se o modelo de Weibull, por meio do pacote Survival do *software* R<sup>®</sup> (THERNEAU, 2013). Após a seleção do modelo matemático mais adequado por meio da análise de resíduos, foi realizada a análise de contraste para verificar a semelhança entre os tratamentos empregados com vista à formação de grupos congêneres. Também foi calculado o tempo letal mediano (TL<sub>50</sub>) para cada grupo formado.

As massas das lagartas foram analisadas por meio do teste de Kruskal-Wallis e, em seguida, submetidas ao teste de comparações múltiplas, empregando-se o *software* R<sup>®</sup> e o pacote Pgirmess (GIRAUDOUX, 2013).

A determinação da curva de concentração-mortalidade e a obtenção da concentração letal mediana ( $CL_{50}$ ) foram realizadas por meio de análise de Logit, utilizando-se o pacote *drc* (RITZ, 2013) do *software* R<sup>®</sup> (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013). Para verificar se havia diferença estatística entre as testemunhas negativas, água e solução aquosa de Tween 80 0,01 mg/mL, empregou-se o teste de Wilcoxon Rank Sum Test (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013).

A análise de correlação de Pearson (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013) foi empregada com vistas a determinar a correlação entre o parâmetro morfométrico, circunferência das árvores, e a atividade inseticida para *S. frugiperda* (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013).

Para análise quimiométrica, os espectros de RMN de <sup>1</sup>H das diferentes espécimes de *D. lanceolata* foram convertidos a uma tabela de área versus intervalo de 0,04 ppm, conhecidos como *buckets*. As conversões dos espectros em *buckets* foram realizadas com o uso do programa computacional AMIX<sup>®</sup> (Bruker). As áreas dos *buckets* (bloco X) e o tempo letal mediano ( $TL_{50}$ , bloco Y) foram então utilizados como variáveis de entrada para as análises quimiométricas. Projeções de estruturas latentes (*PLS*) foram obtidas utilizando o *software* Pirouette 3.11 (Infometrix, Inc., Woodinville, WA). Todos os dados foram centrados na média e antes das análises, a região de  $\delta$  7,18 – 7,30 foi removida para eliminar qualquer influência do sinal residual de  $CHCl_3$  do solvente ( $CDCl_3$ ).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 *Screening* com *S. frugiperda*

A análise de sobrevivência permitiu a formação de três grupos congêneres (Figura 1). O grupo 1, com  $TL_{50}$  de 61,4 horas, consistiu do tratamento com a fração solúvel em diclorometano do extrato metanólico das cascas do caule de *D. lanceolata*, vale ressaltar que no final do período avaliado as lagartas alimentadas com esse tratamento apresentaram apenas 6,9% de sobrevivência. O grupo 2 englobou os tratamentos: *Xylopiya sericea* A.St.-Hil. (frutos, folhas e cascas); *Annona sylvatica* A.St.-Hil. (cascas e folhas); *Annona cacans* Warm. (folhas e cascas); *Guatteria australis* A.St.-Hil. (folhas e cascas); *Annona coriacea* Mart. (folhas); *Annona neolaurifolia* H. Rainer (folhas); *Xylopiya emarginata* Mart. (folhas e cascas); *D. lanceolata* (folhas e frutos); *Xylopiya brasiliensis* Spreng (folhas) e *Duguetia arenicola* Maas (folhas), sendo que ao término do período de avaliação, a sobrevivência acumulada foi de 87,5%. Os tratamentos água, solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL, *A. neolaurifolia* (cascas) e *X. brasiliensis* (cascas) formaram o grupo 3, com sobrevivência acumulada de 94,6%.

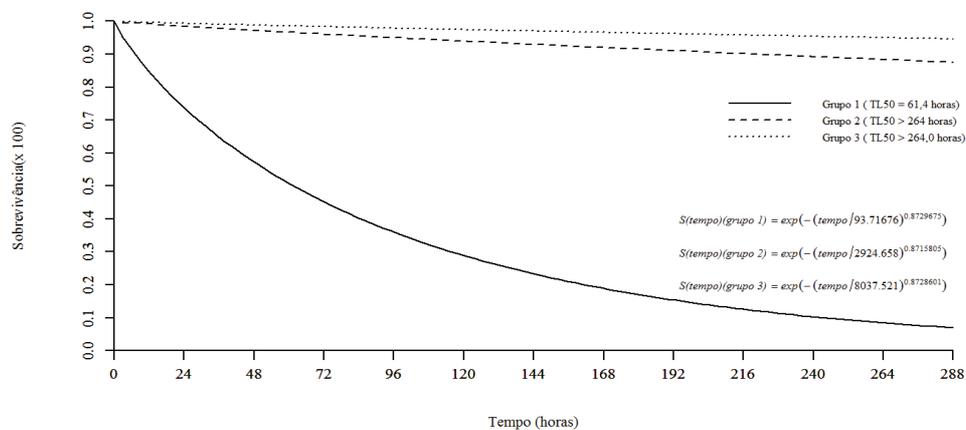
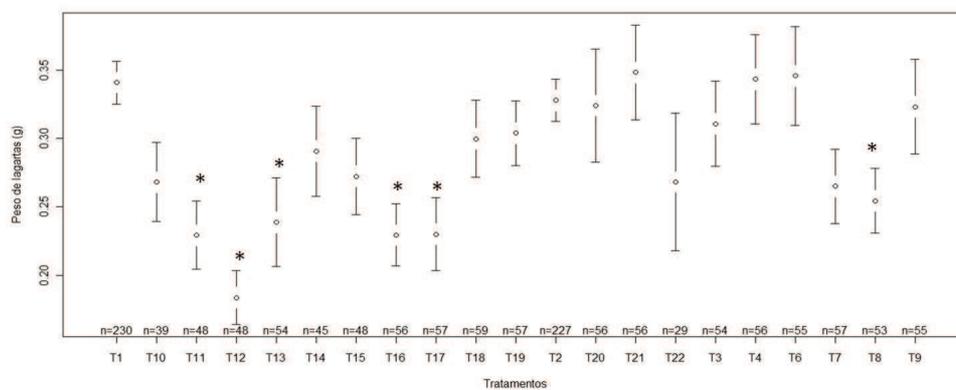


Figura 1 Sobrevivência de lagartas de *Spodoptera frugiperda* ao longo do tempo, alimentadas com dieta artificial contendo frações solúveis em diclorometano, sendo  $S(t) = \exp(-(\text{tempo}/\delta)^\alpha)$ ,  $\delta$  = parâmetro de forma;  $\alpha$  = parâmetro de escala. Grupo 1: *Duguetia lanceolata* cascas (n=173). Grupo 2: *Xylopiia sericea* (frutos (n=120), folhas (n=119) e cascas (n=118)); *Annona sylvatica* (cascas (n=118) e folhas (n=119)); *Annona cacans* (folhas (n=111) e cascas (n=88)); *Guatteria australis* (folhas (n=117) e cascas (n=120)); *Annona coriacea* (folhas (n=114)); *Annona neolaurifolia* (folhas (n=111)); *Xylopiia emarginata* (folhas (n=107) e cascas (n=107)); *Duguetia lanceolata* (folhas (n=119) e frutos (n=116)); *Xylopiia brasiliensis* (folhas (n=119) e *Duguetia arenicola* (folhas (n=116)). Grupo 3: Água (n=401), solução aquosa de Tween 80 a 1% (n=400), *Annona neolaurifolia* (cascas (n=112)) e *Xylopiia brasiliensis* (cascas (n=113)).

No que se refere à massa de lagartas, foi constatado que os insetos alimentados com os tratamentos provenientes de *X. emarginata* (cascas), *A. neolaurifolia* (folhas e cascas), *X. sericea* (frutos e cascas) e *A. coriacea* (folhas) apresentaram massa significativamente inferior ( $\chi^2 = 204,68$ ,  $df = 19$ ,  $p = 2,2e^{-16}$ ) ao constatado para o grupo formado pelas testemunhas água e solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL ( $\chi^2 = 1,53$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,2155$ ) (Figura 2).



- |  |  |  |   |
|--|--|--|---|
| T1: Água   | T7: <i>Xylopi</i> a <i>brasiliensis</i> (cascas) | T13: <i>Annona neolaurifolia</i> (cascas)    | T19: <i>Annona sylvatica</i> (folhas)   |
| T2: Tween 80 a 0,01 g/mL                         | T8: <i>Annona coriacea</i> (folhas)              | T14: <i>Guateria australis</i> (folhas)      | T20: <i>Guateria australis</i> (cascas) |
| T3: <i>Duguetia arenicola</i> (folhas)           | T9: <i>Duguetia lanceolata</i> (folhas)          | T15: <i>Annona cacans</i> (folhas)           | T21: <i>Annona sylvatica</i> (cascas)   |
| T4: <i>Duguetia lanceolata</i> (frutos)          | T10: <i>Xylopi</i> a <i>emarginata</i> (folhas)  | T16: <i>Xylopi</i> a <i>sericea</i> (frutos) | T22: <i>Annona cacans</i> (cascas)      |
| T5: <i>Duguetia lanceolata</i> (cascas)          | T11: <i>Xylopi</i> a <i>emarginata</i> (cascas)  | T17: <i>Xylopi</i> a <i>sericea</i> (cascas) |   |
| T6: <i>Xylopi</i> a <i>brasiliensis</i> (folhas) | T12: <i>Annona neolaurifolia</i> (folhas)        | T18: <i>Xylopi</i> a <i>sericea</i> (folhas) |   |

Figura 2 Médias ( $\pm$ SD) para massa (g) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas dietas artificiais as quais foram incorporadas frações solúveis em diclorometano proveniente de extratos metanólicos de plantas da família Annonaceae.

\*Diferem estatisticamente do grupo formado pelas testemunhas negativas, água e solução aquosa de Tween 80 a 0,01g/mL.

A espécie que se apresentou mais promissora para ser empregada no controle de *S. frugiperda* foi *D. lanceolata*, sendo esse o primeiro relato da atividade inseticida dessa planta. Trabalhos prévios, realizados com essa planta indicaram a presença em seus tecidos de alcaloides, os quais apresentaram forte atividade antiplasmodial e antitripanossoma (FISCHER et al., 2004; TEMPONE et al., 2005). Estudos de CG-MS empregando o óleo essencial de *D. lanceolata* revelaram que os constituintes principais são mono e sesquiterpenos e hidrocarbonetos (SOUSA et al., 2012). Vale ressaltar que, dentre as amostras desta planta que foram estudadas, apenas aquela proveniente das cascas do caule apresentou atividade inseticida. Possivelmente, isto ocorreu devido ao fato das composições e concentrações dos metabólitos secundários poderem variar de acordo com a parte da planta estudada (SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 2011; WHITEHEAD et al., 2013), haja vista que as pressões de seleção e custos para alocação dos metabólitos diferem de acordo com o órgão vegetal, havendo desta forma grande variação constitutiva intraplanta. Vale mencionar que as defesas químicas são uma função do valor do tecido para a planta, em que o valor é correlacionado com o custo que a planta teria caso esse tecido fosse removido (MCCALL; FORDYCE, 2010).

As lagartas alimentadas com a fração solúvel em diclorometano do extrato das folhas de *A. coriaceae* apresentaram redução na massa, sendo pela primeira vez relatado o efeito inseticida dos metabólitos presentes nas folhas dessa planta. Trabalhos anteriores constataram que o extrato metanólico das sementes de *A. coriaceae* causou alterações morfológicas, tais como, vacuolização citoplasmática de células colunares

e regenerativas, no intestino de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), o que possivelmente pode induzir o processo de apoptose (COSTA et al., 2012). O extrato etanólico de tais sementes também provocou interrupção no desenvolvimento, redução na alimentação e aumento na taxa de mortalidade em ninfas e adultos de *Rhodnius neglectus* Lent (Hemiptera: Reduviidae) (CARNEIRO; PEREIRA; GALBIATI, 2013). É possível mencionar que uma lecitina isolada das sementes de *A. coriaceae* provocou alterações nos índices nutricionais de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) e *Corcyra cephalonica* (Stainton) (Lepidoptera: Pyralidae). Segundo análises por cromatografia por afinidade, a referida lecitina se liga a proteínas do intestino desses insetos, podendo interferir na digestão e/ou absorção do alimento (COELHO; MARANGONI; MACEDO, 2007).

Esse é o primeiro relato de atividade inseticida das frações provenientes de *A. neolaurifolia* (folhas e cascas), *X. emarginata* (cascas) e *X. sericea* (frutos e cascas), as quais, no presente trabalho, causaram redução na massa das lagartas de *S. frugiperda*. Apesar de até o momento não existirem relatos do efeito inseticida dessas plantas, as mesmas são conhecidas por produzirem metabólitos que pertencem a classes químicas com reconhecida atividade inseticida. Para exemplificar, é possível citar o isolamento de acetogeninas das folhas de *A. neolaurifolia* (SANTOS PIMENTA et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2003; PIMENTA; NASCIMENTO; BOAVENTURA, 2005; CUNHA et al., 2009), sendo que algumas delas foram relatadas como ativas contra insetos (SRINIVASA RAO et al., 1999; HOE et al., 2010; GUPTA et al., 2011). Também foi constatada a presença de substâncias pertencentes à classe

das acetogeninas em *X. emarginata* (COLMAN-SAIZARBITORIA et al., 2009). Ademais, verificou-se a produção por tal planta de terpenos (VILEGAS et al., 1991; LAGO et al., 2005; MAIA et al., 2005; MOREIRA; ROQUE; LAGO, 2006), sesquiterpenos e hidrocarbonetos (MOREIRA et al., 2007), flavonoides e alcaloides (MOREIRA; LAGO; ROQUE, 2003), que de forma análoga, são bioativos para insetos (MAGADULA; INNOCENT; OTIENO, 2009; BROUSSALIS; CLEMENTE; FERRARO, 2010; BOULOGNE et al., 2012).

Em se tratando de *X. sericea*, óleos essenciais das folhas e frutos apresentaram monoterpenos e sesquiterpenos como constituintes majoritários (PONTES et al., 2007). Especificamente das sementes de *X. sericea* foram isolados mono e diterpenos (TAKAHASHI et al., 2001). As análises químicas de diferentes partes de *X. sericea* revelaram que as raízes apresentam como compostos majoritários mono, sesqui e diterpenos, ao passo que no tronco, folhas e frutos, mono e sesquiterpenos se apresentaram como constituintes majoritários (CÂMARA; ALENCAR; SILVEIRA, 1996). Dentre as substâncias presentes nos óleos essenciais de frutos e cascas de *X. sericeae*, algumas se apresentaram ativas contra insetos, tais como o pineno (KIM; KANG; PARK, 2013; KIM; LEE, 2014) e mirceno (VOURLIOTI-ARAPI et al., 2012).

Apesar de existirem relatos em literatura da atividade inseticida de *A. sylvatica* e *D. arenicola*, neste trabalho tais espécies não apresentaram efeito para *S. frugiperda*, pois foram empregadas partes vegetais diferentes daquelas nas quais foi constada a presença de metabólitos com atividade inseticida. A atividade inseticida do extrato hexânico dos frutos de *A. sylvatica* foi reportada para *Ostrinia nubilalis* (Hübner)

(Lepidoptera: Pyralidae) (MIKOLAJCZAK et al., 1990). De forma análoga, foi constatada a atividade inseticida da raiz de *D. arenicola*, para larvas de *A. aegypti* (RODRIGUES et al., 2006). Assim, tal resultado pode ser devido ao fato dessas plantas estarem alocando a produção de metabólitos tóxicos a herbívoros para partes vegetais nas quais não foram avaliadas no presente trabalho.

As frações oriundas de *A. cacans* (folhas e cascas), *G. australis* (folhas e cascas) e *X. brasiliensis* (folhas e cascas) não apresentaram efeito letal e/ou subletal para as lagartas de *S. frugiperda*, tampouco foram encontrados relatos de atividade inseticida para essas plantas.

### **3.2 Bioensaio de concentração-resposta com a fração das cascas do caule de *D. lanceolata***

Não foi verificada diferença entre a mortalidade nas testemunhas negativas, água e solução aquosa de Tween 80 0,01 mg/mL ( $v = 3$ ,  $p = 0,34$ ), assim apenas os valores referentes à testemunha Tween foram empregados para o cálculo da  $CL_{50}$ . A fração proveniente das cascas do caule de *D. lanceolata* apresentou valor de  $CL_{50}$  igual a 946,57  $\mu\text{g/mL}$  de dieta para lagartas de *S. frugiperda*, após o período de 72 horas, com limite inferior de 837,46  $\mu\text{g/mL}$  e superior de 1.055,8  $\mu\text{g/mL}$ . A  $CL_{90}$  foi de 1.761,84  $\mu\text{g/mL}$ , com limite inferior de 1.409,60 e superior de 2.114,12  $\mu\text{g/mL}$  ( $\chi^2 = 2085$ ,  $df = 287$ ,  $p = 0$ ).

A análise de sobrevivência permitiu a formação de quatro grupos congêneres, sendo o grupo 1, formado pela fração proveniente das cascas do caule de *D. lanceolata* na concentração de 1.818,1  $\mu\text{g/mL}$  e  $TL_{50}$  de

47,8 horas e 100% de mortalidade após 120,0 horas da montagem do experimento. O grupo 2, com  $TL_{50}$  de 100,5 horas consistiu na fração das cascas do caule de *D. lanceolata* na concentração de 909,0  $\mu\text{g/mL}$  de dieta e 100% de mortalidade após 253,0 horas de exposição ao tratamento. A fração proveniente das cascas do caule de *D. lanceolata* na concentração de 454,5  $\mu\text{g/mL}$  de dieta (grupo 3) apresentou sobrevivência acumulada de 68,7% ao término do experimento. Enquanto o grupo 4, formado pelas testemunhas água, solução aquosa de Tween 80 0,01 g/mL e frações provenientes das cascas do caule de *D. lanceolata* nas concentrações de 113,6 e 227,2  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram sobrevivência acumulada de 96,1% (Figura 3).

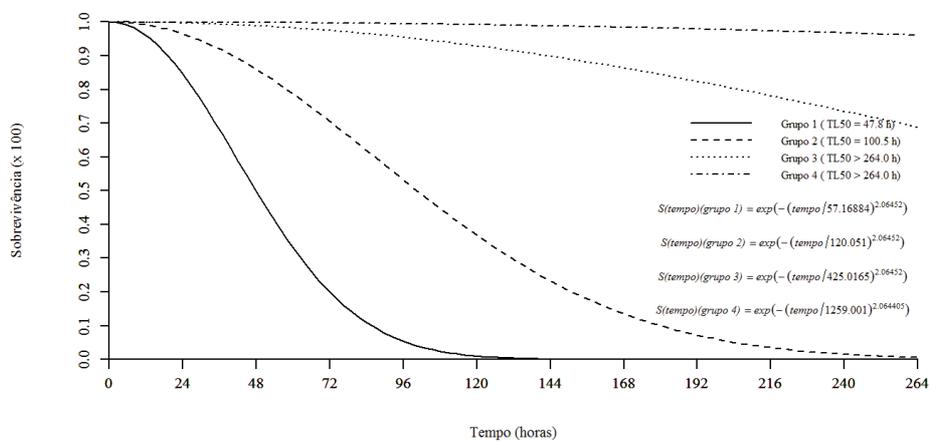


Figura 3 Sobrevivência de lagartas de *Spodoptera frugiperda* ao longo do tempo, alimentadas com dieta artificial contendo frações solúveis em diclorometano provenientes dos extratos das cascas do caule de *Duguetia lanceolata*, sendo  $S(t) = \exp(-(\text{tempo}/\delta)^\alpha)$ ,  $\delta$  = parâmetro de forma;  $\alpha$  = parâmetro de escala. Grupo 1: *Duguetia lanceolata* cascas 1818,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de dieta (n=58). Grupo 2: *Duguetia lanceolata* cascas 909,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de dieta (n=57). Grupo 3: *Duguetia lanceolata* cascas 454,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de dieta (n=57). Grupo 4: Água (n=60); solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL (n=58); *Duguetia lanceolata* cascas 227,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de dieta (n=56) e 113,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de dieta (n=60) (n=173).

A mortalidade das lagartas de *S. frugiperda* mostrou-se dependente da concentração. Os valores encontrados no presente trabalho indicam que essa planta apresenta potencial para ser empregada no controle desse inseto. Trabalhos realizados com produtos de origem natural empregando lagartas de *S. frugiperda*, em condições semelhantes as quais foram conduzidos o presente trabalho, constataram valores de  $CL_{50}$ , após 72 horas de alimentação, de  $2.591 \pm 680$  e  $1.439 \pm 386$  mg/L, respectivamente, para os extratos de *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) e *Melia azedarach* L. (Meliaceae), os quais apresentam comprovada atividade inseticida (BULLANGPOTI et al., 2012). Ainda é possível mencionar os valores de  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  de 2,31 e 12,72 mL/kg, respectivamente, após 7 dias de alimentação de lagartas de *S. frugiperda* com o extrato de *Peumus boldus* Molina (Monimiaceae) (SILVA et al., 2013).

A atividade da fração das cascas do caule de *D. lanceolata* mostrou-se dependente do tempo de exposição aos tratamentos, ou seja, a mortalidade dos insetos só foi constatada após determinado tempo de exposição aos tratamentos. O fato de a toxicidade ter se apresentado dependente do tempo de alimentação das lagartas pode ser devido a fatores que atuam isoladamente ou em conjunto. Foi sugerido, por exemplo, que a mortalidade como fator dependente do tempo, pode ser devido à captação da porção ativa do composto ser dependente do tempo. Assim o efeito tóxico pode ocorrer em função do aumento progressivo da concentração dos compostos ao longo do tempo. Ou ainda a unidade ativa do composto pode estar sendo convertida em metabólitos mais tóxicos no

interior do inseto, resultando em efeito dependente do tempo (KABIR; KHAN; MOSADDIK, 2003).

### **3.3 Bioensaio com as frações provenientes das cascas do caule de diferentes espécimes de *D. lanceolata***

As frações solúveis em diclorometano, provenientes dos extratos das cascas do caule dos seis espécimes de *D. lanceolata*, apresentaram atividade inseticida para lagartas de *S. frugiperda*, sendo mais pronunciada para alguns espécimes com menores valores de  $TL_{50}$ . A análise de sobrevivência permitiu a formação de três grupos congêneres: o grupo 1 englobou os tratamentos denominados espécime 1, espécime 2, espécime 5 e espécime 6, com  $TL_{50}$  de 62,2 horas e mortalidade acumulada de 100% após 194,2 horas. O grupo 2, formado pelos espécimes 3 e 4, apresentou atividade inseticida menos pronunciada ( $TL_{50}$  igual a 89,6 horas), a mortalidade acumulada foi de 100% após 277 horas da exposição das lagartas ao tratamento. Já o grupo 3, formado pelas testemunhas água e solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL, apresentaram sobrevivência acumulada de 93,3% após 264 horas da montagem do experimento (Figura 4).

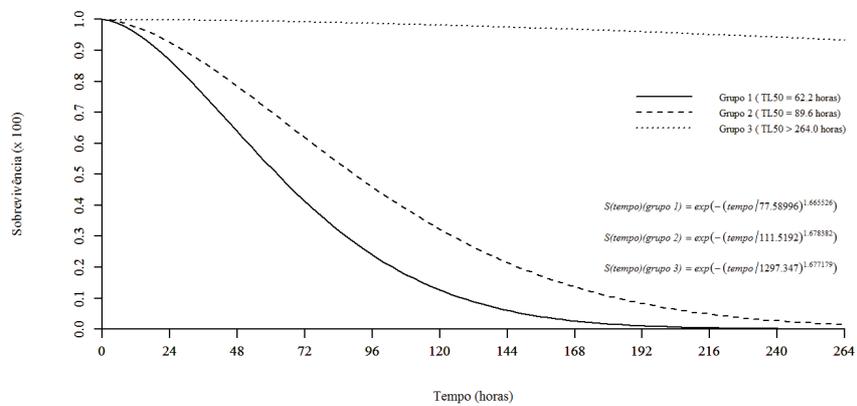


Figura 4 Sobrevivência de lagartas de *Spodoptera frugiperda* ao longo do tempo, alimentadas com dieta artificial contendo frações solúveis em diclorometano provenientes do extrato das cascas do caule de diferentes espécimes de *Duguetia lanceolata*, sendo  $S(t) = \exp(-(\text{tempo}/\delta)^\alpha)$ ,  $\delta$  = parâmetro de forma;  $\alpha$  = parâmetro de escala. Grupo 1: Espécime 1 (n=60), Espécime 2 (n=60), Espécime 5 (n=60), Espécime 6(n=59). Grupo 2 : Espécime 3 (n=59), Espécime 4 (n=59). Grupo 3: Água (n=60), Tween 80 a 1% (n=60).

Por meio de correlação de Pearson, não foi possível estabelecer uma correlação entre o parâmetro dendrométrico, circunferência das árvores ( $t = 0,6352$ ,  $p = 0,5598$ ,  $cor = 0,30$ ), com a atividade inseticida.

As diferenças encontradas na atividade inseticida dos espécimes de *D. lanceolata*, provavelmente, se devem às variações intraespecíficas na produção de metabólitos, as quais podem ser influenciadas por diversos fatores como ontogenia, fenologia, defesas induzidas, condições ambientais, mutações naturais, dentre outras (MOORE et al., 2014).

Apesar da produção de metabólitos especializados muitas vezes se apresentar como um processo dinâmico, sugere-se que as plantas mais velhas, com maiores valores de circunferência, produzam menos metabólitos, mas isso não foi constatado nesse estudo. Assim, mais estudos são necessários com vistas a obter predições seguras acerca do assunto, haja vista que além de ser um processo espécie-específico, alguns grupos de metabólitos podem apresentar aumento na concentração ao longo do processo de desenvolvimento da planta, em detrimento da redução na concentração de outros. Nesse sentido foi constatado aumento na concentração de sesquiterpenos totais e redução na concentração de fenólicos totais para *Eucalyptus froggattii* Blakely (Myrtaceae) (GOODGER; HESKES; WOODROW, 2013). Dessa forma, os resultados aqui encontrados podem ser adicionalmente explorados em trabalhos futuros.

### 3.4 Análise exploratória do perfil metabólito de *D. lanceolata*

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das frações solúveis em diclorometano dos extratos de diferentes espécimes de *D. lanceolata* se mostraram bastante semelhantes quanto aos deslocamentos químicos e, conseqüentemente, quanto à composição qualitativa das referidas frações (Figura 5). Assim, os dados de RMN foram submetidos à análise multivariada através de projeções de estruturas latentes (*PLS*), com vistas a estabelecer uma relação entre dois conjuntos de dados, ou seja, X (preditores) e Y (resposta). Nesse caso, os preditores são os dados de deslocamento químico e intensidade dos sinais obtidos por meio do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , enquanto Y se refere aos dados de atividade biológica dos diferentes espécimes de *D. lanceolata* ( $\text{TL}_{50}$ ). Tal análise foi conduzida com vistas a prever os deslocamentos químicos dos sinais correspondentes às substâncias responsáveis pela bioatividade dos espécimes de *D. lanceolata* para *S. frugiperda*.

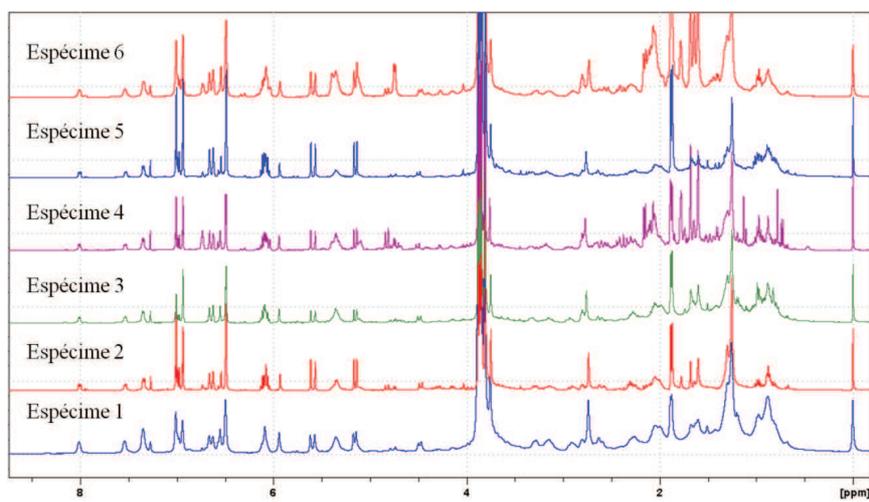


Figura 5 Espectros de RMN de <sup>1</sup>H das frações solúveis em diclorometano das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

A análise quimiométrica permitiu a construção do gráfico de variáveis latentes, sendo que VL1 e VL2 explicaram 56,3% da covariância dos dados e permitiu o agrupamento dos espécimes de acordo com a atividade biológica. Assim, as espécimes 3 e 4, com menor atividade biológica, permaneceram no lado positivo de VL1, enquanto as amostras com maior atividade biológica (5 e 2) permaneceram do lado negativo de VL1 (Figura 6a). O gráfico de peso (Figura 6b) mostrou os sinais no espectro de RMN ( $\delta$  3,80 - 3,96,  $\delta$  5,17 - 5,60 e 6,50 - 7,00 ppm) que contribuíram para a separação dos espécimes mais ativos (5 e 2). Desta forma, a fração solúvel em diclorometano do espécime 5 foi selecionada para análise por RMN bidimensional. Os sinais identificados no gráfico de peso (Figura 6b) foram analisados detalhadamente por meio dos experimentos (*J-resolvido*, COSY, HSQC e HMBC) para identificar o(s) possível(is) composto(s) responsável(is) pela atividade biológica.

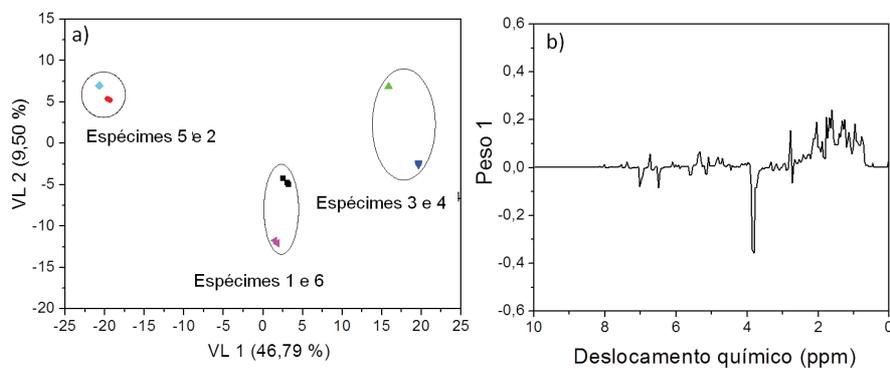


Figura 6 Gráfico de *score* da PLS (a) apresenta o agrupamento dos espécimes de *Duguetia lanceolata* com base nos valores da atividade inseticida e similaridade do perfil metabólico. Gráfico de peso da PLS (b) mostra os sinais (eixo negativo) correlacionados com atividade biológica para *S. frugiperda*, ou seja, os sinais que contribuíram para a separação entre os espécimes de *D. lanceolata*

Utilizando o experimento *J-resolvido* (Figura 7) e  $^1\text{H}$ , foram registrados vários singletos entre  $\delta$  3,83 - 3,96 e entre  $\delta$  6,50 e 7,00 indicando a presença de grupos metóxi e hidrogênios aromáticos, respectivamente. Também foi possível verificar a presença de hidrogênios vinílicos em  $\delta$  5,17 (dd,  $J_{AB} = 1,5$  Hz,  $J_{AC} = 11,4$  Hz),  $\delta$  5,60 (dd,  $J_{BA} = 1,5$  Hz,  $J_{BC} = 17,8$  Hz) e em  $\delta$  7,00 (dd,  $J_{CA} = 10,8$  Hz,  $J_{CB} = 17,8$  Hz). A análise do mapa de contorno da correlação COSY  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (Figura 8) mostrou correlação entre o sinal em  $\delta$  5,17 e o sinal em  $\delta$  7,00, assim como correlação entre os sinais em  $\delta$  5,60 e  $\delta$  7,00, confirmando o acoplamento do tipo ABC. Com o uso do experimento HSQC (Figura 9), foi possível confirmar as correlações dos hidrogênios em  $\delta$  5,17 e  $\delta$  5,60 com  $^{13}\text{C}$  em 111,7 ppm. Assim, a análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$ , *J-resolvido*; COSY e HSQC e a comparação destes com dados da literatura (Tabela 3, Figura 10), indicaram que a substância com atividade inseticida para *S. frugiperda* seja o 2,4,5-trimetoxiestireno (Figura 11).

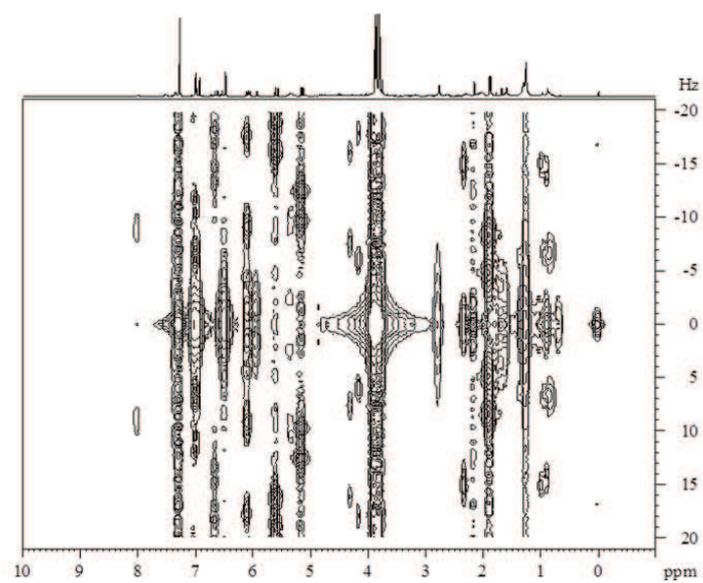


Figura 7 Mapa de contornos bidimensionais *J*-resolvido obtido da fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

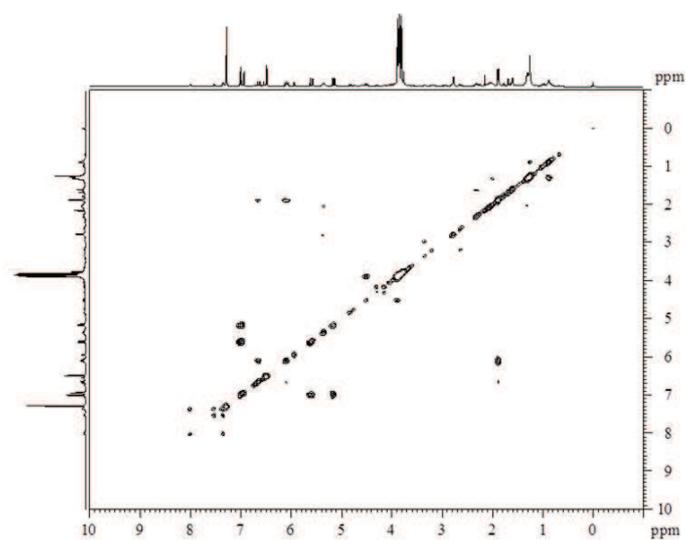


Figura 8 Mapa de contornos COSY obtido da fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

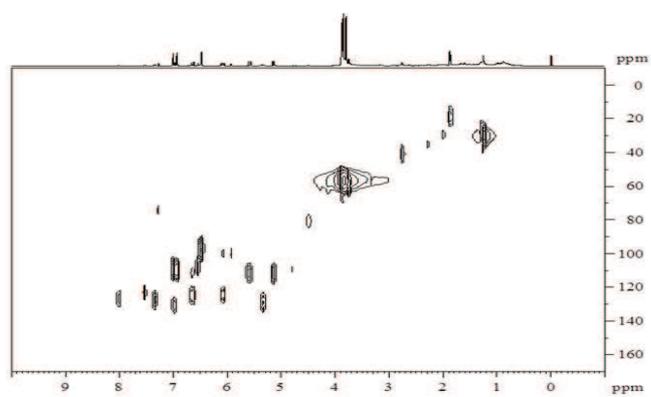


Figura 9 Mapa de contornos HSQC obtido da fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

Tabela 3 Deslocamentos químicos (ppm) de <sup>1</sup>H da substância (1) e comparado com a literatura.

H	$\delta$ <sup>1</sup> H de 1	Waterman (1976)	Nagashima, Murakami e Asakawa (1999)	Silva (2006)
A	5,17 (dd, JAB=1,5 e JAC=11,4 Hz)	5,20 (dd, JAB = 2 e JAC = 10Hz)	5,20 (dd, JAB=1,6 e JAC = 11,3Hz)	5,14 (dd, JAB = 1,2 e JAC = 11,0Hz)
B	5,60 (dd, JBA=1,5 e JBC=17,8 Hz)	5,65 (dd, JBA = 2 e JBC = 18Hz)	5,68 ( dd, JBA=1,4 e JBC=17,9Hz)	5,57 (dd, JBA = 1,2 e JBC = 17,8Hz)
C	7,00 (dd, JCA=10,8 e JCB=17,8 Hz)	7,05 (dd, JCA = 10 e JCB = 18Hz)	7,36 (dd, JCA=11,3 e JCB=17,9Hz)	6,96 (dd, JCA = 11,0 e JCB = 17,8Hz)
3	6,49 (s)	6,58 (s)	6,24 (s)	6,48 (s)
6	7,00 (s)	7,10 (s)	7,10 (s)	6,99 (s)
OCH <sub>3</sub>	3,88 (s)	3,85 (s)	3,32 (s)	3,80 (s)
OCH <sub>3</sub>	3,87 (s)	3,90 (s)	3,39 (s)	3,84 (s)
OCH <sub>3</sub>	3,85 (s)	3,95 (s)	3,45 (s)	3,87 (s)

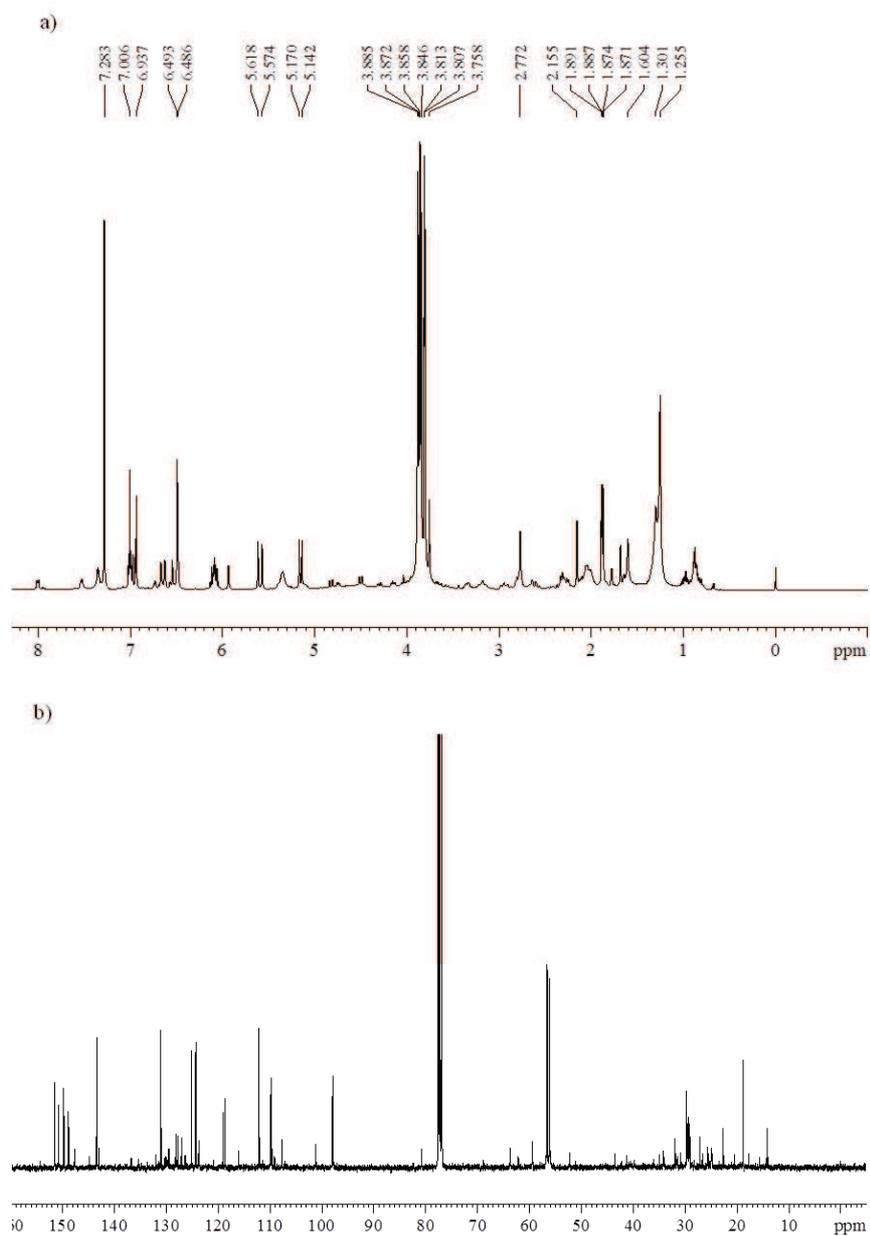


Figura 10 Espectros de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  (a) e  $^{13}\text{C}$  (b) da fração das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

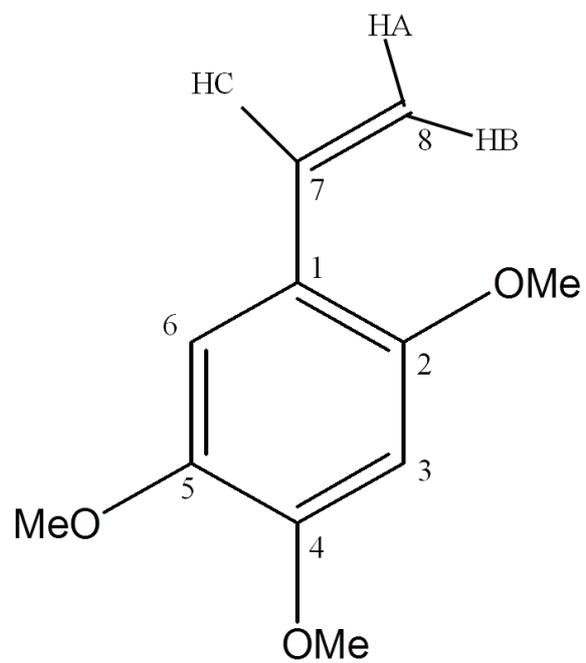


Figura 11 Estrutura molecular da substância 1 (2,4,5-trimetoxiestireno)

O 2,4,5-trimetoxiestireno é um metabólito relativamente comum na família anonácea (WANG et al., 1988; NGADJUI et al., 1989; SILVA, 2006; YAPI et al., 2012). Entretanto, no presente trabalho ele é relatado pela primeira vez na espécie *D. lanceolata*. Essa molécula já foi isolada de *Pachypodanthium staudtii* Engl. & Diels (Anonaceae) e apresentou alta atividade inseticida para *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) (KOONA; BOUDA, 2006). Apesar de este ser o primeiro indicativo da atividade inseticida dessa molécula para *S. frugiperda*, os resultados aqui encontrados podem ser suportados pelo fato de uma molécula bastante parecida, conhecida como asarona, que difere do 2,4,5-trimetoxiestireno por apenas um grupo metil, já teve relatada a sua atividade inseticida para *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae) (BHARDWAJ et al., 2010), corroborando os resultados encontrados no presente trabalho.

#### 4 CONCLUSÕES

As frações solúveis em diclorometano, oriundas de extratos metanólicos, provenientes de *X. emarginata* (cascas), *A. neolaurifolia* (folhas e cascas), *X. sericea* (frutos e cascas) e *A. coriacea* (folhas) causam efeito subletal em lagartas de *S. frugiperda*. A fração das cascas do caule de *D. lanceolata* provoca alta taxa de mortalidade para lagartas de *S. frugiperda*. A condução de análises metabolômicas por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permite sugerir que possivelmente a molécula presente nas cascas do caule de *D. lanceolata* com atividade inseticida para *S. frugiperda* seja o 2,4,5-trimetoxiestireno. Estudos complementares com vistas à avaliação da atividade biológica para *S. frugiperda* e isolamento da(s) molécula(s) ativa(s) estão sendo conduzidos.

**CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES NO TRABALHO**

**Dejane S. Alves: coleta do material botânico, preparo dos extratos e  
partição líquido-líquido, ensaios biológicos, análises estatísticas,  
confeção do manuscrito;**

**Alan R. T. Machado: análises por RMN e identificação da  
substância;**

**Viviane A. Campos: auxílio na extração das frações;**

**Denilson F. Oliveira: coorientador;**

**Geraldo A. Carvalho: orientador.**

**Selection of Annonaceae for the control of *Spodoptera frugiperda* and  
Exploratory Analysis of the *Duguetia lanceolata* Metabolit Profile by  
RMN**

**ABSTRACT**

Fractions soluble in dichloromethane, derived from methanolic extracts from plants of the Annonaceae family, were employed to conduct screening in order to evaluate its biological activity for *Spodoptera frugiperda* worms through the incorporation of an artificial diet. Fractions from *Xylopia emarginata* (barks), *Annona neolaurifolia* (leaves and barks), *Xylopia sericea* (fruit and barks) and *Annona coriacea* (leaves), caused a reduction in the mass of *S. frugiperda* larvae. The fraction derived from *Duguetia lanceolata* stem barks presented insecticide activity for *S. frugiperda*, with  $LT_{50}$  of 61.4 hours and  $LC_{50}$  of 946.57  $\mu\text{g/ml}$  of diet. Consequently, a new collection of botanical material was performed, aiming at assessing the bioactivity for *S. frugiperda* of six *D. lanceolata* specimens, with different morphometric aspects. All specimens presented insecticidal activity. However, two specimens caused less pronounced activity. By the Pearson's correlation test was not possible to establish a correlation between tree circumference and  $LT_{50}$ . In order to infer which substance is responsible for the biological activity, was employed a metabolomics approach. To do this, the fractions of the six *D. lanceolata* specimens were analyzed by hydrogen nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  NMR). Subsequently, was proceeded with chemometric analysis using the  $^1\text{H}$  NMR data and the  $LT_{50}$  values, obtained in the experiment with different *D. lanceolata* specimens, as variables. The analysis employed was the projection to latent structures (PLS). The grouping of *D. lanceolata* specimens according to metabolite profile and insecticide activity was possible. Through the weight graphic, were distinguished the signals in  $^1\text{H}$  NMR spectra, which contributed to the separation of the *D. lanceolata* specimens, which could be influencing the *S. frugiperda* bioactivity. Such signals were analyzed in detail by uni and bidimensional NMR experiments, being possible to infer that one of the metabolites involved with the insecticidal activity of the *D. lanceolata* stem bark fraction is the 2,4,5-trimethoxystyrene.

Keywords: Metabolomics. Chemometrics. Botanical insecticide.

## REFERÊNCIAS

- ACIOLE, S. D. G. et al. et al. Actividad insecticida de tres especies de *Guatteria* (Annonaceae) contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, Bogotá, v. 37, n. 2, p. 262-268, jul./dic. 2011.
- AHMAD, N. et al. Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): a review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Haikou, v. 2, p. S1945-S1953, 2012.
- ALI, K. et al. Identification of bioactive metabolites against adenosine A1 receptor using NMR-based metabolomics. **Metabolomics**, New York, v. 9, n. 4, p. 778-785, Aug. 2013.
- ÁLVAREZ-COLOM, O. et al. Insecticidal, mutagenic and genotoxic evaluation of annonaceous acetogenins. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 5, n. 3, p. 391-394, Mar. 2010.
- ÁLVAREZ-COLOM, O. et al. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Pest Science**, New York, v. 80, n. 1, p. 63-67, Feb. 2007.
- ÁLVAREZ-COLOM, O. et al. Toxic effects of annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. **Journal of Pest Science**, New York, v. 81, n. 2, p. 85-89, June 2008.
- ÁLVAREZ-COLOM, O. et al. Tucupentol, a novel mono-tetrahydrofuranic acetogenin from *Annona montana*, as a potent inhibitor of mitochondrial complex I. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 3, p. 335-340, Mar. 2009.
- ARRIAGA, A. M. C. et al. Chemical constituents and insecticidal activity of *Rollinia leptopetala* (Annonaceae). **Natural Product Communications**, Westerville, v. 3, n. 10, p. 1687-1688, 2008.

BHARDWAJ, A. et al. Larvicidal and structure-activity studies of natural phenylpropanoids and their semisynthetic derivatives against the tobacco armyworm *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Chemistry and Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 168-177, Jan. 2010.

BOULOGNE, I. et al. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 10, n. 4, p. 325-347, Dec. 2012.

BROUSSALIS, A. M.; CLEMENTE, S.; FERRARO, G. E. *Hybanthus parviflorus* (Violaceae): Insecticidal activity of a South American plant. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 9, p. 953-956, Sept. 2010.

BULLANGPOTI, V. et al. Antifeedant activity of *Jatropha gossypifolia* and *Melia azedarach* senescent leaf extracts on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and their potential use as synergists. **Pest Management Science**, Sussex, v. 68, n. 9, p. 1255-1264, Sept. 2012.

CARNEIRO, A. P.; PEREIRA, M. J.; GALBIATI, C. Biocide activity of *Annona coriacea* seeds extract on *Rhodnius neglectus* (Hemiptera: Reduviidae). **Revista de Biologia Tropical**, San José, v. 61, n. 1, p. 419-427, mar. 2013.

CHAIEB, I. Novel advances and perspectives to the use of plant saponins as pesticides. **Acta Horticulturae (ISHS)**, The Hague, v. 997, p. 177-184, 2013. Disponível em:  
<[http://www.actahort.org/books/997/997\\_21.htm](http://www.actahort.org/books/997/997_21.htm)>. Acesso em: 10 dez. 2013.

COELHO, M. B. MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 146, n. 3, p. 406-414, Sept. 2007.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T. et al. Xymarginatin: a new acetogenin inhibitor of mitochondrial electron transport from *Xylopiia emarginata* Mart., Annonaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 19, n. 4, p. 871-875, Oct./Dec. 2009.

COSTA, E. V. et al. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and larvicidal activities of the essential oils of *Annona salzmannii* and *A. pickelii* (Annonaceae). **Natural Product Communications**, Westerville, v. 6, n. 6, p. 907-912, June 2011.

COSTA, M. S. et al. Morphological changes in the Midgut of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae following exposure to an *Annona coriacea* (Magnoliales: Annonaceae) extract. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 41, n. 4, p. 311-314, Aug. 2012.

CUNHA, M. M. et al. Screening of cytotoxic activity in hexanic and ethanolic extracts of *Rollinia laurifolia*. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 28, n. 2, p. 234-240, 2009.

CÂMARA, C. A. G. da.; ALENCAR, J. W. de; SILVEIRA, E. R. Volatile constituents of *Xylopiia sericea* St. Hill. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 8, n. 1, p. 75-78, Jan./Feb. 1996.

FEITOSA, E. M. A. et al. Chemical composition and larvicidal activity of *Rollinia leptopetala* (Annonaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 375-378, 2009.

FISCHER, D. C. H. et al. In vitro screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. **Acta Tropica**, Basel, v. 92, n. 3, p. 261-266, nov./dic. 2004.

GIORGI, A. et al. Chemometric analysis of the secondary metabolite profile of Yarrow (*Achillea collina* Becker ex Rchb.) affected by phloem feeding *Myzus persicae* Sulzer aphids. **Journal of Entomological and Acarological Research, Ser. II**, Milano, v. 42, n. 2, p. 91-102, 2010.

GIRAUDOUX, P. Data analysis in ecology. Package 'pgirmess'. 2013. <http://cran.r-project.org/web/packages/pgirmess/pgirmess.pdf>

GOODGER, J. Q. D.; HESKES, A. M.; WOODROW, I. E. Contrasting ontogenetic trajectories for phenolic and terpenoid defences in *Eucalyptus froggattii*. **Annals of Botany**, London v. 112, n. 4, p. 651-659, 2013.

GRDIŠA, M.; GRŠIĆ, K. Botanical insecticides in plant protection. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, Zagreb, v. 78, n. 2, p. 85-93, 2013.

GREEN, B. T. et al. Plant toxins that affect nicotinic acetylcholine receptors: a review. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 26, n. 8, p. 1129-1138, July 2013.

GUPTA, A. et al. Annonaceous acetogenins: the unrevealed area for cytotoxic and pesticidal activities. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 2, n. 2, p. 104-109, 2011.

HOE, P. K. et al. Biological activity of *Annona muricata* seed extracts. **Malaysian Journal of Science**, Kuala Lumpur, v. 29, n. 2, p. 153-159, 2010.

INUI, T. et al. Unbiased evaluation of bioactive secondary metabolites in complex matrices. **Fitoterapia**, New York, v. 83, n. 7, p. 1218-1225, Oct. 2012.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 51, n. 1, p. 45-66, Jan. 2006.

IZQUIERDO-GARCÍA, J. L. et al. Descriptive review of current NMR-based metabolomic data analysis packages. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, Elmsford, v. 59, n. 3, p. 263-270, Oct. 2011.

JESCHKE, P.; NAUEN, R.; BECK, M. E. Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a milestone for modern crop protection. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 52, n. 36, p. 9464-9485, Sept. 2013.

KABIR, K. E.; KHAN, A. R.; MOSADDIK, M. A. Goniiothalamine - a potent mosquito larvicide from *Bryonopsis laciniosa* L. **Journal of Applied Entomology**, Washington, v. 127, n. 2, p. 112-115, Mar. 2003.

KABIR, K. E. Larvicidal effect of an alkaloidal fraction of *Artabotrys odoratissimus* (Annonaceae) bark against the filarial mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, Wallingford, v. 30, n. 3, p. 167-169, Sept. 2010.

KOONA, P.; BOUDA, H. Biological activity of *Pachypodanthium staudtii* (Annonaceae) against the bean beetle *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Applied Sciences Research**, v. 2, n. 12, p. 1129-1131, 2006.

KERSTEN, B. et al. Integrated transcriptomics and metabolomics decipher differences in the resistance of pedunculate oak to the herbivore *Tortrix viridana* L. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, Oct. 2013.

KIHAMPA, C. et al. Larvicidal and IGR activity of extract of Tanzanian plants against malaria vector mosquitoes. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 46, n. 2, p. 145-152, June 2009.

KIM, S.-W.; KANG, J.; PARK, I.-K. Fumigant toxicity of Apiaceae essential oils and their constituents against *Sitophilus oryzae* and their acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 16, n. 4, p. 443-448, Dec. 2013.

KIM, S.-I.; LEE, D.-W. Toxicity of basil and orange essential oils and their components against two coleopteran stored products insect pests. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 17, n. 1, p. 13-17, 2014.

LAGO, J. H. G. et al. Composition of the leaf oil of *Xylopiia emarginata* Mart. (Annonaceae). **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 17, n. 6, p. 622-623, 2005.

LEISS, K. A. et al. An eco-metabolomic study of host plant resistance to Western flower thrips in cultivated, biofortified and wild carrots. **Phytochemistry**: chemistry, biochemistry, molecular biology, New York, v. 93, p. 63-70, Sept. 2013.

LLANOS, C. A. H.; ARANGO, D. L.; GIRALDO, M. C. Insecticidal activity of *Annona muricata* (Anonaceae) seed extracts on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, Bogotá, v. 34, n. 1, p. 76-82, 2008.

MAGADULA, J. J.; INNOCENT, E.; OTIENO, J. N. Mosquito larvicidal and cytotoxic activities of 3 *Annona* species and isolation of active principles. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 9, p. 674-680, 2009.

MAIA, J. G. S. et al. Leaf volatile oils from four Brazilian *Xylopi*a species. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 20, n. 5, p. 474-477, Sept. 2005.

MCCALL, A. C.; FORDYCE, J. A. Can optimal defence theory be used to predict the distribution of plant chemical defences? **The Journal of Ecology**, Oxford, v. 98, n. 5, p. 985-992, Sept. 2010.

MIKOLAJCZAK, K. J. et al. Sylvaticin: a new cytotoxic and insecticidal acetogenin from *Rollinia sylvatica* (Annonaceae). **Experientia**, v. 46, n. 3, p. 324-327, Mar. 1990.

MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Plant defense against herbivores: chemical aspects. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, p. 431-450, Feb. 2012.

MOORE, B. D. et al. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. **New Phytologist**, v. 201, n. 3, p. 733-750, Feb. 2014.

MOREIRA, I. C. et al. Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopi*a *emarginata* (Annonaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 55-58, Jan./Mar. 2007.

MOREIRA, I. C.; LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F. Alkaloid, flavonoids and terpenoids from leaves and fruits of *Xylopia emarginata* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 535-537, 2003.

MOREIRA, I. C.; ROQUE, N. F.; LAGO, J. H. G. Diterpene adducts from branches of *Xylopia emarginata*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 34, n. 11, p. 833-837, July 2006.

NAGASHIMA, F.; MURAKAMI, Y.; ASAKAWA, Y. Aromatic compounds from the Ecuadorian liverwort *Marchesinia brachiata*: a revision. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**. New York, v. 51, p. 1101-1104, 1999.

NASCIMENTO, F. D. C. do. et al. Acetogeninas de anonáceas isoladas de folhas de *Rollinia laurifolia*. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 319-322, 2003.

NGADJUI, B. T. et al. Pachypophyllin and pachypostaudins A and B: three bisnorlignans from *Pachypodanthium staudtii*. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 28, n. 1, p. 231-234, 1989.

NGUEMTCHOUIN, M. M. G. et al. Insecticidal formulation based on *Xylopia aethiopica* essential oil and kaolinite clay for maize protection. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 9, p. 985-991, Sept. 2010.

NYANDORO, S. S. et al. New antimicrobial, mosquito larvicidal and other metabolites from two *Artabotrys* species. **Natural Product Research**, Abingdon, v. 27, n. 16, p. 1450-1458, 2013.

OKONKWO, E. U. Plant materials used for controlling insect pests of stored products in Nigeria, families Annonaceae, Piperaceae, and Rutaceae. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, Birmingham, v. 11, n. 1-2, p. 47-69, 2004.

OLIVEIRA-FILHO, A. T. **TreeAtlas 2.0, flora arbórea da América do Sul cisandina tropical e subtropical**: um banco de dados envolvendo biogeografia, diversidade e conservação. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.icb.ufmg.br/treetlan/>>. Acesso em: 20 jan. 2013.

ORAFIDIYA, L. O. et al. Pesticidal and antimicrobial profile of the sesquiterpene rich leaf essential oil of *Polyalthia longifolia* (Sonn.) Thwaites. **International Journal of Essential Oil Therapeutics**, v. 4, n. 1-2, p. 11-16, 2010.

PATRA, B. et al. Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**: gene regulatory mechanisms, Amsterdam, v. 1829, n. 11, p. 1236-1247, Nov. 2013.

PIMENTA, L. P. S.; NASCIMENTO, F. C.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogenins from the leaves of *Rollinia laurifolia*. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 88, n. 12, p. 3225-3231, Dec. 2005.

PONTES, W. J. T. et al. Atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Xylopiya sericea* sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* Koch). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 838-841, jul./ago. 2007.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna, 2014. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 1 jul. 2013.

RIBEIRO, L. D. P. et al. *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): A promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 55, p. 6-14, Oct. 2013.

RITZ, C. **Package 'drc'**: analysis of dose-response curve data. 2013. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/web/packages/drc/drc.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

RODRIGUES, A. M. S. et al. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 22, n. 2, p. 314-317, June 2006.

SANTOS PIMENTA, L. P. et al. Laurifolin, a novel acetogenin from *Rollinia laurifolia* leaves. **Tetrahedron Letters**, Elmsford, v. 42, n. 48, p. 8433-8434, Jan. 2001.

SILVA, D. B. da. **Estudo fitoquímico e avaliação alelopática das partes subterrâneas de *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Benth. & Hook. f. - Annonaceae**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2006.

SILVA, D. M. et al. Ent-kaurane diterpenoids and other constituents from the stem of *Xylopija laevigata* (Annonaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 8, p. 1570-1576, 2012.

SILVA, G. et al. Bioactivity of a water extract of boldus (*Peumus boldus molina*) against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) and *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae). **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillán, v. 73, n. 2, p. 135-141, jun. 2013.

STORER, N. P. et al. Discovery and characterization of field resistance to Bt Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, May 2010.

SOUSA, O. V. et al. Chemical composition and biological activities of the essential oils from *Duguetia lanceolata* St. Hil. Barks. **Molecules**, Switzerland, v. 17, n. 9, p. 11056-11066, Sept. 2012.

SRINIVASA RAO, M. et al. Efficacy of botanicals against gram pod borer, *Helicoverpa armigera* Hub. **Pestology**, v. 23, n. 1, p. 18-22, 1999.

SRIVASTAVA, N. K.; SRIVASTAVA, A. K. Allocation of different <sup>14</sup>C substrates into primary metabolites in relation to total alkaloid accumulation into *Catharanthus roseus* plants. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 5, n. 19, p. 4747-4753, Sept. 2011.

SUN, J. et al. Metabolites of *Ammopiptanthus mongolicus* induced by *Orgyia ericae* attack and mechanical wounding. **Plant, Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 69, p. 101-107, Aug. 2013.

TABASHNIK, B. E.; RENSBURG, J. B. J. van; CARRÍRE, Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, n. 6, p. 2011-2025, Dec. 2009.

TAKAHASHI, J. A. et al. Mono and diterpenes from seeds of *Xylopiasericca*. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 5, p. 616-618, 2001.

THERNEAU, T. M. A **Package for Survival**: survival analysis. Version 2.37-7. 2013. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=survival>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

TEMPONE, A. G. et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, Jena, v. 12, n. 5, p. 382-390, May 2005.

TOLOSA, D. et al. Insecticidal effects of acetogenins from *Rollinia occidentalis* seed extract. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 7, n. 12, p. 1645-1646, Dec. 2012.

TONG, F.; COATS, J. R. Quantitative structure-activity relationships of monoterpenoid binding activities to the housefly GABA receptor. **Pest Management Science**, Sussex, v. 68, n. 8, p. 1122-1129, Aug. 2012.

VILEGAS, W. et al. Diterpenic adducts from *Xylopiaspecies*. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 30, n. 6, p. 1869-1872, 1991.

VOURLIOTI-ARAPI, F. Essential oils of indigenous in Greece six Juniperus taxa: Chemical composition and larvicidal activity against the West Nile virus vector *Culex pipiens*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 110, n. 5, p. 1829-1839, May 2012.

WANG, Z.-W. et al. 2,4,5- trimethoxystyrene, a bioactive component of the bark of *Duguetia panamensis*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 51, n. 2, p. 382, Mar./Apr. 1988.

WATERMAN, P.G. 2,4,5-trimethoxystyrene from *Pachydonanthium staudtii*. **Phytochemistry**: chemistry, biochemistry, molecular biology, New York, v. 15, n. 2, p. 347, 1976.

WATKINS, F. et al. Antimicrobial assays of three native British plants used in Anglo-Saxon medicine for wound healing formulations in 10th century England. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 144, n. 2, p. 408-415, Nov. 2012.

WHITEHEAD, S. R. et al. Patterns of secondary metabolite allocation to fruits and seeds in *Piper reticulatum*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 39, n. 11-12, p. 1373-1384, Dec. 2013.

YAPI, T. A. et al. *Pachypodanthium staudtii* Engl & Diels from côte d'ivoire: composition of leaf, stem bark and roots oils. **European Journal of Scientific Research**, Victoria, v. 69, n. 1, p. 137-142, Jan. 2012.

YULIANA, N. D. et al. Comprehensive extraction method integrated with NMR metabolomics: a new bioactivity screening method for plants, adenosine a1 receptor binding compounds in *Orthosiphon stamineus* Benth. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 83, n. 17, p. 6902-6906, July 2011.

YULIANA, N. D. et al. NMR metabolomics for identification of adenosine A1 receptor binding compounds from *Boesenbergia rotunda* rhizomes extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 150, n. 1, p. 95-99, Aug. 2013.

**ARTIGO 2** Purificação de metabólitos das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* ativos para *Spodoptera frugiperda*

**Artigo normalizado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003).**

**Purificação de metabólitos das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* ativos para *Spodoptera frugiperda***

**Dejane S. Alves<sup>\*1</sup>; Viviane A. Campos<sup>2</sup>; Alan R. T. Machado<sup>3</sup>;  
Denilson F. Oliveira<sup>2</sup>; Geraldo A. Carvalho<sup>1</sup>**

**RESUMO**

*Duguetia lanceolata* St. Hil. é uma anonácea, nativa do Brasil, na qual os estudos fitoquímicos e trabalhos objetivando avaliar o uso potencial de seus metabólitos até o momento são escassos. Em trabalhos anteriores, foi constatada alta atividade inseticida da fração solúvel em diclorometano, proveniente do extrato metanólico, das cascas do caule dessa planta, para lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Assim, este trabalho teve como objetivo realizar o estudo fitoquímico da fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *D. lanceolata*, proveniente do extrato metanólico, com vistas ao isolamento da(s) molécula(s) bioativa(s) para *S. frugiperda*. Para tanto, a fração solúvel em diclorometano foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel do tipo *flash* e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o que permitiu o isolamento de oito substâncias. Por meio de experimentos uni e bidimensionais de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H (hidrogênio) e <sup>13</sup>C (carbono treze), foi possível a identificação de duas substâncias. Ensaio biológicos com *S. frugiperda* revelaram que as moléculas responsáveis pela atividade biológica são a *trans*-asarona e 2,4,5-trimetoxiestireno. A mistura de *trans*-asarona + 2,4,5-trimetoxiestireno, quando incorporada em dieta artificial e oferecida a lagartas de *S. frugiperda*, provocou altos índices de mortalidade durante a fase larval; redução no peso de pupas; alongamento na fase larval; mortalidade na fase pupal e efeito antialimentar, em ensaios conduzidos com e sem chance de escolha. As substâncias *trans*-asarona e 2,4,5-trimetoxiestireno,

---

\*<sup>1</sup> Universidade Federal de Lavras, Departamento de Entomologia - Caixa Postal 3.037, CEP 37.200-000 Lavras, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Lavras, Departamento de Química - Caixa Postal 3.037, CEP 37.200-000 Lavras, MG, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

quando oferecidas de forma isolada para lagartas de *S. frugiperda*, também provocaram alta taxa de mortalidade, entretanto o 2,4,5-trimetoxiestireno mostrou-se mais ativo do que a *trans*-asarona.

Palavras-chave: Lagarta do cartucho do milho. Produtos naturais. Inseticida botânico. Fenilpropanoides.

## 1 INTRODUÇÃO

Annonaceae é uma família botânica com cerca de 2.500 espécies descritas, dentre as quais aproximadamente 900 estão presentes nas Américas (JUNIKKA; KOEK-NOORMAN, 2007). A família apresenta distribuição cosmopolita, sendo muitas as espécies conhecidas pela produção de metabólitos tóxicos a herbívoros (GONZÁLEZ-ESQUINCA et al., 2012; MADHUMITHA et al., 2012; TOLOSA et al., 2012; RIBEIRO et al., 2013). Dentre as classes de substâncias produzidas por essas plantas, com atividade pesticida, é possível mencionar as acetogeninas (metabólitos exclusivos dessa família), os alcaloides e diversos terpenoides (KOUNINKI et al., 2007; HOE et al., 2010; SEDLACEK et al., 2010; RIBEIRO et al., 2013).

Nesse contexto, *Duguetia* A. St.- Hil. (Annonaceae) é um dos maiores gêneros da família Annonaceae, com cerca de 100 espécies descritas (PÉREZ; CASSELS, 2010). Dentre os metabólitos produzidos por plantas pertencentes à *Duguetia* spp., é possível citar os alcaloides aporfínicos (CAROLLO et al., 2006a; CAROLLO; SIQUEIRA, 2009; SILVA et al., 2009); alcaloides protoberberínicos e derivados do cinamato (ALMEIDA et al., 2007); alcaloides isoquinolínicos (CAROLLO et al., 2006b); sesquiterpenos de núcleo santalano (GOMES-PEREIRA et al., 2003); flavonoides glicosilados (SANTOS; SALATINO, 2000); e fenilpropanoides (LIU; PILARINOU; MCLAUGHLIN, 1999). Destaca-se ainda a presença de terpenos, sesquiterpenos e sesquiterpenos do tipo aromadendrano nos tecidos vegetais de espécies desse gênero (SIQUEIRA et al., 2003; ALMEIDA et al., 2010). Vale ressaltar que

algumas das moléculas pertencentes às supracitadas classes químicas apresentam toxicidade a insetos, como por exemplo, o alcaloide aporfínico glaucina (PARK et al., 2011) e o alcaloide protoberberínico berberina (SHIELDS et al., 2008).

Dentre as plantas pertencentes ao gênero *Duguetia*, distribuídas pelo território brasileiro, vale mencionar *Duguetia lanceolata* St. Hil. (Annonaceae), que se trata de uma espécie nativa do Brasil, conhecida popularmente como pindaíva, pindaíba, pindauva ou perovana, que tem emprego na medicina popular para o tratamento de contusões (RODRIGUES; CARVALHO, 2008). Entretanto, os estudos fitoquímicos com vistas a avaliar o potencial uso das moléculas produzidas por essa espécie até o momento são escassos, sendo poucos os estudos descritos na literatura. Em um deles, foi constatado o efeito antiplasmodial e antiprotozoário da fração enriquecida em alcaloides proveniente das folhas dessa planta (FISCHER et al., 2004; TEMPONE et al., 2005). Em outro estudo, foram observados os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato etanólico das folhas de *D. lanceolata* (SOUSA et al., 2008). Mais recentemente foi constatada a atividade antimicrobiana do óleo essencial das cascas dos galhos de *D. lanceolata* que, segundo análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, tinha como componentes majoritários o  $\beta$ -elemeno, óxido de cariofileno e  $\beta$ -selineno (SOUSA et al., 2012).

Destaca-se ainda que, em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisas em Produtos Naturais da Universidade Federal de Lavras para Aplicação na Agropecuária, foi constatada alta atividade inseticida da fração solúvel em diclorometano do extrato metanólico das

cascas do caule de *D. lanceolata* para lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), praga chave da cultura do milho nas Américas, inclusive no Brasil. Ademais, através de análises empregando uma abordagem metabolômica foi sugerido que a molécula responsável pela atividade inseticida dessa planta seria o 2,4,5-trimetoxiestireno (dados não publicados). Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo fitoquímico da fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *D. lanceolata* e avaliar a bioatividade das moléculas isoladas para lagartas de *S. frugiperda*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Procedimentos experimentais gerais

Foi utilizado hexano (Hex) e acetato de etila (AcOEt) de grau UV-HPLC (Vetec, Brasil), enquanto os demais solventes foram de grau analítico (Vetec, Brasil). Para as análises por CCD (cromatografia em camada delgada), foram empregadas placas de alumínio recobertas com sílica gel 60 impregnada com indicador de fluorescência. Os reveladores utilizados em tais análises foram luz UV (ultravioleta, 254 nm), vapor de iodo, vapor de iodo + luz UV, solução de sulfato cérico amoniacal, ácido fosfomolibdico a 0,05 g/mL em etanol e solução de p-anisalaldeído sulfúrico 0,025 g/mL. Sílica gel (Merck, 0.040 - 0.063 mm, 60 Å) foi empregada para o fracionamento em coluna do tipo *flash*. As análises e fracionamentos por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) foram realizados em aparelho Shimadzu com detector do tipo DAD,

modelo SPDM20A, equipado com duas bombas modelo LC-6AD, injetor manual Reodyne, modelo 20i ou injetor automático, modelo SIL-10AF, degaseificador de solventes, modelo DGU – 20A3, interface CBM-20A (SCL-10Avp) e *software* LCSOLUTION 1.21. As análises por CLAE foram feitas empregando coluna analítica (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm) de sílica, Phenomenex Gemini, equipadas com pré-coluna contendo a mesma fase estacionária. Para a condução das análises por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e carbono ( $^{13}\text{C}$ ) unidimensionais foi empregado espectrômetro Varian Inova 600, operando a 600 MHz para  $^1\text{H}$  e 151,5 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Além dos espectros unidimensionais também foram obtidos mapas de contorno de COSY (correlação espectroscópica homonuclear), HMBC (correlação espectroscópica heteronuclear a longa distância) e HSQC (correlação espectroscópica heteronuclear a curta distância). Para tanto, as amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO- $d_6$ ) da marca Acros Organics ou clorofórmio deuterado  $\text{CDCl}_3$  da marca Aldrich, estabilizado com 0,5% m/m de prata, sendo que ambos os solventes continham 0,03% (v/v) de TMS (tetrametilsilano), cujos sinais residuais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram empregados como referências para as calibrações dos espectros.

## 2.2 Material vegetal

As cascas do caule de *D. lanceolata* foram coletadas no campus da Universidade Federal de Lavras (Região do Alto Rio Grande: Lavras, Minas Gerais - Brasil) no mês de junho de 2012 (23 K 0,503609; UTM 7652514), uma amostra do material foi encaminhada para o herbário

ESAL onde foi depositada exsicata (27631). O restante do material botânico foi submetido à secagem em estufa de ventilação forçada a 40 °C por 72 horas. Em seguida, a amostra foi moída em moinho do tipo Willey, dando origem ao material vegetal seco, o qual foi empregado para o preparo do extrato e fracionamento.

### **2.3 Preparo do extrato e partição líquido-líquido**

O material vegetal seco e moído (1.058,7 g) foi imerso em metanol (MeOH, 6 L) por 24 horas. Em seguida, o material foi submetido à filtração em algodão hidrófilo e se repetiu o processo de extração com o resíduo por oito vezes, sendo utilizados 4 L de MeOH em cada uma delas. Ao final, as fases líquidas foram combinadas e concentradas até *secura* em evaporador rotatório, dando origem ao extrato metanólico (146,5 g).

Parte do extrato metanólico (105,97 g) foi submetida à partição líquido-líquido entre diclorometano (420 mL) e água (420 mL). Após separação da fase inferior, a fase aquosa (superior) foi submetida a mais duas partições com diclorometano (2 x 420 mL). As fases solúveis em diclorometano foram combinadas e tratadas com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro para a remoção de água. Após filtração da mistura resultante em algodão hidrófilo, a fase líquida foi concentrada até *secura* em evaporador rotatório e liofilizada, dando origem à fração solúvel em diclorometano (15,97 g) (ÁLVAREZ-COLOM et al., 2007; 2008; 2009).

## 2.4 Purificação dos metabólitos das cascas do caule de *D. lanceolata*

Parte da fração solúvel em diclorometano do extrato das cascas do caule de *D. lanceolata* (2,51 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel do tipo *flash* (150 x 50 mm d.i. – diâmetro interno) empregando-se como eluentes: Hex: AcOEt (9:1, 1L); Hex: AcOEt (9:2, 1L); AcOEt (1L); MeOH (1L) e H<sub>2</sub>O (1L). As frações coletadas foram analisadas através de CCD e reunidas de acordo com suas similaridades, originando 22 frações. Foram selecionadas seis frações, as quais foram denominadas fração I (De02D-34-10), II (De02D-34-21), III (De02D-34-11), IV (De02D-34-20), V (De02D-34-18) e VI (De02D-140-22), para dar prosseguimento ao processo de purificação. As frações foram concentradas até *secura* em evaporador rotatório e liofilizadas.

A fração I (De02D-34-10) foi analisada por CLAE-DAD (modo isocrático, Hex: AcOEt, 88:12), o que revelou a presença de duas substâncias, que se apresentavam como uma única mancha devido à grande similaridade química entre elas e, conseqüentemente, à baixa diferença no R<sub>f</sub>. Dessa forma, a amostra (120 mg) foi solubilizada em Hex: AcOEt, 94:6 (12 mL) e submetida a processo de extração em fase sólida (*clean-up*). Em seguida, a amostra foi injetada em cromatógrafo (60 µL a cada 8 minutos), empregando coluna analítica de sílica (modo isocrático, Hex: AcOEt, 96:4), originando as substâncias **1** e **2** (Figura 2), que posteriormente foram submetidas a análises por RMN.

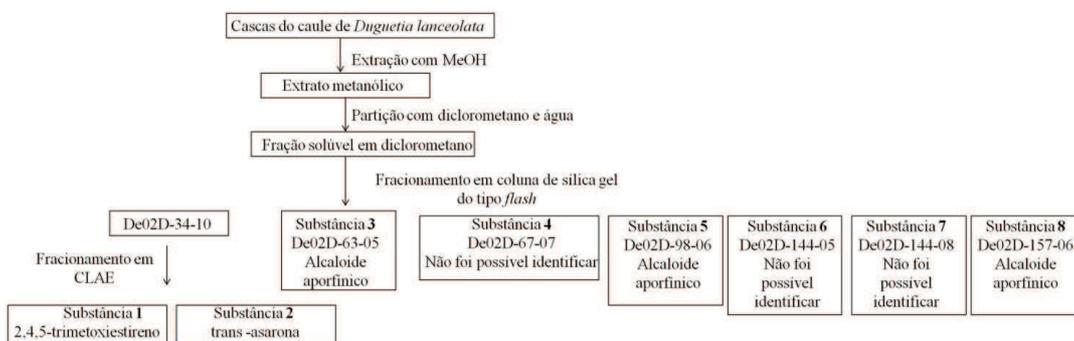


Figura 1 Resumo dos procedimentos adotados durante o fracionamento da fração solúvel em diclorometano, proveniente do extrato metanólico, das cascas do caule de *Duguetia lanceolata*

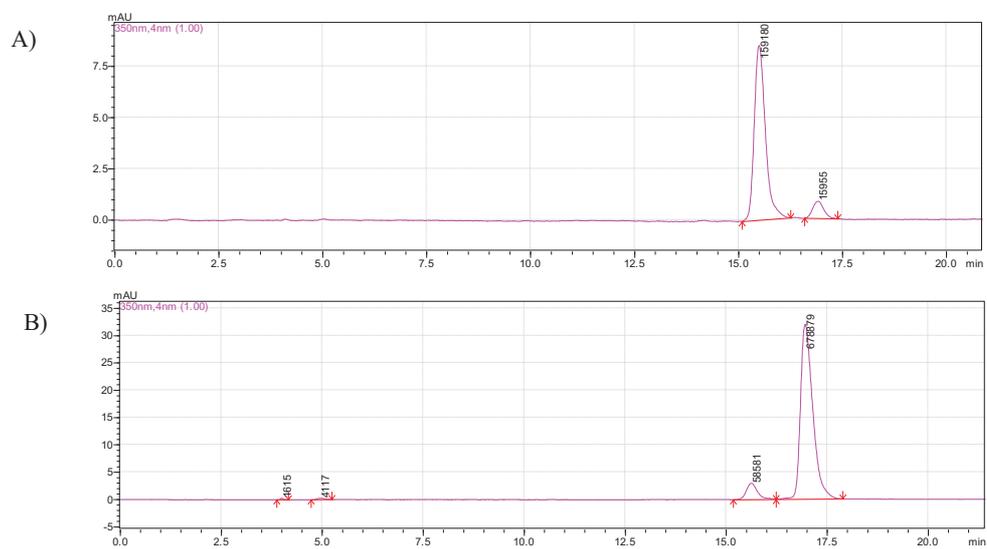


Figura 2 Cromatograma obtido durante o processo de fracionamento do 2,4,5-trimetoxiestireno (a) e *trans*-asarona (b) em CLAE-DAD. Condições cromatográficas: coluna de sílica, modo isocrático com Hex/ AcOEt (94:6)

Análises por CCD revelaram que a fração II (De02D-34-21) apresentava-se, ainda, com impurezas, dessa maneira, uma alíquota (0,1247 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel do tipo *flash* (150 x 10 mm d.i.), empregando como eluente AcOEt: Hex (99:1, 0,1L), o que originou a substância **3** (0,0628 g, De02D-63-05).

De forma semelhante, a fração III (De02D-34-11) (0,0474 g) também foi submetida a novo processo de cromatografia em coluna de sílica gel do tipo *flash* (150 x 10 mm d.i.) utilizando como eluente Hex: AcOEt (84: 16, 0,2 L) o que permitiu o isolamento da substância **4** (0,0038 g, De02D-67-07).

Para a fração IV (De02D-34-20) (0,438 g), o processo de purificação também foi conduzido empregando cromatografia em coluna de sílica gel do tipo *flash* (150 x 20 mm d.i) e o sistema de eluente utilizado foi álcool isopropílico: ácido acético glacial: H<sub>2</sub>O na proporção de 84: 8: 8 (0,2 L), possibilitando o isolamento da substância **5** (0,0327 g, De02D-98-06).

A fração V De02D-34-18 (0,0885 g) foi eluída através de coluna de sílica gel do tipo *flash* (150 x 10 mm d.i.) empregando-se o sistema de solventes constituído por butanol: ácido acético glacial: H<sub>2</sub>O (82: 8: 10, 0,2 L), o que originou a subfração A (De02D-104-06) (0,0447 g). Análises por CCD da subfração A (De02D-104-06) revelaram a presença de duas substâncias, assim a mesma foi novamente submetida a cromatografia (200 x 10 mm d.i) empregando o mesmo sistema de eluente descrito anteriormente, o que resultou no isolamento de duas substâncias **6** (0,0263 g, De02D-144-05) e **7** (0,0043 g, De02D-144-08).

Análises por CCD da fração VI (De02D-140-22, 0,1498 g) revelaram a presença de uma substância aparentemente majoritária, assim por meio de cromatografia em coluna de sílica gel do tipo *flash* (150 x 10 mm d.i.) e sistema de eluente constituído pela combinação de MeOH: AcOEt (60:40) + 1% de trietilamina (0,2 L), foi possível o isolamento da substância **8** (16,6 mg, De02D-157-06).

## **2.5 Bioensaios**

### **2.5.1 Insetos**

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas lagartas de *S. frugiperda*, com 48 horas de idade, alimentadas com dieta artificial e provenientes da segunda postura de espécimes criadas em laboratório. A dieta artificial foi constituída de feijão do grupo Carioca (166,66 g); gérmen de trigo (79,20 g); levedo de cerveja (50,70 g); ácido sórbico (1,65 g); ácido ascórbico (5,10 g); 4-hidroxibenzoato de metila (3,15 g); ágar (27,0 g); formaldeído (4,15 mL) e solução inibidora de crescimento microbiano (4,15 mL) preparada a partir de ácido propanoico (18,0 mL), ácido fosfórico (43,0 mL) e água (540,0 mL). Para o preparo da dieta, o feijão foi levado ao fogo até cozimento com 1,5 L de água. As proporções de ingredientes supracitadas foram empregadas para o volume de 750 mL de água destilada, usada para dissolução do ágar, mais 750 mL de caldo de feijão, proveniente do cozimento do feijão. Os adultos foram alimentados com solução aquosa de mel (0,1 mL/mL). Todos os insetos

foram mantidos em sala climatizada a  $25 \pm 2$  °C,  $70 \pm 10\%$  UR e fotofase de 12 horas por dia.

### **2.5.2 Resposta concentração - mortalidade de lagartas de *S.***

#### ***frugiperda* alimentadas com a fração solúvel em diclorometano do extrato das cascas do caule de *D. lanceolata***

A fração solúvel em diclorometano proveniente do extrato das cascas do caule de *D. lanceolata* (25, 50, 100, 200 e 400 mg) foi solubilizada em solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL (20 mL) e incorporada em dieta artificial (200 mL) ligeiramente quente (50 °C). Após endurecimento da dieta pelo resfriamento até aproximadamente 25 °C, pedaços da mesma, de igual tamanho (1,0 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) foram transferidos para tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro x 8,0 cm de altura), nos quais foram colocadas lagartas de *S. frugiperda* com 48 horas de idade, alimentadas previamente com dieta artificial. Cada tubo, que continha apenas uma lagarta e um pedaço de dieta, foi tampado com algodão hidrófilo.

O delineamento foi inteiramente casualizado, sendo que cada parcela experimental foi constituída por uma lagarta, mantida individualizada. Os tratamentos empregados constituíram das frações das cascas do caule de *D. lanceolata* nas concentrações de 113,6; 227,2; 454,5; 909,0 e 1.818,1 µg/mL de dieta e das testemunhas dieta acrescida de água e de solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL. Foram empregadas 60 repetições por tratamento, sendo a parcela experimental constituída por uma lagarta mantida individualizada. A sobrevivência dos

insetos foi avaliada diariamente, durante 11 dias, para a determinação do tempo letal mediano (TL<sub>50</sub>). Os dados de sobrevivência após 72 horas da montagem do bioensaio foram empregados para o cálculo da concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>).

### **2.5.3 Determinação do TL<sub>50</sub> para lagartas de *S. frugiperda***

#### **alimentadas com substâncias isoladas das cascas do caule de *D. lanceolata***

Para a determinação da concentração dos tratamentos empregados nesse bioensaio, utilizou-se o valor de CL<sub>90</sub>, obtido para a fração solúvel em diclorometano do extrato das cascas do caule de *D. lanceolata*, determinada em ensaio prévio. No que se refere às substâncias puras, os cálculos foram baseados na percentagem de rendimento obtida na extração baseando-se também no valor de CL<sub>90</sub> da fração solúvel em diclorometano.

Dessa maneira, os tratamentos empregados consistiram da fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *D. lanceolata* (242,2 mg); 2,4,5-trimetoxiestireno + trans-asarona (80,0 mg; De02D-34-10); substância pura **3** (6,0 mg; De02D-63-05) e substância pura **5** (4,6 mg; De02D-98-06), sendo as testemunhas dieta acrescida de água e de solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL. Os tratamentos foram solubilizados em solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL e incorporados à dieta artificial, conforme descrito previamente (2.5.2). Foram empregadas lagartas com 48 horas de idade, alimentadas previamente com dieta artificial.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com 60 repetições por tratamento, sendo que cada parcela experimental foi constituída por uma lagarta, mantida individualizada. A sobrevivência dos insetos foi avaliada diariamente, durante 11 dias, para determinação do tempo letal mediano.

#### **2.5.4 Resposta concentração - mortalidade de lagartas de *S.***

##### ***frugiperda* alimentadas com combinação de 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona**

Para a realização desse bioensaio, uma combinação de 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona (10, 20, 40, 80 e 160 mg) foi solubilizada em solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL (20 mL) e incorporada em dieta artificial. Foram empregadas lagartas com 48 horas de idade, alimentadas previamente com dieta artificial. Os tratamentos foram dieta acrescida da fração nas concentrações de 45,4; 90,9; 181,8; 363,6 e 727,2 µg/mL de dieta, como testemunhas empregou-se dieta acrescida de água e solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL. O delineamento foi inteiramente casualizado, sendo que cada parcela experimental foi constituída por uma lagarta, mantida individualizada, foram empregadas 60 repetições por tratamento. A sobrevivência dos insetos foi avaliada diariamente, durante 11 dias, para determinação do tempo letal mediano, sendo que os dados de sobrevivência após 72 horas da montagem do bioensaio foram empregados para o cálculo da CL<sub>50</sub>.

### 2.5.5 Efeito antialimentar para *S. frugiperda*

A metodologia empregada foi adaptada de Burgueño-Tapia et al. (2008), Cespedes et al. (2013) e Muñoz et al. (2013). Assim, a fração solúvel em diclorometano do extrato cascas do caule de *D. lanceolata* (29 mg) e uma combinação do 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona (17 mg) foram solubilizadas em solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL (20 mL) para serem incorporadas em dieta artificial (200 mL) conforme descrito previamente.

Cada arena consistiu de uma placa de Petri (9 cm de diâmetro), com dois pedaços de dieta (1,0 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura), sendo uma acrescida do tratamento a ser testado e o outro de dieta com solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL. A testemunha consistiu de arenas contendo um pedaço de dieta acrescida de água e outro de solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL. Os pedaços de dieta tiveram a massa fresca previamente mensurada. No centro de cada arena, foi liberada uma lagarta de *S. frugiperda*, com dez dias de idade, mantida em dieta artificial e privada de alimento por duas horas. Após 96 horas da liberação das lagartas, no centro de cada arena, os pedaços de dieta foram liofilizados e massa seca mensurada, sendo que alíquotas da dieta foram empregadas para a estimativa da massa seca inicial. O parâmetro avaliado foi o consumo alimentar dos insetos.

### **2.5.6 Variáveis nutricionais de lagartas de *S. frugiperda***

A fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *D. lanceolata* (29 mg) e uma combinação do 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona (10 mg) foram solubilizadas em solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL (20 mL) e incorporadas em dieta artificial (200 mL) conforme descrito previamente. Em seguida, dois pedaços de dieta de igual tamanho (1,0 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) foram transferidos para tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro x 8,0 cm de altura), nos quais foram inoculados uma lagarta de *S. frugiperda* por vidro, com 48 horas de idade, alimentada previamente com dieta artificial.

Após 14 dias da alimentação das lagartas de dieta contendo os tratamentos, as sobras alimentares da dieta e lagartas, foram submetidas ao processo de liofilização para determinação do peso seco. Alíquotas da dieta também foram amostradas para a estimativa do peso seco inicial da dieta. As variáveis avaliadas foram o consumo alimentar dos insetos (mg); índice de consumo alimentar (mg/dia) e massa das lagartas (mg).

### **2.5.7 Variáveis biológicas de lagartas de *S. frugiperda***

A fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *D. lanceolata* (25, 29 e 65 mg) e uma combinação do 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona (10, 17 e 27 mg) foram solubilizadas em solução aquosa de Tween 80 a 0,01% (20 mL) e incorporadas em dieta artificial (200 mL) conforme descrito previamente. Em seguida, dois pedaços de dieta de igual tamanho (1,0 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) foram transferidos

para tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro x 8,0 cm de altura), nos quais foram inoculados uma lagarta de *S. frugiperda* por vidro, com 48 horas de idade, alimentada previamente com dieta artificial.

As variáveis biológicas avaliadas foram: sobrevivência das lagartas durante a fase larval (diariamente até o 18º dia da montagem do experimento), duração das fases larval e pupal, peso das pupas e sobrevivência dos insetos na fase pupal. Logo após a emergência dos insetos, no mínimo 10 casais de *S. frugiperda* foram isolados em gaiolas. A longevidade dos adultos foi determinada pelas observações diárias. As posturas foram recolhidas diariamente para quantificação, também foram determinados os períodos de pré-oviposição, oviposição e sobrevivência dos insetos na fase adulta. Os tratamentos empregados consistiram na dieta acrescida da fração das cascas do caule de *D. lanceolata*, nas concentrações de 113,6; 131,8 e 295,4 µg/mL e mistura do 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona (45,4; 77,2 e 127,7 µg/mL). As testemunhas foram água e solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL.

#### **2.5.8 TL<sub>50</sub> de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com 2,4,5-trimetoxiestireno e *trans*-asarona**

As frações solúveis em diclorometano do extrato das cascas do caule de *D. lanceolata* (27 mg), 2,4,5-trimetoxiestireno (27 mg) e *trans*-asarona (27 mg) foram solubilizadas em solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL (20 mL) e incorporadas em dieta artificial (200 mL) conforme descrito previamente. Foram empregadas lagartas com 48 horas de idade, alimentadas previamente com dieta artificial. O delineamento foi

inteiramente casualizado, com 60 repetições por tratamento, sendo que cada parcela experimental foi constituída por uma lagarta, mantida individualizada. A sobrevivência dos insetos foi avaliada diariamente, durante 11 dias, para determinação do tempo letal mediano.

## 2.6 Análise estatística

Os dados referentes à sobrevivência dos insetos durante a fase larval foram submetidos à análise de sobrevivência, aplicando-se o modelo de Weibull, por meio do pacote Survival (THERNEAU, 2013) do *software* R® (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013). Após a seleção do modelo matemático mais adequado por meio da análise de resíduos, foi realizada a análise de contraste para verificar a semelhança entre os tratamentos empregados com vista à formação de grupos congêneres. Também foi calculado o tempo letal mediano ( $TL_{50}$ ) para cada grupo formado.

A determinação da resposta concentração-mortalidade e a obtenção da concentração letal mediana ( $CL_{50}$ ) foram realizadas por meio de análise de Logit, utilizando-se o pacote drc (RITZ, 2013) do *software* R® (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013). Para verificar se havia diferença estatística entre as testemunhas negativas, água e solução aquosa de Tween 80 0,01 mg/mL, empregou-se o teste de Wilcoxon Rank Sum Test (R PACKAGE, 2013), como não foi observada diferença, apenas os valores referentes à testemunha solução aquosa de Tween 80 0,01 mg/mL foram empregados para a construção da curva de concentração-resposta.

Para o ensaio de preferência com chance de escolha, foi empregado o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Os dados referentes aos parâmetros nutricionais e biológicos foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e, em seguida, ao teste de comparações múltiplas empregando o *software* R® (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013) e o pacote Pgirmess (GIRAUDOUX, 2013).

### 3 RESULTADOS

O estudo fitoquímico da fração solúvel em diclorometano, proveniente do extrato metanólico das cascas do caule de *D. lanceolata*, permitiu o isolamento de oito substâncias, sendo inicialmente identificada uma mistura formada pelo 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona (Figura 3; Tabela 1), que posteriormente teve as duas substâncias isoladas (Figura 2). Dentre os sinais que permitiram a identificação do 2,4,5-trimetoxiestireno, destacam-se dois singletos relativos aos hidrogênios aromáticos e três singletos referentes às metoxilas aromáticas. Também foi constatada a presença de átomos de hidrogênios com os sinais de mesmo padrão de desdobramento, duplo duplete e constantes de acoplamentos característicos de grupos vinílicos. No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , destacam-se sinais intensos relativos a três metoxilas aromáticas e seis sinais referentes a carbonos aromáticos. Quanto à *trans*-asarona, foram detectados sinais semelhantes, correspondentes a singletos de átomos de hidrogênio e metoxilas aromáticas. Entretanto, foi detectado um grupo metil, o qual não está presente no 2,4,5-trimetoxiestireno. As substâncias 2,4,5-trimetoxiestireno e *trans*-asarona também foram

submetidas isoladamente a análise de RMN de  $^1\text{H}$ , o que permitiu concluir a identificação e confirmar que se trata da *trans*-asarona (apêndice; Figura 6S) e do 2,4,5-trimetoxi-estireno (apêndice; Figura 7S). Como pode ser observado, os espectros são bastante semelhantes diferindo, entre si, pelo sinal em aproximadamente 1,89 ppm, característica de hidrogênios metílicos (grupo metila) pertencentes à *trans*-asarona e inexistentes para o 2,4,5-trimetoxi-estireno.

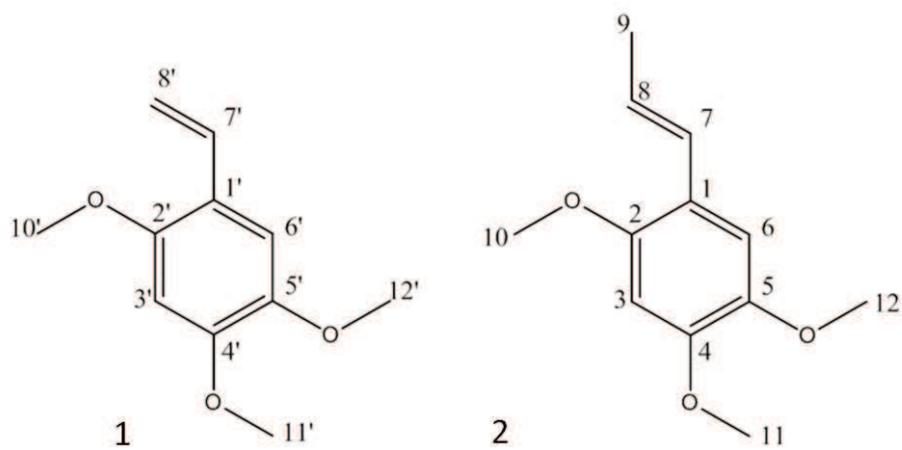


Figura 3 Estruturas moleculares do 2,4,5-trimetoxi-estireno (1) *trans*-asarona (2)

Tabela 1 Deslocamentos químicos (ppm) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das substâncias presentes na amostra De02D-34-10, *trans*-asarona (1) e 2,4,5-trimetoxi-estireno (2) e comparados com a literatura. Utilizou-se o pico de TMS para a calibração dos picos

continua

Posições dos carbonos	De02D-34-10 (CDCl <sub>3</sub> )		<i>Trans</i> -asarona (CDCl <sub>3</sub> ) Zuo et al. (2012)		<i>Trans</i> -asarona (CDCl <sub>3</sub> ) Patra e Mitra (1981)		Posições dos carbonos	2,4,5-trimetoxi-estireno (CDCl <sub>3</sub> ) Waterman (1976)	2,4,5-trimetoxi-estireno (CDCl <sub>3</sub> ) Peterson, Russel e Everson (1991)	2,4,5-trimetoxi-estireno (C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ) <sup>5</sup> Nagashima, Murakami e Asakawa (1999)	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$		$^1\text{H}$	$^1\text{H}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
4		151,4 150,6		150,8		149,9	2'				152,1
		149,6					4'				151,0
2		148,7		148,9		148,0					
1		143,3		143,5		142,6	5'				144,7
5		119,0 118,6		119,2		118,3					119,3
		7,0143 (s, 1H)					1'	7,10 (s, 1H)	7,01 (s, 1H)	7,10 7,01 (s, 1H)	111,6
		6,990 (ddd, J= 0.4, 11.2, 17.7 Hz, 1H)					7'	7,05 (dd, J=10,0, 18 Hz, 1H)	6,99 (dd, J=11,0, 17,8 Hz, 1H)	7,36 (dd, J= 11,3, 17,9 Hz, 1H)	131,8
6		6,944 (s, 1H)	6,95 (s, 1H)	109,9	6,91 (s, 1H)	109,2	6'				111,4

Tabela 1 Deslocamentos químicos (ppm) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das substâncias presentes na amostra De02D-34-10, *trans*-asarona (1) e 2,4,5-trimetoxi-estireno (2) e comparados com a literatura. Utilizou-se o pico de TMS para a calibração dos picos

Posições dos carbonos	De02D-34-10 (CDCl <sub>3</sub> )		<i>Trans</i> -asarona (CDCl <sub>3</sub> ) Zuo et al. (2012)		<i>Trans</i> -asarona (CDCl <sub>3</sub> ) Patra e Mitra (1981)		Posições dos carbonos	2,4,5-trimetoxi-estireno (CDCl <sub>3</sub> ) Waterman (1976)		2,4,5-trimetoxi-estireno (CDCl <sub>3</sub> ) Peterson, Russel e Everson (1991)		2,4,5-trimetoxi-estireno (C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ) <sup>δ</sup> Nagashima, Murakami e Asakawa (1999)	
			$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$		$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$											
7	6,652 (ddq, J=0,3, 1,7, 15,8 Hz, 1H) 6,503 (s, 1H)	125,0 97,8 ou 97,7 *	6,65 (dd, J=1,6 e 16 Hz, 1H)	125,2	6,64 (dq, J=1,5 e 16 Hz, 1H)	124,4	3'	6,58 (s, 1H)		6,50 (s, 1H)		6,24 (s, 1H)	98,9
3	6,495 (s, 1H)	97,9 ou 98,0 *	6,48 (s, 1H)	98,1	6,45 (s, 1H)	97,3		6,58 (s, 1H)					
8	6,098 (dq, J= 6.6, 15.9 Hz, 1H) 5,600 (dd, J=1.4, 17.7 Hz, 1H)	124,3 112,0	6,09 (dq, J=7,2 e 16 Hz, 1H)	124,5	6,02 (dq, J=6,2 e 16 Hz, 1H)	123,4	8'	5,65 (dd, J=2,0, 18,0 Hz, 1H)		5,60 (dd, J=1,4, 17,8 Hz, 1H)		5,68 (dd, J=1,6, 17,9 Hz, 1H)	111,8

Tabela 1 Deslocamentos químicos (ppm) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das substâncias presentes na amostra De02D-34-10, *trans*-asarona (1) e 2,4,5-trimetoxi-estireno (2) e comparados com a literatura. Utilizou-se o pico de TMS para a calibração dos picos

Posições dos carbonos	De02D-34-10 (CDCl <sub>3</sub> )		<i>Trans</i> -asarona (CDCl <sub>3</sub> ) Zuo et al. (2012)		<i>Trans</i> -asarona (CDCl <sub>3</sub> ) Patra e Mitra (1981)		Posições dos carbonos	2,4,5-trimetoxi-estireno (CDCl <sub>3</sub> ) Waterman (1976)	2,4,5-trimetoxi-estireno (CDCl <sub>3</sub> ) Peterson, Russel e Everson (1991)	2,4,5-trimetoxi-estireno (C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ) <sup>δ</sup> Nagashima, Murakami e Asakawa (1999)		conclusão
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$		$^1\text{H}$	$^1\text{H}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	
		5,164 (dd, J=1.4, 11.1 Hz, 1H)	112,0						8'	5,20 (dd, J=2,0, 10,0 Hz, 1H)	5,16 (dd, J=1.4, 11.0 Hz, 1H)	
		56,32 ou 56,28;* (s, 3H)				55,1*	11'		3,90 (s, 3H)	3,45 (s, 3H)	55,8	
11	3,897 (s, 3H)	56,32 ou 56,28;* (s, 3H)	3,84 (s, 3H)	56,2								
12	3,883 (s, 3H)	56,70 ou 56,68;* (s, 3H)	3,88 (s, 3H)	56,8	3,77 (s, 3H)							
10		56,70 ou 56,68;* (s, 3H)	3,90 (s, 3H)	56,6	3,81 (s, 3H)	56,1*						
	3,870 (s, 3H)	56,68;* 56,93 ou 56,92;* (s, 3H)						3,85-3,95 (s, 9H)*	3,83 (s, 3H)	3,39 (s, 3H)	56,0	
	3,856 (s, 3H)	56,93 ou 56,92* (s, 3H)			3,84 (s, 3H)				3,78 (s, 3H)	3,32 (s, 3H)	56,5	
						55,7*						
	3,827 (s, 3H)											
9	3,818 (s, 3H)											
	1,887 (dd, J=1.8, 6.6 Hz, 3H)	19,0	1,89 (dd, J=1,6 e 7,2Hz, 3H)	18,9	1,87 (dd, J=1,5 e 6,2Hz, 3H)	18,7						

No que se refere às substâncias **3** (De02D-63-05), **5** (De02D-98-06) e **8** (De02D-157-06), foi possível verificar que se tratavam de alcaloides aporfínicos, pois foram constatados sinais de metileno dióxido, hidrogênios aromáticos e metoxila. Entretanto até o momento não foi possível a elucidação estrutural completa das mesmas (apêndice). As análises por RMN das substâncias **4** (De02D-67-07), **6** (De02D-144-05) e **7** (De02D-144-08) revelaram que as mesmas estavam muito diluídas e com impurezas, o que impossibilitou a identificação.

A fração solúvel em diclorometano do extrato das cascas do caule *D. lanceolata* apresentou alta atividade inseticida para lagartas de *S. frugiperda*, sendo que a análise de sobrevivência de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta, acrescida de diferentes concentrações da fração solúvel em diclorometano dessa planta, permitiu a formação de cinco grupos congêneres. O grupo 1 englobou as lagartas alimentadas com dieta contendo a fração das cascas do caule de *D. lanceolata* (1818,1 µg/mL), com TL<sub>50</sub> de 23,4 horas. Ao passo que o grupo 2 foi formado pelo tratamento empregando a fração solúvel em diclorometano de *D. lanceolata* na concentração de 909,0 µg/mL, e TL<sub>50</sub> de 34,1 horas. Enquanto a fração das cascas de *D. lanceolata* na concentração de 454,5 µg/mL formou o grupo 3, com TL<sub>50</sub> de 74,1 horas. As lagartas alimentadas com dieta acrescida da fração nas concentrações de 113,6 e 227,2 µg/mL de dieta formaram o grupo 4, que apresentou TL<sub>50</sub> maior do que de 264 horas. As testemunhas água e solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL englobaram o grupo 5 (Figura 4).

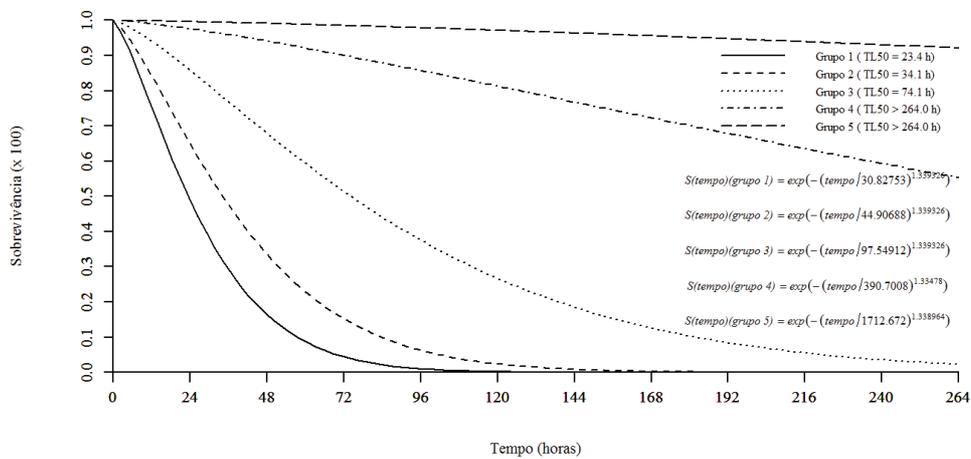


Figura 4 Sobrevivência de lagartas de *Spodoptera frugiperda* ao longo do tempo, alimentadas com dieta artificial contendo diferentes concentrações da fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *Duguetia lanceolata*, sendo  $S(t) = \exp(-(\text{tempo}/\delta)^\alpha)$ ,  $\delta$  = parâmetro de forma;  $\alpha$  = parâmetro de escala. Grupo 1: Fração das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* 1818,1 µg/ml (n=56). Grupo 2: Fração das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* 909,0 µg/ml (n=54). Grupo 3: Fração das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* 454,5 µg/ml (n=50). Grupo 4: Fração das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* 113,6 µg/ml (n=57) e 227,2 µg/ml (57). Grupo 5: Água (n=60), solução aquosa de Tween 80 a 1% (n=58).

Destaca-se ainda que, após 72 horas da alimentação dos insetos com a fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *D. lanceolata*, a  $CL_{50}$  foi de  $294,56 \pm 28,46$ , com limite inferior (LI) de 238,77 e limite superior (LS) de  $350,36 \mu\text{g/mL}$  de dieta ( $\chi^2 = 229,5$ ;  $df = 258$ ;  $p = 0,8987$ ), sendo que a concentração estimada capaz de provocar morte em 90% dos indivíduos foi de  $1099,76 \pm 190,81$  (LI = 725,77; LS = 1473,7)  $\mu\text{g/mL}$  de dieta. Ao passo que a  $CL_{20}$  foi estimada em  $128,29 \pm 19,45 \mu\text{g/mL}$  de dieta (LI = 90,15; LS = 166,44). Não foi verificada diferença entre a mortalidade nas testemunhas negativas, água e solução aquosa de Tween 80 0,01 mg/mL ( $v = 36$ ,  $p = 0,005$ ), assim apenas os valores referentes à testemunha Tween foram empregados para o cálculo da  $CL_{50}$ .

Dentre as substâncias isoladas das cascas do caule de *D. lanceolata* foi possível a realização do ensaio biológico apenas com as substâncias majoritárias denominadas mistura do 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona; substância pura **3** (De02D-63-05) e substância pura **5** (De02D-98-06). Sendo que a análise de sobrevivência permitiu a formação de dois grupos congêneres, o grupo 1 englobou a fração das cascas do caule de *D. lanceolata* e mistura do 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona, as quais apresentaram  $TL_{50}$  de 51,0 horas, destaca-se que após 99 horas de exposição aos tratamentos 100% das lagartas estavam mortas. Ao passo que o grupo 2 foi formado pelas testemunhas água e solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL e as substâncias puras **3** (De02D-63-05) e **5** (De02D-98-06), com sobrevivência acumulada no término do período de avaliação do experimento de 93,2% (Figura 5). Assim foi constatado que a mistura de 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-

asarona é a responsável pela atividade inseticida da fração das cascas do caule de *D. lanceolata*.

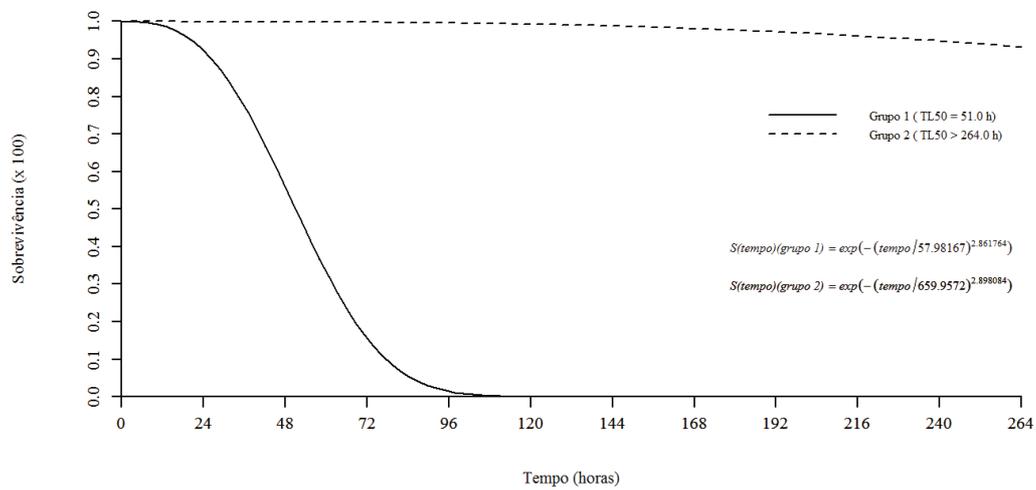


Figura 5 Sobrevivência de lagartas de *Spodoptera frugiperda* ao longo do tempo, alimentadas com dieta artificial contendo substâncias isoladas das cascas do caule de *Duguetia lanceolata*, sendo  $S(t) = \exp(-(\text{tempo}/\delta)^\alpha)$ ,  $\delta$  = parâmetro de forma;  $\alpha$  = parâmetro de escala. Grupo 1: Fração das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* (n=57), 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona (De02D-34-10) (n=60). Grupo 2: Água (n=60), solução aquosa de Tween 80 a 1% (n=60), substância pura 3 (De02D-63-05) (n=56) e substância pura 5.

O bioensaio de concentração-mortalidade com lagartas de *S. frugiperda* empregando a mistura composta pelo 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona, permitiu determinar o valor de  $CL_{50}$  em  $123,72 \pm 7,80$  (LI = 108,41; LS = 139,03)  $\mu\text{g/mL}$  de dieta ( $\chi^2 = 283,48$ ;  $df = 292$ ;  $p = 0,6287$ ). Também foi estimado o valor da  $CL_{20}$  e  $CL_{90}$ , respectivamente,  $78,07 \pm 6,47$  (LI = 65,38; LS = 90,77) e  $256,65 \pm 26,21$  (LI = 205,26; LS = 308,04). Não foi verificada diferença entre a mortalidade nas testemunhas negativas, água e solução aquosa de Tween 80 0,01 mg/mL ( $v = 28$ ,  $p = 0,010$ ), assim apenas os valores referentes à testemunha Tween foram empregados para o cálculo da  $CL_{50}$ . Quanto ao  $TL_{50}$ , foi possível a formação de cinco grupos congêneres, o grupo 1 agrupou o 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona (727,2  $\mu\text{g/mL}$  de dieta), com  $TL_{50}$  de 38,5 horas. Ao passo que o grupo 2, com  $TL_{50}$  de 52,3 horas foi formado pelo tratamento 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona, na concentração de 363,6  $\mu\text{g/mL}$  de dieta. A concentração de 181,8  $\mu\text{g/mL}$  do 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona, formou o grupo 3, com  $TL_{50}$  de 62,0 horas. Ao passo que a concentração de 90,9  $\mu\text{g/mL}$  da mistura do 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona causou  $TL_{50}$  de 138,0 horas nas lagartas de *S. frugiperda*. O grupo cinco englobou as testemunhas, água e solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL e, a mistura do 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona (45,4  $\mu\text{g/mL}$ ) com sobrevivência acumulada de 87,0% (Figura 6).

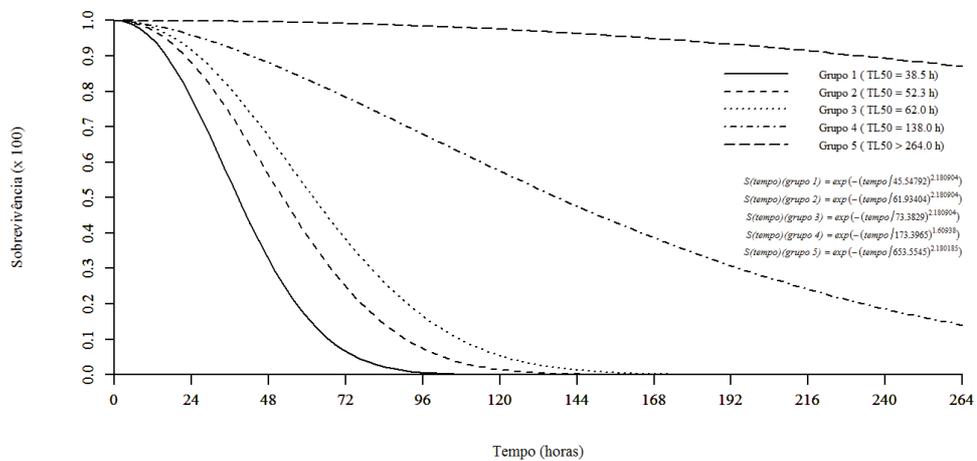


Figura 6 Sobrevivência de lagartas de *Spodoptera frugiperda* ao longo do tempo, alimentadas com dieta artificial contendo diferentes concentrações da mistura de 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona, sendo  $S(t) = \exp(-(\text{tempo}/\delta)^\alpha)$ ,  $\delta$  = parâmetro de forma;  $\alpha$  = parâmetro de escala. Grupo 1: 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona – 727,2  $\mu\text{g/ml}$  (n=59). Grupo 2: 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona – 363,6  $\mu\text{g/ml}$  (n=57). Grupo 3: 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona – 181,8  $\mu\text{g/ml}$  (n=59). Grupo 4: 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona – 90,9  $\mu\text{g/ml}$  (n=60). Grupo 5: Água (n=59); solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL (n=59); 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona – 45,4  $\mu\text{g/ml}$  (n=60).

Com vistas a investigar a ação antialimentar da fração solúvel em diclorometano de *D. lanceolata* e da mistura de 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona para lagartas de *S. frugiperda*, foram conduzidos ensaios de preferência alimentar com e sem chance de escolha. Em ensaio de preferência alimentar com chance de escolha, foi constatado forte efeito antialimentar desses tratamentos (Figura 7). O consumo alimentar das lagartas na dieta acrescida de solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL foi significativamente maior ( $88,4 \pm 5,46$  mg) do que o consumo no tratamento contendo a fração das cascas do caule de *D. lanceolata* ( $12,5 \pm 5,31$  mg) ( $\chi^2 = 35,4992$ ;  $df = 1$ ;  $p = 2,555e^{-09}$ ). De forma análoga, o consumo alimentar da dieta com a mistura de 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona foi significativamente inferior ( $16,7 \pm 10,98$  mg) do que o constatado na dieta acrescida de solução aquosa de Tween 80 a 0,01g/mL ( $82,8 \pm 7,17$  mg) ( $\chi^2 = 36,8660$ ;  $df = 1$ ;  $p = 1,61e^{-09}$ ).

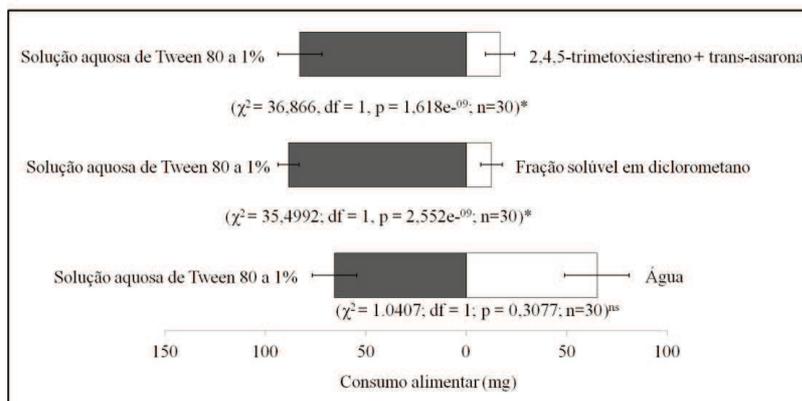


Figura 7 Ensaio de preferência alimentar com chance de escolha para lagartas de *Spodoptera frugiperda*

Em ensaio de preferência alimentar sem chance de escolha, foi observado forte efeito inibidor do crescimento e do consumo alimentar das lagartas de *S. frugiperda*, quando alimentadas com dieta acrescida da fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *D. lanceolata* e mistura do 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona. O consumo das lagartas alimentadas com dieta contendo a fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *D. lanceolata* ( $40,7 \pm 6,41$  mg) e mistura do 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona ( $48,7 \pm 8,70$  mg) foi aproximadamente 9 vezes menor do que o constatado para as testemunhas constituídas por dieta acrescida de água ( $417,5 \pm 25,36$  mg) e de solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL ( $378,3 \pm 24,17$  mg) ( $\chi^2 = 108,3799$ ;  $df = 3$ ,  $p = 2,2e^{-16}$ ). De forma análoga, foi constatada significativa redução no índice de consumo, que se refere à estimativa do consumo diário dos insetos, para lagartas alimentadas com dieta contendo a fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *D. lanceolata* ( $2,9 \pm 0,45$  mg/dia) e mistura do 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona ( $3,4 \pm 0,62$  mg/dia), quando comparado ao índice de consumo das lagartas alimentadas com dieta contendo as testemunhas, água ( $29,8 \pm 1,81$  mg/dia) e solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL ( $27,0 \pm 1,72$  mg/dia) ( $\chi^2 = 108,3799$ ;  $df = 3$ ;  $p = 2,2e^{-16}$ ). A redução no peso das lagartas, para as quais foram ofertadas dieta acrescida da fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *D. lanceolata* ( $11,9 \pm 1,84$ ) e mistura do 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona ( $13,6 \pm 2,07$ ), foi de aproximadamente oito vezes, quando comparadas com as testemunhas água ( $84,5 \pm 5,37$ ) e solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL ( $81,4 \pm 5,17$ ) ( $\chi^2 = 102,4888$ ;  $df = 3$ ;  $p = 2,2e^{-16}$ ) (Figura 8, Figura 9).

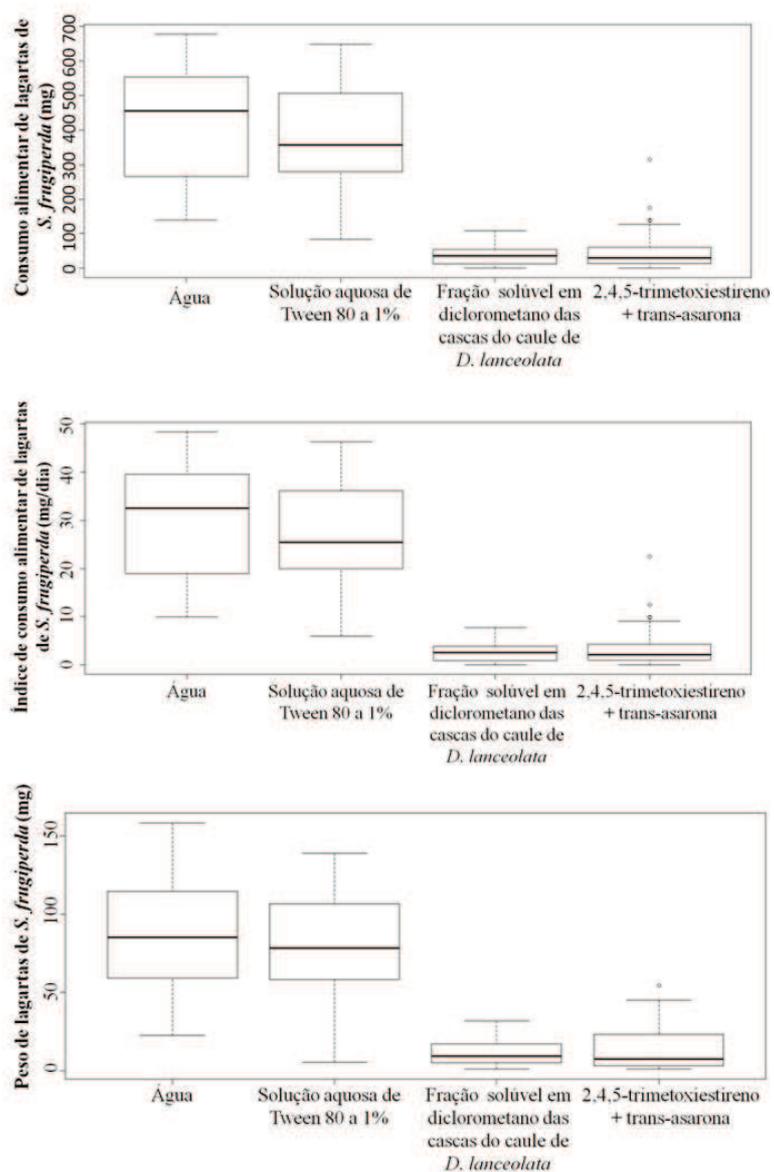


Figura 8 Ensaio de preferência alimentar sem chance de escolha para lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas dieta acrescida de água (n=38), solução aquosa de Tween 80 a 1% (n=43), fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *D. lanceolata* (n=36), e 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans-asarona* (45).

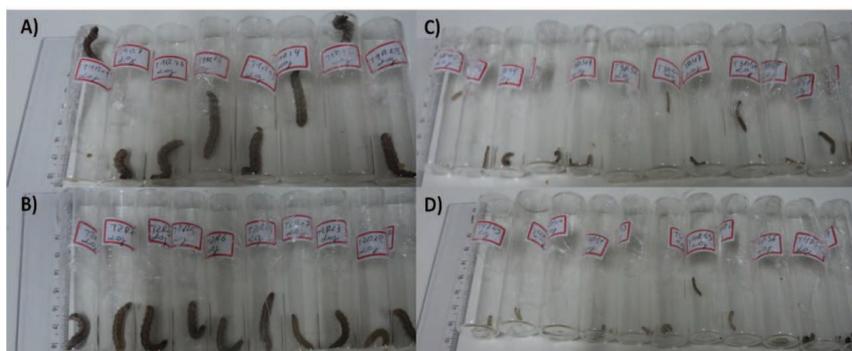


Figura 9 Lagartas alimentadas com dieta acrescida de: água (a), solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL, fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *D. lanceolata* e mistura do 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona

Também foi estudado o efeito de concentrações subletais da fração das cascas do caule de *D. lanceolata* e da mistura do 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona sobre variáveis biológicas de *S. frugiperda*. A análise de sobrevivência resultou na formação de quatro grupos, o grupo 1 foi formado pela fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *D. lanceolata* (295,4 µg/mL de dieta) e 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona (122,7 µg/mL de dieta), com TL<sub>50</sub> de 69,4 horas. Ao passo que o grupo 2 englobou a mistura do 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona, na concentração de 77,2 µg/mL de dieta, com TL<sub>50</sub> de 143,5 horas. O grupo 3, com sobrevivência acumulada de 51,1%, foi constituído pela fração das cascas do caule de *D. lanceolata* (113,6 e 131,8 µg/mL de dieta) e 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona (45,4 µg/mL de dieta). Os tratamentos constituídos pelas testemunhas dieta acrescida de água e de solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL formaram o grupo 4, com sobrevivência acumulada de 77,8% (Figura 10).

A fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *D. lanceolata* (113,6 e 131,8 µg/mL de dieta) e a mistura do 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona (45,4 µg/mL de dieta) provocaram redução no peso das pupas de *S. frugiperda* e aumento na duração da fase larval. Ademais, a fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *D. lanceolata* (131,8 µg/mL de dieta) e a mistura do 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona (45,4 µg/mL de dieta) provocaram aumento na mortalidade dos insetos durante a fase pupal. As variáveis reprodutivas, períodos de pré e oviposição, número de ovos por fêmeas e longevidade dos adultos, os quais as lagartas foram alimentadas com a fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *D. lanceolata*

(113,6  $\mu\text{g/mL}$ ) durante a fase larval, não apresentaram alterações quando comparados com as testemunhas, água e solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL (Tabela 2).

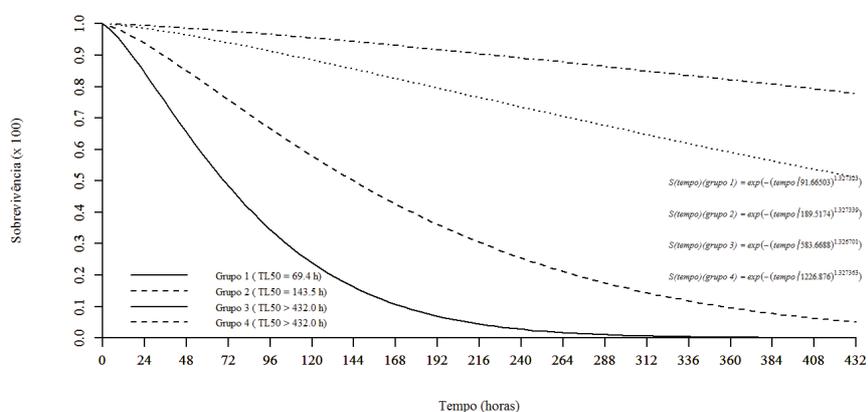


Figura 10 Sobrevivência de lagartas de *Spodoptera frugiperda* ao longo do tempo, alimentadas com dieta artificial contendo diferentes concentrações da fração das cascas do caule de *D. lanceolata* e da mistura de 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona, sendo  $S(t) = \exp(-(\text{tempo}/\delta)^{\alpha})$ ,  $\delta$  = parâmetro de forma;  $\alpha$  = parâmetro de escala. Grupo 1: Fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* (295,4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de dieta) (n=111); 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona (122,7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de dieta) (n=115). Grupo 2: 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona (77,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de dieta) (n=117). Grupo 3: Fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* (113,6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de dieta) (n=112); Fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* (131,8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de dieta) (n=114); 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona (45,4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de dieta) (n=113). Grupo 4: Água (n=200); solução aquosa de Tween 80 a 1% (n=210)

Tabela 2 Variáveis biológicas de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta contendo a fração solúvel em diclorometano das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* e 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona

Tratamentos	Peso de Pupas (g)	Duração da fase larval (dias)	Sobrevivência na fase pupal (%)	Período de pré-oviposição (dias) <sup>ns</sup>	Período de oviposição (dias) <sup>ns</sup>	Número de ovos/fêmeas <sup>ns</sup>	Longevidade dos adultos (dias) <sup>ns</sup>
Água	299,7 ± 2,58 a (150)	20,1 ± 0,13 d (150)	88,0 a (150)	2,5 ± 0,35 (13)	9,3 ± 0,39 (13)	1355,5 ± 90,74 (13)	14,9 ± 0,86 (26)
Tween 80 a 1%	298,8 ± 2,50 a (156)	20,2 ± 0,14 d (156)	83,3 a (156)	2,3 ± 0,19 (12)	9,6 ± 0,78 (12)	1237,9 ± 86,13 (12)	13,4 ± 0,52 (24)
Fração solúvel em diclorometano (113,6 µg/ml de dieta)	304,93 ± 3,14 ab (60)	24,2 ± 0,23 c (60)	90,0 a (60)	2,4 ± 0,14 (13)	8,2 ± 0,53 (13)	1523,5 ± 140,44 (13)	13,5 ± 0,99 (26)
Fração solúvel em diclorometano (131,8 µg/ml de dieta)	247,6 ± 6,82 b (45)	28,6 ± 0,62 a (45)	48,9 bc (45)	-	-	-	-
2,4,5-trimetoxiestireno + <i>trans</i> -asarona (45,4 µg/ml de dieta)	249,5 ± 5,82 b (49)	25,8 ± 0,43 b (49)	67,3 b (49)	-	-	-	-
p	2,2e <sup>-16</sup>	2,2e <sup>-16</sup>	6,97e <sup>-09</sup>	0,8149	0,3327	0,1059	0,2360
χ <sup>2</sup>	108,0183	283,2682	43,8267	0,4093	2,2012	4,4907	2,8881
df	4	4	4	2	2	2	3

Em ensaio empregando a mistura do 2,4,5-trimetoxiestireno e *trans*-asarona e as substâncias isoladas, foi constatado que ambas as moléculas possuem atividade inseticida para lagartas de *S. frugiperda*, entretanto o 2,4,5-trimetoxiestireno apresenta maior atividade do que a *trans*-asarona. A análise de sobrevivência resultou na formação de quatro grupos congêneres, sendo o grupo 1 formado pelo 2,4,5-trimetoxiestireno, com TL<sub>50</sub> de 73,4 horas. Ao passo que o grupo 2 englobou a mistura de 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona, com TL<sub>50</sub> de 108,6 horas. A *trans*-asarona formou o grupo 3, que apresentou TL<sub>50</sub> de 170 horas, enquanto o grupo 4 foi formado pelas testemunhas água e solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL, com sobrevivência acumulada de 96,6% (Figura 11).

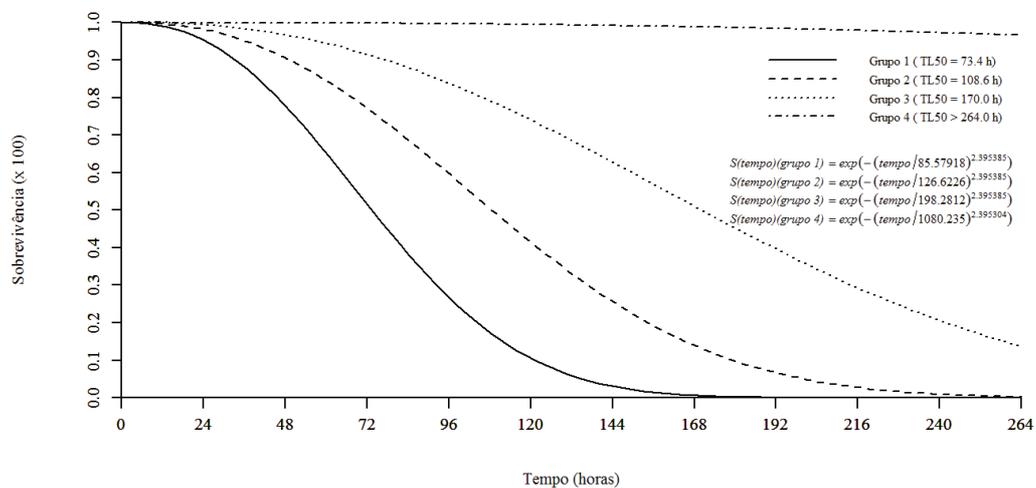


Figura 11 Sobrevivência de lagartas de *Spodoptera frugiperda* ao longo do tempo, alimentadas com dieta artificial contendo substâncias isoladas das cascas do caule de *Duguetia lanceolata*, sendo  $S(t) = \exp(-(\text{tempo}/\delta)^\alpha)$ ,  $\delta$  = parâmetro de forma;  $\alpha$  = parâmetro de escala. Grupo 1: 2,4,5-trimetoxiestireno (n=59). Grupo 2: 2,4,5-trimetoxiestireno + *trans*-asarona (n=60). Grupo 3: *trans*-asarona (n=59) (122,7 µg/ml de dieta). Grupo 4: água (n=60), solução aquosa de Tween 80 a 1% (n=60)

#### 4 DISCUSSÃO

O estudo fitoquímico da fração das cascas do caule de *D. lanceolata* possibilitou o isolamento de três alcaloides aporfínicos, os quais até o momento não tiveram suas estruturas elucidadas, entretanto, substâncias pertencentes a essa classe são bastante comuns na família Annonaceae (CAROLLO et al., 2006a; PÉREZ; CASSELS, 2010).

Este é o primeiro relato do isolamento do 2,4,5-trimetoxiestireno em *D. lanceolata*, entretanto essa substância foi identificada em outras espécies de plantas pertencentes à família Annonaceae, tais como, *Pachypodanthium staudtii* Engl. & Diels (WATERMAN, 1976; NGADJUI et al., 1989, YAPI et al., 2012), *Duguetia panamensis* Standl. (WANG et al., 1988) e *Duguetia furfuracea* (A.St.-Hil.) (SILVA et al., 2007). Em se tratando da *trans*-asarona, foi constatada a presença dessa substância no óleo essencial dos galhos de *D. lanceolata* (SOUSA et al., 2012). Ademais, a *trans*-asarona também foi relatada em outras espécies do gênero, tais como, *D. furfuracea* (SILVA et al., 2007; VIDOTTO et al., 2013).

No presente trabalho, foi constatada alta atividade inseticida da fração das cascas do caule de *D. lanceolata* para lagartas de *S. frugiperda*, sendo esse o primeiro relato do potencial dos metabólitos produzidos por *D. lanceolata* para o controle de insetos. No entanto, a atividade tóxica de outras plantas pertencentes à família Annonaceae para insetos fitófagos é conhecida, sendo que nos últimos anos intensificaram-se os estudos com vistas a estudar o potencial de plantas dessa família botânica para o controle de insetos (ISMAN, 2006; ACIOLE et al., 2011; TRINDADE et

al., 2011; NWANKWO et al., 2012). Dentre os metabólitos produzidos por anonáceas com potencial para o emprego como pesticida, é possível mencionar alcaloides, acetogeninas e sesquiterpenos (GONZÁLEZ-COLOMA et al., 2002; ACIOLE et al., 2011; RIBEIRO et al., 2013).

No que se refere aos efeitos causados nos insetos pelos metabólitos de anonáceas com potencial uso inseticida, é possível mencionar alterações morfológicas no intestino, as quais incluem destruição das células intestinais (COSTA et al., 2012); efeito antialimentar (SEDLACEK et al., 2010); interrupção no processo de ecdise, alterações morfológicas e redução na fecundidade e fertilidade dos insetos (CHOUBEY; BHANDARI; KULKARNI, 2012; CARNEIRO; PEREIRA; GALBIATI, 2013); efeito larvicida e alterações nas variáveis nutricionais (TOLOSA et al., 2012). No presente trabalho, foi verificado forte efeito larvicida, antialimentar e redução no peso dos insetos, os quais foram atribuídos aos fenilpropanoides, 2,4,5-trimetoxiestireno e *trans*-asarona.

Os fenilpropanoides são uma das classes mais diversas de metabólitos de plantas, os quais são derivados do aminoácido fenilamina e estão envolvidos na defesa das plantas contra a herbivoria. Os resultados encontrados no presente trabalho sugerem que a atividade inseticida dessas moléculas para *S. frugiperda* seja devida a um forte efeito antialimentar.

Nesse sentido, foi constatado que a *trans*-asarona isolada das sementes de *Daucus carota* L. (Apiaceae), quando incorporada em dieta artificial, provocou forte redução no peso das lagartas de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae), *Heliothis virescens* (Fabricius)

(Lepidoptera: Noctuidae) e *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae) (MOMIN; NAIR, 2002). Também é possível mencionar a atividade inseticida de fenilpropanoides naturais e derivados semissintéticos para *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae), os quais incluem a *cis*-asarona, o que corrobora com os resultados encontrados no presente trabalho (BHARDWAJ et al., 2010). No que se refere à atividade inseticida do 2,4,5-trimetoxiestireno para lagartas de *S. frugiperda*, no presente trabalho está relatado pela primeira vez, contudo a essa molécula já foi atribuída atividade inseticida para *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae) (KOONA; BOUDA, 2006).

No que diz respeito ao mecanismo de ação, foi constatada a atividade da *trans* e *cis*-asarona para as pragas de grãos armazenados, *Sitophilus granarius* L. (Coleoptera: Curculionidae), *Tribolium confusum* (Jacqueline duVal) (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae), sendo que os autores atribuíram a atividade inseticida ao fato das asaronas serem alquilbenzenos substituídos, assim elas podem apresentar alta reatividade em relação a fatores nucleofílicos que ocorrem nas proteínas e células. Dessa maneira, em ambas as moléculas existe uma porção benzila altamente reativa que pode interagir com os grupos tiol SH, das glândulas endócrinas e também intestinais, formando combinações estáveis, tal como acontece com os precocenos e, dessa maneira exercer sua atividade de dissuasão contra os insetos (POPŁEWSKI et al., 2000).

Vale ressaltar que em estudos realizados com *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae), nos quais foram empregados diversos isômeros derivados da *trans*-asarona, foi sugerido

que o efeito fagodeterrente encontra-se relacionado com a presença dos três grupos metoxi, além disso, a presença de uma ligação insaturada na cadeia lateral alquila também se mostrou importante para determinação da atividade biológica (ŁOZOWICKA; KACZYŃSKI; NAWROT, 2013). De forma análoga, em estudo com diversos isômeros derivados da *trans*-asarona para os insetos *S. granarius*, *T. granarium* e *T. confusum*, foi também constatada relação entre presença dos três grupos metoxi e da ligação insaturada na cadeia lateral alquila, com a atividade biológica. Sendo que os autores sugerem que existe a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio externas e internas entre os três grupos metoxi. Assim, os átomos de oxigênio do grupo metoxi, podem desempenhar um papel importante na formação de ligações com os aminoácidos das proteínas nas células, tais como, asparagina e serina, exercendo assim a atividade de dissuasão (ŁOZOWICKA; KACZYŃSKI, 2013).

No entanto, deve-se considerar que os fenilpropanoides podem atuar de forma diferente de acordo com o grupo de inseto, sendo que no caso específico de lepidópteros o mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado (BHARDWAJ et al., 2010), mas trabalhos com coleópteros têm sugerido efeitos fisiológicos no sistema enzimático e digestivo (HUANG; HO; KINI, 1999), tais como os exemplificados anteriormente.

O fato de no presente trabalho, as substâncias terem se apresentado mais tóxicas para as lagartas de *S. frugiperda*, quando empregadas em concentrações mais elevadas, do que quando submetidas à exposição prolongada em baixa concentração pode ser explicada devido à presença da ligação C=C, o qual pode tornar essas moléculas

vulneráveis à oxidação ao longo do tempo (LANDER; SCHREIER, 1991).

Apesar das duas substâncias terem se apresentado ativas para *S. frugiperda*, tanto de forma combinada quanto isolada, o 2,4,5-trimetoxiestireno apresentou-se mais ativo do que a *trans*-asarona, isso pode ser atribuído ao fato do 2,4,5-trimetoxiestireno apresentar uma metila a menos do que a *trans*-asarona, o que pode contribuir para aumentar a reatividade desse composto com os elementos intracelulares.

Ademais, a *trans*-asarona não apresenta potencial para ser empregada de forma natural como pesticida, haja vista que já foi relatada ação mutagênica (GOGGELMANN; SCHIMMER, 1983); genotóxica (HASHEMINEJAD; CALDWELL, 1994); carcinogênica (GROSS et al., 1967); teratogênica (SALAZAR et al., 1992); indução na troca de cromátides irmãs em linfócitos humanos *in vitro* e em células da medula óssea de ratos *in vivo* (MORALES-RAMÍREZ et al., 1992) da asarona e de alguns de seus isômeros naturais. Entretanto, essa molécula pode servir de modelo para síntese de novos produtos, haja vista, que estudos realizados com análogos sintéticos da *trans*-asarona, mostraram que algumas dessas moléculas não apresentaram atividade mutagênica e genotóxica (KARWICKA et al., 2008). No que se refere ao 2,4,5-trimetoxiestireno, trata-se de uma substância ainda pouco estudada, necessitando assim de mais trabalhos com vistas a avaliar a toxicidade para organismos não alvo e conseqüentemente o potencial para o emprego na agricultura.

Os resultados encontrados no presente trabalho mostraram que os metabólitos das cascas do caule de *D. lanceolata* ativos para *S. frugiperda*

são a *trans*-asarona e o 2,4,5-trimetoxiestireno, sendo possível inferir que o mecanismo de ação dessas substâncias provavelmente se dê por meio da dissuasão da alimentação. Apesar dos altos valores de mortalidade provocados pela ingestão dessas moléculas, são necessários mais estudos com objetivo de avaliar o efeito a organismos não alvo, ou ainda, empregá-las como moléculas modelo para a síntese de novos produtos.

## **CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES**

**Dejane S. Alves: Coleta, preparo do extrato, fracionamento e purificação das substâncias, ensaios biológicos, análises estatísticas, confecção do manuscrito;**

**Viviane A. Campos: Análises por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e identificação das substâncias;**

**Alan R. T. Machado: Análise por RMN de  $^1\text{H}$ ;**

**Denilson F. Oliveira: Coorientador;**

**Geraldo A. Carvalho: Orientador.**

**Purification of metabolites from active *Duguetia lanceolata* stem barks for *Spodoptera frugiperda***

**ABSTRACT**

*Duguetia lanceolata* St. Hil. is an Annonaceae native from Brazil, and of which the phytochemical studies and the evaluation of potential use of its metabolites are scarce. In previous works was reported high insecticidal activity of the fraction soluble in dichloromethane, derived from this plant's stem bark methanol extract, to *Spodoptera frugiperda* worms (JE Smith). Thus, this study aimed at performing the phytochemical study of the *D. lanceola* stem bark fraction soluble in dichloromethane, derived from the methanol extract, with a view on isolating the bioactive molecule (s) for *S. frugiperda*. In order to do this, the fraction soluble in dichloromethane was subjected to silica gel column chromatography of the flash type, as well as to high performance liquid chromatography (HPLC), which allowed the isolation of eight substances. The structural elucidation of two molecules was possible through uni and bidimensional  $^1\text{H}$  (hydrogen) and  $^{13}\text{C}$  (carbon thirteen) nuclear magnetic resonance experiments. Bioassays with *S. frugiperda* revealed that the molecules responsible for biological activity are trans-asarone and 2,4,5-trimethoxystyrene. A mixture of trans-asarone + 2,4,5-trimethoxystyrene, when incorporated to artificial diet and offered to *S. frugiperda* larvae, caused high mortality indexes during the larval stage, reduction in pupal weight, elongation of the larval stage; mortality in the pupal stage and antifeedant effect in tests conducted with and without choice. The trans-asarone and 2,4,5-trimethoxystyrene substances, when offered in isolation to *S. frugiperda* larvae, also caused high mortality rate. However, 2,4,5-trimethoxystyrene was more active than trans-asarone.

Keywords: Armyworm. Natural products. Botanical insecticide. Phenylpropanoids.

## REFERÊNCIAS

ACIOLE, S. D. G. et al. Insecticidal activity of three species of *Guatteria* (Annonaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, Bogotá, v. 37, n. 2, p. 262-268, jul./dic. 2011.

ALMEIDA, J. R. G. da S. et al. Alkaloids and a new cinnamate derivative from *Duguetia gardneriana*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 35, n. 7, p. 456-458, Jan. 2007.

ALMEIDA, J. R. G. D. da S. et al. Composition and antimicrobial activity of the leaf essential oils of *Duguetia gardneriana* Mart, and *Duguetia moricandiana* Mart. (Annonaceae). **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 22, n. 3, p. 275-278, 2010.

ÁLVAREZ-COLOM, O. et al. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Pest Science**, New York, v. 80, n. 1, p. 63-67, Feb. 2007.

ÁLVAREZ-COLOM, O. et al. Toxic effects of annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. **Journal of Pest Science**, New York, v. 81, n. 2, p. 85-89, June 2008.

ÁLVAREZ-COLOM, O. et al. Tucupentol, a novel mono-tetrahydrofuranic acetogenin from *Annona montana*, as a potent inhibitor of mitochondrial complex I. **Chemistry and Biodiversity**, v. 6, n. 3, p. 335-340, Mar. 2009.

BHARDWAJ, A. et al. Larvicidal and structure-activity studies of natural phenylpropanoids and their semisynthetic derivatives against the tobacco armyworm *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Chemistry and Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 168-177, Jan. 2010.

BURGUEÑO-TAPIA, E. et al. Antifeedant and phytotoxic activity of the sesquiterpene p-benzoquinone perezone and some of its derivatives. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 34, n. 6, p. 766-771, June 2008.

CARNEIRO, A. P.; PEREIRA, M. J.; GALBIATI, C. Biocide activity of *Annona coriacea* seeds extract on *Rhodnius neglectus* (Hemiptera: Reduviidae). **Revista de Biología Tropical**, San José, v. 61, n. 1, p. 419-427, mar. 2013.

CAROLLO, C. A. et al. N-Nitrosoanonaine and N-nitrosoxylopine, aporphine alkaloids from *Duguetia furfuracea*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 69, n. 8, p. 1222-1224, Aug. 2006a.

CAROLLO, C. A. et al. Alkaloids and a flavonoid from aerial parts (leaves and twigs) of *Duguetia furfuracea* – Annonaceae. **Journal of the Chilean Chemical Society**, Concepción, v. 51, n. 2, p. 837-841, jun. 2006b.

CAROLLO, C. A.; SIQUEIRA, J. M. de. Isolation of a minor nitro-alkaloid from the aerial parts of *Duguetia furfuracea* – Annonaceae. **Natural Product Research**, Abingdon, v. 23, n. 7, p. 633-637, 2009.

CESPEDES, C. L. et al. The insecticidal, molting disruption and insect growth inhibitory activity of extracts from *Condalia microphylla* Cav. (Rhamnaceae). **Industrial Crops and Products**, New York, v. 42, n. 1, p. 78-86, Mar. 2013.

CHOUBEY, V.; BHANDARI, R.; KULKARNI, N. Effect of botanicals on the seed weevil, *Sitophilus rugicollis* Casey. **Journal of Entomological Research**, New Delhi, v. 36, n. 3, p. 259-262, Sept. 2012.

COSTA, M. S. et al. Morphological changes in the midgut of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae following exposure to an *Annona coriacea* (Magnoliales: Annonaceae) extract. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 41, n. 4, p. 311-314, Aug. 2012.

FISCHER, D. C. H. et al. In vitro screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. **Acta Tropica**, Basel, v. 92, n. 3, p. 261-266, nov./dic. 2004.

GIRAUDOUX, P. **Package 'pgirmess'**: data analysis in ecology. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/web/packages/pgirmess/pgirmess.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

GOGGELMANN, W.; SCHIMMER, O. Mutagenicity testing of  $\beta$ -asarone and commercial calamus drugs with *Salmonella typhimurium*. **Mutation Research**, v. 121, n. 3-4, p. 191-194, Sept. 1983.

GOMES-PEREIRA, N. F. et al. Novel santalane sesquiterpenoids from the stem bark of *Duguetia glabriuscula* – Annonaceae. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 512-516, 2003.

GONZÁLEZ-COLOMA, A. et al. Selective action of acetogenin mitochondrial complex I inhibitors. **Zeitschrift fur Naturforschung: section C journal of biosciences**, Tubigen, v. 57c, n. 11-12, p. 1028-1034, Nov./Dec. 2002.

GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. et al. In vitro larvicidal evaluation of *Annona muricata* L., *A. diversifolia* Saff. and *A. lutescens* Saff. extracts against *Anastrepha ludens* larvae (Diptera, Tephritidae). **Interciencia**, v. 37, n. 4, p. 284-289, May 2012.

GROSS, M. A. et al. Carcinogenicity of oil of calamus. **Proceedings of the American Association for Cancer Research**, Chicago, v. 8, n. 24, 1967.

HASHEMINEJAD, G.; CALDWELL, J. Genotoxicity of the alkenylbenzenes  $\alpha$ - and  $\beta$ -asarone, myristicin and elemicin as determined by the UDS assay in cultured rat hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 32, n. 3, p. 223-231, Mar. 1994.

HOE, P. K. et al. Biological activity of *Annona muricata* seed extracts. **Malaysian Journal of Science**, Kuala Lumpur, v. 29, n. 2, p. 153-159, 2010.

HUANG, Y; HO, S. H.; KINI, R. M. Bioactivities of safrole and isosafrole on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera : Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera : Tenebrionidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, n. 3, p. 676-683, June 1999.

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

JUNIKKA, L.; KOEK-NOORMAN, J. Anatomical structure of barks in Neotropical genera of Annonaceae. **Annales Botanici Fennici**, Helsinki, v. 44, p. 79-132, 2007. Supplement.

KARWICKA, E. et al. Genotoxicity of  $\alpha$ -asarone analogues. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 11, p. 6069-6074, June 2008.

KOONA, P.; BOUDA, H. Biological Activity of *Pachypodanthium staudtii* (Annonaceae) Against the Bean Beetle *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Applied Sciences Research**, v. 2, n. 12, p. 1129-1131, 2006.

KOUNINKI, H. et al. Toxicity of some terpenoids of essential oils of *Xylopi aethiopica* from Cameroon against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 131, n. 4, p. 269-274, May 2007.

LANDER, V.; SCHREIER, P. Light-induced transformation of asarone. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 6, n. 1, p. 21-28, Mar. 1991.

LIU, X.-X.; PILARINOU, E.; MCLAUGHLIN, J. L. Pondaplin: a novel cyclic prenylated phenylpropanoid from *Annona glabra*. **Tetrahedron Letters**, Elmsford, v. 40, n. 3, p. 399-402, 1999.

ŁOZOWICKA, B.; KACZYŃSKI, P.; NAWROT, J. Study of lipophilicity of alpha-asarone derivatives and their deterrent activity against the Colorado potato beetle. **Central European Journal of Chemistry**, v. 11, n. 12, p. 2120-2133, Dec. 2013.

ŁOZOWICKA, B.; KACZYŃSKI, P. Synthesis and antifeedant activity of novel alpha-asarone derivatives against stored-product pests. **Pest Management Science**, Sussex, v. 69, n. 8, p. 964-974, Aug. 2013.

MADHUMITHA, G. et al. Acaricidal, insecticidal, and larvicidal efficacy of fruit peel aqueous extract of *Annona squamosa* and its compounds against blood-feeding parasites. **Parasitology Research**, Berlin, v. 111, n. 5, p. 2189-2199, Nov. 2012.

MOMIN, R. A.; NAIR, M. G. Pest-managing efficacy of trans-asarone isolated from *Daucus carota* L. seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 16, p. 4475-4478, July 2002.

MORALES-RAMÍREZ, P. et al. Sister-chromatid exchange induction produced by in vivo and in vitro exposure to alpha-asarone. **Mutation Research: genetic toxicology testing**, Amsterdam, v. 279, n. 4, p. 269-273, June 1992.

MUÑOZ, E. et al. Antifeedant, insect growth regulatory and insecticidal effects of *Calceolaria talcana* (Calceolariaceae) on *Drosophila melanogaster* and *Spodoptera frugiperda*. **Industrial Crops and Products**, New York, v. 42, n. 1, p. 137-144, Jan. 2013.

NGADJUI, B. T. et al. Pachypophyllin and pachypostaudins A and B: three bisnorlignans from *Pachypodanthium staudtii*. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 28, n. 1, p. 231-234, 1989.

NAGASHIMA, F.; MURAKAMI, Y.; ASAKAWA, Y. Aromatic compounds from the Ecuadorian liverwort *Marchesinia brachiata*: a revision. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 51, p. 1101-1104, Jan. 1999.

NWANKWO, E. N. et al. Toxicity of novaluron (Mosquiron® 100EC) compared to *Annona muricata* seed oil extract against the larvae of *Aedes aegypti*. **Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences**, v. 14, n. 4, p. 481-488, 2012.

PARK, H.-J. et al. Insecticidal alkaloids on aphids from *Corydalis turtschaninovii* tubers. **Journal of Applied Biological Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 345-352, June 2011.

PATRA, A.; MITRA, A. K. Constituents of *Acorus calamus*: structure of acoramone. Carbon-13 NMR spectra of *cis* and *trans*-asarone. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 44, n. 6, p. 668-669, Nov. 1981.

PÉREZ, E. G.; CASSELS, B. K. Alkaloids from the genus *Duguetia*. **The Alkaloids: chemistry and biology**, v. 68, p. 83-156, 2010.

PETERSON, J. R.; RUSSEL, M. E.; EVERSON, T. P. Synthesis and experimental ionization energies of certain methoxy-substituted styrenes. **Journal of Polymer Science**, New York, v. 29, n. 6, p. 933-936, May 1991.

POPLEWSKI, J. et al. Feeding-deterrent activity of  $\alpha$ -asarone isomers against some stored Coleoptera. **Pest Management Science**, Sussex, v. 56, n. 6, p. 560-564, May 2000.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna, 2014. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 1 jul. 2013.

RIBEIRO, L. D. P. et al. *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): A promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 55, p. 6-14, Oct. 2013.

RITZ, C. **Package ‘drc’**: analysis of dose-response curve data. 2013. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/web/packages/drc/drc.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Florística de plantas medicinais nativas de remanescentes de floresta estacional semidecidual na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Cerne**, Lavras, v. 14, n. 2, p.93-112, abr./jun. 2008.

SALAZAR, M. et al. Teratogenic effect of  $\alpha$ -asarone in mice. **Journal de Toxicologie Clinique et Experimentale**, v. 12, n. 3, p. 149-154, 1992.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 55, n. 6, p. 567-573, Nov. 2000.

SEDLACEK, J. D. et al. Potential of ripe pawpaw fruit extract as an insecticide and feeding deterrent for striped cucumber beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) on squash. **Journal of Entomological Science**, Tifton, v. 45, n. 4, p. 378-384, Oct. 2010.

SHIELDS, V. D. C. et al. The effect of varying alkaloid concentrations on the feeding behavior of gypsy moth larvae, *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae). **Arthropod-Plant Interactions**, v. 2, n. 2, p. 101-107, June 2008.

SILVA, D. B. da et al. Chemical constituents of the underground stem bark of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 18, n. 8, p. 1560-1565, 2007.

SILVA, D. B. et al. da. The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, Jena, v. 16, n. 11, p. 1059-1063, Nov. 2009.

SIQUEIRA, J. M. de. et al. Aromadendrane sesquiterpenoids from the essential oil of leaves of *Duguetia glabriuscula* – Annonaceae. **Journal of the Chilean Chemical Society**, Concepción v. 48, n. 4, p. 89-93, dic. 2003.

SOUSA, O. V. et al. Chemical composition and biological activities of the essential oils from *Duguetia lanceolata* St. Hil barks. **Molecules**, Switzerland, v. 17, n. 9, p. 11056-11066, Sept. 2012.

SOUSA, O. V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Duguetia lanceolata* St.-Hil. (Annonaceae) leaves ethanol extract. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 27, n. 3, p. 398-402, 2008.

TEMPONE, A. G. et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, Jena, v. 12, n. 5, p. 382-390, May 2005.

THERNEAU, T. M. **A Package for Survival: survival analysis**. Version 2.37-7. 2013. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=survival>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

TOLOSA, D. et al. Insecticidal effects of acetogenins from *Rollinia occidentalis* seed extract. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 7, n. 12, p. 1645-1646, Dec. 2012.

TRINDADE, R. C. P. et al. Larvicidal activity and seasonal variation of *Annona muricata* (Annonaceae) extract on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, Bogotá, v. 37, n. 2, p. 223-227, jul./dic. 2011.

VIDOTTO, C. et al. Brine shrimp lethality test as a biological model for preliminary selection of pediculicidal components from natural source. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 1, p. 255-263, 2013.

WANG, Z.-W. et al. 2,4,5-trimethoxystyrene, a bioactive component of the bark of *Duguetia panamensis*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 51, n. 2, p. 382, Mar./Apr. 1988.

WATERMAN, P. G. 2,4,5-Trimethoxystyrene from *Pachypodanthium staudtii*. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 15, n. 2, p. 347, Jan. 1976.

YAPI, T. A. et al. *Pachypodanthium staudtii* engl & diels from côte d'ivoire: Composition of leaf, stem bark and roots oils. **European Journal of Scientific Research**, Victoria, v. 69, n. 1, p. 137-142, Jan. 2012.

ZUO, H. L. et al. Separation of *cis* - and *trans* -Asarone from *Acorus tatarinowii* by preparative gas chromatography. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, New York, v. 2012, p. 1-5, 2, Art. ID 402081, 2012.

**ARTIGO 3** **Atividade acaricida de frações de anonáceas para**  
***Tetranychus tumidus* e *Tetranychus urticae* e análise do perfil**  
**metabólito de *Duguetia lanceolata* por CG-EM**

**Artigo normalizado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003).**

**Atividade acaricida de frações de anonáceas para *Tetranychus tumidus* E *Tetranychus urticae* e análise do perfil metabólito de *Duguetia lanceolata* por CG-EM**

**Dejane Santos Alves<sup>\*1</sup>; Reinaldo Chico Morejón<sup>2</sup>; Alan Rodrigues Teixeira Machado<sup>3</sup>; Oriela Pina<sup>2</sup>; Geraldo Andrade Carvalho<sup>1</sup>; Denilson Ferreira de Oliveira<sup>4</sup>; Maria de los Angeles Martínez Rivero<sup>2</sup>; Vanda Helena Paes Bueno<sup>1</sup>**

**RESUMO**

O objetivo inicial deste trabalho foi avaliar o efeito acaricida de frações solúveis em diclorometano de extratos metanólicos de *Annona cacans*, *Annona coriacea*, *Annona neolaurifolia*, *Annona sylvatica*, *Duguetia lanceolata*, *Guatteria australis*, *Xylopia brasiliensis*, *Xylopia emarginata* e *Xylopia sericerae* sobre *Tetranychus tumidus*. A seguir, buscou-se estudar os efeitos das frações dos extratos das folhas, frutos e cascas do caule de *D. lanceolata* sobre *Tetranychus urticae*. Para isso, as frações foram solubilizadas em mistura de DMSO 0,05 mL/mL e solução aquosa de Tween 80 a 0,01 mL/mL, resultando em soluções na concentração final de 10 mg/mL, as quais foram usadas no bioensaio, empregando-se o método de microimersão, com modificações. Dentre as frações estudadas, aquela proveniente das cascas do caule de *D. lanceolata* foi a que se apresentou mais ativa para *T. tumidus*. Em decorrência, tal fração foi empregada em ensaios com vistas a avaliar seus efeitos sobre a fecundidade e fertilidade desse ácaro, empregando-se também o método de microimersão. Foi constatado que a fração das cascas do caule de *D. lanceolata* reduziu a fecundidade e a viabilidade dos ovos de fêmeas de *T. tumidus*. A fração das cascas do caule de *D. lanceolata* também foi estudada em bioensaio com objetivo de avaliar seu

---

\*<sup>1</sup> Universidade Federal de Lavras, Departamento de Entomologia - Caixa Postal 3037, CEP 37.200-000 Lavras, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria - Apdo Postal 10. Mayabeque, Cuba

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>4</sup> Universidade Federal de Lavras, Departamento de Química - Caixa Postal 3037, CEP 37.200-000 Lavras, MG, Brasil.

efeito sobre ovos de *T. tumidus*. Para isso, pedaços de folhas de *plátano* (*Musa* sp.) contendo ovos desse ácaro foram submetidas à imersão, não sendo constatada atividade ovicida. Ademais, em ensaio empregando o método de microimersão adaptado, a fração das cascas do caule de *D. lanceolata* causou alta taxa de mortalidade em fêmeas de *T. urticae*. Análises do perfil metabólico em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) revelaram que os constituintes majoritários da fração das cascas do caule de *D. lanceolata* são o 2,4,5-trimetoxiestireno e *trans*-asarona.

Palavras-chave: Metabólitos secundários. Acaricida natural. 1,2,4-trimetoxi-5-vinilbenzeno. 1,2,4-trimetoxi-5-[(1E)-1-propen-1-il]benzeno.

## 1 INTRODUÇÃO

A família Tetranychidae compreende o principal grupo de ácaros fitófagos, pois várias das espécies desta família são pragas em muitos sistemas de cultivo (MARCIC, 2012). Dentre as espécies de ácaros fitófagos que causam prejuízos agrícolas, *Tetranychus tumidus* Banks (Acari: Tetranychidae) se destaca como praga chave em viveiros de *plátano* (*Musa* spp.) em Cuba, ao passo que *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) é uma importante praga em diversos cultivos hortícolas no Brasil e em Cuba. O método comumente usado para o controle de ácaros é o emprego de acaricidas sintéticos. Entretanto, o uso indiscriminado desses pesticidas, aliado ao elevado potencial reprodutivo e curto ciclo de vida dos ácaros, vem provocando seleção de populações resistentes em diversas culturas (SATO et al., 2005; LEEUWEN et al., 2010; SOKOLYANSKAYA, 2010).

Nesse contexto, o uso de produtos derivados do metabolismo de plantas vem sendo cada vez mais estudado para o controle de ácaros (YANAR; KADIOĞLU; GÖKÇE, 2011; ERDOGAN; YILDIRIM; SEVER, 2012; VERONEZ; SATO; NICASTRO, 2012). Em se tratando especificamente do efeito de produtos de origem natural sobre espécies pertencentes à família Tetranychidae, já foi constatada atividade acaricida do extrato das raízes de *Phytolacca americana* L. (Phytolaccaceae) (DING et al., 2013). De forma análoga, os extratos das folhas de *Anisosciadium orientale* DC. (Apiaceae), *Scaligeria meifolia* Boiss. (Apiaceae), *Trigonella elliptica* Boiss. (Fabaceae) e *Dodonaea viscosa* L (Sapindaceae) também se mostraram com promissora atividade acaricida

(GHADERI et al., 2013). Ainda é possível mencionar a atividade acaricida dos extratos de *Deverra scoparia* Coss. & Durieu (Apiaceae), *Haplophyllum tuberculatum* (Forsskal) A. Juss. (Rutaceae), *Chrysanthemum coronarium* L. (Asteraceae) e *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae) (ATTIA et al., 2012a).

No que se refere aos efeitos provocados por metabólitos de plantas em ácaros, sabe-se que tais substâncias podem apresentar efeito repelente, toxicidade por contato, inibição de processos enzimáticos e alterações nos parâmetros reprodutivos, provocando a morte ou ainda reduzindo o desempenho desses artrópodes (LÜMMEN, 1998; SERTKAYA; KAYA; SOYLU, 2010; WEI et al., 2011; LABORDA et al., 2013; SRIMONGKOLCHAI; VICHITBANDHA; PUNG, 2013; ZHANG et al., 2013). Nesse sentido, são inúmeras as famílias botânicas conhecidas pela produção de metabólitos tóxicos a esses fitófagos, dentre as quais a família Annonaceae vem merecendo atenção especial nos últimos anos, tendo-se intensificado os estudos visando avaliar o seu emprego como pesticida (MCLAUGHLIN, 2008; CHAMPY et al, 2011; GUPTA et al., 2011; MADHUMITHA et al., 2012). Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a bioatividade de frações provenientes de plantas da família Annonaceae, oriundas da região do Alto do Rio Grande em Lavras, Minas Gerais – Brasil, para populações cubanas de *T. tumidus* e *T. urticae*, e realizar a análise do perfil metabólito de *D. lanceolata*, planta cujo extrato se mostrou ativa para esses ácaros, por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta e processamento do material botânico**

O material botânico empregado para a realização dos bioensaios foi coletado na Região do Alto Rio Grande – Lavras/Minas Gerais, no período de março a abril de 2011, sendo que amostras do material também foram empregadas para a confecção de exsicatas, as quais foram depositadas no herbário ESAL (Tabela 1).

Tabela 1 Materiais botânicos empregados para preparo dos extratos vegetais e obtenção das frações solúveis em diclorometano

continua

Nome científico	Sinónimia <sup>1</sup>	Parte coletada	Estágio fenológico	Coordenadas	Número de exsicata
<i>Annona cacans</i> Warm.		Folhas	Vegetativo	S 21°13.649'; W 044°58.234'	27639
<i>Annona coriacea</i> Mart.		Folhas	Vegetativo	S 21°15.685'; W 044°58.254'	27640
<i>Annona neolaurifolia</i> H. Rainer	<i>Rollinia laurifolia</i> Schldt	Cascas Folhas	Vegetativo	S 21°13.648'; W 044°57.405'	27638
<i>Annona sylvatica</i> A.St.-Hil.	<i>Annona silvestris</i> Vell., <i>Annona fagifolia</i> A.St.-Hil. & Tul., <i>Annona exalbida</i> Vell., <i>Rollinia sylvatica</i> (A.St.-Hil.) Mart., <i>Rollinia exalbida</i> (Vell.) Mart., <i>Rollinia fagifolia</i> A.St.-Hil.	Folhas	Vegetativo	S 23°00.00.000' W 049°23.080'23	27647
<i>Duguetia lanceolata</i> A. St.-Hil.		Folhas Frutos Cascas	Reprodutivo com frutos	S 21°13.567'; W 044°57.575'	27631

Tabela 1 Materiais botânicos empregados para preparo dos extratos vegetais e obtenção das frações solúveis em diclorometano

						continuação
Nome científico	Sinónimia <sup>1</sup>	Parte coletada	Estágio fenológico	Coordenadas	Número de exsicata	
<i>Guatteria australis</i> A.St.-Hil.	<i>Guatteria acutiflora</i> Mart., <i>Guatteria acutipetala</i> R.E.Fr., <i>Guatteria asterantha</i> R.E.Fr., <i>Guatteria blanchetiana</i> R.E.Fr., <i>Guatteria clavigera</i> R.E.Fr., <i>Guatteria curvinervia</i> R.E.Fr., <i>Guatteria densicoma</i> Mart., <i>Guatteria dimorphopetala</i> R.E.Fr., <i>Guatteria duseii</i> R.E.Fr., <i>Guatteria flava</i> A.St.-Hil., <i>Guatteria fruticosa</i> R.E.Fr., <i>Guatteria glabrescens</i> R.E.Fr., <i>Guatteria gomeziana</i> A.St.-Hil., <i>Guatteria hilariana</i> Schldl., <i>Guatteria hookeri</i> A.St.-Hil. & Tul., <i>Guatteria klotzschiana</i> Mart., <i>Guatteria lutea</i> A.St.-Hil., <i>Guatteria minarum</i> R.E.Fr., <i>Guatteria mosenii</i> R.E.Fr., <i>Guatteria neglecta</i> R.E.Fr., <i>Guatteria nigrescens</i> Mart., <i>Guatteria odontopetala</i> Mart., <i>Guatteria paranensis</i> R.E.Fr., <i>Guatteria parvifolia</i> R.E.Fr., <i>Guatteria penduliflora</i> R.E.Fr., <i>Guatteria polycarpa</i> R.E.Fr., <i>Guatteria psilopus</i> Mart., <i>Guatteria reflexa</i> R.E.Fr., <i>Guatteria riedeliana</i> R.E.Fr., <i>Guatteria salicifolia</i> R.E.Fr., <i>Guatteria silvatica</i> R.E.Fr., <i>Guatteria sordida</i> R.E.Fr., <i>Guatteria tenuis</i> R.E.Fr.	Folhas	Vegetativo	S 21°15.436'; W 044°57.216'	27645	

Tabela 1 Materiais botânicos empregados para preparo dos extratos vegetais e obtenção das frações solúveis em diclorometano

Nome científico	Sinonímia <sup>1</sup>	Parte coletada	Estágio fenológico	Coordenadas	conclusão Número de exsicata
<i>Xylopia brasiliensis</i> Spreng.	<i>Xylopia gracilis</i> (R.E.Fr.) R.E.Fr.	Folhas	Reprodutivo com frutos	S 21°13.732'; W 044°58.064'	27636
<i>Xylopia emarginata</i> Mart.		Cascas Folhas	Vegetativo	S 21° 17.8071'; W 044°42.8061'	-
<i>Xylopia sericea</i> A.St.-Hil.	<i>Xylopia intermedia</i> R.E.Fr.	Cascas Folhas Frutos	Reprodutivo	S 23°000.000; W 049°22.910'	27646

<sup>1</sup> Oliveira-Filho (2013). <sup>2</sup> Diâmetro a altura de 1,20 m do solo.

Inicialmente, o material foi submetido à secagem em estufa de ventilação forçada a 40 °C, sendo que as folhas permaneceram em estufa durante 48 horas, ao passo que as cascas foram secas por 72 horas e as bagas dos frutos por 96 horas. Em seguida, as amostras foram moídas, em moinho do tipo Willey, dando origem aos materiais vegetais secos, os quais foram empregados para o preparo dos extratos e suas frações.

## **2.2 Preparo dos extratos vegetais e partição líquido-líquido**

Para o preparo dos extratos, os materiais vegetais secos (50 g) foram imersos em metanol (300 mL) por 24 horas. Em seguida, as misturas foram filtradas em algodão hidrofílico e se acrescentou mais 200 mL de metanol aos resíduos das filtrações. O procedimento de extração foi repetido por oito vezes, sendo as fases líquidas combinadas e o solvente removido em evaporador rotatório, dando origem aos extratos vegetais metanólicos.

Os extratos vegetais metanólicos (5 g) foram submetidos à partição líquido-líquido, empregando-se diclorometano (3 x 20 mL) e água (1 x 20 mL). Para cada extrato, a fase solúvel em água foi descartada, enquanto as solúveis em diclorometano foram combinadas, resultando em sobrenadante que foi tratado com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro para a remoção de umidade, filtrado em algodão hidrófilo, concentrado até securo em evaporador rotatório e liofilizado, dando origem às frações solúveis em diclorometano (ÁLVAREZ-COLOM et al., 2007; 2008; 2009). As frações foram transportadas do Brasil para Cuba e para isto foi

obtida Licença de Importação de Flora concedida pelo IBAMA – Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (nº da licença: 12BR008914/DF).

### **2.3 Criação de manutenção dos ácaros**

Os ácaros empregados nos bioensaios foram obtidos a partir de criação de manutenção do Laboratório de Acarologia do CENSA (Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria), onde espécimes de *T. tumidus* foram mantidos em folhas de plátano (*Musa* sp. var. Ciento en boca), ao passo que para *T. urticae* foram empregadas folhas de citros. Para a realização dos bioensaios foram empregadas fêmeas adultas com idade variando entre 48 e 72 horas.

### **2.4 Efeito das frações solúveis em diclorometano sobre fêmeas adultas de *T. tumidus***

Para a realização do presente estudo foram empregadas as frações solúveis em diclorometano dos extratos das folhas de *Annona cacans* Warm., *Annona coriacea* Mart., *Annona sylvatica* A.St.-Hil., *Guatteria australis* A.St.-Hil. e *Xylopia brasiliensis* Spreng.; das folhas e cascas do caule de *Annona neolaurifolia* H. Rainer e *Xylopia emarginata* Mart.; das folhas, frutos e cascas do caule de *Duguetia lanceolata* A. St.-Hil. e *Xylopia sericea* A.St.-Hil. Tais frações (10 mg) foram mescladas com DMSO (50 µL) e, em seguida, foi acrescentada solução aquosa de Tween 80 a (0,01 mL/mL) (950 µL), resultando em volume final de 1,0 mL de amostra, na concentração de 10 mg/mL.

Para a aplicação tópica das soluções das frações nas fêmeas de *T. tumidus* (adaptado de DENNEHY; FARNHAM; DENHOLM, 1993), ponteiros de plástico para volume de 200  $\mu\text{L}$  foram cortadas ao meio e reconectadas, de forma que um pedaço de tecido do tipo organza pudesse separar o espaço interno da ponteira em duas partes. Uma mangueira foi adaptada à extremidade anterior da ponteira, ou seja, a parte mais grossa da ponteira, e assim no mínimo 25 fêmeas adultas, mantidas em criação, foram succionadas. Em seguida, a ponteira foi conectada a uma micropipeta e 100  $\mu\text{L}$  de solução da fração do extrato em solução de DMSO e Tween 80 foram succionados para dentro da ponteira. Os ácaros permaneceram imersos no tratamento por 30 segundos e então, a suspensão dos ácaros nos tratamentos foi filtrada empregando-se papel-filtro (2 cm x 2 cm), o qual foi colocado sobre um pedaço de folha de plátano (aproximadamente 5 cm x 3 cm) envolto por algodão umedecido com água no interior da placa de Petri, que correspondeu a uma parcela experimental.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento. Foram empregadas como testemunha negativa: água e solução aquosa contendo DMSO (0,05 mL/mL) e Tween 80 a 1% (0,01 mL/mL); a testemunha positiva foi o acaricida dicofol (0,01 mL/mL). As avaliações foram realizadas após 24, 48 e 72 horas da montagem do experimento, contando-se o número de ácaros vivos e mortos.

### **2.5 Efeito da fração solúvel em diclorometano do extrato das cascas do caule de *D. lanceolata* sobre a fecundidade e viabilidade de ovos de *T. tumidus***

A metodologia empregada foi o método de microimersão com adaptações, conforme descrito previamente, sendo que, após 72 horas da montagem do bioensaio, as fêmeas foram descartadas e se contou os ovos em cada parcela experimental. As ninfas eclodidas também foram contadas seis dias após a remoção das fêmeas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo os tratamentos empregados: água; DMSO (0,05 mL/mL) + Tween 80 (0,01 mL/mL) e a fração proveniente das cascas de *D. lanceolata* (10 mg/mL). O experimento foi repetido por duas vezes no tempo.

### **2.6 Efeito da fração solúvel em diclorometano do extrato das cascas do caule de *D. lanceolata* sobre ovos de *T. tumidus***

Pedaços de folhas de plátano (3,0 x 3,0 cm) com os bordos envoltos em algodão umedecido com água destilada foram arranjadas em placas de Petri. Transferiram-se 100 fêmeas com idade entre 24 e 48 horas para cada pedaço de folha/placa, no qual foram mantidas por 24 horas para que pudessem ovipositar. Após esse período, as fêmeas foram removidas, os ovos contabilizados e o seu excesso foi retirado com auxílio de pincel, sendo que em cada pedaço de folha permaneceram aproximadamente 50 ovos. Os pedaços de folhas contendo os ovos foram imersos em 4 mL de cada tratamento durante 30 segundos. Em seguida,

as folhas foram mantidas por aproximadamente 2 horas em condição ambiente para a secagem e, em seguida, arranjadas em placas de Petri (um pedaço de folha por placa). Após seis dias da montagem do bioensaio, contaram-se as ninfas eclodidas.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo que os tratamentos empregados foram água; DMSO (0,05 mL/mL) + Tween 80 (0,01 mL/mL), fração solúvel em diclorometano do extrato das cascas de *D. lanceolata* a (10 mg/mL) e dicofol (0,01 mL/mL). Cada parcela experimental correspondeu a uma placa de Petri com um pedaço de folha, contendo aproximadamente 50 ovos. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento. O experimento foi repetido por duas vezes no tempo.

## **2.7 Efeito das frações solúveis em diclorometano do extrato de *D. lanceolata* sobre fêmeas adultas de *T. urticae***

Para o bioensaio com *T. urticae* foram empregadas fêmeas provenientes de criação de laboratório, sendo utilizado o método de microimersão com adaptações, descrito previamente. Os tratamentos avaliados foram as frações provenientes das folhas, cascas do caule e frutos de *D. lanceolata* na concentração de 10 mg/mL. Como testemunhas negativas foram utilizadas água e DMSO (0,05 mL/mL) + Tween 80 (0,01 mL/mL), enquanto a testemunha positiva consistiu de dicofol (0,01 mL/mL). A parcela experimental foi uma placa de Petri, contendo uma folha de citros e 25 fêmeas de *T. urticae*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. As avaliações foram realizadas após 24, 48 e

72 horas da montagem do bioensaio por meio da contagem dos ácaros vivos e mortos. O experimento foi repetido duas vezes no tempo, sendo que no primeiro experimento foram empregadas cinco repetições por tratamento e no segundo quatro repetições por tratamento.

## 2.8 Análise por CG-EM

As análises por CG-EM foram feitas em cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu GCMS-QP2010 Plus, equipado com sistema de injeção automática AOC-10. As análises foram conduzidas usando coluna capilar Rxi-1 (30 m x 0,25 mm, revestida com 100% de polidimetilsiloxano, cuja espessura do filme era de 0,25  $\mu\text{m}$ ), empregando-se He como gás de arraste (fluxo de 7,2 mL/min). A temperatura do injetor foi de 250 °C, enquanto a temperatura da coluna variou de 150 °C a 280 °C a uma taxa de 3 °C/min. O volume de injeção foi de 1  $\mu\text{L}$  em modo *split* a uma taxa de 10:1. A análise de EM foi realizada em sistema de quadrupolo (QP-2010plus) com ionização por impacto de elétrons a 70 eV, sob as mesmas condições que as descritas acima. Os compostos majoritários foram identificados por comparação com os espectros de massas das bibliotecas NIST 62 e NIST 12 e dados de literatura (Tabela 6).

## 2.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, empregando o pacote *Mvnormtest* (JAREK, 2009), com vistas a verificar a

normalidade. Em seguida, foi empregada análise de variância e se comparou as médias pelo teste de Scott-Knott, com o pacote Laércio (SILVA, 2010). Para os experimentos que foram repetidos no tempo, foi realizada análise conjunta dos dados, para tanto se empregou o teste de Bartlett, com vista a verificar a homogeneidade das variâncias (R PACKAGE, 2013). Todas as análises foram feitas com o *software* R versão 3.01 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Efeito das frações solúveis em diclorometano sobre fêmeas adultas de *T. tumidus*

Foi constatado que, após 24 horas da imersão das fêmeas de *T. tumidus*, apenas a fração solúvel em diclorometano proveniente das cascas do caule de *D. lanceolata* reduziu a sobrevivência desse ácaro ( $F = 54,89$ ;  $df = 17$ ;  $p = 2,2e^{-16}$ ). Nas avaliações realizadas após 48 horas ( $F = 36,19$ ;  $df = 17$ ;  $p = 2,2e^{-16}$ ) e 72 horas ( $F = 37,34$ ;  $df = 17$ ;  $p = 2,2e^{-16}$ ), observou-se que as frações oriundas das cascas do caule de *D. lanceolata* e frutos de *X. sericea* acarretaram menores valores de sobrevivência de *T. tumidus*. A menor sobrevivência ( $59,0 \pm 7,43$  %) das fêmeas tratadas foi observada 72 horas após a exposição das mesmas à fração das cascas do caule de *D. lanceolata* (Tabela 2).

Tabela 2 Sobrevivência média (%) ( $\pm$  erro-padrão da média) de *Tetranychus tumidus* submetidos a tratamento com frações solúveis em diclorometano de extratos metanólicos provenientes de anonáceas, empregando o método de microimersão, com adaptações

Tratamento	n*	24 horas**	48 horas**	72 horas**
Água	148	93,6 $\pm$ 2,96 a	92,7 $\pm$ 2,40 a	91,8 $\pm$ 2,10 a
DMSO (0,05 mL/mL) + Tween 80 (0,01 mL/mL)	139	94,0 $\pm$ 2,15 a	94,0 $\pm$ 2,15 a	94,0 $\pm$ 2,15 a
<i>Annona cacans</i> - folhas	177	97,2 $\pm$ 1,05 a	97,2 $\pm$ 1,05 a	96,0 $\pm$ 1,11 a
<i>Annona coriaceae</i> - folhas	161	93,8 $\pm$ 3,64 a	92,9 $\pm$ 4,05 a	92,9 $\pm$ 4,05 a
<i>Annona neolaurifolia</i> - folhas	137	93,2 $\pm$ 1,04 a	93,2 $\pm$ 1,04 a	93,2 $\pm$ 1,04 a
<i>Annona neolaurifolia</i> - cascas	160	94,2 $\pm$ 2,60 a	94,2 $\pm$ 2,60 a	93,6 $\pm$ 2,18 a
<i>Annona sylvatica</i> - folhas	123	89,7 $\pm$ 4,78 a	89,7 $\pm$ 4,78 a	87,4 $\pm$ 4,39 a
<i>Duguetia lanceolata</i> cascas	142	68,4 $\pm$ 6,24 b	62,6 $\pm$ 8,19 c	59,0 $\pm$ 7,43 c
<i>Duguetia lanceolata</i> - folhas	121	91,0 $\pm$ 1,90 a	90,0 $\pm$ 1,68 a	88,8 $\pm$ 1,84 a
<i>Duguetia lanceolata</i> - frutos	170	93,3 $\pm$ 0,82 a	93,3 $\pm$ 0,82 a	92,1 $\pm$ 0,87a
<i>Guateria australis</i> - folhas	143	93,5 $\pm$ 2,56 a	88,9 $\pm$ 5,16 a	88,9 $\pm$ 5,16 a
<i>Xylopia brasiliensis</i> - folhas	166	96,8 $\pm$ 1,24 a	96,8 $\pm$ 1,24 a	96,8 $\pm$ 1,24 a
<i>Xylopia emarginata</i> - cascas	181	95,2 $\pm$ 2,82 a	95,2 $\pm$ 2,82 a	95,2 $\pm$ 2,82 a
<i>Xylopia emarginata</i> - folhas	146	90,0 $\pm$ 2,96 a	90,0 $\pm$ 2,96 a	88,4 $\pm$ 4,52a
<i>Xylopia sericea</i> - cascas	178	95,8 $\pm$ 2,38 a	95,8 $\pm$ 2,38 a	94,4 $\pm$ 1,94 a
<i>Xylopia sericea</i> - folhas	177	94,6 $\pm$ 3,59 a	93,6 $\pm$ 3,20 a	93,6 $\pm$ 3,20 a
<i>Xylopia sericea</i> - frutos	105	84,3 $\pm$ 4,67 a	78,5 $\pm$ 8,29 b	76,7 $\pm$ 8,42 b
Dicofol a 1%		0,0 $\pm$ 0,00 c	0,0 $\pm$ 0,00 d	0,0 $\pm$ 0,00 d
F		54,89	36,19	37,34
p $\leq$		2,2e <sup>-16</sup>	2,2e <sup>-16</sup>	2,2e <sup>-16</sup>

\*n: número de fêmeas tratadas.

\*\*As letras se referem às comparações de médias nas colunas, pelo teste de Scott-Knott.

A fração das cascas do caule de *D. lanceolata* foi a mais ativa para fêmeas de *T. tumidus*, no entanto, as frações provenientes dos extratos das folhas e frutos não foram bioativas, tal resultado pode ser explicado devido ao fato de comumente existirem diferenças intra planta na alocação de metabólitos (UDDIN et al., 2013; SOMKUWAR; KAMBLE, 2013). Esse é o primeiro relato da atividade acaricida dessa planta, sendo que até o momento são escassos os trabalhos empregando *Duguetia* spp., entretanto vale ressaltar que já foi constatado que o extrato das folhas de *Duguetia furfuracea* (St. Hil) Bent. não apresentou

atividade acaricida para *Rhipicephalus microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae) (VALENTE et al., 2014). Estudos fitoquímicos empregando *D. lanceolata* corroboram para os resultados encontrados no presente trabalho, haja vista, que já foram detectados grupos de substâncias relatados por possuírem atividade acaricida (NEVES; DA CAMARA, 2011), tais como, alcaloides isoquinolínicos (FISCHER et al., 2004; TEMPONE et al., 2005) e sesquiterpenos (SOUSA et al., 2012).

Apesar da atividade acaricida de *Annona* spp. já ter sido descrita para *Tetranychus* spp. (POTENZA et al., 2006; LIN et al., 2009), no presente trabalho, as espécies pertencentes ao gênero *Annona* não apresentaram efeito letal para *T. tumidus*. Dentre os metabólitos produzidos por plantas pertencentes ao gênero *Annona*, destacam-se as acetogeninas, pois muitas delas apresentam atividade acaricida (LÜMMEN, 1998). Apesar de não existirem relatos prévios da atividade acaricida de *A. cacans* para *Tetranychus* spp., alcaloides já foram isolados dessa planta, tais como o liriodenine (SAITO; ALVARENGA, 1994), o qual possui atividade acaricida para *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart) (Acari: Pyroglyphidae) (AKENDENGUE et al., 2003). Entretanto, no presente trabalho, não foi constatada atividade acaricida dos metabólitos de tal espécie vegetal para *T. tumidus*.

De forma análoga, não foram encontrados relatos prévios da atividade acaricida de *A. coriaceae*, *A. neolaurifolia* e *A. sylvatica*, apesar de relatos da produção de substâncias com potencial uso como pesticidas por parte de tais plantas. Para exemplificar, é possível mencionar que das raízes de *A. coriaceae* já foi isolada a acetogenina gigantetronenin (SILVA et al., 1996), que possui atividade inibitória no complexo I

mitocondrial (COLOM et al., 2009). As diferenças entre os resultados obtidos no presente trabalho e descrito na literatura podem ter ocorrido em função da utilização de metodologias diferentes para a obtenção dos metabólitos a serem testados. Em se tratando de *A. neolaurifolia* e *A. sylvatica*, não foram encontrados relatos prévios de atividade acaricida. Entretanto, estudos fitoquímicos de tais espécies indicam a produção de substâncias que podem apresentar atividade pesticida (MIKOLAJCZAK et al., 1990; SANTOS PIMENTA et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2003; PIMENTA; NASCIMENTO; BOAVENTURA, 2005; FORMAGIO et al., 2013).

No que se refere a *G. australis*, já foi reportada a atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase do extrato alcoólico dos ramos dessa planta, ao passo que não foi observada a mesma bioatividade para o extrato proveniente das folhas de *G. australis* (CARDOSO-LOPES et al., 2008). Este último resultado está de acordo com a inatividade da fração do extrato das folhas de *G. australis* que foi observada no presente trabalho.

Em se tratando das espécies pertencentes ao gênero *Xylopia*, apenas a fração proveniente dos frutos de *X. sericea* causou redução na sobrevivência de *T. tumidus*. Estudos prévios realizados com o óleo essencial das folhas e frutos dessa planta demonstraram o efeito acaricida de tais partes vegetais sobre *T. urticae* (PONTES et al., 2007). Não foram encontrados relatos prévios da atividade acaricida de *X. brasiliensis* e *X. emarginata*. Entretanto, estudos fitoquímicos indicam a produção de metabólitos que podem apresentar efeito tóxico para herbívoros (LAGO

et al., 2003; 2005; MOREIRA; LAGO; ROQUE, 2005; COLMAN-SAIZARBITORIA et al., 2009; MOREIRA et al., 2013).

### **3.2 Efeito da fração das cascas do caule de *D. lanceolata* sobre a fecundidade e viabilidade de ovos de fêmeas de *T. tumidus***

As fêmeas tratadas com a fração do extrato das cascas do caule de *D. lanceolata* apresentaram redução na fecundidade ( $F = 7,6419$ ;  $df = 2$ ;  $p = 0,0036$ ) e viabilidade dos ovos ( $F = 7,3178$ ;  $df = 2$ ;  $p = 0,0044$ ) (Tabela 3). Salienta-se que, além do extrato de *D. lanceolata* provocar efeito letal sobre *T. tumidus*, também provoca efeito subletal, constatado a partir da redução no número de ovos por fêmea e porcentagem de eclosão de ninfas.

Tabela 3 Efeito da fração solúvel em diclorometano proveniente do extrato metanólico das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* sobre a fecundidade e viabilidade dos ovos de *Tetranychus tumidus*, empregando o método de microimersão, com adaptações.

Tratamento	n*	Número de ovos por fêmea ± erro padrão da média***	n**	Eclosão de ninfas(%) ± erro padrão da média***
Água	106	2,4 ± 0,04 a	262	97,1 ± 1,40 a
DMSO (0,05 mL/mL) + Tween 80 (0,01 mL/mL)	143	2,7 ± 0,37 a	356	95,6 ± 1,18 a
<i>Duguetia lanceolata</i> - cascas	165	1,4 ± 0,25 b	198	89,2 ± 1,92 b
F		7,64		7,31
p≤		0,0036		0,0044

n\*: número total de fêmeas.

n\*\*: número total de ovos.

\*\*\*As letras se referem às comparações de médias nas colunas, pelo teste de Scott-Knott.

Os efeitos de produtos naturais provenientes de plantas sobre a fecundidade e viabilidade de ovos de *Tetranychus* spp. vêm sendo relatados por diversos autores (MANSOUR et al., 2004; BRITO et al., 2006; ATTIA et al., 2012b; LABORDA et al., 2013); entretanto esse é o primeiro relato do potencial de *D. lanceolata* em afetar os parâmetros reprodutivos de *T. tumidus*.

### **3.3 Efeito da fração das cascas do caule de *D. lanceolata* sobre ovos de *T. tumidus***

O tratamento dos ovos de *T. tumidus* com a fração proveniente das cascas do caule de *D. lanceolata* não causou redução na eclosão das ninfas ( $F = 17,14$ ;  $df = 3$ ;  $p = 9,5e^{-07}$ ) (Tabela 4). Isso pode ter ocorrido devido ao fato da fase de ovo consistir em uma das mais resistentes às condições adversas do meio ambiente em muitos grupos de artrópodes. Por isso, geralmente produtos naturais de plantas são mais tóxicos às fases jovem e adulta de *Tetranychus* spp. (CHANDRASHEKHARAI AH et al., 2011; ERDOGAN; YILDIRIM; SEVER, 2012). Assim, é comum que até mesmo acaricidas sintéticos não apresentem efeito sobre a fase de ovo de muitas dessas espécies, o que pode ser consequência da dificuldade de transposição das cutículas dos ovos desses artrópodes (GRACIA SALINAS et al., 1993).

Tabela 4 Efeito da fração solúvel em diclorometano proveniente do extrato metanólico das cascas do caule de *Duguetia lanceolata* sobre ovos de *Tetranychus tumidus*

Tratamento	n*	Eclosão de ninfas (%) ± erro padrão da média**
Água	408	82,94 ± 9,21 a
DMSO (0,05 mL/mL) + Tween 80 (0,01 mL/mL)	385	77,64 ± 11,93 a
<i>Duguetia lanceolata</i> – cascas	432	71,77 ± 9,34 a
Dicofol®	298	0,0 ± 0,00 b
F		17,148
p≤		9,5e <sup>-07</sup>

n\*: número total de ovos.

\*\*\*As letras se referem às comparações de médias nas colunas, pelo teste de Scott-Knott.

### **3.4 Efeito das frações de *D. lanceolata* sobre fêmeas adultas de *T. urticae***

Foi constatado que as frações dos extratos das folhas, frutos e cascas do caule de *D. lanceolata* causaram redução na sobrevivência de *T. urticae* após 24 horas ( $F = 233,09$ ;  $df = 5$ ;  $p = 2,2^{e-16}$ ), 48 horas ( $F = 218,82$ ;  $df = 5$ ;  $p = 2,2^{e-16}$ ) e 72 horas ( $F = 198,72$ ;  $df = 5$ ;  $p = 2,2^{e-16}$ ) da aplicação dos tratamentos. Entretanto, os resultados mais promissores foram encontrados quando se aplicou a fração das cascas do caule de *D. lanceolata* que, após 72 horas da montagem do bioensaio, causou 95,5% de mortalidade (Tabela 5).

Tabela 5 Sobrevivência média (%) ( $\pm$  erro-padrão da média) de *Tetranychus urticae* submetidos a tratamento com frações solúveis em diclorometano provenientes de extratos metanólicos de *Duguetia lanceolata*, empregando o método de microimersão, com adaptações

Tratamento	n*	24 horas**	48 horas**	72 horas**
Água	193	90,4 $\pm$ 1,89 a	88,3 $\pm$ 1,84 a	87,6 $\pm$ 1,81 a
DMSO + Tween	269	89,9 $\pm$ 0,99 a	86,8 $\pm$ 1,83 a	85,3 $\pm$ 1,99 a
<i>Duguetia lanceolata</i> - folhas	233	83,4 $\pm$ 2,69 b	81,1 $\pm$ 3,62 b	80,6 $\pm$ 3,49 b
<i>Duguetia lanceolata</i> - frutos	257	77,5 $\pm$ 3,64 b	75,7 $\pm$ 2,67 b	74,3 $\pm$ 2,67 b
<i>Duguetia lanceolata</i> - cascas	243	5,9 $\pm$ 4,39 c	4,5 $\pm$ 4,28 c	4,5 $\pm$ 4,28 c
Dicofol	257	0,0 $\pm$ 0,00 c	0,0 $\pm$ 0,00 c	0,0 $\pm$ 0,00 c
F		233,09	218,82	198,72
p $\leq$		2,2 <sup>e-16</sup>	2,2 <sup>e-16</sup>	2,2 <sup>e-16</sup>

\*n: número de fêmeas tratadas.

\*\*As letras se referem às comparações de médias nas colunas, pelo teste de Scott-Knott.

A fração das cascas do caule de *D. lanceolata* mostrou-se mais ativa para *T. urticae* do que para *T. tumidus*, isso pode ser explicado devido a variações espécie-específicas. Sendo relativamente comum, em muitos artrópodes, que espécies aparentadas possuam diferentes habilidades e mecanismos para detoxificação diante de um metabólito tóxico (KIM; KIM; AHN, 2003; SONG et al., 2011).

### 3.5 Análise por CG-MS

A análise dos constituintes da fração solúvel em diclorometano do extrato das cascas do caule de *D. lanceolata* revelou a presença de dois constituintes majoritários. O primeiro deles correspondeu ao pico com tempo de retenção de 4,28 minutos e apresentava maior valor de massa/carga ( $m/z$ ) igual a 194 u, que provavelmente correspondia ao pico do íon molecular  $[M]^+$ . A outra substância, cujo pico apresentava tempo de retenção de 5,74 minutos, tinha maior valor de  $m/z$  igual 209, que provavelmente correspondia a  $[M]^+$ ., as demais fragmentações dos espectros de massas foram comparadas com espectros de massas das bibliotecas NIST 12 e 62 e também comparadas com dados de literatura (Tabela 6), o que possibilitou a identificação das substâncias majoritárias como sendo os fenilpropanoides: 2,4,5-trimetoxiestireno e *trans*-asarona, com tempo de retenção de 4,28 e 5,74 minutos, respectivamente. (Figuras 1 e 2).

Tabela 6 Íons moleculares e fragmentos iônicos dos picos **1** e **2**, obtidos a partir do espectro de massas da fração solúvel em diclorometano proveniente do extrato metanólico das cascas do caule de *Duguetia lanceolata*, após ionização por impacto de elétrons a 70 eV

continua

Pico 1 (m/z)	Nagashima, Murakami e Asakawa (1999) (m/z)	Pico 2 (m/z)	Oprean, Tamas e Roman (1998) (m/z)	Zuo et al. (2012) (m/z)
194	194	208	208	208
179	179	193	193	193
164	-	177	177	177
151	151	165	165	165
136	136	162	162	-
121	121	150	150	150
108	-	137	137	137
91	91	118	-	-
77	-	-	119	119
69	69	105	105	105
65	-	91	91	91
51	51	79	-	79

Tabela 6 Íons moleculares e fragmentos iônicos dos picos 1 e 2, obtidos a partir do espectro de massas da fração solúvel em diclorometano proveniente do extrato metanólico das cascas do caule de *Duguetia lanceolata*, após ionização por impacto de elétrons a 70 eV

Pico 1 (m/z)	Nagashima, Murakami e Asakawa (1999) (m/z)	Pico 2 (m/z)	conclusão	
			Oprean, Tamas e Roman (1998) (m/z)	Zuo et al. (2012) (m/z)
-	39	-	77	-
		69	69	69
		-	-	53
		65	-	39
		51	-	28
		-	-	15

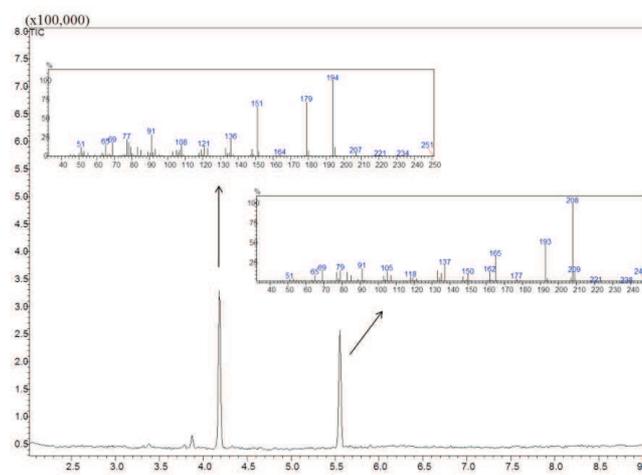
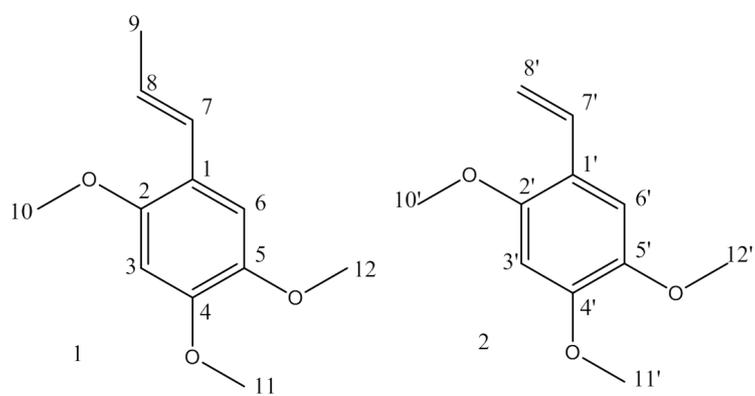


Figura 1 Cromatograma e espectros de massas para a fração solúvel em diclorometano proveniente do extrato metanólico das cascas do caule de *Duguetia lanceolata*, após ionização por impacto de elétrons a 70 e V



*Trans*-asarona (1) e 2,4,5-trimetoxi-estireno (2)

Figura 2 Fórmulas estruturais dos constituintes majoritários da fração solúvel em diclorometano proveniente do extrato metanólico das cascas do caule de *Duguetia lanceolata*

A abundância do 2,4,5-trimetoxiestireno e *trans*-asarona na fração das cascas do caule de *D. lanceolata* corrobora para a alta atividade contra *T. urticae*, haja vista que ambas as moléculas são relatadas por possuírem atividade pesticida (KOONA; BOUDA, 2006; BHARDWAJ et al., 2010). Ademais, a atividade acaricida dessas moléculas encontra suporte no fato de que outras moléculas, também pertencentes à classe química dos fenilpropanoides, são relatadas por possuírem atividade acaricida. Nesse sentido é possível mencionar, que o fenilpropanoide eugenol é conhecido por apresentar atividade para *T. urticae*, sendo que alguns autores já atribuíram seu mecanismo de toxicidade à ação fumigante e de contato (HAN et al., 2011; ARAÚJO et al., 2012). A *trans*-asarona e o 2,4,5-trimetoxiestireno são metabólitos relativamente comuns em plantas da família Annonaceae (WANG et al., 1988; NGADJUI et al., 1989; SILVA et al., 2007; YAPI et al., 2012). Ressalta-se que a molécula *trans*-asarona foi recentemente identificada como um dos componentes do óleo essencial dos galhos de *D. lanceolata* (SOUSA et al., 2012).

#### 4 CONCLUSÕES

A fração oriunda das cascas do caule de *D. lanceolata* reduziu a sobrevivência, fecundidade e viabilidade dos ovos de *T. tumidus*. Referente à *T. urticae*, a fração das cascas do caule de *D. lanceolata* causou a diminuição significativa de sua sobrevivência. As análises por CG-EM revelaram que os constituintes majoritários da fração das cascas do caule de *D. lanceolata* são o 2,4,5-trimetoxiestireno e *trans*-asarona. Os resultados encontrados no presente trabalho evidenciam o potencial da fração das cascas de *D. lanceolata* para o controle de *T. tumidus* e *T. urticae*.

## CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

**Dejane Santos Alves<sup>1</sup>**: coleta e processamento das plantas; obtenção dos extratos e das frações; testes biológicos; redação do artigo científico.

**Reinaldo Chico Morejón<sup>2</sup>**: auxílio na criação dos ácaros e na execução dos testes biológicos.

**Alan Rodrigues Teixeira Machado<sup>3</sup>**: análise por CG-EM.

**Oriela Pina<sup>2</sup>**: orientadora em Cuba.

**Geraldo Andrade Carvalho<sup>1</sup>**: orientador no Brasil, supervisão na redação do artigo científico.

**Denilson Ferreira de Oliveira<sup>4</sup>**: coorientador no Brasil; supervisão na obtenção dos extratos e das frações; auxílio na redação do artigo científico.

**Maria de los Angeles Martínez Rivero<sup>2</sup>**: coordenadora do projeto em Cuba.

**Vanda Elena Paes Bueno<sup>1</sup>**: coordenadora do projeto no Brasil.

**Acaricide activity of annonaceae fractions for *Tetranychus tumidus* and *Tetranychus urticae* and analysis of the *Duguetia lanceolata* metabolite profile by CG-EM**

**ABSTRACT**

The initial objective of this study was to evaluate the acaricide effect of fractions soluble in dichloromethane of methanol extracts of *Annona cacans*, *Annona coriacea*, *Annona neolaurifolia*, *Annona sylvatica*, *Duguetia lanceolata*, *Guatteria australis*, *Xylopia brasiliensis*, *Xylopia emarginata* and *Xylopia sericerae* for *Tetranychus tumidus*. Subsequently, we sought to study the effects *D. lanceolata* leaves, fruits and stem bark extract fractions on *Tetranychus urticae*. For this, the fractions were solubilized in a mixture of 0.05 mL/mL DMSO and Tween 80 at 0.01 mL/mL aqueous solution, resulting in solutions of a final concentration of 10 mL/mL, which were used in the bioassay, employing the microimmersion method, with modifications. Among the studied fractions, that derived from the *D. lanceolata* stem bark was the most active for *T. tumidus*. As a result, this fraction was used in experiments in order to assess its effects over the fecundity and fertility of the mite, also employing the microimmersion method. It was found that the *D. lanceolata* stem bark fraction reduced fecundity and viability of females *T. tumidus* eggs. The *D. lanceolata* stem bark fraction was also studied in a bioassay with the objective of evaluating its effect over *T. tumidus* eggs. For this, pieces of *Musa* sp. leaves containing mite eggs were submitted to immersion, not occurring ovicidal activity. Moreover, in trial employing the adapted microimmersion method, the *D. lanceolata* stem bark fraction caused high mortality rates in *T. urticae* females. Analysis of the metabolic profile in gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) revealed that the major constituents of the *D. lanceolata* stem bark fraction are 2,4,5-trimethoxystyrene and trans-asarone.

Key words: Secondary metabolites. Natural acaricide. 1,2,4-trimethoxy-5-vinylbenzene. 1,2,4-trimethoxy-5-[(1E)-1-propen-1-yl]benzene.

## REFERÊNCIAS

- AKENDENGUE, B. et al. Acaricidal activity of *Uvaria versicolor* and *Uvaria klaineana* (Annonaceae). **Phytotherapy Research**, London, v. 17, n. 4, p. 364- 367, Apr. 2003.
- ÁLVAREZ-COLOM, O. et al. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Pest Science**, New York, v. 80, n.1, p. 63-67, Feb. 2007.
- ÁLVAREZ-COLOM, O. et al. Toxic effects of annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. **Journal of Pest Science**, New York, v. 81, n. 2, p. 85-89, June 2008.
- ÁLVAREZ-COLOM, O. et al. Tucupentol, a novel mono-tetrahydrofuranic acetogenin from *Annona montana*, as a potent inhibitor of mitochondrial complex I. **Chemistry and Biodiversity**, v. 6, n. 3, p. 335-340, Mar. 2009.
- ARAÚJO, M. J. C. et al. Acaricidal activity and repellency of essential oil from *Piper aduncum* and its components against *Tetranychus urticae*. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 57, n. 2, p. 139-155, June 2012.
- ATTIA, S. et al. Acaricidal activity of 31 essential oils extracted from plants collected in Tunisia. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 24, n. 3, p. 279-288, May 2012a.
- ATTIA, S. et al. Effective concentrations of garlic distillate (*Allium sativum*) for the control of *Tetranychus urticae* (Tetranychidae). **Journal of Applied Entomology**, Washington, v. 136, n. 4, p. 302-312, May 2012b.
- BHARDWAJ, A. et al. Larvicidal and structure-activity studies of natural phenylpropanoids and their semisynthetic derivatives against the tobacco armyworm *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Chemistry and Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 168-177, Jan. 2010.

BRITO, H. M. et al. Toxicidade de formulações de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) ao ácaro-rajado e a *Euseius alatus* de Leon e *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 500-505, July/Aug. 2006.

CARDOSO-LOPES, E. M. et al. Screening for antifungal, DNA-damaging and anticholinesterasic activities of Brazilian plants from the Atlantic Rainforest - Ilha do Cardoso State Park. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 18, p. 655-660, Dec. 2008. Supplement.

CHAMPY, P. Acetogenins from the seeds of the custard apple (*Annona squamosa* L.) and their health outcomes. In: PREEDY, V. R.; WATSON, R. R.; PATEL, V. B. (Ed.). **Nuts and seeds in health and disease prevention**. 1<sup>st</sup> ed. San Diego: Academic, 2011. p. 429-437.

CHANDRASHEKHARAIHAH, M. et al. Evaluation of acaricidal properties of selected plant extracts and organic materials against two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Tetranychidae: Acari). **Biopesticides International**, v. 7, n. 1, p. 35-42, June. 2011.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T. et al. Xymarginatin: a new acetogenin inhibitor of mitochondrial electron transport from *Xylopiia emarginata* Mart., Annonaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 19, n. 4, p. 871-875, Oct./Dec. 2009.

COLOM, O. Á. et al. Tucupentol, a novel mono-tetrahydrofuranic acetogenin from *Annona montana*, as a potent inhibitor of mitochondrial complex I. **Chemistry and Biodiversity**, v. 6, n. 3, p. 335-340, Mar. 2009.

DENNEHY, T.; FARNHAM, A.; DENHOLM, I. The microimmersion bioassay: a novel method for the topical application of pesticides to spider mites. **Pesticide Science**, Oxford, n. 39, p. 47-54, 1993.

DING, L.-J. et al. Bioguided fractionation and isolation of esculentoside P from *Phytolacca americana* L. **Industrial Crops and Products**, New York, v. 44, p. 534-541, 2013.

ERDOGAN, P.; YILDIRIM, A.; SEVER, B. Investigations on the effects of five different plant extracts on the two-spotted mite *Tetranychus urticae* Koch (Arachnida: Tetranychidae). **Psyche: journal of entomology**, Cambridge, Art. 125284, p. 1-5, 2012.

FISCHER, D. C. H. et al. In vitro screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. **Acta Tropica**, Basel, v. 92, n. 3, p. 261-266, nov./dic. 2004.

FORMAGIO, A. S. N. et al. Composition and evaluation of the anti-inflammatory and anticancer activities of the essential oil from *Annona sylvatica* A. St.-Hil. **Journal of Medicinal Food**, Florida, v. 16, n. 1, p. 20-25, Jan. 2013.

GHADERI, S. et al. Toxicity and ovicidal activity of different plant extracts on two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, London, v. 46, n. 1, p. 120-126, 2013.

GRACIA SALINAS, M. J. et al. Activity of some acaricides against engorged females and eggs of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Research and Reviews in Parasitology**, Barcelona, v. 53, n. 3-4, p. 87-91, 1993.

GUPTA, A. et al. Annonaceous acetogenins: The unrevealed area for cytotoxic and pesticidal activities. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 2, n. 2, p. 104-109, 2011.

HAN, J. et al. Fumigant toxicity of lemon eucalyptus oil constituents to acaricide-susceptible and acaricide-resistant *Tetranychus urticae*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 67, n. 12, p. 1583-1588, Dec. 2011.

JAREK, S. **R Package**: mvnrmtest: normality test for multivariate variables. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/web/packages/mvnrmtest/index>>. Acesso em: 10 dez. 2009.

KIM, E.-H.; KIM, H.-K.; AHN, Y.-J. Acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 4, p. 885-889, 2003.

KOONA, P.; BOUDA, H. Biological activity of *Pachypodanthium staudtii* (Annonaceae) against the bean beetle *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Applied Sciences Research**, v. 2, n. 12, p. 1129-1131, 2006.

LABORDA, R. et al. Effects of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* essential oils on *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Industrial Crops and Products**, New York, v. 48, p. 106-110, Jan. 2013.

LAGO, J. H. G. et al. Composition of the leaf oil of *Xylopia emarginata* Mart. (Annonaceae). **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 17, n. 6, p. 622-623, Nov./Dec. 2005.

LAGO, J. H. G. et al. Mono and sesquiterpenes from the leaf essential oil of *Xylopia brasiliensis* Spreng. (Annonaceae). **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 15, n. 6, p. 406-407, 2003.

LEEUWEN, T. V. et al. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: a review. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 8, p. 563-572, 2010.

LIN, C.-Y. et al. Control of silverleaf whitefly, cotton aphid and kanzawa spider mite with oil and extracts from seeds of sugar apple. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, n. 4, p. 531-536, July/Aug. 2009.

- LÜMMEN, P. Complex I inhibitors as insecticides and acaricides. **Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics**, Amsterdam, v. 1364, n. 2, p. 287-296, May 1998.
- MADHUMITHA, G. et al. Acaricidal, insecticidal, and larvicidal efficacy of fruit peel aqueous extract of *Annona squamosa* and its compounds against blood-feeding parasites. **Parasitology Research**, Berlin, v. 111, n. 5, p. 2189-2199, Nov. 2012.
- MANSOUR, F. et al. The Potential of middle eastern flora as a source of new safe bio-acaricides to control *Tetranychus cinnabarinus*, the carmine spider mite. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 32, n. 1, p. 66-72, 2004.
- MARCIC, D. Acaricides in modern management of plant-feeding mites. **Journal of Pest Science**, New York, v. 85, n. 4, p. 395-408, Dec. 2012.
- MCLAUGHLIN, J. L. Paw paw and cancer: Annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 71, n. 7, p. 1311-1321, July 2008.
- MIKOLAJCZAK, K. J. et al. Sylvaticin: A new cytotoxic and insecticidal acetogenin from *Rollinia sylvatica* (Annonaceae). **Experientia**, v. 46, n. 3, p. 324-327, Mar. 1990.
- MOREIRA, I. C. et al. Genus *Xylopi*a (Annonaceae): Chemical and biological aspects. **Chemistry and Biodiversity**, v. 10, n. 11, p. 1921-1943, 2013.
- MOREIRA, I. C.; LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F. Sesquiterpenes, diterpenes, steroids and alkaloid from branches of *Xylopi*a *brasiliensis* Spreng (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 33, n. 9, p. 948-951, 2005.
- NAGASHIMA, F.; MURAKAMI, Y.; ASAKAWA, Y. Aromatic compounds from the Ecuadorian liverwort *Marchesinia brachiata*: a revision. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 51, n. 8, p. 1101-1104, 1999.

NASCIMENTO, F. D. C. do. et al. Acetogeninas de anonáceas isoladas de folhas de *Rollinia laurifolia*. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 319-322, maio/jun. 2003.

NEVES, I. A.; CAMARA, C. A. G. da. Acaricidal activity against *Tetranychus urticae* and essential oil composition of four croton species from caatinga biome in northeastern Brazil. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 6, n. 6, p. 893-89, 2011.

NGADJUI, B. T. et al. Pachypophyllin and pachypostaudins A and B: three bisnorlignans from *Pachypodanthium staudtii*. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 28, n. 1, p. 231-234, 1989.

OPREAN, R.; TAMAS, M.; ROMAN, L. Comparison of GC-MS and TLC techniques for asarone isomers determination. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 18, n. 1-2, p. 227-234, 1998.

PIMENTA, L. P. S.; NASCIMENTO, F. C.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogenins from the leaves of *Rollinia laurifolia*. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 88, n. 12, p. 3225-3231, 2005.

PONTES, W. J. T. et al. Atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Xylopia sericea* sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* Koch). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 838-841, jul./ago. 2007.

POTENZA, M. R. et al. Avaliação de produtos naturais para o controle do ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari:Tetranychidae) em casa de vegetação. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 4, p. 455-459, 2006.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna, 2014. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 1 jul. 2013.

SAITO, M. L.; ALVARENGA, M. A. Composição química de *Annona cacans* Warming. **Lecta**: revista de farmácia e biologia da Universidade São Francisco, Bragança Paulista, v. 12, n. 1, p. 135-40, 1994.

SANTOS PIMENTA, L. P. et al. Laurifolin, a novel acetogenin from *Rollinia laurifolia* leaves. **Tetrahedron Letters**, Elmsford, v. 42, n. 48, p. 8433-8434, 2001.

SATO, M. E. et al. Abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): selection, cross-resistance and stability of resistance. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 991-998, 2005.

SERTKAYA, E.; KAYA, K.; SOYLU, S. Acaricidal activities of the essential oils from several medicinal plants against the carmine spider mite (*Tetranychus cinnabarinus* Boisd.) (Acarina: Tetranychidae). **Industrial Crops and Products**, New York, v. 31, n. 1, p. 107-112, 2010.

SILVA, D. B. da. et al. Chemical constituents of the underground stem bark of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 18, n. 8, p. 1560-1565, 2007.

SILVA, E. L. M. da. et al. Coriadienin, the first annonaceous acetogenin with two double bonds isolated from *Annona coriaceae*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 59, n. 5, p. 528-530, 1996.

SILVA, L. J. da. **R package**: Duncan test, Tukey test and Scott-Knott test. 2010. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/web/packages/laercio/laercio.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

SOKOLYANSKAYA, M. P. The problem of the insect and mite resistance to insectoacaricides; resistance to organochlorines and organophosphates. **Resistant Pest Management Newsletter**, v. 19, n. 2, p. 62-66, 2010.

SOMKUWAR, D. O.; KAMBLE, V.A. Phytochemical screening of ethanolic extracts of stem, leaves, flower and seed kernel of *Mangifera indica* L. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, New Delhi, v. 4, n. 2, p. 383-389, 2013.

SONG, H. Y. et al. Acaricidal activities of apiol and its derivatives from petroselinum sativum seeds against *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, and *Tyrophagus putrescentiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 14, p. 7759-7764, 2011.

SOUSA, O. V. et al. Chemical composition and biological activities of the essential oils from *Duguetia lanceolata* St. Hil. Barks. **Molecules**, Switzerland, v. 17, n. 9, p. 11056-11066, Sept. 2012.

SRIMONGKOLCHAI, W.; VICHITBANDHA, P.; PUNG, T. Toxic effects of leaf and flower crude extracts from *Lantana camara* on *Tetranychus urticae*. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 4881-4884, 2013.

TEMPONE, A. G. et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, Jena, v. 12, n. 5, p. 382-390, May 2005.

UDDIN, M. R. et al. Phenolic compounds in different organs of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) cultivars. **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, n. 12, p. 1861-1865, Nov. 2013.

VALENTE, P. P. et al. In vitro acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, Berlin, v. 113, n. 1, p. 417-423, Jan. 2014.

VERONEZ, B.; SATO, M. E.; NICASTRO, R. L. Toxicidade de compostos sintéticos e naturais sobre *Tetranychus urticae* e o predador *Phytoseiulus macropilis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 4, p. 511-518, 2012.

WANG, Z.-W. et al. 2,4,5- trimethoxystyrene, a bioactive component of the bark of *Duguetia panamensis*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 51, n. 2, p. 382, Mar./Apr. 1988.

WEI, J. et al. Acaricidal activity of *Aloe vera* L. leaf extracts against *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acarina: Tetranychidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 14, n. 3, p. 353-356, 2011.

YANAR, D.; KADIOĞLU, D.; GÖKÇE, A. Ovicidal activity of different plant extracts on twospotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) (Acari: Tetranychidae). **Scientific Research and Essays**, v. 6, n. 14, p. 3041-3044, 2011.

YAPI, T. A. et al. *Pachypodanthium staudtii* Engl & Diels from côte d'ivoire: Composition of leaf, stem bark and roots oils. **European Journal of Scientific Research**, Victoria, v. 69, n. 1, p. 137-142, 2012.

ZHANG, Q. et al. Action modes of *Aloe vera* L. extracts against *Tetranychus cinnabarinus* Boisduval (Acarina: Tetranychidae). **Agricultural Sciences**, v. 4, n. 3, p. 117-122, 2013.

ZUO, H. L. et al. Separation of *cis* - and *trans* -Asarone from *Acorus tatarinowii* by preparative gas chromatography. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, New York, v. 2012, p. 1-5, 2, Art. ID 402081, 2012.

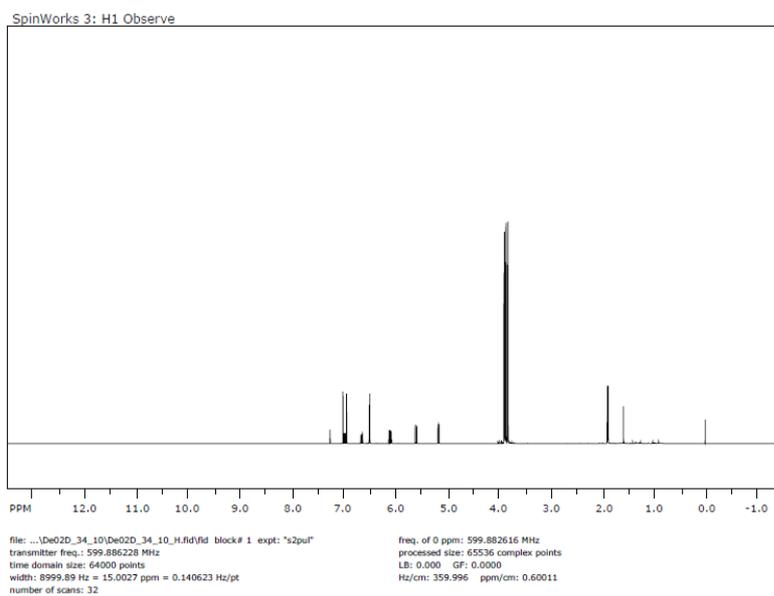
## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plantas pertencentes à família anonácea apresentam grande potencial para serem empregadas como fonte de moléculas bioativas para o controle de artrópodes fitófagos. No presente trabalho, foi constatado que as frações solúveis em diclorometano, provenientes de extrato metanólico, de *Xylopi*a *emarginata* (cascas), *Annona neolaurifolia* (folhas e cascas), *Xylopi*a *sericea* (frutos e cascas) e *Annona coriacea* (folhas), causaram redução na massa das lagartas de *S. frugiperda*. A fração oriunda das cascas do caule do extrato de *Duguetia lanceolata* apresentou alta atividade inseticida para lagartas *S. frugiperda*. Assim foi realizada uma análise exploratória do perfil metabólito dessa planta, empregando ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H e métodos quimiométricos. Foi possível inferir que o 2,4,5-trimetoxiestireno provavelmente era a substância responsável pela atividade inseticida. Dessa forma, empregando técnicas de fracionamento foi realizado estudo fitoquímico da fração das cascas do caule de *D. lanceolata*, o que possibilitou o isolamento de oito substâncias, dentre elas o 2,4,5-trimetoxiestireno e *trans*-asarona, os quais em mistura apresentaram atividade inseticida para *S. frugiperda*. Além disso, foi constatada a presença de três alcaloides aporfínicos, os quais ainda não tiveram suas estruturas elucidadas. O 2,4,5-trimetoxiestireno e *trans*-asarona, quando incorporados isoladamente em dieta, oferecida a lagartas de *S. frugiperda*, apresentaram atividade inseticida, porém o 2,4,5-trimetoxiestireno apresentou-se mais ativo, confirmando os resultados encontrados na análise metabólica. A fração das cascas do caule do extrato de *D. lanceolata* apresentou-se ativa para *Tetranychus tumidus* e *Tetranychus urticae*, embora o maior efeito biocida tenha sido observado para *T. urticae*. Análises por cromatografia gasosa acoplada e espectrometria de massas indicaram que os constituintes majoritários da fração das cascas do caule de *D. lanceolata* são o 2,4,5-trimetoxiestireno e a *trans*-asarona.

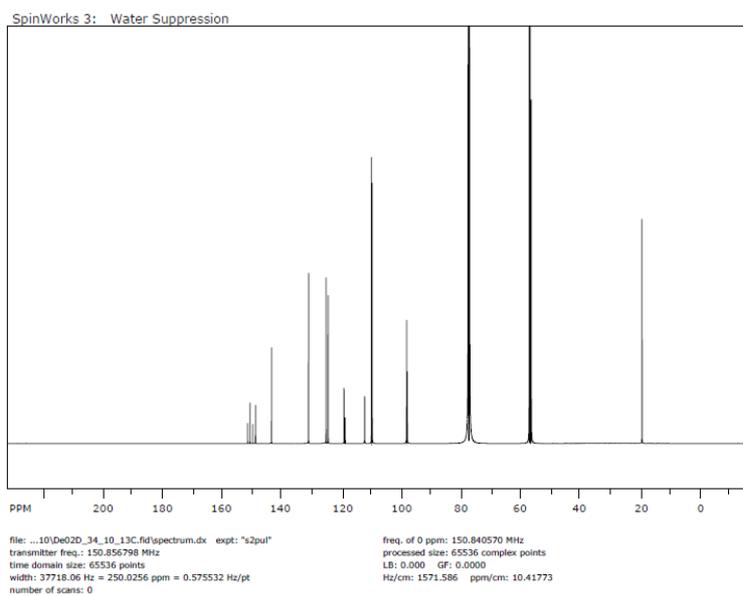
## APÊNDICES

<b>Figura 1S.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de De02D-34-10 (mistura de 2,4,5-trimetoxiestireno e <i>trans</i> -asarona) (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	231
<b>Figura 2S.</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ de De02D-34-10 (mistura de 2,4,5-trimetoxiestireno e <i>trans</i> -asarona) (151,5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	232
<b>Figura3S.</b> Correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ (600 x 151,5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de De02D-34-10 (mistura de 2,4,5-trimetoxiestireno e <i>trans</i> -asarona). .....	233
<b>Figura 4S.</b> Correlação heteronuclear a curta distância (HSQC) $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ (600 x 151,5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de De02D-34-10 (mistura de 2,4,5-trimetoxiestireno e <i>trans</i> -asarona). .....	234
<b>Figura 5S.</b> Correlação homonuclear (COSY) $^1\text{H}$ x $^1\text{H}$ (600 x 600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de De02D-34-10 (mistura de 2,4,5-trimetoxiestireno e <i>trans</i> -asarona).....	235
<b>Figura 6S.</b> Espectro de $^1\text{H}$ da <i>trans</i> -asarona (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	236
<b>Figura 7S.</b> Espectro de $^1\text{H}$ do 2,4,5-trimetoestireno (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	237
<b>Figura 8S.</b> Espectro de $^1\text{H}$ de De02D-63-05 (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	238
<b>Figura 9S.</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ de De02D-63-05 (151,5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	239
<b>Figura 10S.</b> Correlação homonuclear (COSY) $^1\text{H}$ x $^1\text{H}$ (600 x 600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de De02D-63-05.....	240
<b>Figura 11S.</b> Correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ (600 x 151,5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de De02D-63-05.....	241
<b>Figura 12S.</b> Correlação heteronuclear a curta distância (HSQC) $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ (600 x 151,5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de De02D-63-05.....	242
<b>Figura 13S.</b> Espectro de $^1\text{H}$ de De02D-67-07 (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	243
<b>Figura 14S.</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ de De02D-67-07 (151,5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	244

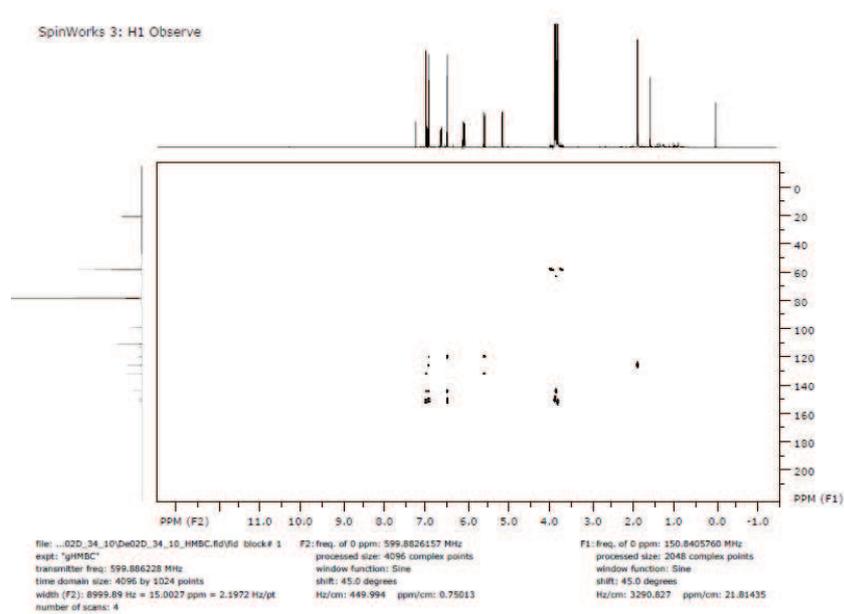
<b>Figura 15S.</b> Correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151,5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de De02D-67-07.....	245
<b>Figura 16S.</b> Correlação heteronuclear a curta distância (HSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151,5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de De02D-67-07.....	246
<b>Figura 17S.</b> Espectro de $^1\text{H}$ de De02D-98-06 (600 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ). .....	247
<b>Figura 18S.</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ de De02D-98-06 (151,5 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ). .....	248
<b>Figura 19S.</b> Correlação heteronuclear a curta distância (HSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151,5 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) de De02D-98-06. ....	249
<b>Figura 20S.</b> Correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151,5 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) de De02D-98-06. ....	250
<b>Figura 21S.</b> Correlação homonuclear (COSY) $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (600 x 600 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) de De02D-98-06. ....	251
<b>Figura 22S.</b> Espectro de $^1\text{H}$ de De02D-144-05 (600 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ). .....	252
<b>Figura 23S.</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ de De02D-144-05 (151,5 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ). .....	253
<b>Figura 24S.</b> Correlação homonuclear (COSY) $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (600 x 600 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) de De02D-144-05. ....	254
<b>Figura 25S.</b> Espectro de $^1\text{H}$ de De02D-144-08 (600 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ). .....	255
<b>Figura 26S.</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ de De02D-144-08 (151,5 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ). .....	256
<b>Figura 27S.</b> Espectro de $^1\text{H}$ de De02D-157-06 (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	257
<b>Figura 28S.</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ de De02D-157-06 (151,5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	258
<b>Figura 29S.</b> Correlação heteronuclear a curta distância (HSQC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151,5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de De02D-157-06.....	259
<b>Figura 30S.</b> Correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151,5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de De02D-157-06.....	260
<b>Figura 31S.</b> Correlação homonuclear (COSY) $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (600 x 600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de De02D-157-06. ....	261



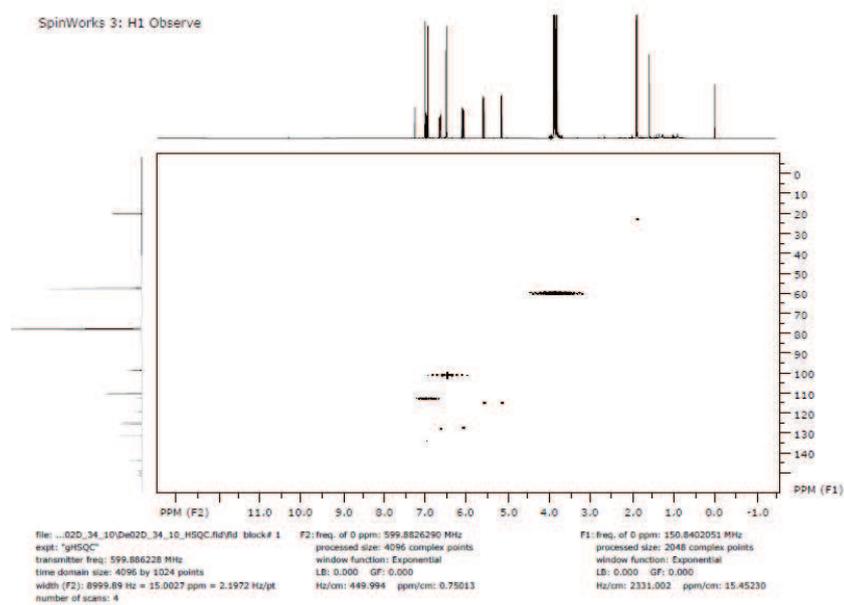
**Figura 1S.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de De02D-34-10 (mistura de 2,4,5-trimetoxiestireno e *trans*-asarona) (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



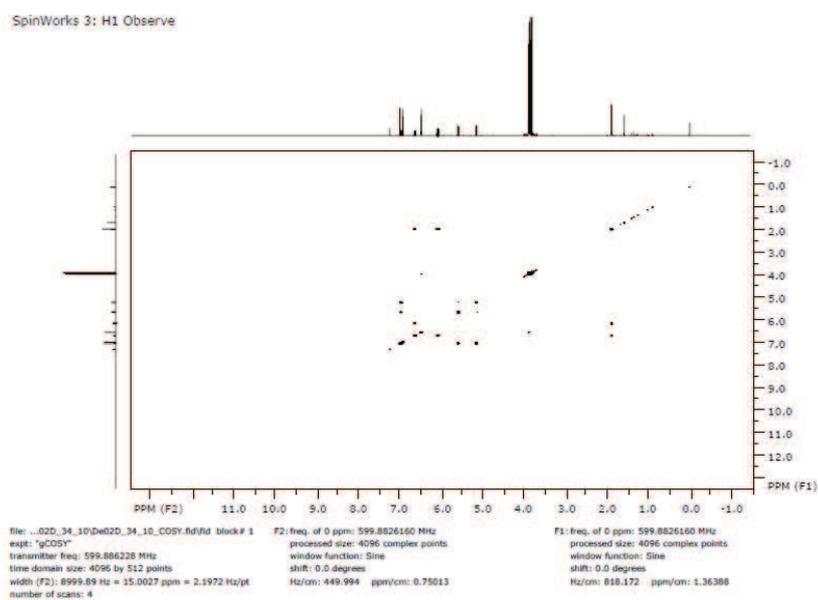
**Figura 2S.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  de De02D-34-10 (mistura de 2,4,5-trimetoxiestireno e *trans*-asarona) (151,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



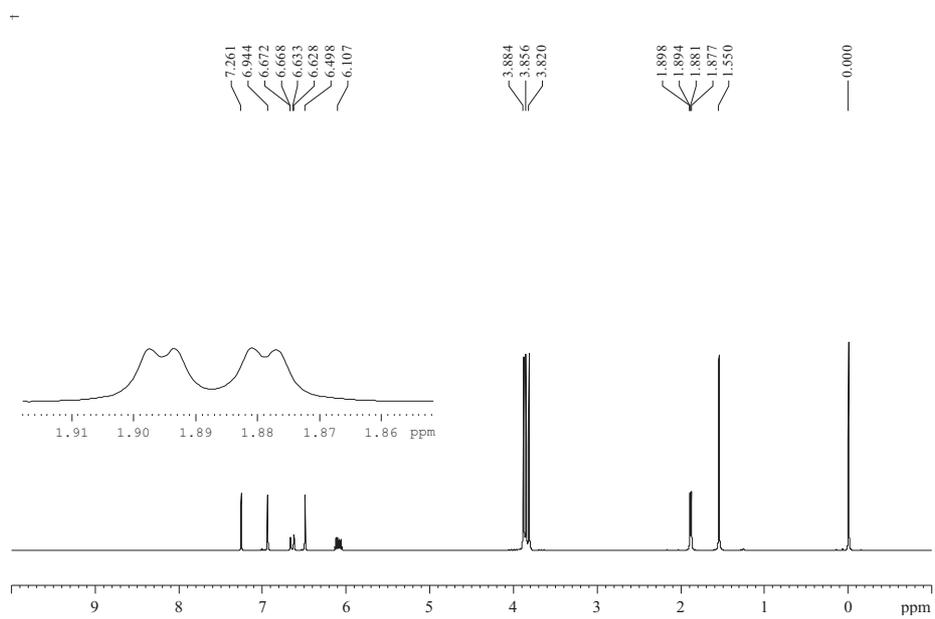
**Figura3S.** Correlação heteronuclear a longa distância (HMBC)  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (600 x 151,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de De02D-34-10 (mistura de 2,4,5-trimetoxiestireno e *trans*-asarona).



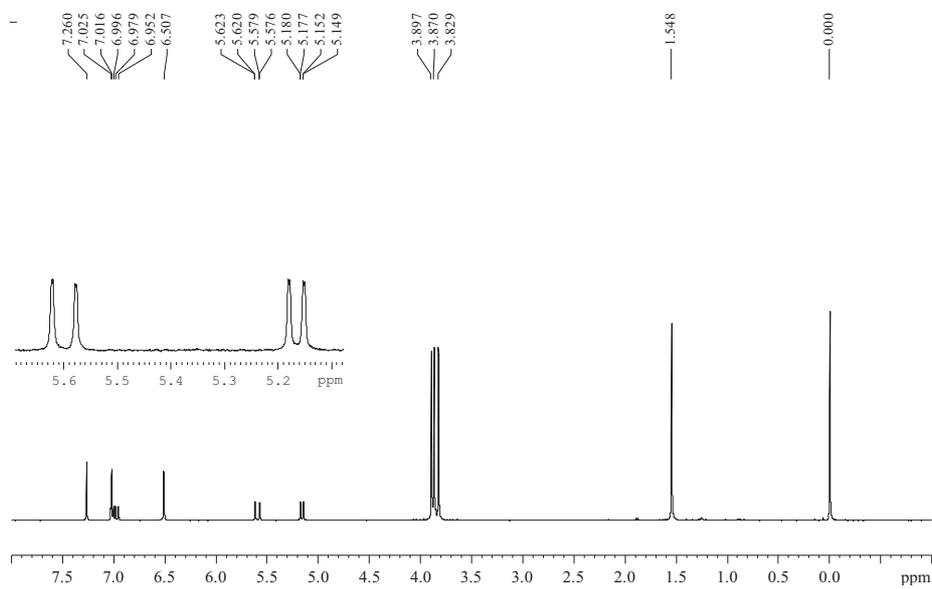
**Figura 4S.** Correlação heteronuclear a curta distância (HSQC)  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (600 x 151,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de De02D-34-10 (mistura de 2,4,5-trimetoxiestireno e *trans*-asarona).



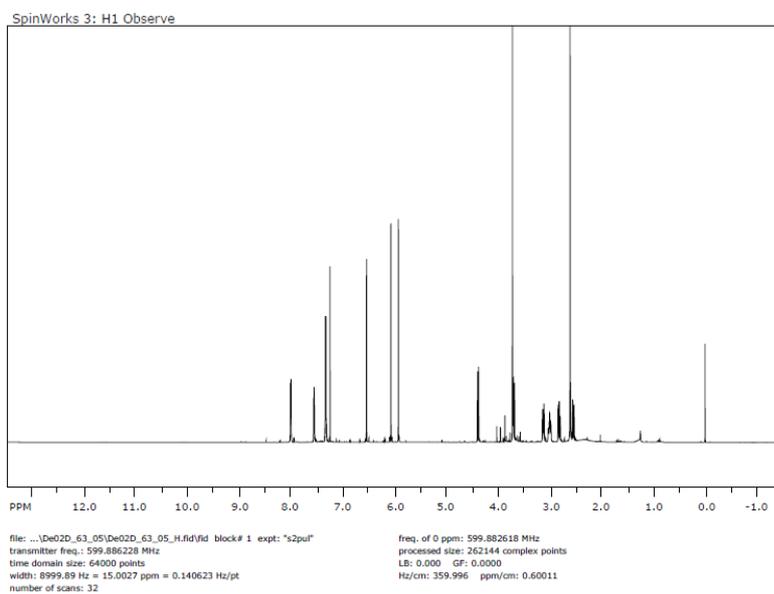
**Figura 5S.** Correlação homonuclear (COSY)  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (600 x 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de De02D-34-10 (mistura de 2,4,5-trimetoxiestireno e *trans*-asarona).



**Figura 6S.** Espectro de  $^1\text{H}$  da *trans*-asarona (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 7S.** Espectro de  $^1\text{H}$  do 2,4,5-trimetoestireno (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 8S.** Espectro de  $^1\text{H}$  de De02D-63-05 (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

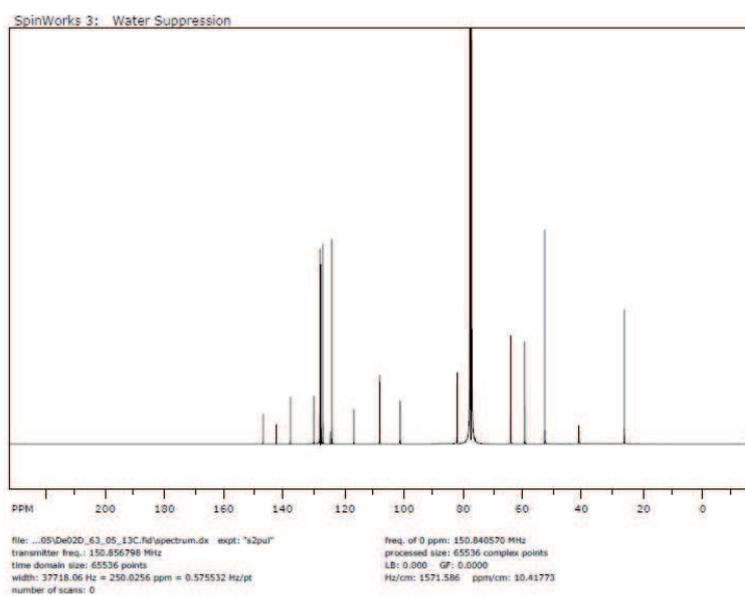
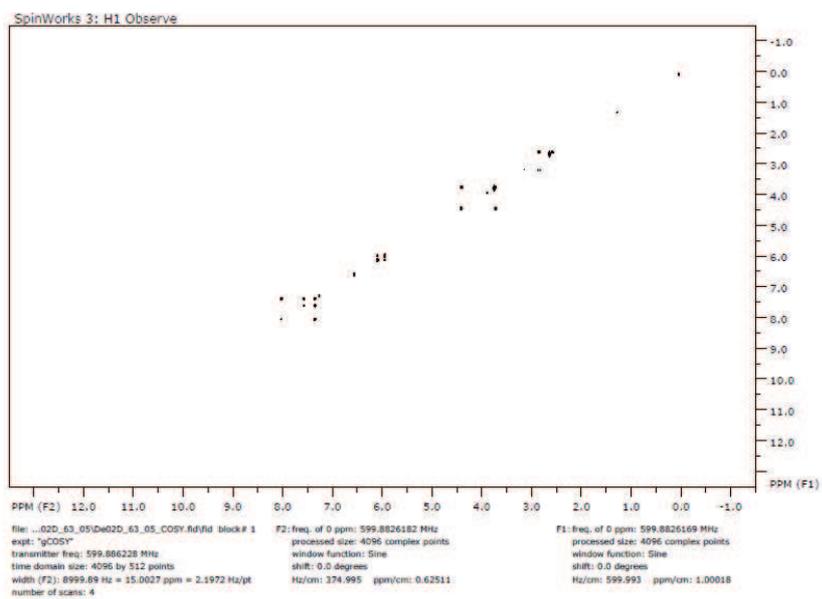
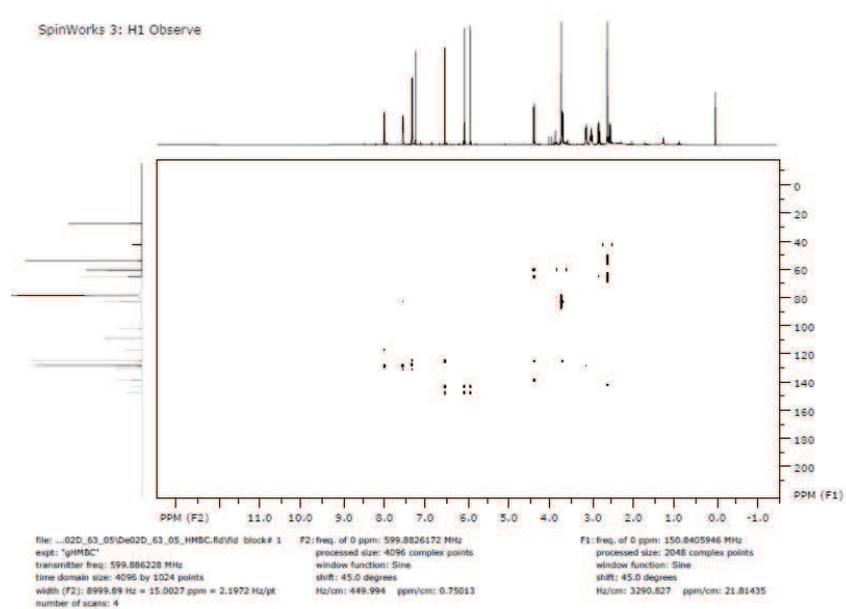


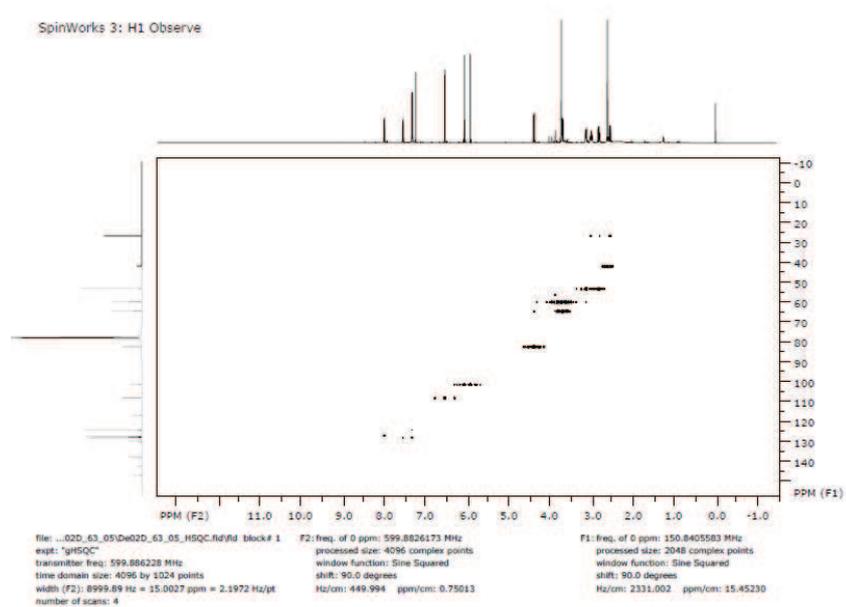
Figura 9S. Espectro de  $^{13}\text{C}$  de De02D-63-05 (151,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 10S.** Correlação homonuclear (COSY)  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (600 x 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de De02D-63-05.



**Figura 11S.** Correlação heteronuclear a longa distância (HMBC)  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (600 x 151,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de De02D-63-05.



**Figura 12S.** Correlação heteronuclear a curta distância (HSQC)  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (600 x 151,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de De02D-63-05.

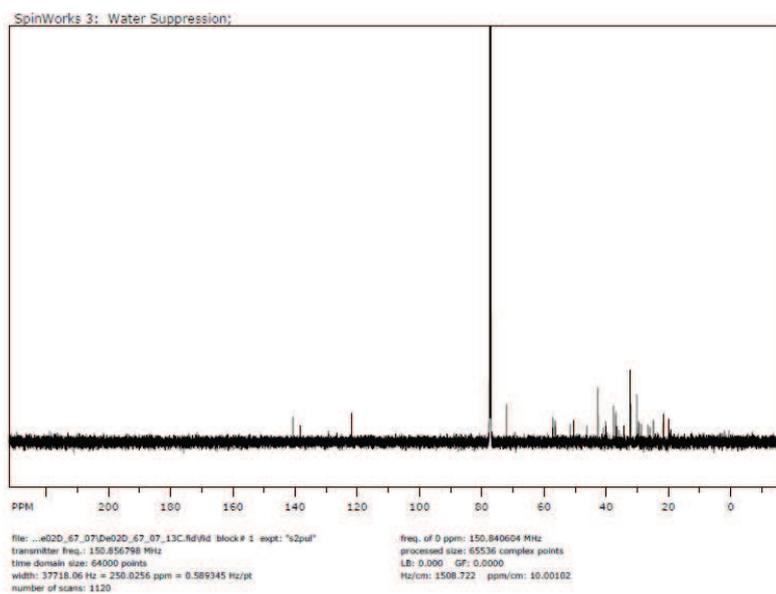


Figura 13S. Espectro de  $^1\text{H}$  de De02D-67-07 (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

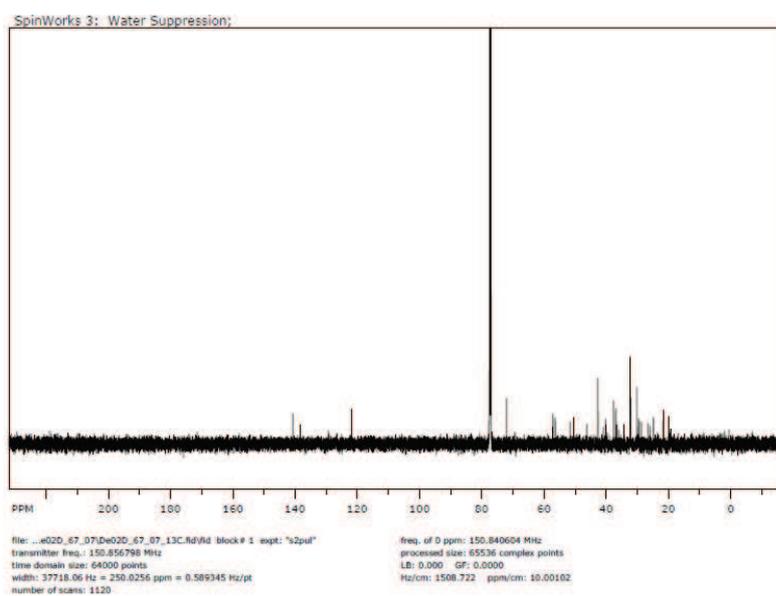
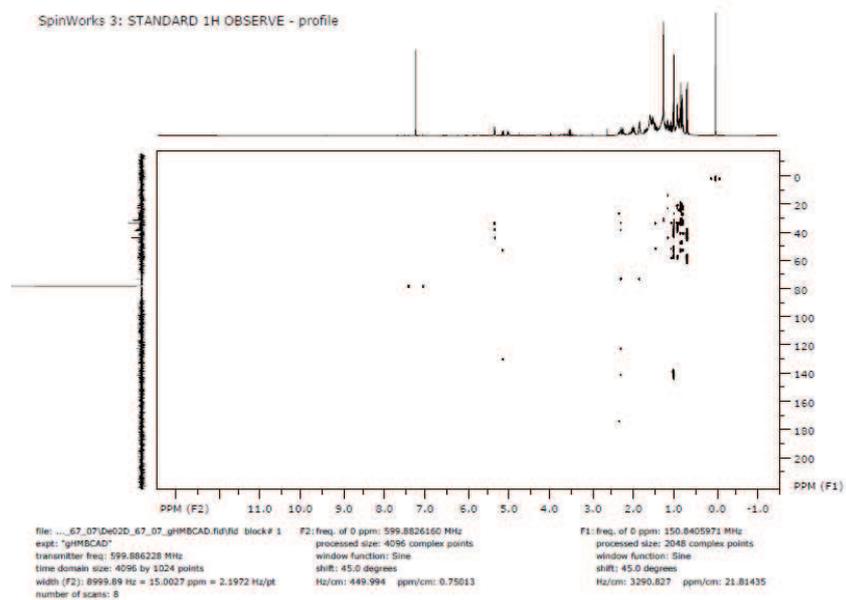
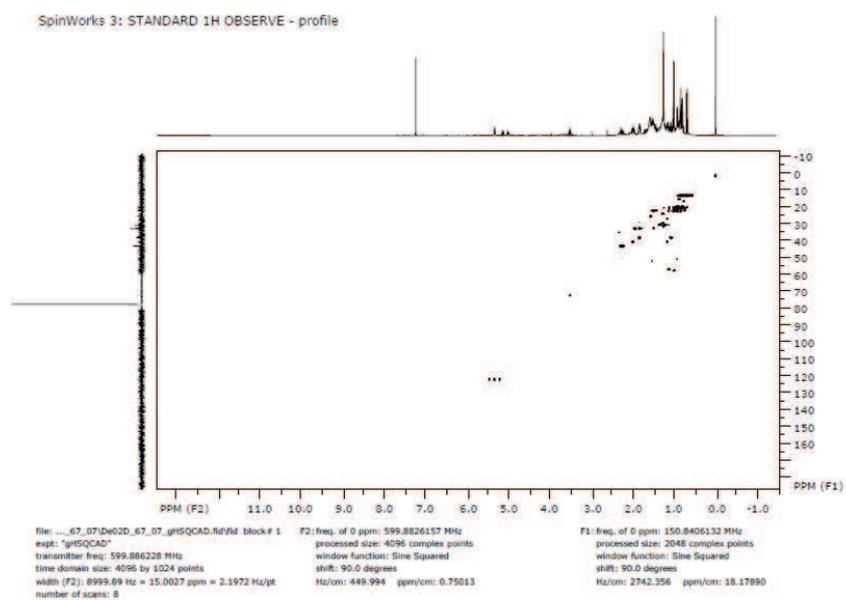


Figura 14S. Espectro de  $^{13}\text{C}$  de De02D-67-07 (151,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 15S.** Correlação heteronuclear a longa distância (HMBC)  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  (600 x 151,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de De02D-67-07.



**Figura 16S.** Correlação heteronuclear a curta distância (HSQC)  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (600 x 151,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de De02D-67-07.

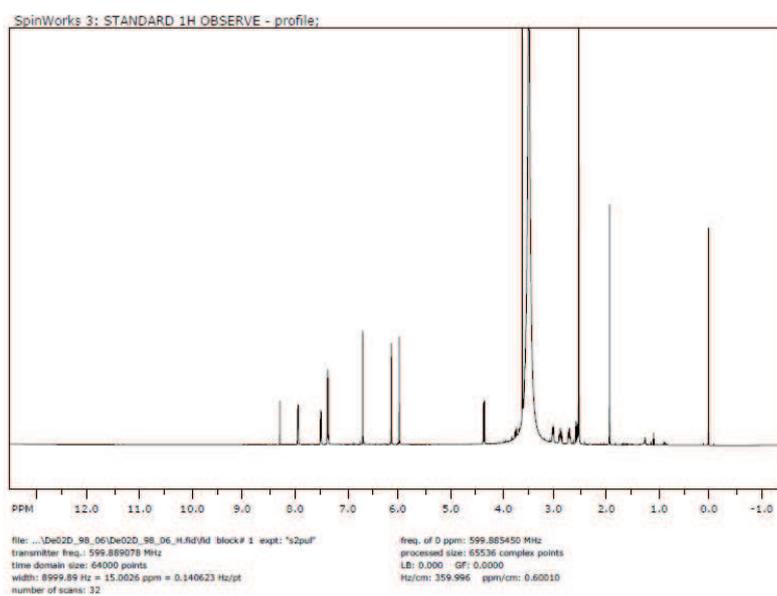


Figura 17S. Espectro de  $^1\text{H}$  de De02D-98-06 (600 MHz, DMSO- $d_6$ ).

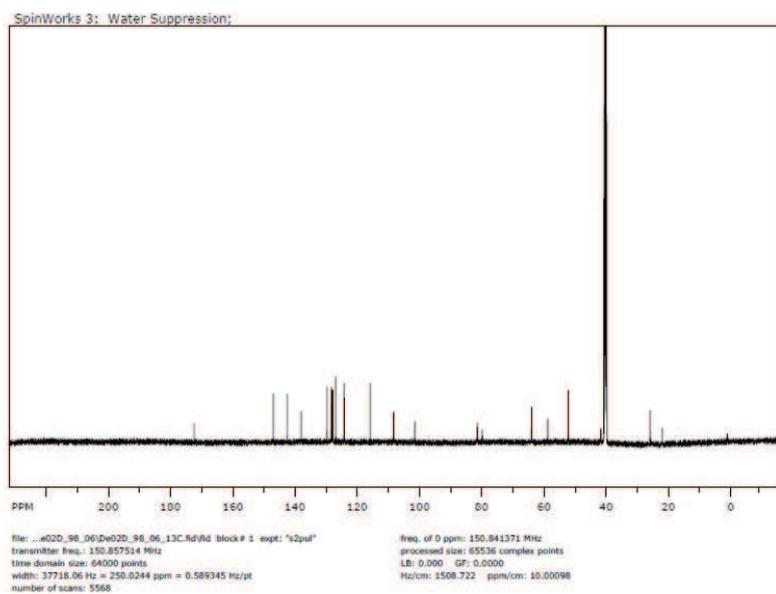
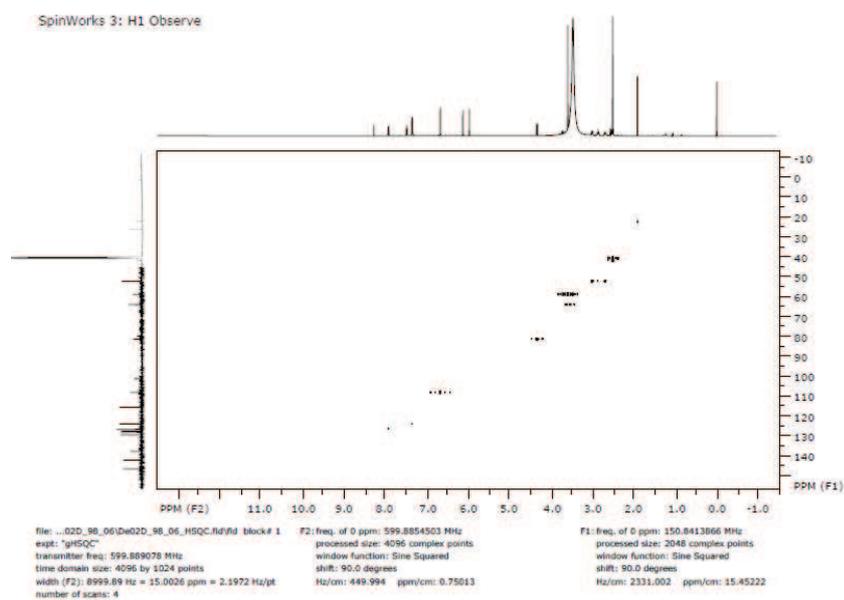
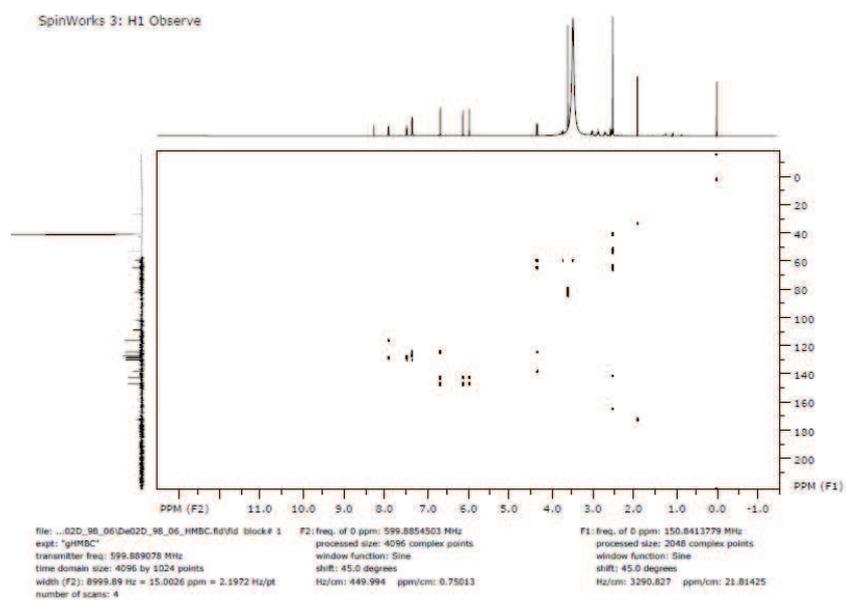


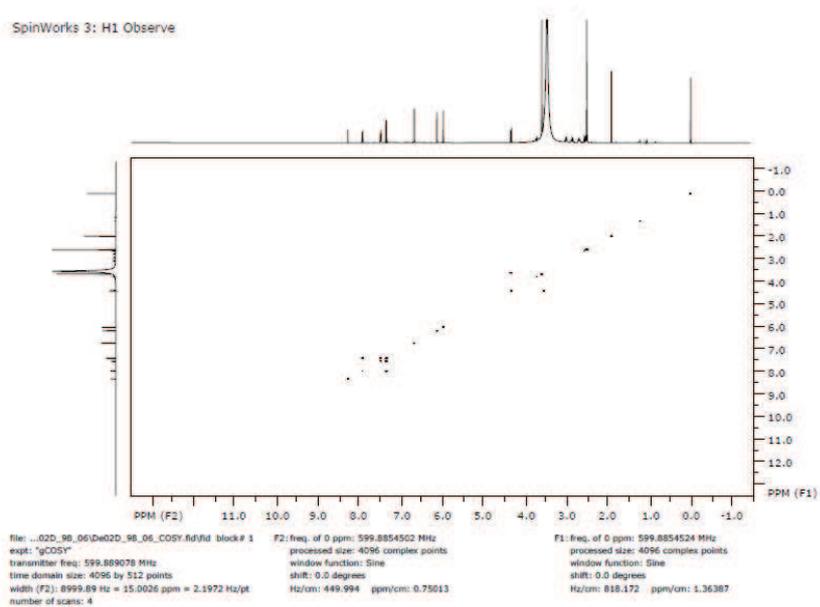
Figura 18S. Espectro de  $^{13}\text{C}$  de De02D-98-06 (151,5 MHz, DMSO- $d_6$ ).



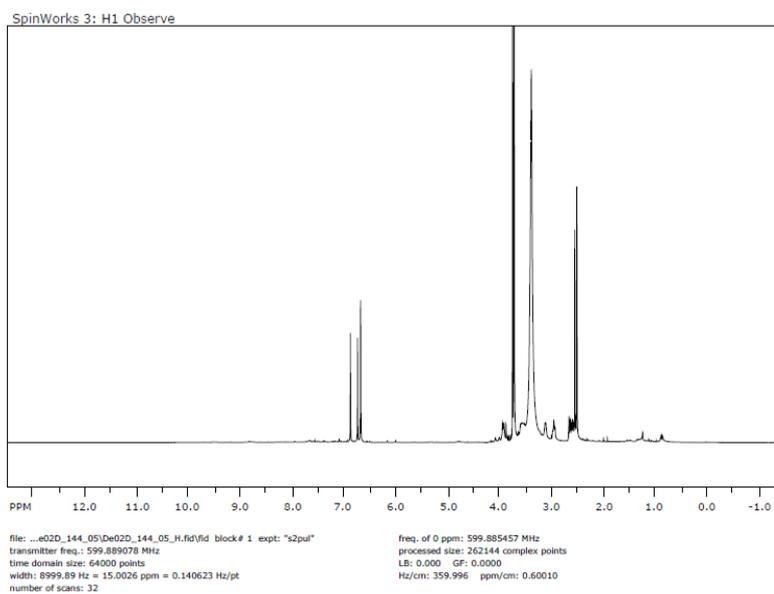
**Figura 19S.** Correlação heteronuclear a curta distância (HSQC)  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (600 x 151,5 MHz, DMSO- $d_6$ ) de De02D-98-06.



**Figura 20S.** Correlação heteronuclear a longa distância (HMBC)  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  (600 x 151,5 MHz, DMSO- $d_6$ ) de De02D-98-06.



**Figura 21S.** Correlação homonuclear (COSY)  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (600 x 600 MHz, DMSO- $d_6$ ) de De02D-98-06.



**Figura 22S.** Espectro de  $^1\text{H}$  de De02D-144-05 (600 MHz, DMSO- $d_6$ ).

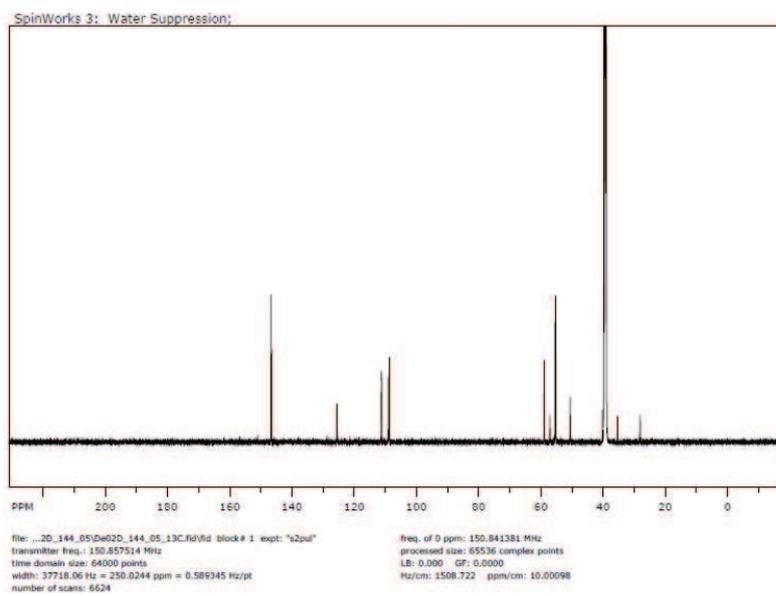
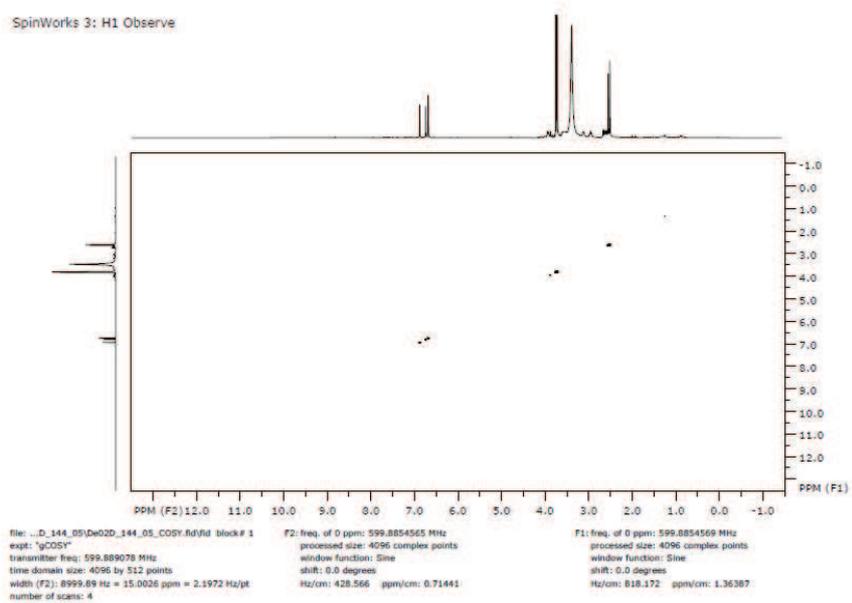
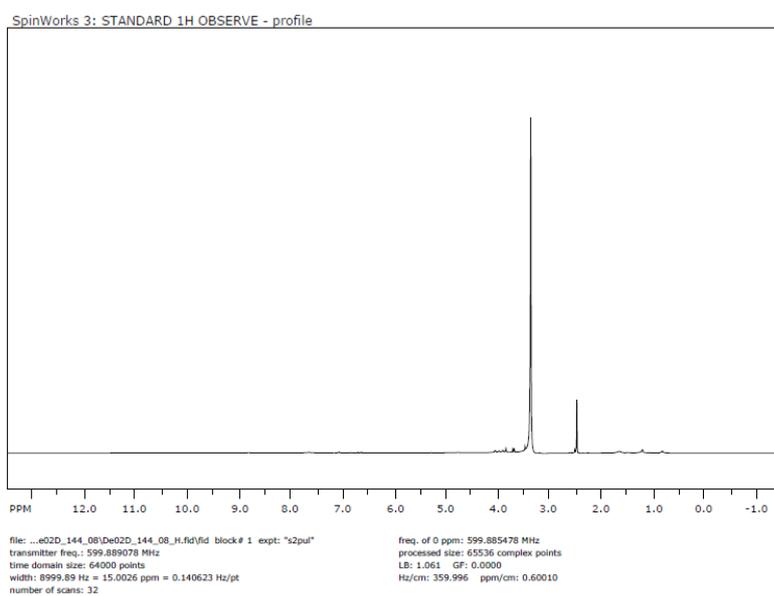


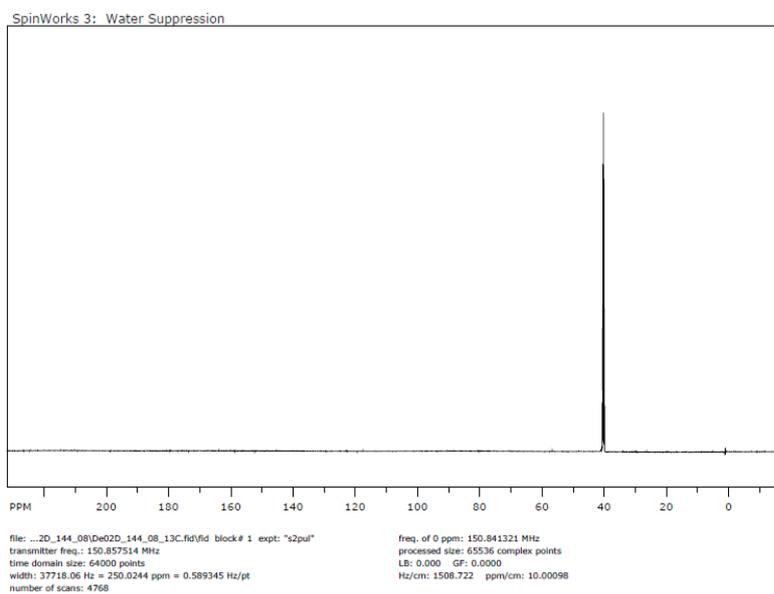
Figura 23S. Espectro de  $^{13}\text{C}$  de De02D-144-05 (151,5 MHz, DMSO- $d_6$ ).



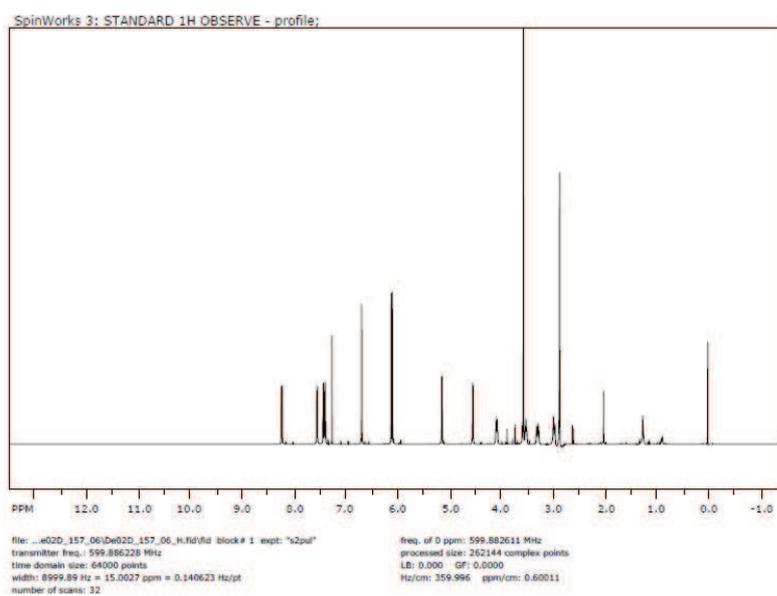
**Figura 24S.** Correlação homonuclear (COSY)  $^1\text{Hx}^1\text{H}$  (600 x 600 MHz, DMSO- $d_6$ ) de De02D-144-05.



**Figura 25S.** Espectro de  $^1\text{H}$  de De02D-144-08 (600 MHz, DMSO- $d_6$ ).



**Figura 26S.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  de De02D-144-08 (151,5 MHz, DMSO- $d_6$ ).



**Figura 27S.** Espectro de  $^1\text{H}$  de De02D-157-06 (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

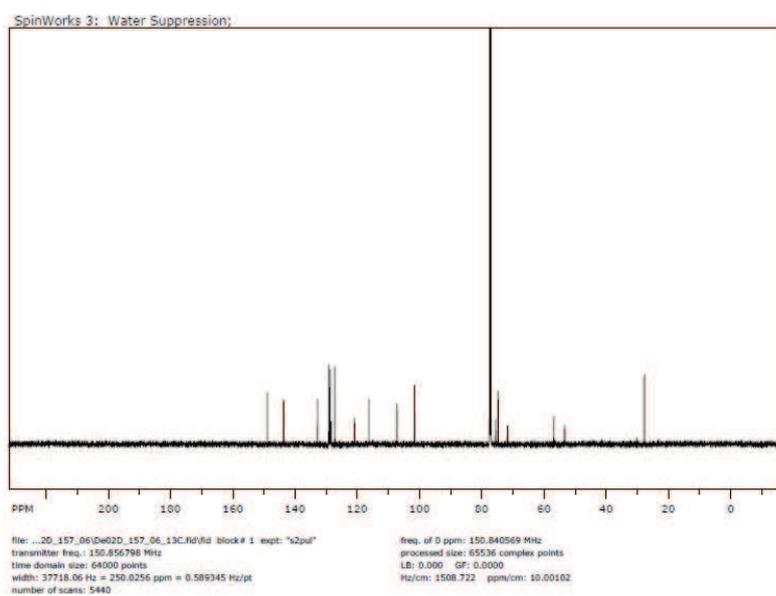
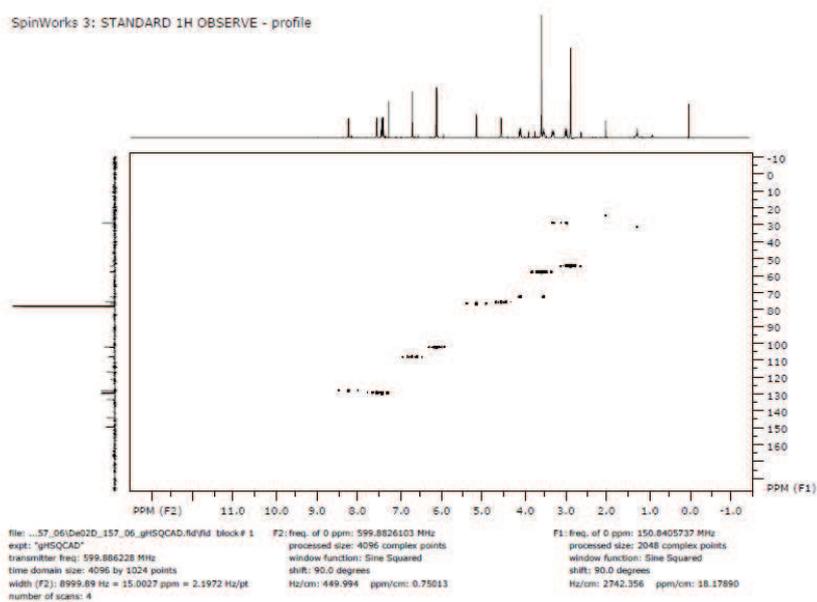
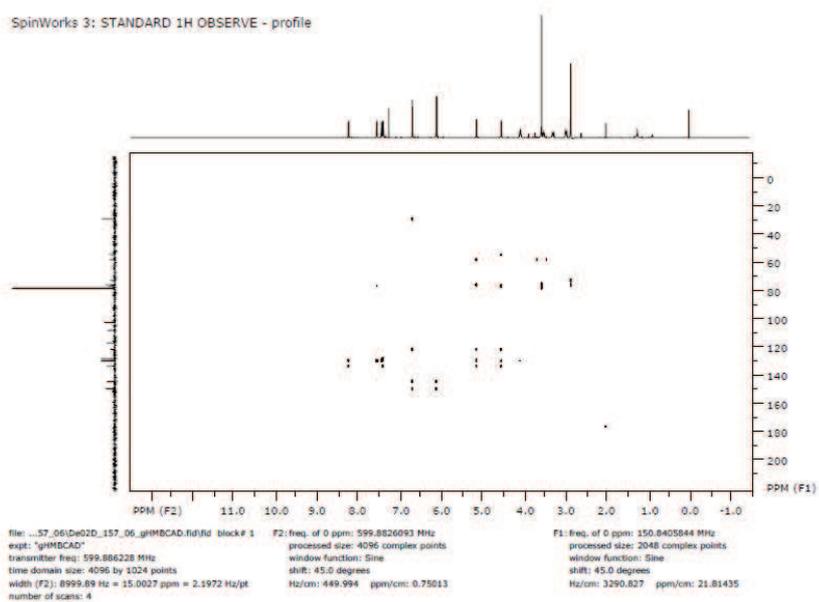


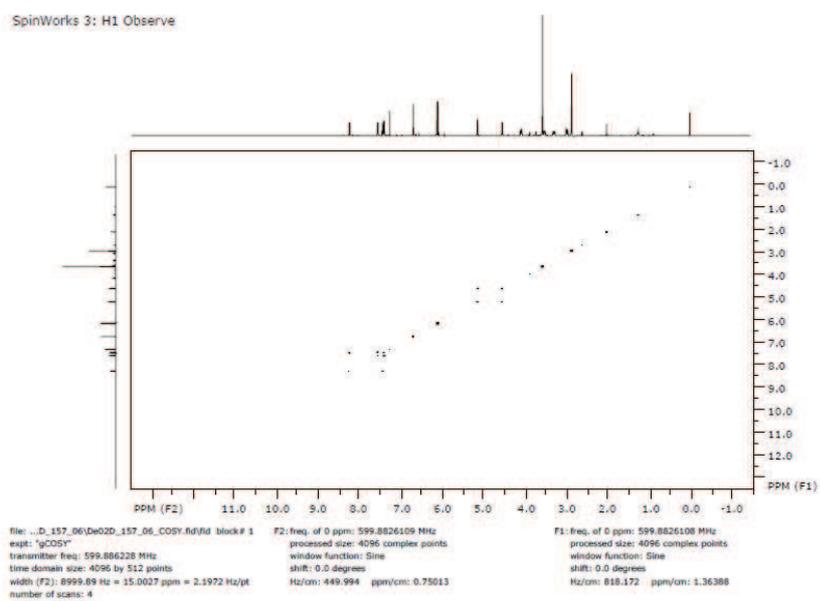
Figura 28S. Espectro de  $^{13}\text{C}$  de De02D-157-06 (151,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 29S.** Correlação heteronuclear a curta distância (HSQC)  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (600 x 151,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de De02D-157-06.



**Figura 30S.** Correlação heteronuclear a longa distância (HMBC)  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (600 x 151,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de De02D-157-06.



**Figura 31S.** Correlação homonuclear (COSY)  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (600 x 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de De02D-157-06.